



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

TÍTULO:

"Efecto de la pioglitazona sobre la funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad y del endotelio, en mujeres premenopáusicas con lupus eritematoso sistémico"

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias

presenta el Alumno:

Juan Gabriel Juárez Rojas

Comité Tutor:

Dr. Carlos Posadas Romero

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Oscar A. Pérez Méndez



México, D.F.

Noviembre de 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

TÍTULO:

“Efecto de la pioglitazona sobre la funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad y del endotelio, en mujeres premenopáusicas con lupus eritematoso sistémico”

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias

presenta el Alumno:

Juan Gabriel Juárez Rojas

Comité Tutor:

Dr. Carlos Posadas Romero

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Oscar A. Pérez Méndez

Jurado de examen para obtención de grado:

Presidente: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Secretario: Dr. Carlos Posadas Romero

Vocal: Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza

Vocal: Dr. Luis Llorente Peters

Vocal: Dr. Eduardo García Zepeda

DEDICATORIAS:

A mi madre[†]:

Por que a pesar de no estar físicamente presente, se que donde quiera que estés siempre pides por mi y me das tu apoyo incondicional para lograr mis metas y mis sueños. Por ti soy lo que soy, por que tu me motivas a luchar y no rendirme jamás. Para mi sigues siendo un ejemplo a seguir, por que fuiste una mujer de valores que camino siempre con la frente en alto. Con tu ejemplo me enseñaste a superarme día a día, gracias por tu amor, apoyo y confianza.

Sin duda alguna, eres y serás por siempre el motor de mi vida, TE AMO MAMA...

A Karen:

Mi hija, mi orgullo, mi alegría y mis ganas de seguir. A ti mi papilla hermosa te dedico todo esto, por que te llevo siempre en mi corazón. No olvides que mientras el cielo exista, siempre estaremos juntos debajo de él, de la luna y de las estrellas.

Te amo hija...

A Isabel y a Paty:

No tengo palabras para agradecerles todo lo que hacen por mí. Gracias a ustedes nunca me he sentido solo y por ustedes es que he llegado hasta aquí. Las quiero mucho por que además, ustedes dos me hacen sentir que mamá sigue aquí. Recuerden que este es un triunfo de los tres.

Las quiero mucho...

A Danny:

Con dedicatoria especial para ti, por el optimismo, las ganas, el valor y la fortaleza que viniste a inyectarme, para que este momento llegara. Con tu sonrisa aprendí que la vida está llena de ilusiones que iluminan el camino de los sueños. Gracias a ti mis sueños hoy se han vuelto a alegrar y gracias a ti, ya no pienso parar.

Eres lo máximo y te adoro pequeña niña hermosa...

AGRADECIMIENTOS:

Si bien es cierto que esta tesis ha requerido de esfuerzo y dedicación, su finalización no hubiese sido posible sin la cooperación de todos y cada uno de los que a continuación citaré.

Gracias a Dios:

Por dejarme conocer y seguir en este mundo lleno de sorpresas, en el que cada uno de nosotros decide su camino.

Gracias al Dr. Carlos Posadas Romero

Por ser más que un tutor, un excelente maestro. Gracias por todas esas tardes de enseñanza, dedicación y paciencia, de las que tanto he aprendido como alumno, como investigador, pero sobre todo, como ser humano. A usted le debo gran parte de mis conocimientos, por que con su inagotable entusiasmo, esta siempre dispuesto a abrir la puerta de su oficina para formar a profesionistas de bien.

Gracias a mi comité tutor:

Dr. Oscar Pérez Méndez y Dr. Jaime Mas Oliva. Quienes con sus atinados consejos hicieron posible la culminación del presente trabajo. Gracias por compartir su tiempo y sus conocimientos; pero sobre todo, gracias por su compromiso.

Gracias al Departamento de Endocrinología:

Por su apoyo para la realización de este trabajo. Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo.

Gracias al jurado de examen de grado:

Por el tiempo y la dedicación para enriquecer el presente trabajo de tesis.

Gracias a la UNAM:

Por mantener abiertas las puertas del conocimiento para todo aquel que tiene ganas.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que se escapan de mi memoria y sin esperar nada a cambio, compartieron pláticas, conocimientos y diversión. A todos aquellos que durante los cinco años que duró este sueño, lograron convertirlo en realidad...

REFLEXIÓN:

Indiscutiblemente, el nuestro, es un mundo de retos en el que aquel que los enfrenta se sumerge en un tobogán de emociones de todo tipo. Lo realmente maravilloso, es que después de cada reto, siempre terminas en un lugar más alto. Recordemos lo que escribió Dante Alighieri a principios del siglo XIV, en su primer canto al “Infierno” del poema épico “Divina Comedia”:

A mitad del camino de la vida,
en una selva oscura me encontraba
porque mi ruta había extraviado.

¡Cuán dura cosa es decir cuál era
esta salvaje selva, áspera y fuerte
que me vuelve el temor al pensamiento!

Es tan amarga casi cual la muerte;
mas por tratar del bien que allí encontré,
de otras cosas diré que me ocurrieron.

Yo no sé repetir cómo entré en ella
pues tan dormido me hallaba en el punto
que abandoné la senda verdadera.

Mas cuando hube llegado al pie de un monte,
allí donde aquel valle terminaba
que el corazón habíame aterrado,
hacia lo alto miré, y vi que en su cima
ya vestían los rayos del planeta
que lleva recto por cualquier camino.

A pesar de tener los caminos trazados, en el pentagrama de la vida nada está escrito y nosotros mismos decidimos la nota que queremos seguir.

Disfrutemos la maravilla de vivir en armonía...

INDICE:

1. Resumen (español).....	9
2. Resumen (inglés).....	10
3. Introducción.....	11
3.1 Lupus Eritematoso Sistémico.....	11
3.2 LES y Enfermedad Arterial Coronaria.....	14
3.3 Factores de Riesgo Cardiovascular en LES.....	17
3.3a Inflamación.....	17
3.3b Resistencia a la insulina.....	20
3.3c Alteraciones lipídicas.....	21
3.3d Disfunción endotelial.....	25
3.4 Evaluación de la función endotelial.....	26
3.5 Tomografía por emisión de positrones (PET).....	28
3.6 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas.....	29
4. Planteamiento del problema.....	32
5. Hipótesis.....	33
6. Objetivos.....	34
6.1 Objetivo General.....	34
6.2 Objetivos Específicos.....	34
7. Material y Métodos.....	35
7.1 Pacientes.....	35
7.2 Calculo del tamaño de la muestra.....	36
7.3 Protocolo de estudio.....	37
7.4 Métodos de laboratorio.....	39

7.5 Función Endotelial.....	40
7.6 Distribución de subclases de HDL.....	41
7.7 Composición de HDL.....	43
7.8 Análisis estadístico.....	43
8. Resultados.....	45
9. Discusión.....	51
10. Conclusiones.....	56
11. Perspectivas.....	56
12. Anexo 1 (Artículo primero).....	57
13. Anexo 2 (Artículo segundo).....	64
14. Anexo 3 (Carta de aceptación, artículo tercero).....	69
15. Anexo 4 (Galeras, artículo tercero).....	70
16. Glosario de términos.....	79
17. Bibliografía.....	81

1. RESUMEN (Español):

Los avances en el tratamiento y en el diagnóstico temprano de pacientes con lupus eritematoso sistémico durante las últimas décadas, han generado que este tipo de pacientes tengan un mejor pronóstico respecto a las complicaciones propias de la enfermedad. En la actualidad, la aterosclerosis acelerada es una de las principales causas de morbimortalidad en pacientes con lupus y aunque comparados con la población general, los pacientes con lupus presentan prevalencias más altas de factores de riesgo tradicionales, éstos no explican por completo el riesgo incrementado de aterosclerosis. La inflamación, la resistencia a la insulina, las alteraciones lipídicas y la disfunción endotelial son algunos de los factores de riesgo cardiovascular que podrían explicar la aterosclerosis acelerada observada en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

La pioglitazona tiene el potencial de modificar favorablemente el elevado riesgo cardiovascular observado en las pacientes jóvenes con lupus. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la pioglitazona sobre la insulina plasmática, algunos marcadores de inflamación, el perfil de lípidos, las características lipoprotéicas y la función vascular en mujeres jóvenes con lupus eritematoso sistémico.

El presente estudio, de tipo prospectivo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, mostró que la pioglitazona (30 mg/día durante doce semanas) produce cambios con potencial importancia clínica en las concentraciones de insulina, proteína C reactiva y amiloide sérico A en plasma, así como cambios en la distribución de subclases de las lipoproteínas de alta densidad y mejoría en la función endotelial de las arterias coronarias de pacientes con lupus sin complicaciones. Nuestros hallazgos sugieren que este fármaco pudiera ser de utilidad en la prevención de la enfermedad cardiovascular acelerada que se ha observado en pacientes jóvenes con lupus eritematoso sistémico.

2. RESUMEN (Inglés):

The advancement in both, the treatment and early diagnosis of patients with systemic lupus erythemathosus during the last decades, has resulted in the improvement of the disease. As a consequence, the accelerated atherosclerosis is the main cause of morbidity and mortality in these patients.

Compared with the general population, patients with lupus show higher prevalences of traditional risk factors, which do not completely explain the increased risk of atherosclerosis. Inflammation, insulin resistance, lipid alterations and endothelial dysfunction are some of the cardiovascular risk factors that would explain the accelerated atherosclerosis observed in patients with lupus.

Pioglitazone has the potential to favorably modify the high cardiovascular risk observed in young patients with lupus. The aim of this study was to evaluate the effect of pioglitazone on insulin plasma levels, some inflammation markers, the lipid profile, lipoprotein characteristics and vascular function in women with systemic lupus erythemathosus.

This prospective, randomized, double blind, placebo controled trial showed that pioglitazone (30 mg/day during 12 weeks), resulted in favorable changes in insulin, C reactive protein and serum amiloid A plasma concentrations, as well as changes in the distribution of high density lipoprotein of patients with systemic lupus erythemathosus. Our findings suggest that this drug could be useful in the prevention of accelerated cardiovascular disease observed in some young patients with systemic lupus erythemathosus.

3. INTRODUCCIÓN:

3.1 Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad crónica, autoinmune y de etiología desconocida. Esta enfermedad es relativamente poco frecuente, con una prevalencia de 122 casos por cada 100,000 habitantes y una incidencia de 1.5 casos por 100,000 habitantes. El 90% de las pacientes son mujeres jóvenes en edad fértil, pero esta preponderancia disminuye si la enfermedad se presenta en edad infantil o a partir de los 65 años; situaciones en las que niños y hombres también son afectados. El LES tiene un curso clínico caracterizado por episodios de actividad y remisión. La activación de la enfermedad es extremadamente variable e incluye síntomas leves con afección a cualquier órgano, pudiendo aparecer posteriormente con manifestaciones adicionales o bien, iniciar con formas graves multisistémicas y fulminantes.^{1, 2}

El diagnóstico de LES se establece con base en las manifestaciones clínicas y pruebas de laboratorio. Los criterios para el diagnóstico fueron definidos en 1971, por la Asociación Americana de Reumatología pero debido a su baja especificidad y sensibilidad, esos criterios fueron revisados y mejorados en 1982 y posteriormente en 1997, por el Colegio Americano de Reumatología, alcanzando una especificidad y sensibilidad del 96%.³ Para el diagnóstico de LES se requiere la presencia de 4 de 11 criterios establecidos (Tabla 1).

Para la evaluación de la actividad de la enfermedad existen diferentes índices que se han desarrollado y validado como el SLEDAI (systemic lupus eritematosus disease activity index), el SLAM (systemic lupus activity measure), el ECLAM (european community lupus activity measure), el BILAG (British Isles Lupus Activity Group) y el MEX-SLEDAI en México (índice modificado de la actividad de la enfermedad de lupus eritematoso

sistémico mexicano).⁴⁻⁸ Además de la evaluación de la actividad de la enfermedad, el daño acumulado en los órganos de los pacientes puede ser evaluado con el índice de daño orgánico o de cronicidad del Colegio Americano de Reumatología, que se realizó en colaboración con Clínicas Internacionales (SLICC/ACR-DI).⁹

Tabla 1. Criterios establecidos para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico

Criterio	Definición
Eritema Malar	Ronchas en la mejillas
Eritema Discoide	Ronchas en placas levantadas
Fotosensibilidad	Reacción a la luz solar produciendo un aumento del eritema en la piel
Úlceras Orales	Úlceras en la nariz o boca, habitualmente indoloras
Artritis	Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas (artritis en donde el hueso cercano a la articulación no llega a destruirse)
Serositis	Pleuritis o pericarditis (inflamación de la capa que envuelve el corazón o pulmón)
Afección renal	Exceso de proteínas en la orina (mayor de 0.5 gramos al día, o 3+ en las tiras diagnósticas de laboratorio) y/o cilindros celulares (elementos anormales que se forman de glóbulos rojos o blancos y/o células en el túbulo renal)
Afección Neurológica	Convulsiones y/o psicosis en ausencia de medicamentos o trastornos neurológicos, los cuales pueden producir estas manifestaciones.
Afección Hematológica	Anemia hemolítica o leucopenia (glóbulos blancos por debajo de 4,000 células por milímetro cúbico) o linfopenia (menos de 1,500 linfocitos por milímetro cúbico o trombocitopenia (menos de 100,000 plaquetas por milímetro cúbico). La leucopenia y linfopenia se deben detectar en dos o más ocasiones. La trombocitopenia se debe detectar en ausencia de medicamentos que pueden producir esta disminución.
Anticuerpos Antinucleares	Prueba positiva para los anticuerpos antinucleares (ANA) en ausencia de las drogas que inducen positividad.
Afección Inmunológica	Examen de laboratorio positivo para anti ADN de doble cadena, anti Sm positivo, o falsas positivas para la sífilis (VDRL).

Aunque la etiología y la patogenia del LES se desconoce en la actualidad, es bien sabido que factores genéticos, hormonales y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de esta entidad, que se caracteriza por daño tisular y celular, así como por la presencia de múltiples manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de autoanticuerpos. Es muy probable que diferentes agentes patogénicos y etiológicos

intervengan en diferentes pacientes, lo que explicaría la heterogeneidad clínica y de laboratorio que se observa en la población afectada.

El LES es una de las enfermedades reumáticas con mayor mortalidad, alcanzando un 14.5% de muertes y representando hasta 44% de las muertes por enfermedad reumática en las personas con menos de 45 años (datos no publicados del Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de la Salud [CDC]). La supervivencia de pacientes con LES ha aumentado en las últimas décadas, gracias a la información valiosa generada por las pruebas clínicas y serológicas que permiten identificar las etapas de reactivación de la enfermedad ⁴⁻⁸ y a los avances terapéuticos que incluyen el uso de corticoesteroides, antimaláricos y aspirina, como fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para su tratamiento. ⁸ Los primeros estudios en 1955 informaron que la supervivencia de los pacientes con LES a 5 años era inferior al 50%; ¹⁰ mientras que en la actualidad se ha incrementado a cerca del 90% a 10 años y a 70% a 20 años. ^{11, 12}

El aumento en la sobrevida de los pacientes con LES ha generado una mayor incidencia de complicaciones crónicas, así como daños permanentes secundarios a los efectos de la enfermedad misma y/o de su tratamiento. En el año de 1976, Urowitz y cols. ¹³ describieron el patrón de mortalidad bimodal en pacientes con LES, con base en la observación de pacientes fallecidos por actividad de LES o sépsis y pacientes fallecidos por infarto agudo del miocardio. Posteriormente, otros estudios han confirmado este patrón bimodal de mortalidad por LES, y el análisis de la sobrevida ha mostrado que las principales causas de muerte tardía en pacientes con LES, se reportan entre aquellos pacientes con inactividad de la enfermedad, observándose una notable incidencia de infartos miocárdicos causados por enfermedad cardiovascular. ¹⁴

3.2 LES y Enfermedad Arterial Coronaria

En la actualidad, la aterosclerosis acelerada es una de las principales causas de morbimortalidad en pacientes con LES. El riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC) en los pacientes con LES es de 5 a 10 veces mayor que lo observado en población general.^{15, 16} Manzi y cols.¹⁵ encontraron que las mujeres entre 14 y 44 años de edad con LES tenían 50 veces más riesgo de presentar un infarto agudo del miocardio que las mujeres sanas. Por otro lado, Bruce y cols.¹⁷ en un estudio de seguimiento de 12.4 años, observaron que 13.4% de los pacientes con LES desarrollaron un evento coronario agudo. Además, Esdaile y cols.¹⁸ en dos cohortes retrospectivas de pacientes con LES, encontraron que después de un seguimiento de 8.6 años, el 12.9% de los pacientes desarrolló enfermedad coronaria aguda. Estas observaciones sugieren que la aterosclerosis en los pacientes con LES es más prevalente y prematura que en la población general.

Existen estudios de autopsia que evidencian que la patogénesis de la enfermedad cardiovascular en el LES es de origen aterosclerótico.¹⁹ Por décadas, la aterosclerosis se consideró como una enfermedad causada por exceso de colesterol. Sin embargo, múltiples evidencias acumuladas en los últimos años, sugieren que el proceso de la enfermedad aterosclerótica en la pared arterial es consecuencia de la interrelación de numerosas vías y procesos que interactúan entre sí.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio activo mediado por una respuesta inmune; por lo que la inflamación crónica y la alteración del sistema inmune que son características del lupus, indudablemente contribuyen al proceso acelerado de esta enfermedad.²⁰ La respuesta inflamatoria e inmune de la aterosclerosis es generada por la adhesión de leucocitos al endotelio vascular, promoviendo la síntesis y expresión de factor tisular, factor VII, sitios de unión de alta afinidad para fibrinógeno, y citocinas como

la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La adhesión de los leucocitos es seguida por su migración hacia el subendotelio (la cual es inducida por la proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 [MCP-1]) y su diferenciación a macrófagos, aparentemente causada por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas que comienzan a acumularse en el subendotelio y por el mismo incremento en la producción de citocinas como la IL-6 y el TNF- α . La manifestación morfológica primaria de las lesiones aterosclerosas es la “estría grasa”; la cual está dada por el cúmulo de lípidos en los macrófagos, ubicados en el espacio subendotelial. El incremento de la respuesta proinflamatoria, posteriormente estimula la proliferación y migración vascular de las células del músculo liso, que se infiltran al área inflamada favoreciendo su crecimiento. La inflamación continua y la posterior formación de tejido fibroso lleva a la progresión y engrosamiento de las estrías grasas, originando las lesiones aterosclerosas avanzadas con centros lipídicos, necróticos y algunas veces, material calcificado.^{21, 22}

El peligro y las consecuencias potencialmente letales de la aterosclerosis son la desestabilización de las placas avanzadas, que podrían culminar con la ruptura de la superficie de la placa y originar una trombosis luminal. La ruptura de la placa con la trombosis como consecuencia, es una de las más frecuentes manifestaciones anatomopatológicas de los síndromes coronarios agudos como la angina inestable, el infarto agudo del miocardio y la muerte coronaria (Figura 1).

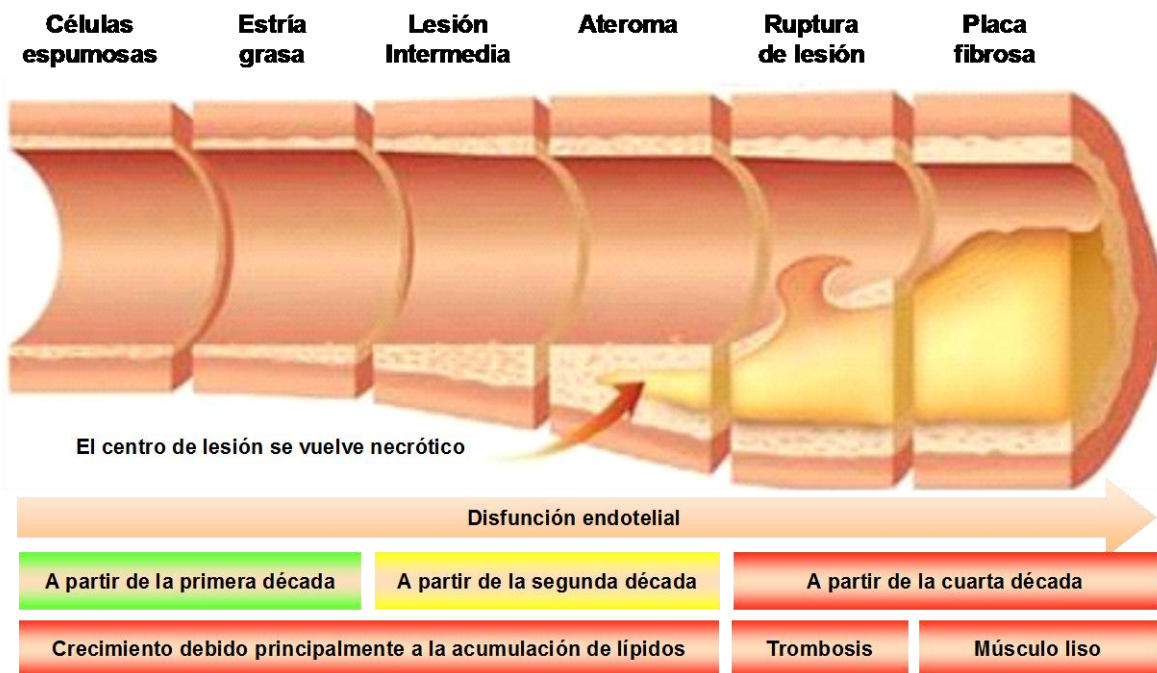


Figura 1. Aterogénesis. El cúmulo de células espumosas originadas por el paso de los monocitos hacia el subendotelio que, convertidos a macrófagos fagocitan a las lipoproteínas de baja densidad, crean la estría grasa y desplazan al subendotelio hacia el exterior, formando una lesión intermedia y posteriormente el ateroma, que se caracteriza por el alto contenido lipídico en su centro y por la invasión de la luz vascular. El ateroma puede romperse y generar un trombo capaz de ocluir total o parcialmente la luz vascular y /o dar origen a una placa fibrosa. Imagen modificada de: http://www.cardiologos.mx/Cardiologia_Clinica_e_Intervencionista/Aterosclerosis.html

Las células endoteliales que delimitan la luz vascular juegan un papel importante en el balance homeostático. Ross ²³ en 1993 propuso que el daño endotelial podría ser un evento inicial en el proceso de la aterogénesis ya que las células de este órgano, además de estar involucradas en los procesos proaterogénicos, como la vasoconstricción, agregación plaquetaria, adhesión leucocitaria, trombogénesis y proliferación de las células del músculo liso vascular, también tienen efectos antiaterogénicos como la vasorelajación, fibrinólisis, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de leucocitos. ²⁴⁻²⁶ En los estados de disfunción endotelial existe un desbalance entre los factores antiaterogénicos y los proaterogénicos,

que en las etapas más tempranas se puede evaluar de varias formas como se mencionará más adelante.

3.3 Factores de Riesgo Cardiovascular en LES

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de las arterias, asociada con varios factores de riesgo que promueven alteraciones lipídicas, desarrollo y progresión de lesiones ateroscleróticas, ruptura de placas y trombosis vascular.²⁷ Como se mencionó previamente, la aterosclerosis se incrementa en enfermedades autoinmunes, y algunas investigaciones no invasivas han mostrado incremento en el grosor de la íntima media, placa carótida y calcificación de arterias coronarias en pacientes con LES, comparados con controles sanos.²⁸

En la actualidad, las razones para el proceso acelerado de aterosclerosis en pacientes con LES no son claras y aunque factores de riesgo tradicionales como las dislipidemias, tabaquismo, obesidad, hipertensión, diabetes mellitus y sedentarismo, son más prevalentes en estos pacientes cuando se comparan con la población general, éstos no explican por completo el riesgo incrementado de aterosclerosis.²⁹ La inflamación, la resistencia a la insulina, las alteraciones lipídicas y la disfunción endotelial son algunos de los factores de riesgo cardiovascular que se han evaluado en los últimos años como posibles causas de su aterosclerosis acelerada. Independientemente de los factores de riesgo tradicionales, las evidencias recientes sugieren que el sistema inmune juega un papel dominante en la progresión de la aterosclerosis en pacientes con lupus.

3.3a Inflamación

En la respuesta vascular inflamatoria existen interacciones complejas entre células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos), células endoteliales,

células del músculo liso vascular y la matriz extracelular. Además, el daño vascular se ha encontrado asociado con la expresión incrementada de moléculas de adhesión en las células endoteliales y con el reclutamiento de células inflamatorias, factores de crecimiento y citocinas, que muestran efectos directos sobre las mismas células endoteliales, células del músculo liso vascular y la matriz extracelular.

En pacientes con LES, diversas citocinas como el TNF- α , el factor de necrosis κ B (NF- κ B) y las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6), han sido implicadas en la regulación de la actividad de la enfermedad y en la afección de los diferentes órganos.³⁰ Por lo que la clasificación de las citocinas, de acuerdo a la forma en que ellas regulan a la alta o a la baja la respuesta inflamatoria, pudiera ser de utilidad en este tipo de enfermedades, en las que el balance entre las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, determina el grado y la extensión de la inflamación, así como las consecuencias clínicas.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria en la que se pueden encontrar grandes cantidades de células inmunes como los macrófagos y los linfocitos T. La activación de dichas células favorece una cascada de síntesis de citocinas, que inducen un estado inflamatorio en el que los monocitos y los linfocitos T son reclutados al espacio subendotelial, a través de un endotelio que expresa cantidades elevadas de moléculas de adhesión vascular e intercelular. La elevada concentración de estas moléculas de adhesión es favorecida por el NF- κ B; el cual es incrementado por la activación de los receptores de tipo toll (TLRs), que se encuentran en los macrófagos.³¹ Estudios previos han mostrado que los fosfolípidos oxidados presentes en las LDL pueden activar a los TLRs de los macrófagos y promover la síntesis de quimiocinas como la MCP-1. La MCP-1, con capacidad de promover el reclutamiento de monocitos y linfocitos T, es una de las principales quimiocinas expresadas en la aterosclerosis.^{22, 32}

La diferenciación de monocitos a macrófagos es un proceso clave en la aterogénesis y es mediado principalmente por el factor estimulante de colonias de macrófagos.³¹ Además de jugar un papel importante en la inflamación y en la respuesta inmune innata, los macrófagos también pueden iniciar una respuesta inmune adaptativa, por activación de los linfocitos T, mediante la presentación de antígenos.³¹ Cuando el receptor de antígeno de los linfocitos T se une a su ligando, ocurre una respuesta de tipo Th1, que promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias como el interferon- γ , que además de favorecer la activación de macrófagos, aumenta la síntesis de IL-1 y TNF- α . El TNF- α induce la producción elevada de IL-6, que a su vez, estimula al hígado a sintetizar grandes cantidades de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) y el amiloide sérico A (ASA).²² Aunque las citocinas tienen importantes efectos biológicos a diferentes niveles, la amplificación de cada uno de los pasos de la cascada inflamatoria, hace que la medición de los indicadores plasmáticos resultantes como la PCR y el ASA sean particularmente útiles en el diagnóstico clínico.

Numerosas anomalías en la regulación de las citocinas han sido descritas en pacientes con LES y en modelos murinos de lupus. Lo anterior podría resultar en la acumulación de células y en el incremento en el depósito de LDL y matriz extracelular observada en la aterogénesis.³³ Por otro lado, estudios experimentales y observaciones en humanos sugieren que tanto la respuesta inmune adaptativa como la innata participan en la patogénesis de la aterosclerosis y las enfermedades autoinmunes.³⁴ Por lo tanto, la respuesta inflamatoria prolongada como la observada en pacientes con lupus, pudiera ser un importante promotor de la aterogénesis en este tipo de pacientes.

3.3b Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona polipeptídica producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Esta hormona es capaz de regular múltiples aspectos metabólicos y es clave en la regulación de la glucosa. La acción de la insulina es mediada por la activación de su receptor, que pertenece a la clase de receptores de superficie celular con actividad cinasa de tirosina. El receptor de la insulina es un heterotetrámero de 2 subunidades alfa extracelulares, unidas por puentes disulfuro a dos subunidades beta transmembranales.^{35, 36}

Con relación a la homeostasis de la glucosa, los efectos de la activación del receptor de la insulina, al unirse con la hormona, incluye eventos de fosforilación que favorecen la glucogenogénesis e inhiben la glucogenolisis. La activación de los receptores aumenta la glucólisis y la respiración celular, lo que permite a las células tener el aporte energético necesario en forma de ATP.³⁷

Durante mucho tiempo, la resistencia a la insulina ha sido investigada como un factor de riesgo potencial para la EAC. Además, la resistencia a la insulina se asocia con el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, y puede ser definida como la capacidad reducida de la insulina para estimular la captura de la glucosa en el músculo esquelético y en el adipocito; así como para inhibir la lipólisis en tejido adiposo.³⁸

En estudios transversales de cohortes en los que se incluyeron pacientes con LES, se ha encontrado que la diabetes mellitus se presenta con mayor frecuencia de lo esperado.^{39, 40} Además, Bruce y cols.⁴¹ en el estudio de factores de riesgo, realizado en Toronto, reportaron que la diabetes fue significativamente más común en pacientes con LES que en la población general. Estudios posteriores, también han reportado que pacientes tanto pediátricos⁴² como adultos³⁹ con LES, tienen hiperinsulinemia y/o resistencia a la

insulina, la cual no está completamente explicada por el tratamiento farmacológico esteroideo.^{39, 42-44}

La resistencia a la insulina podría explicar, al menos parcialmente, la pérdida de la protección contra la EAC en mujeres jóvenes con LES^{15, 44} y ser uno de los principales factores de riesgo cardiovascular como se ha mostrado en algunos estudios, en los que la resistencia a la insulina se ha encontrado asociada a la aterosclerosis coronaria independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular.^{43, 45, 46}

Existen varias explicaciones posibles para la elevación de la insulina plasmática en pacientes con LES. En primer lugar, concentraciones moderadamente elevadas de anticuerpos antiinsulina han sido descritos en este tipo de pacientes, aún en ausencia de diabetes.^{47, 48} A diferencia de lo observado en pacientes con diabetes, la presencia de anticuerpos antiinsulina en sujetos con enfermedades autoinmunes no parece tener efectos destructivos de las células beta pancreáticas.⁴⁹ Además, el control adecuado del lupus, con el uso de inmunosupresores, permite mantener bajas las concentraciones de esos anticuerpos. Por otro lado, las concentraciones de marcadores de inflamación como el TNF- α , la IL-6, la PCR o el ASA, se encuentran elevadas en pacientes con LES y numerosos estudios han mostrado que estos marcadores se asocian tanto con la hiperinsulinemia como con el desarrollo de resistencia a la insulina.^{43, 50, 51}

3.3c Alteraciones lipídicas

La insulina tiene un efecto antilipolítico importante y, de hecho, una de sus acciones más importantes es la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo. Por lo tanto, en presencia de resistencia a la insulina, hay aumento en la lipólisis de los triglicéridos almacenados en tejido adiposo, con su consecuente elevación en circulación. Los triglicéridos, el colesterol y los fosfolípidos son los principales lípidos circulantes en la sangre. Los dos

primeros son lípidos simples porque no se degradan mediante hidrólisis o por que, al degradarse, producen derivados lípidos más glicerol. Los fosfolípidos son lípidos compuestos; ya que durante su hidrólisis producen derivados lipídicos, fosfato inorgánico y glicerol.^{52, 53}

Los lípidos son moléculas insolubles en fase acuosa como el plasma sanguíneo y, por tanto, se transportan combinados con proteínas, dando origen a las lipoproteínas.^{52, 54}

Las lipoproteínas son partículas compuestas de apolipoproteínas y fosfolípidos presentes en la región externa, que encapsulan a los lípidos no polares insolubles como los ésteres de colesterol y los triglicéridos.⁵⁴ Las lipoproteínas, como los quilomicrones, pueden ser sintetizadas a nivel intestinal, a partir de los alimentos consumidos o provenir de la síntesis hepática, como las lipoproteínas de alta densidad (éstas también pueden tener su origen en el intestino) o las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que posteriormente son transformadas a lipoproteínas de densidad intermedia y LDL.^{54, 55}

La función principal de las lipoproteínas endógenas es el transporte de los lípidos entre el hígado y los tejidos periféricos. El transporte inicia con la secreción de las VLDL ricas en triglicéridos (~70%). Los triglicéridos contenidos en las VLDL son hidrolizados por acción de la lipasa lipoprotéica y los ácidos grasos liberados son captados por los tejidos periféricos, que los oxidan para la generación de energía en forma de ATP, o los esterifican nuevamente a triglicéridos, que son almacenados en el tejido adiposo, como reserva de energía.^{54, 55}

Debido a la continua hidrólisis de los triglicéridos y al continuo intercambio de componentes con otras lipoproteínas, las VLDL pierden fosfolípidos y apolipoproteínas de la superficie y se reducen de tamaño hasta generar las lipoproteínas de densidad intermedia que son finalmente convertidas a LDL enriquecidas en colesterol (~65%). La mayor parte del colesterol que llega a los tejidos periféricos es transportado por las LDL.

Estas lipoproteínas se caracterizan por tener una sola molécula de apolipoproteína B en su superficie que, actuando como ligando, permite la captación de la lipoproteína por los receptores de LDL presentes en todos los tejidos, pero principalmente, en las células hepáticas.^{54, 55}

Los tejidos periféricos, carecen de las enzimas necesarias para degradar el colesterol, por tanto, el exceso de colesterol en los tejidos debe ser llevado nuevamente al hígado, en donde es reciclado o pasa a la bilis para finalmente ser eliminado en las heces. En este proceso, conocido como transporte reverso de colesterol, las HDL y la apolipoproteína AI (la principal apolipoproteína de las HDL), juegan un papel esencial.^{54, 55}

Múltiples estudios han indicado que la dislipidemia caracterizada por concentraciones altas de triglicéridos y bajas del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) es muy frecuente en pacientes con LES.⁵⁶ Además, previamente se reportó que en este mismo tipo de pacientes existe una preponderancia de LDL pequeñas y densas, que son más susceptibles a la oxidación y son un factor de riesgo independiente para la ocurrencia de eventos cardiovasculares futuros.^{42, 57, 58}

El incremento en el estrés oxidativo y en la lipoperoxidación de las LDL son factores de riesgo cardiovascular establecidos en pacientes con LES, que originan partículas de LDL con actividad inmunogénica, quimiotáctica y proinflamatoria. Estas LDL son más fácilmente capturadas por los macrófagos y dan lugar a la formación de células espumosas y a la generación de una respuesta humoral que produce anticuerpos contra LDL oxidadas.^{42, 59}

Un factor importante en la protección contra la oxidación de las LDL son las HDL, las cuales, además de proteger contra la aterosclerosis a través de su papel en el transporte reverso del colesterol (transporta el colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado) y

su efecto antiinflamatorio (inhibe la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio), previenen o revierten la oxidación de las LDL. Debido a esto, numerosos estudios han indicado que la concentración de las HDL en plasma puede determinar el riesgo de aterosclerosis. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que además de la concentración, las características funcionales y estructurales de las HDL, son igualmente significativas en el riesgo de la EAC.^{60, 61}

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas lipoprotéicas grandes (HDL_{2b} y HDL_{2a}) y pequeñas (HDL_{3a}, HDL_{3b} y HDL_{3c}) que difieren en tamaño, forma, composición lipídica, densidad y función (Figura 2).⁶² Van Lenten y cols., reportaron que durante la fase aguda, la respuesta de las HDL puede ser convertida de su función antiinflamatoria a un estado proinflamatorio que es capaz de incrementar la oxidación de las LDL.⁶³

En el caso de las pacientes con LES, se ha informado que 45% de estas pacientes y 4% de las mujeres sanas, tienen HDL proinflamatorias que no sólo son incapaces de inhibir la oxidación, si no que incluso incrementan la oxidación de las LDL. Más aún, la concentración de las HDL proinflamatorias fue mayor en las pacientes con LES y EAC que en aquellas con LES sin EAC.⁶⁴ En estudios subsiguientes, se indicó que 86.7% de las mujeres con LES y con placa aterosclerosa tienen HDL proinflamatorias,⁶⁵ las cuales son predictoras de aterosclerosis subclínica en pacientes con LES (razón de momios: 16.6).⁶⁶ Además, como parte del presente trabajo de tesis, previamente publicamos que existen alteraciones estructurales en las partículas de HDL (Anexo 1); ya que se caracterizan por una mayor proporción de HDL pequeñas enriquecidas en triglicéridos y con menor cantidad de ésteres de colesterol, cuando se comparan con las HDL de mujeres sanas.⁶⁷ Estos resultados fueron confirmados por Chung y cols. quienes también encontraron que las HDL de pacientes con LES son de menor tamaño.⁶⁸ En conjunto, todas estas alteraciones tanto en la concentración como en las características

de las HDL, indican que estas lipoproteínas podrían ser un biomarcador del riesgo de aterosclerosis acelerada que se ha observado en las pacientes con LES, además de ser un blanco en el tratamiento para prevenir la EAC.

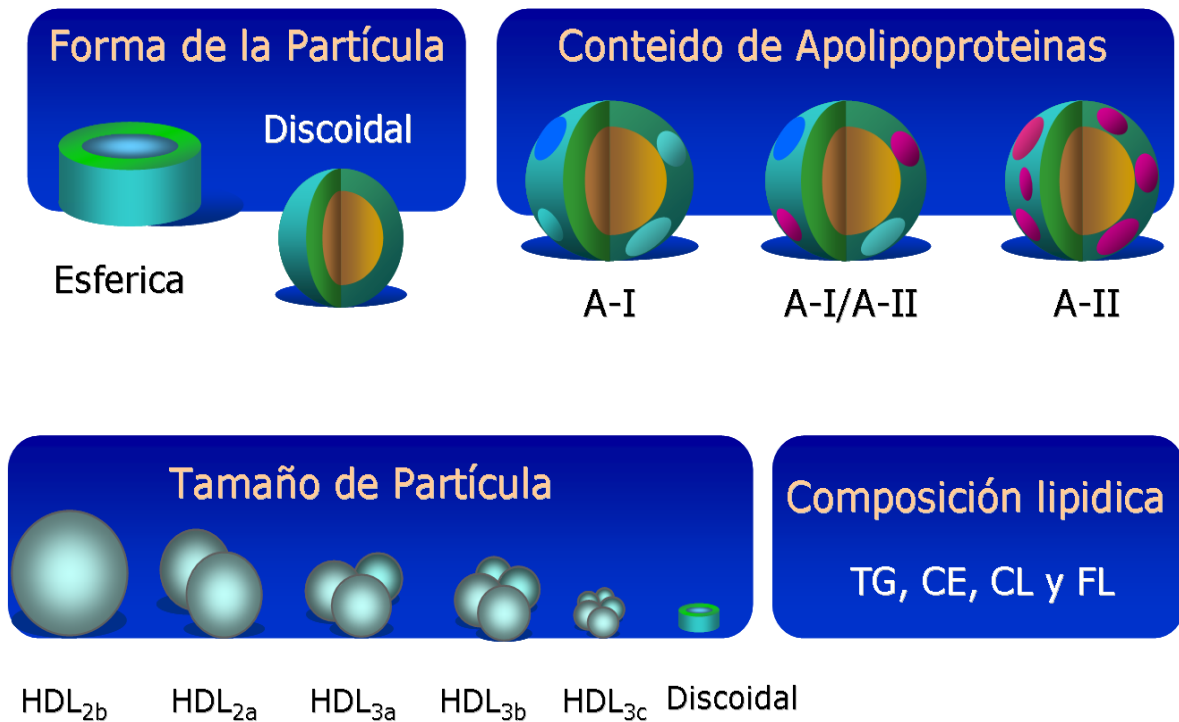


Figura 2. Heterogeneidad de las HDL. A-I: apolipoproteína AI; A-II: apolipoproteína AII; TG: triglicéridos; CE: colesterol esterificado; CL: colesterol libre; FL: fosfolípidos. Modificada de Rye KA, *Atherosclerosis* 1999;145:227-238. ⁶⁹

3.3d Disfunción endotelial

En respuesta a diversos agentes estimulantes, presentes en el subendotelio vascular y que están incrementados en pacientes con LES (IL-1, complejos inmunes, virus, lipoproteínas oxidadas, y otras toxinas), las células endoteliales sufren una serie de cambios conocidos como activación celular endotelial. Para que esta activación se lleve a cabo, los agentes que actúan en la pared vascular, activan la vía del complemento que estimula la migración de los leucocitos y el daño del endotelio vascular. La activación celular endotelial genera un estado de lesión que incrementa la permeabilidad (por aumento en la expresión de moléculas vasoactivas) así como las propiedades adhesivas

(mediadas por moléculas de adhesión celular vascular e intercelular) y procoagulantes del endotelio (factor de Von Willebrand y trombomodulina), favoreciendo la respuesta inflamatoria y la disfunción endotelial.⁷⁰⁻⁷²

La disfunción endotelial representa la incapacidad del endotelio vascular para modular de manera adecuada el flujo sanguíneo miocárdico a través de la secreción de óxido nítrico y es considerada un marcador temprano de aterosclerosis.⁷³ Varios estudios han mostrado que la función endotelial, evaluada como la dilatación mediada por flujo de la arteria braquial en respuesta a la hiperemia reactiva, está significativamente alterada en pacientes con LES, comparadas con controles sanas; aún después de ajustar por factores de riesgo tradicional.⁷⁴⁻⁷⁶ Sin embargo, ese tipo de estudios no permite detectar la disfunción endotelial en sus etapas más tempranas y tampoco es útil para evaluar en forma directa la disfunción de la microvasculatura coronaria. En este sentido, la tomografía por emisión de positrones (PET), es un método capaz de evaluar la capacidad vasodilatadora integrada de las células del músculo liso (reserva de flujo coronario [RFC], un indicador de la función coronaria independiente del endotelio) y del endotelio (índice de vasodilatación dependiente de endotelio [IVED], indicador de función coronaria dependiente de endotelio) directamente de la microvasculatura coronaria. Como parte de los resultados del presente trabajo de tesis, se ha reportado que, en comparación con controles sanas de la misma edad, las mujeres jóvenes con LES tienen disfunción endotelial tanto dependiente como independiente de endotelio (Anexo 2).⁷⁷

3.4 Evaluación de la función endotelial

Como se mencionó previamente, en respuesta a estímulos nocivos, el endotelio sufre un cambio fenotípico (estado no adaptativo) comúnmente llamado disfunción endotelial. Esta anomalía funcional se caracteriza por la pérdida o reducción de los mecanismos

homeostáticos operativos en las células endoteliales sanas, que pueden ser evaluados invasivamente usando bradicinina, acetilcolina, L-arginina o metacolina; las cuales inducen dilatación dependiente de endotelio.⁷⁸⁻⁸⁰ La evaluación de la respuesta vascular (por medición de los cambios en el diámetro vascular o en el flujo sanguíneo) a estímulos dependientes de endotelio, constituye una herramienta importante para conocer el efecto vasorregulador del endotelio.

Debido a que el tono vascular está determinado tanto por la producción de sustancias vasoactivas en las células endoteliales, como por las condiciones del músculo liso, la respuesta vascular anormal a un estímulo puede ser secundaria a defectos de las células endoteliales o a cambios en la función del músculo liso. Por lo tanto, para definir la existencia de daño vascular, es necesario evaluar la reactividad del músculo liso, lo cual se logra usando agentes que actúan sobre las células del músculo liso (por ejemplo, nitroprusiato de sodio o nitroglicerina), causando vasorelajación sin tener efecto sobre las células del endotelio. La combinación de la información provista por las respuestas a estímulos dependientes e independientes de endotelio, permite concluir si el daño en la respuesta está asociado o no a función endotelial anormal.⁷⁸

El papel del endotelio en la regulación del tono vascular puede ser evaluado en la circulación coronaria y periférica. En la circulación periférica se puede medir tanto en las extremidades superiores como en las inferiores. La visualización de la arteria braquial con el ultrasonido de alta frecuencia, permite medir la dilatación mediada por flujo como el incremento en el diámetro de la arteria durante la hiperemia inducida por un periodo de isquemia de la extremidad distal.

La técnica de perfusión braquial requiere la inserción de un catéter dentro de la arteria braquial para la infusión farmacológica (por ejemplo bradicinina) y medición de la respuesta del flujo sanguíneo braquial por medio de pletismografía. El flujo sanguíneo

braquial en reposo y durante la infusión de un agente farmacológico puede ser evaluado por medición del incremento en el flujo arterial, obtenido durante un breve periodo de oclusión venosa.^{78, 81, 82}

Por otro lado, para cuantificar la respuesta a agentes cuya acción es dependiente o independiente del endotelio, las arterias coronarias epicárdicas pueden ser visualizadas por técnicas de medicina nuclear o de tomografía y su circunferencia medida por medio de la angiografía coronaria cuantitativa. La microcirculación coronaria también puede ser examinada mediante estudio Doppler realizado después de la canulación de las arterias coronarias. Este método permite medir la velocidad del flujo sanguíneo antes y durante la administración de diferentes agonistas o antagonistas. La velocidad del flujo sanguíneo incrementa durante la hiperemia inducida por vasodilatadores.⁷⁸⁻⁸²

3.5 Tomografía por emisión de positrones (PET)

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés) es una medición no invasiva de la función microvascular coronaria que puede ser realizada por técnicas que emplean radionúclidos. Los radionúclidos son isótopos inestables de diversos elementos (Tabla 2), que son producidos en aceleradores de partículas conocidos como ciclotrones.^{83, 84}

El ^{13}N -amonio y el H_2^{15}O se usan para medir el flujo sanguíneo miocárdico, ofreciendo la posibilidad de detectar disfunción vascular aún en pacientes sin enfermedad arterial coronaria obstructiva.⁸⁵ El flujo coronario puede ser cuantificado con PET en condiciones basales (FCB), después de la estimulación farmacológica (FCE) (el estímulo con fármacos favorece una respuesta vasodilatadora mediada tanto por la relajación del músculo liso como por vasodilatación mediada por el óxido nítrico liberado por las células endoteliales), y también después del empleo de estímulos fisiológicos como la prueba de

estimulación por frío (FC-CPT) (consiste en la activación del sistema simpático por inmersión del brazo del paciente en agua helada para inducir la vasodilatación epicárdica e incrementar el flujo coronario). Con la medición del flujo coronario en estas tres condiciones, es posible calcular la reserva de flujo coronario ($RFC = FCE/FCB$) que indica la función vascular independiente de endotelio, además del índice de vasodilatación dependiente de endotelio ($IVED = FC-CPT/FCB$), que refleja la función vascular dependiente de endotelio.⁸⁶

Tabla 2. Propiedades físicas de los positrones

<i>Isótopo</i>	<i>Vida media (min)</i>	<i>Radionúclidos (trazadores)</i>	<i>Aplicación</i>
¹⁵ O	2.03	¹⁵ O ₂	Consumo de oxígeno
		H ₂ ¹⁵ O	Flujo sanguíneo
		C ¹⁵ O	Volumen sanguíneo
¹³ N	10.0	¹³ NH ₃	Flujo sanguíneo
¹¹ C	20.4	¹¹ C-HED	Captura presináptica de catecolaminas
		¹¹ C-CGP 12177	Adrenoreceptores β
		¹¹ C-MQNB	Receptores muscarínicos
¹⁸ F	109.8	¹⁸ F-FDG	Metabolismo de glucosa
		¹⁸ F-FDopa	Almacenamiento de dopamina

3.6 Receptores activados por el proliferador de peroxisomas

Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs) constituyen un subgrupo de la familia de los receptores nucleares, que regulan la expresión génica en respuesta a la unión de su ligando. Estos receptores participan de manera importante en la regulación de numerosos procesos celulares relacionados al metabolismo, la

diferenciación celular, la proliferación y la inflamación tisular que contribuye a las alteraciones metabólicas y a la enfermedad cardiovascular.^{87, 88}

Existen tres subtipos de receptores PPARs que son codificados por genes distintos localizados en cromosomas diferentes.⁸⁹ Los tres subtipos tienen diferentes patrones de distribución y regulan diferentes genes. Mientras que los PPAR α y los PPAR β (también llamados PPAR δ) son potentes activadores de genes involucrados en la oxidación de lípidos, los PPAR γ se caracterizan por su capacidad para activar genes lipogénicos, inflamatorios y de diferenciación celular. Como reflejo de sus propiedades específicas, los PPAR α y β se expresan en tejidos con elevadas tasas de β -oxidación como el hígado, el músculo y el corazón; mientras que los PPAR γ se expresan principalmente en tejido adiposo, pero también se pueden encontrar en células beta pancreáticas, endotelio vascular y macrófagos.^{90, 91}

Después de la unión con su ligando, los PPARs sufren cambios conformacionales que les permiten unirse a una o más proteínas coactivadoras. Los ligandos de los PPARs difieren en su capacidad para interactuar con los coactivadores; lo que explica la variación biológica observada en la respuesta, después de la activación de los receptores. Los PPARs regulan la transcripción génica por dos mecanismos. La transactivación es un mecanismo dependiente de DNA e involucra la unión de los PPARs a elementos de respuesta de los genes blanco así como su heterodimerización con el receptor retinoide X.⁹² El segundo mecanismo, conocido como transrepresión, explica las propiedades antiinflamatorias de los PPARs, e involucra la interferencia de estos receptores sobre las vías de expresión de otros factores de transcripción independientemente del DNA.⁹³

Los tres subtipos de PPARs pueden ser activados por una gran variedad de ácidos grasos y metabolitos de ácidos grasos como los eicosanoides hidroxilados,

prostaglandinas y leucotrienos, así como por compuestos sintéticos. Los PPAR α son específicamente activados por los fibratos y otros fármacos hipolipemiantes; mientras que los PPAR γ son activados por fármacos sensibilizadores de la acción de la insulina, como los pertenecientes a la familia de las tiazolidinedionas (TZD).⁹⁴

La pioglitazona es un compuesto sensibilizador a la acción de la insulina del tipo de las TZD, que activa el receptor nuclear PPAR γ , regulando la transcripción de genes con funciones clave en la inflamación, así como en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.^{95, 96} La pioglitazona aumenta la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y en hígado, lo que conduce a mejoría tanto de la glucemia, como de los valores bajos de C-HDL y altos de triglicéridos en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.⁹⁷ Por otro lado, este tipo de TZD aumenta el tamaño de las partículas de LDL y disminuye su susceptibilidad a la oxidación.⁹⁸ Los efectos cualitativos de la pioglitazona sobre las lipoproteínas también se han observado en las subfracciones de las HDL ya que con el empleo de este fármaco, el tamaño promedio de las partículas de HDL se incrementa en sujetos con^{99, 100} y sin¹⁰¹ diabetes mellitus. Además, datos de un estudio previo muestran que la pioglitazona reduce el contenido de triglicéridos en las partículas de HDL de sujetos sanos con obesidad moderada.¹⁰² Finalmente, existen evidencias de que la pioglitazona puede mejorar la disfunción endotelial y otras enfermedades inflamatorias de los vasos.¹⁰³ Debido a que este compuesto mejora la sensibilidad a la insulina sin estimular la liberación de esta hormona por las células beta pancreáticas, el riesgo de generar hipoglucemia es bajo.¹⁰⁴

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Numerosos estudios han reportado que en pacientes jóvenes con LES, existe un elevado riesgo a desarrollar enfermedad arterial coronaria. Este riesgo no ha podido ser explicado completamente por factores de riesgo tradicionales, por la actividad misma de la enfermedad, ni por el tratamiento farmacológico empleado en este tipo de pacientes.^{29,}

¹⁰⁵ Aunque previamente se reportó que la pioglitazona reduce algunos factores de riesgo cardiovascular y las alteraciones renales generadas por procesos inflamatorios en un modelo murino de lupus,¹⁰⁶ ningún estudio ha examinado el efecto de esta droga sobre el perfil de lípidos, las características lipoprotéicas, la insulina plasmática, algunos marcadores de inflamación y la función vascular en mujeres jóvenes con LES.

5. HIPÓTESIS:

Los múltiples efectos cardioprotectores de la pioglitazona indican que este fármaco mejorará el perfil de lípidos, modificará favorablemente las características estructurales de las lipoproteínas de alta densidad, reducirá las concentraciones plasmáticas de la insulina y de marcadores de inflamación como la proteína C reactiva y el amiloide sérico A, en pacientes premenopáusicas con lupus eritematoso sistémico sin complicaciones. Como resultado de estas modificaciones, la pioglitazona mejorará la función endotelial de las arterias coronarias en este grupo de pacientes, mejorando su perfil de riesgo cardiovascular.

6. OBJETIVOS:

6.1 Objetivo General:

Conocer el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre las características de las lipoproteínas de alta densidad, las concentraciones de insulina y de marcadores de inflamación en plasma, así como sobre la función endotelial de pacientes premenopáusicas con LES.

6.2 Objetivos Específicos:

6.2.1 Dilucidar el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre el perfil de lípidos, las características de las lipoproteínas de alta densidad, la concentración de insulina y de proteína C reactiva y amiloide serico A.

6.2.2 Estudiar el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la función endotelial.

7. MATERIAL Y METÓDOS:

7.1 Pacientes

El presente trabajo fue un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, paralelo, controlado con placebo, realizado en la Ciudad de México. Las participantes fueron mujeres premenopáusicas con LES, mayores de 18 años, atendidas en la consulta externa de reumatología de tres hospitales de tercer nivel: el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, el Hospital Regional N°1 del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Hospital General de México. Todas las participantes cumplieron los criterios para la clasificación de LES del Colegio Americano de Reumatología 1982.¹⁰⁷ Para evitar el efecto confusor de otros factores de riesgo cardiovascular, se excluyeron pacientes con evidencia clínica de menopausia, diabetes, disfunción tiroidea, enfermedad neurológica, renal o hepática, historia personal de hipertensión, EAC, evento cerebrovascular, infección aguda o crónica, cáncer y consumo excesivo de alcohol.

Durante el estudio, ninguna de las pacientes fumaba, se embarazó, ni consumió fármacos hormonales o para la regulación de lípidos; además, los anticuerpos anticardiolipina, anticoagulante lúpico y antibeta-2-glicoproteína-1 fueron negativos en todos los casos. Las pacientes fueron incluidas en el estudio después de haber firmado el consentimiento informado. El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de cada hospital y fue realizado de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

Todas las evaluaciones se realizaron en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de marzo de 2007 a abril de 2010. La información de la terapia farmacológica actual y cumulativa; así como la presencia de alguna enfermedad en las pacientes, fue obtenida a través de un cuestionario y un examen físico. La actividad del LES fue

evaluada utilizando el MEX-SLEDAI.⁴ Con base en el MEX-SLEDAI, el puntaje mayor a 5 se consideró indicativo de enfermedad activa. La estatura (m), el peso (kg) y la tensión arterial fueron medidos; y el índice de masa corporal fue calculado dividiendo el peso entre la estatura al cuadrado (kg/m²).

7.2 Cálculo del tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra fue empleado para detectar los cambios en el tamaño de HDL, utilizando la monoterapia con pioglitazona.¹⁰¹ Con base en los resultados mostrados por Szapary y cols,¹⁰¹ anticipamos un incremento en el tamaño de HDL después de 12 semanas de tratamiento con pioglitazona, y calculamos que:

$$[(Z\alpha + Z\beta) SD / (\mu_0 - \mu_1)]^2 = [(1.65 + 0.84) 0.25 / (8.4 - 8.6)]^2.$$

El cálculo mostró que para tener un poder del 80%, en el nivel de significancia del 5%, diez pacientes eran necesarias en cada grupo (placebo y pioglitazona). De un total de 521 expedientes revisados, reclutamos y aleatorizamos a 30 pacientes como se muestra en la figura 3.

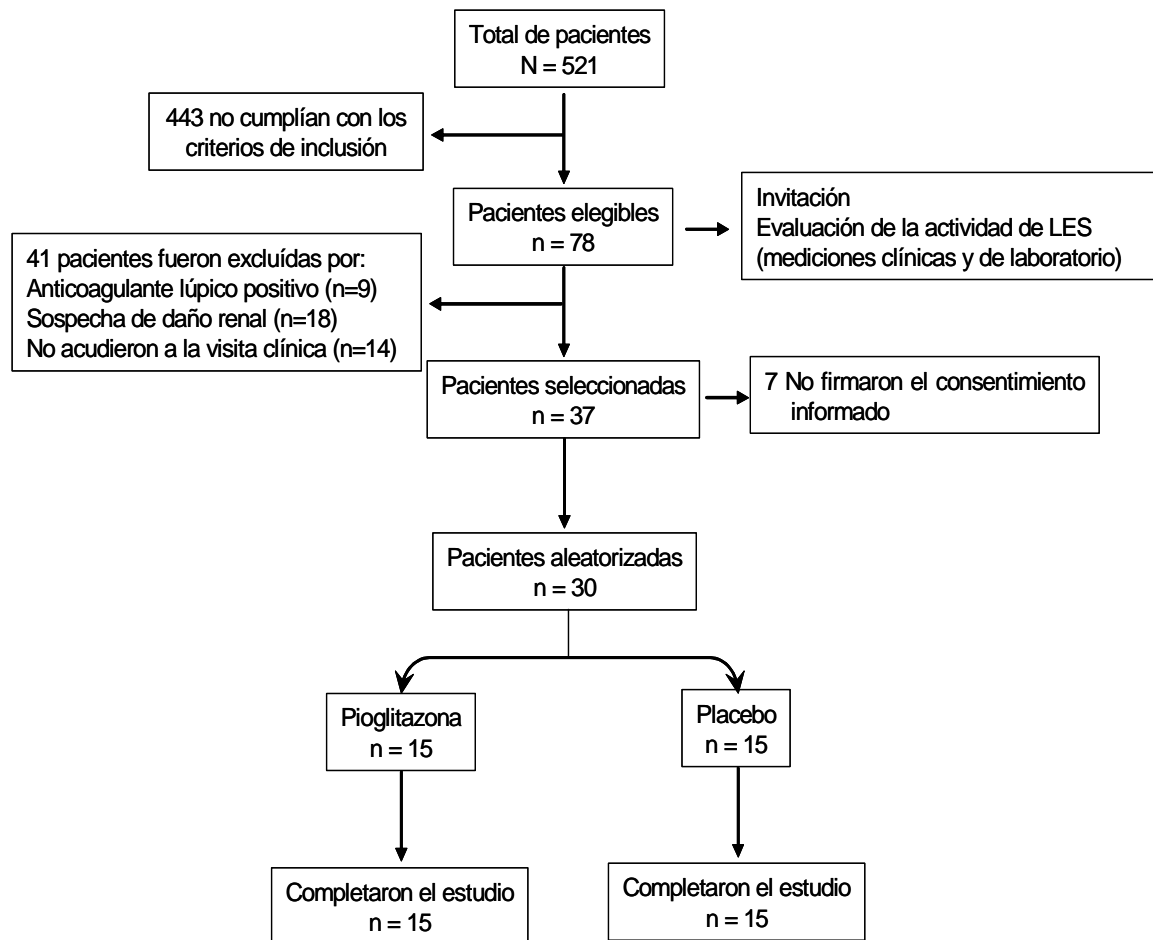


Figura 3. Selección de pacientes.

7.3 Protocolo de estudio

En la figura 4 se muestra el cronograma del estudio. En resumen, a las pacientes que reunieron los criterios de inclusión se les pidió acudir durante los primeros cinco días de su ciclo menstrual al Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología. En esta visita 1 se les explicó ampliamente las características y los objetivos del estudio. A las que aceptaron participar se les solicitó firmar la hoja de consentimiento informado.

A continuación se obtuvo una muestra de sangre venosa en la que se analizaron las variables de seguridad (biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática, examen general de orina) e inmunológicas (determinación de complementos y anticuerpos). En todas se indicó seguir la Dieta Fase I de la Asociación Americana del Corazón durante todo el curso del estudio; la cual únicamente indica consumo bajo de grasas saturadas (menos de 10% de la dieta) y colesterol (menos de 300 mg/día).¹⁰⁸ Cuatro semanas después (visita 2), durante los primeros cinco días de su ciclo menstrual, en las pacientes se practicó examen clínico y se revisaron los estudios de seguridad.

En las pacientes que continuaron reuniendo los criterios de inclusión, se obtuvo muestra de sangre para exámenes de seguridad, inmunología y medición de variables de interés. Posteriormente fueron trasladadas a la Facultad de Medicina de la UNAM, en donde se realizó el estudio de función endotelial mediante PET. Al final del mismo, aleatoriamente fueron asignadas al grupo de pioglitazona o de placebo. En la visita 3, realizada a las cuatro semanas de tratamiento, se repitieron el examen clínico y los exámenes de seguridad. En la semana 8 (visita 4) únicamente se practicó la revisión clínica. Al final del estudio (semana 12, visita 5), durante los primeros cinco días del ciclo menstrual, se repitieron todos los estudios realizados en la visita 2. La adherencia al tratamiento se evaluó mediante el conteo de tabletas en las visitas 3, 4 y 5.

DIETA BAJA EN LÍPIDOS Y COLESTEROL

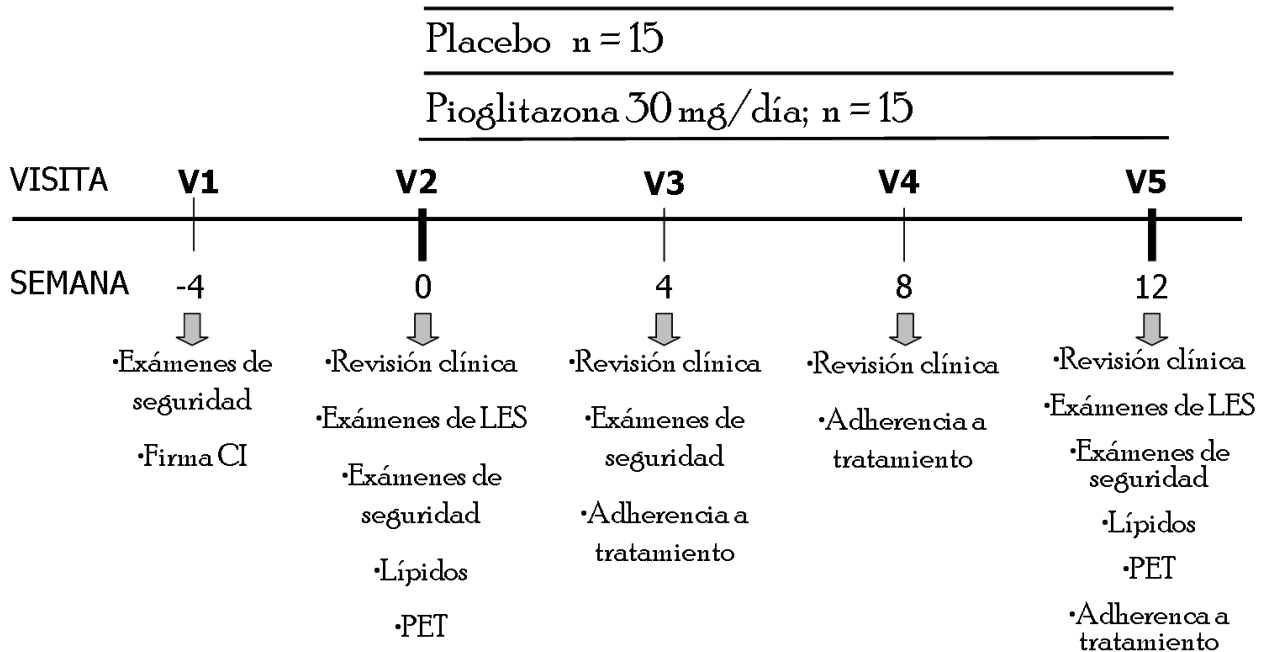


Figura 4. Diseño del estudio.

7.4 Métodos de laboratorio

Todas las pacientes fueron recibidas en la mañana, después de al menos 10 horas de ayuno para obtener las muestras de sangre venosa. El plasma fue separado por centrifugación a 4°C a 2500 rpm por 20 minutos y utilizado para la medición de glucosa, lípidos y lipoproteínas. Otras alícuotas de las muestras fueron almacenadas a -70°C, con aprotinina (100 KIU/ml) y benzamidina (1 mM) utilizados como inhibidores de proteasas. La glucosa, el colesterol total, los triglicéridos y el C-HDL fueron medidos en plasma, utilizando un procedimiento enzimático estandarizado en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio, Japón).¹⁰⁹ La precisión de las determinaciones en nuestro laboratorio está bajo vigilancia periódica por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention Service, Atlanta, GA, USA). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) fue estimado utilizando la

fórmula de Friedewald modificada por De Long y cols ($[\text{triglicéridos} / 5] + \text{C-HDL} - \text{colesterol total}$).¹¹⁰ Las concentraciones totales de PCR, ASA, apolipoproteína B-100 (apoB-100) y apolipoproteína AI (apo-AI), fueron determinadas por inmunonefelometría en un nefelómetro BN Pro Spect (Dade Behring Marburg GmbH, Germany). Los coeficientes de variación interensayo fueron < 3 para todas estas determinaciones. Las concentraciones de insulina plasmática fueron determinadas por un análisis radioinmunométrico (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, California, USA). La resistencia a la insulina fue estimada utilizando el modelo de homeostasis para la valoración de la resistencia a la insulina (HOMA-RI).¹¹¹ Los valores normales de insulina y HOMA-RI fueron $< 6.6 \mu\text{UI/ml}$ y < 1.3 , respectivamente, de acuerdo a la percentila 75th de una muestra de mujeres sanas, previamente descrita.⁶⁷

7.5 Función endotelial

En todas las pacientes se realizó el estudio de PET antes y al final del tratamiento. Se indicó a las pacientes no ingerir café, bebidas de cola o chocolate por al menos 24 h antes del estudio. Para el estudio de PET, las pacientes acudieron en ayuno de 6 hrs y dentro de los primeros siete días del periodo menstrual, debido a que durante el ciclo hormonal existen cambios en la función endotelial.^{112, 113} Se cuantificó el flujo coronario en tres condiciones: a) basal (FCB), b) durante la prueba de estimulación con frío (FC-CPT) y c) durante el estrés farmacológico con $140 \mu\text{g/Kg/min}$ de adenosina durante 6 minutos (FCE). Para cada una de las fases se aplicó un bolo de 20 mCi de ^{13}N -amonia, el cual es producido en el ciclotrón ubicado próximo a la cámara PET. Se inyectó el bolo en cada una de las fases con la paciente posicionada debajo de la cámara PET, monitorizando la tensión arterial y la actividad electrocardiográfica cada dos minutos durante las pruebas FC-CPT y FCE.⁸⁵ El procesamiento de las imágenes se realizó con

una cámara PET con el sistema de imágenes ECAT EXACT HR+ (CTI-Siemens, Knoxville, Tenn. USA). El flujo sanguíneo se cuantificó en mL/g/min con el programa Polar Flow de la Universidad de California (UCLA). Después de obtener los tres flujos coronarios (FCB, FCE y FC-CPT), se calculó la reserva de flujo coronario (RFC), definida como el cociente FCE/FCB y que representa la función endotelial independiente de endotelio; además del índice de vasodilatación dependiente de endotelio (IVED) obtenido como el cociente FC-CPT/FCB, que refleja la función endotelial dependiente de endotelio.

7.6 Distribución de subclases de HDL

Las HDL fueron aisladas del plasma por ultracentrifugación; para lo cual, se ajustó 1 mL de plasma a una densidad de 1.063 con KBr $\delta= 1.37$, calculando el volumen necesario de KBr a usar con siguiente formula:

$$\text{(Vol plasma ml) (1.063 - 1.006) / Densidad KBr (1.37 - 1.063) = 0.057 / 0.42059 = Vol de solución KBr (\delta= 1.37) por mL de plasma}$$

Se agitó perfectamente el plasma y se le agregó 1 mL de KBr $\delta=1.063$, cuidadosamente por la pared del tubo para formar 2 fases. Se marcó el tubo en el punto de separación de las dos fases y se centrifugó 2 horas 30 minutos a 100,000 rpm con una temperatura de 10°C. Después de la centrifugación se separó el sobrenadante (lipoproteínas ricas en apolipoproteína B) tomando el líquido de la superficie con un poco de aire para generar “burbujas”, y eliminando el exceso de volumen hasta la marca en el tubo (la mitad de la segunda fase de KBr $\delta=1.063$). Se agitó perfectamente el infranadante y se midió el

volumen restante para ajustar la densidad a 1.25 con KBr sólido, utilizando la siguiente formula:

$$(\text{Vol plasma ml}) (1.25 - 1.063) / 1 - (1.25 - 0.312) = \text{KBr (mg)}$$

Después de agregar el KBr, se agitó perfectamente en el vórtex hasta disolver por completo la sal y se agregaron cuidadosamente 1.5 mL de KBr en solución ($\delta = 1.25$) para formar dos fases y centrifugar a 100,000 rpm durante 3 horas 15 minutos. Posteriormente se recuperó la parte superior de la solución (en donde se encontraban las HDL) y se pasaron a otro tubo en donde se les agregó KBr en solución ($\delta = 1.25$) y se centrifugaron nuevamente a 100,000 rpm durante 3 horas 15 minutos a 10 °C (lavado). Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante (HDL) y se dializó con buffer PBS 10 mM pH 7.4 durante 36 horas, haciendo cambios del buffer cada 8 horas, para eliminar el exceso de sales. Finalmente, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry y las muestras fueron cargadas en un gradiente de gel de poliacrilamida del 4 al 30%, a una concentración de 20 μg de proteína por 20 μL de solución depositados en cada pozo del gel; incluyendo 5 μL de azul de bromofenol. Después de la electroforesis, los geles fueron teñidos para proteínas con azul brillante de Coomassie R-250, escaneados y digitalizados en un densitómetro GS-670 Bio-Rad, utilizando un software Molecular Analyst TM. Los intervalos de migración de proteínas de alto peso molecular (Tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2; y albúmina, 7.1nm), fueron calculados en cada gel y utilizados como curva estándar de acuerdo a la distancia de migración.^{114, 115} La proporción relativa de subclases de HDL fue estimada con los siguientes intervalos de tamaño: HDL_{3c} 7.21-7.76 nm; HDL_{3b} 7.76-8.17 nm; HDL_{3a} 8.17-8.77 nm; HDL_{2a} 8.77-9.71 nm;

HDL_{2b} 9.71-12.93 nm. El coeficiente de variación para cada subclase de HDL fue <10%. El promedio del tamaño por partícula de HDL representa la distribución total de las subclases de HDL y fue calculado como el intervalo promedio del tamaño de cada subclase de HDL (nm), multiplicado por la densidad del área escaneada.^{114, 115} El coeficiente de variación para esta determinación fue menor a 1%.

7.7 Composición de HDL

El contenido de proteínas totales, colesterol total, colesterol libre, fosfolípidos y triglicéridos en HDL aisladas, fue determinado por un autoanalizador Hitachi 902, utilizando análisis enzimáticos disponibles comercialmente. Los ésteres de colesterol fueron calculados multiplicando la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre por 1.67.¹¹⁶ El contenido de apolipoproteínas (AI, AV y E) fue evaluado semicuantitativamente por geles en gradiente de poliacrilamida del 4 al 21%, adicionados con SDS. La preparación y el análisis de los geles fueron similares a lo descrito en el análisis de distribución de subclases de HDL.¹¹⁵

7.8 Análisis estadístico

El análisis fue transportado a un software estadístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS inc. Chicago IL, USA). Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar (SD) para variables con distribución normal, o como medianas (rango intercuartil) para variables con distribución anormal. Las diferencias entre grupos se analizaron por t-Student o U-Mann Whitney para muestras independientes. Para las diferencias intra-grupo (antes vs después del tratamiento) se utilizaron las pruebas t-Student o Wilcoxon para muestras relacionadas. El coeficiente de correlación de Spearman fue calculado para evaluar la relación de todas las variables estudiadas con la función endotelial y con

el tamaño de HDL. Todos los resultados con $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. RESULTADOS:

En el presente estudio se incluyeron 30 pacientes que fueron aleatorizadas a tratamiento con pioglitazona (30 mg/día) o placebo (Figuras 3 y 4). Todas las pacientes aleatorizadas cumplieron con las visitas programadas y concluyeron el estudio. Las características clínicas basales de las 30 pacientes se muestran en la tabla 3. La duración y la actividad de la enfermedad fueron de 5.0 (2.0 – 10.0) años y 2.5 (1.2 – 4.7) puntos; respectivamente. La proporción de pacientes tratadas con prednisona fue de 46.7% y con antimaláricos de 83.3%, y fue similar en los dos grupos. Tres pacientes del grupo placebo (20%) y cinco (33%) del grupo de pioglitazona tomaban más de 10 mg/día de prednisona ($p = \text{N.S.}$); mientras que solo 2 pacientes (13%) de cada grupo recibían más de 200 mg/día de antimaláricos. No se observaron cambios en la actividad de LES, en el tratamiento farmacológico, ni en los valores de tensión arterial durante el curso del estudio (Tabla 3)

Tabla 3. Características clínicas de las pacientes incluidas

	<i>Total</i>	<i>Placebo (n=15)</i>	<i>Pioglitazona (n=15)</i>	<i>p^a</i>
Edad (años)	30 ± 8	29 ± 7	32 ± 10	N.S.
Índice de masa corporal (kg/m ²)	24.7 (22.4-28.9)	24.5 (23.5-30.0)	24.9 (21.8-28.6)	N.S
Circunferencia de cintura (cm ²)	81 (72-92)	81 (76-90)	82 (71-92)	N.S
Tensión arterial sistólica (mmHg)	107 (97-118)	110 (90-120)	107 (98-115)	N.S
Tensión arterial diastólica (mmHg)	70 (65-76)	70 (60-80)	70 (65-75)	N.S
Evolución del LES (años)	5.0(2.0-10.0)	4.0(2.0-11.7)	5.0(2.9-9.5)	N.S
Índice MEX-SLEDAI	2.5(1.2-4.7)	4.0(2.0-6.0)	2.0(1.0-3.5)	N.S

Media ± D.E. o mediana (rango intercuartil).

^a = t-Student para medias o U-Mann Whitney para medianas.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico; MEX-SLEDAI: índice modificado de la actividad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico mexicano.

Los datos de la tabla 4 confirman que en general, las pacientes de los dos grupos cursaron sin actividad clínica ni bioquímica de la enfermedad. No hubo diferencias significativas en la mediana del índice de masa corporal (24.9 vs 24.8), hemoglobina (13.1 g/dL vs 13.0 g/dL), hematocrito (39.1% vs 38.4%), aspartato aminotransferasa (21.3 U/L vs 21.7 U/L) ni en alanina aminotransferasa (16.1 U/L vs 17.3 U/L), al comparar a las pacientes antes y después del tratamiento con pioglitazona. Resultados similares fueron observados en el grupo placebo. De acuerdo con el conteo de tabletas, las pacientes completaron el estudio con una adherencia total al tratamiento del 94% (placebo 95% vs pioglitazona 93%; $p = \text{N.S.}$). Efectos colaterales fueron reportados por tres pacientes del grupo placebo (dolor de cabeza, palpitaciones, mareos, náusea y dolor de pecho) y en dos pacientes del grupo de pioglitazona (dolor de cabeza e insomnio); sin embargo, todos estos efectos desaparecieron después de la semana cuatro de tratamiento.

Tabla 4. Características bioquímicas de las pacientes incluidas

	<i>Total</i>	<i>Placebo (n=15)</i>	<i>Pioglitazona (n=15)</i>	<i>p^a</i>
Hemoglobina (g/dL)	13.2 ± 1.1	13.1 ± 1.3	13.2 ± 0.9	N.S
Leucocitos (µL)	4950 (4000-6050)	5000 (4000-5400)	4900 (3700-8600)	N.S
Linfocitos (µL)	1270 (1000-1550)	1100 (1000-1500)	1300 (1000-1700)	N.S
Plaquetas (*1000/µL)	237 (179-265)	236 (145-292)	238 (215-253)	N.S
Velocidad de sedimentación globular (mm/hr)	18.5 (14.2-31.0)	18.0 (14.5-27.0)	26.0 (12.0-32.0)	N.S
Complemento C4 (mg/dL)	14.1 ± 3.9	14.5 ± 3.9	13.7 ± 4.1	N.S
Complemento C3 (mg/dL)	94.8 ± 21.0	98.6 ± 22.3	91.1 ± 19.3	N.S

Media ± D.E. o mediana (rango intercuartil).

^a = t-Student para medias o U-Mann Whitney para medianas.

Los valores de lípidos, glucosa, insulina, resistencia a la insulina y marcadores de inflamación se muestran en la tabla 5. El tratamiento con pioglitazona incrementó las concentraciones de C-HDL (14.2%; $p = 0.029$) después de 12 semanas. El colesterol total, el C-LDL, los triglicéridos, las apolipoproteínas A1 y B, así como la glucosa en plasma permanecieron sin cambios significativos después del tratamiento con placebo o con pioglitazona. Las concentraciones de insulina en plasma y el HOMA-RI fueron similares entre los dos grupos al inicio del estudio. Sin embargo, ambos parámetros mostraron reducciones a las doce semanas de tratamiento con pioglitazona (insulina -23.6%; $p = 0.006$ y HOMA-RI -31.7%; $p = 0.008$), pero no con el uso del placebo. Las concentraciones de PCR se redujeron 70.9% y 0.3% en los grupos tratados con pioglitazona y con placebo, respectivamente ($p = 0.013$); mientras que el ASA disminuyó 34.9% en el grupo de pioglitazona y aumentó 25.5% en el grupo placebo ($p = 0.029$).

La distribución de subclases de HDL fue similar en los dos grupos al inicio del tratamiento. Aunque la proporción de HDL_{2b} fue la única subfracción que mostró un incremento significativo después del tratamiento con pioglitazona (11.9% vs 13.3%; $p = 0.030$), el cambio porcentual en HDL_{2b}, HDL_{3b} y HDL_{3c} fue diferente en el grupo de pioglitazona al compararlo con el observado en el placebo (Figura 5). La pioglitazona produjo un aumento significativo en el tamaño promedio de las partículas de HDL (8.80 nm vs 8.95 nm; $p = 0.044$); y el cambio porcentual medio fue significativamente diferente al compararlo con el mostrado por el grupo placebo (pioglitazona: +0.77% vs placebo: -0.67%; $p = 0.018$). El análisis de la composición de las HDL, reveló que, en comparación con el grupo placebo, únicamente aumentó la proporción de colesterol libre, después del tratamiento con pioglitazona (+6.82% vs -4.87%; $p = 0.043$); mientras que la proporción de ésteres de colesterol mostró tendencia a aumentar después del tratamiento con pioglitazona (+5.03% vs -1.68%; $p = 0.09$). El contenido de fosfolípidos y triglicéridos; así

como la proporción de las diferentes apolipoproteínas en las partículas de HDL, no se modificaron después de las doce semanas de tratamiento con pioglitazona o placebo.

Tabla 5. Parámetros lipídicos, glucometabólicos e inflamatorios antes y después del tratamiento con placebo o pioglitazona

	<i>Placebo (n=15)</i>			<i>Pioglitazona (n=15)</i>		
	Basal	Semana 12	p ^a	Basal	Semana 12	p ^a
Colesterol Total (mg/dL)	143 (124-155)	143 (126-159)	N.S.	133 (119-148)	139 (125-154)	N.S.
Colesterol LDL (mg/dL)	76 (68-101)	78 (63-103)	N.S.	79 (52-85)	75 (64-82)	N.S.
Colesterol HDL (mg/dL)	45 (43-49)	43 (40-57)	N.S.	46 (37-55)	52 (43-61)	0.029
Triglicéridos (mg/dL)	92 (69-182)	91 (66-120)	N.S.	93 (83-114)	80 (74-120)	N.S.
Apolipoproteína AI (mg/dL)	135 (118-139)	129 (119-149)	N.S.	130 (121-154)	136 (122-150)	N.S.
Apolipoproteína B (mg/dL)	62 (55-79)	66 (57-80)	N.S.	64 (57-78)	62 (57-73)	N.S.
Glucosa (mg/dL)	84 (78-92)	84 (75-90)	N.S.	85 (78-88)	79 (72-84)	N.S.
Insulina (mIU/mL)	4.92 (0.84-12.95)	3.51 (1.54-12.78)	N.S.	6.60 (5.11-14.37)	5.40 (3.42-10.34)	0.006
HOMA-RI	1.11 (0.19-2.49)	0.79 (0.32-2.51)	N.S.	1.50 (1.06-2.80)	1.00 (0.67-1.82)	0.008
PCR (mg/L)	1.9 (1.1-3.1)	1.9 (0.9-5.4)	N.S.	2.6 (0.6-4.2)	0.5 (0.4-2.1)	0.026
Amiloide sérico A (mg/L)	3.83 (2.26-9.86)	4.48 (2.75-15.60)	N.S.	4.97 (1.78-8.39)	2.95 (2.05-7.36)	0.036

Mediana (rango intercuartil).

^a = Prueba de Wilcoxon.

LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HOMA-RI: modelo de homeostasis para evaluar la resistencia a la insulina; CRP: proteína C reactiva.

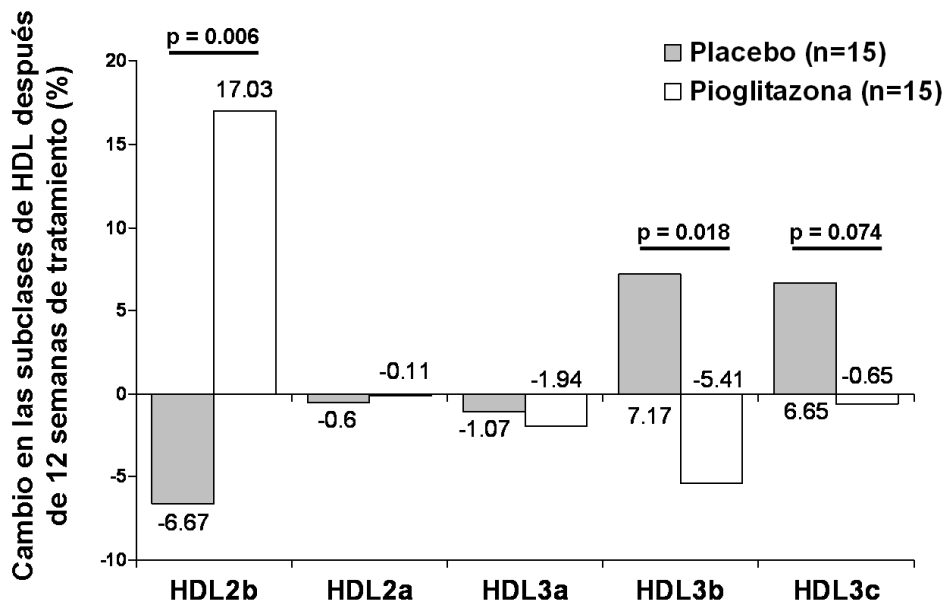


Figura 5. Efecto del tratamiento con placebo o pioglitazona (30 mg/día) sobre la distribución de subclases de HDL. El valor de p se calculó con la prueba U-Mann Whitney, usando la mediana del cambio porcentual de cada subclase de HDL en cada grupo.

Finalmente, al comparar el efecto del tratamiento sobre la función endotelial, se observó que ni el placebo ni la pioglitazona modificaron la función vascular dependiente de endotelio. Sin embargo, la administración de pioglitazona aumentó significativamente (+38.5%; $p = 0.041$) la función vascular independiente de endotelio, mientras que el placebo no mostró efectos importantes (+0.3%; $p = \text{N.S.}$) (Tabla 6). El análisis de correlación de Spearman indicó que en aquellas pacientes que tuvieron mejoría en la función endotelial, el tamaño de las partículas de HDL fue la única variable que se asoció de manera importante con la RFC ($r = 0.738$; $p = 0.037$). El tamaño de las HDL también se asoció con el aumento en la proporción de colesterol libre en HDL ($r = 0.573$; $p = 0.002$), la concentración del C-HDL en plasma ($r = 0.522$; $p = 0.003$), la proporción de ésteres de colesterol en HDL ($r = 0.443$; $p = 0.023$) y con la concentración de la apolipoproteína AI en plasma ($r = 0.411$; $p = 0.027$).

Tabla 6. Efecto del tratamiento con placebo o pioglitazona, sobre la función endotelial dependiente (IVED) e independiente (RFC) de endotelio

		<i>Placebo (n = 15)</i>	<i>Pioglitazona (n = 15)</i>
IVED	Basal	1.28 (1.16-1.46)	1.44 (1.22-1.51)
	Semana 12	1.44 (1.19-2.10)	1.53 (1.25-1.75)
	p	0.551	0.496
RFC	Basal	3.48 (2.87-4.01)	3.01 (2.54-3.55)
	Semana 12	3.47 (2.89-4.18)	4.17 (3.23-5.09)
	p	0.233	0.041

IVED: índice de vasodilatación dependiente de endotelio; RFC: reserva de flujo coronario.

9. DISCUSION:

Los datos del presente trabajo de tesis por primera vez indican, que las pacientes con LES tienen alteración en las características estructurales de las HDL, así como disfunción endotelial de las arterias coronarias, evaluadas por PET. Además, el estudio de tipo prospectivo, aleatorizado y controlado con placebo, mostró que la pioglitazona produce reducciones potencialmente importantes en las concentraciones de insulina, proteína C reactiva y amiloide sérico A en plasma, así como cambios en la composición y en la distribución de subclases de las HDL y mejoría en la función endotelial de las arterias coronarias de pacientes con LES sin complicaciones. Estos hallazgos, en conjunto con los de estudios *in vivo* e *in vitro*, que han reportado los efectos antiinflamatorio y antiaterosclerótico de los agonistas PPAR γ , sugieren que estos fármacos pudieran ser de utilidad en la prevención de la enfermedad cardiovascular.

Es ampliamente aceptado que las pacientes con lupus presentan una tasa importante de morbimortalidad por enfermedad cardiovascular. Los factores de riesgo tradicionales, el lupus mismo y su tratamiento, contribuyen sólo parcialmente al riesgo incrementado de EAC.^{56, 105} La resistencia a la insulina, es un factor de riesgo metabólico emergente, que pudiera jugar un papel crucial en la aterogénesis del LES.⁴⁴ Nuestro grupo de trabajo⁴² y otros autores,³⁹ previamente mostraron que los pacientes con LES se caracterizan por tener valores elevados de insulina en plasma así como sensibilidad a la insulina reducida, anormalidades que se han encontrado asociadas al riesgo cardiovascular elevado de este tipo de pacientes.⁴⁴ El presente estudio muestra que la administración de pioglitazona reduce significativamente la concentración de insulina en plasma y la resistencia a la insulina. Estos hallazgos coinciden con los del estudio en un modelo murino de LES que mostró reducción de la resistencia a la insulina con la administración

de pioglitazona.¹⁰⁶ La mejoría en la sensibilidad a la insulina en pacientes con LES podría reducir el riesgo alto de complicaciones cardiovasculares, independientemente de las concentraciones de glucosa, como se ha observado en otro tipo de pacientes con y sin diabetes mellitus, tratados con pioglitazona.^{117, 118}

Las evidencias sobre la asociación de las alteraciones inflamatorias crónicas y la autoinmunidad, con el desarrollo de la aterosclerosis acelerada en pacientes con LES, han aumentado durante los últimos años.¹¹⁹ Al igual que en otros estudios,¹²⁰ en el presente trabajo, el tratamiento con pioglitazona redujo significativamente las concentraciones de PCR (-70.9%). Además, este es el primer estudio que muestra que el tratamiento con pioglitazona reduce las concentraciones de ASA (-34.9%), la cual es una de las principales proteínas de fase aguda en vertebrados y es sintetizada en el hígado en respuesta a infecciones, inflamación y estrés o daño tisular.¹²¹ La facilidad en la medición del ASA y que se ha mostrado que esta proteína es predictora de eventos cardiovasculares, ha conducido a sugerir que esta proteína puede ser un marcador útil de la enfermedad aterosclerosa.¹²²⁻¹²⁵ Nuestros resultados indican que además de la mejoría en la resistencia a la insulina, la pioglitazona también reduce la inflamación a corto plazo ya que además de reducir la síntesis de TNF- α e IL-6 como previamente se ha reportado,¹²⁶ también reduce la síntesis de PCR y ASA; lo pudiera verse reflejado en la reducción del riesgo de EAC.

La hipertrigliceridemia y los valores bajos de C-HDL son dos componentes característicos de la resistencia a la insulina y del LES.⁵⁶ En el LES, estas anormalidades lipídicas correlacionan con la terapia farmacológica, con la actividad de la enfermedad, con la presencia de síndrome metabólico y con algunas citocinas inflamatorias.^{56, 105, 118, 127} Consistente con un estudio previo,⁶⁴ nosotros encontramos que las concentraciones de C-HDL y triglicéridos en el plasma de las pacientes incluidas,

estaban dentro de límites normales. Esto pudiera ser explicado por el hecho de que las mujeres seleccionadas fueron pacientes sin complicaciones, con baja actividad de la enfermedad y como consecuencia, con dosis bajas de terapia farmacológica. A pesar de tener valores normales de C-HDL, las pacientes del grupo pioglitazona incrementaron la concentración de C-HDL en 14.2%. Estos aumentos son similares a los observados en otros estudios (10-20%).¹²⁰ Se ha sugerido que la señalización de los PPAR pudiera tener efecto directo sobre la expresión del gen del ABCA1¹²⁸ e incrementar el flujo de colesterol de las células hacia la apolipoproteína AI.¹²⁹ Si los PPAR estuvieran involucrados en la regulación de la expresión del gen de ABCA1, el tratamiento con pioglitazona podría tener efectos directos sobre las concentraciones de C-HDL en plasma y sobre las características de las partículas de HDL, como las observadas en el presente estudio.

Aunque es ampliamente aceptado que los valores bajos de C-HDL constituyen un factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis y EAC, en la actualidad existe cada vez más evidencia de que las características de las partículas de HDL pueden ser más importantes que su concentración para proteger contra la aterosclerosis.

⁶⁰ En la primera etapa del presente estudio, se reportó que, comparadas con mujeres sanas de la misma edad, las pacientes con LES tienen HDL enriquecidas en triglicéridos y empobrecidas en esteres de colesterol, así como una baja proporción de HDL grandes y una alta proporción de partículas de HDL pequeñas.⁶⁷ Estas partículas anormales de HDL también se han descrito en otros estados de resistencia a la insulina y se han encontrado asociadas con la prevalencia de EAC y con la recurrencia de eventos coronarios.^{130, 131}

McMahon y cols. reportaron que 48.2% de 276 mujeres con LES tenían HDL proinflamatorias y estas partículas anormales, contribuyeron al incremento de 17 veces la

probabilidad de tener aterosclerosis.⁶⁵ Nuestros resultados mostraron que la pioglitazona modifica el tamaño y la composición de la partícula de HDL y, aunque no pudimos evaluar la funcionalidad ateroprotectora de las HDL después de la terapia con pioglitazona, varios estudios han encontrado que las partículas de HDL pequeñas enriquecidas en triglicéridos y empobrecidas en colesterol, tienen función ateroprotectora disminuida y se asocian con un pobre pronóstico para el desarrollo de enfermedad cardiovascular.^{60, 130, 131} Nuestros resultados sugieren que la pioglitazona pudiera reestablecer las funciones ateroprotectoras de las HDL en pacientes con LES.

Reportes previos en la literatura indican que el tratamiento con pioglitazona mejora la función vascular dependiente de endotelio en pacientes con^{132, 133} y sin diabetes mellitus.^{118, 134} Este efecto está mediado por la modificación favorable de anomalías presentes en estos pacientes y que incluyen disminución de la producción de óxido nítrico, aumento del estrés oxidativo y de la síntesis de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1.^{135, 136} Dado que todas estas alteraciones se encuentran presentes tanto en pacientes con y sin diabetes pero con otros factores de riesgo cardiovascular,¹²⁷⁻¹³⁰ pensamos que la ausencia de mejoría significativa en el IVED de nuestro estudio, pudiera ser explicada por que las pacientes no presentaban otros factores de riesgo cardiovascular. Es importante señalar que la disfunción endotelial en pacientes con LES es parcialmente explicada por una alta actividad de la enfermedad y un estado inflamatorio elevado, el tratamiento farmacológico, la dislipidemia y sobre todo, la elevación del estrés oxidativo.¹³⁷⁻¹⁴⁰ Además de los criterios de selección de nuestra muestra, el equipo empleado para la determinación de la función endotelial (PET), las condiciones en las que se realizó la medición (ver metodología) y la dosis y el tiempo de uso de la pioglitazona, podrían explicar las diferencias en resultados con estudios previos que si mostraron mejoría de la función vascular dependiente de endotelio.

Por otro lado, previamente se ha reportado que el endotelio también es capaz de regular la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular de manera independiente al óxido nítrico, aumentando la entrada de potasio y favoreciendo la propagación de la despolarización de las células de músculo liso para mantener la vasodilatación.¹⁴¹ Los factores involucrados en este proceso (factores derivados del citocromo y posiblemente el péptido natriurético tipo C) han sido poco estudiados, pero se ha visto que pueden compensar la pérdida de la vasodilatación mediada por óxido nítrico y parecen ser de gran relevancia cuando la biodisponibilidad de éste es reducida.¹⁴² Nomura y cols. describieron que la pioglitazona favorece la relajación de diferentes tipos de arterias, por apertura de los canales de potasio en las células del músculo liso.¹³⁶ Estos datos apoyan nuestra observación de que la pioglitazona mejora la vasodilatación independiente de endotelio evaluada por la RFC.

10. CONCLUSIONES:

El presente trabajo muestra que en pacientes con LES sin complicaciones, el tratamiento con pioglitazona disminuye significativamente la resistencia a la insulina, reduce las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva y amiloide sérico A, modifica las características estructurales de las HDL y aumenta la función vascular independiente de endotelio. Estos resultados sugieren que la pioglitazona tiene efectos potencialmente benéficos que podrían conducir a un perfil de riesgo menor para el desarrollo y/o progresión de la aterosclerosis en este tipo de pacientes.

11. PERSPECTIVAS:

A pesar de los beneficios observados con el uso de pioglitazona y tomando en cuenta los criterios de selección utilizados en el diseño del presente estudio, solamente ~15% de pacientes con LES serían elegibles para ser tratadas con dicho fármaco para reducir el riesgo cardiovascular. Sin embargo, es necesario diseñar otro tipo de estudios en donde también se pueda incluir a pacientes con otras complicaciones y con factores de riesgo cardiovascular, para evaluar si éstos, pudieran tener los mismos efectos positivos al ser tratados con pioglitazona. Además, es importante señalar que debido a la corta duración del presente trabajo, los resultados del tratamiento con pioglitazona solo pudieron ser evaluados a corto plazo; por lo que es necesario diseñar más estudios que nos permitan conocer si estos resultados benéficos se mantienen a largo plazo, traduciéndose en un mejor pronóstico cardiovascular.

PAPER

High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus

JG Juárez-Rojas¹, AX Medina-Urrutia¹, R Posadas-Sánchez¹, E Jorge-Galarza¹, E Mendoza-Pérez¹, N Caracas-Portilla¹, G Cardoso-Saldaña¹, G Muñoz-Gallegos² and C Posadas-Romero¹

¹Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico; and ²Department of Rheumatology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico

Little is known about qualitative abnormalities of high-density lipoproteins (HDL) in systemic lupus erythematosus (SLE). We studied distribution and composition of HDL subclasses in 30 premenopausal women with uncomplicated SLE, and 18 controls matched for age and sex. Plasma and HDL lipids were determined by colorimetric enzymatic assays, HDL size distribution by native gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and apolipoproteins in HDL by sodium dodecyl sulphate denaturing PAGE. Compared with controls, SLE patients had significantly lower proportions of HDL_{2b} (−14.7%) and higher proportions of HDL_{3b} (+8.8%) and HDL_{3c} (+23.3%). Cholesteryl ester (−18%) and apolipoprotein AI (−9%) were lower, whereas triglycerides (+32%) and apolipoprotein E (+27%) were higher in SLE HDL ($P < 0.05$; for all). In the whole population, stepwise regression analysis showed that only insulin concentrations ($R^2 = 0.327$) and plasma total apo AI ($R^2 = 0.114$) accounted independently to the variance in HDL size. This study shows that HDL distribution and composition are abnormal in non-complicated SLE patients. These HDL abnormalities have been reported to be associated to impaired atheroprotective properties of HDL and prevalence of coronary heart disease. Therefore, they may contribute to the premature atherosclerosis observed in young women with SLE. *Lupus* (2008) 17, 981–987.

Key words: cardiovascular disease; high-density lipoproteins; systemic lupus erythematosus

Introduction

Accelerated atherosclerosis and its sequelae are increasingly recognized as the most frequent causes of morbidity and mortality in young women with systemic lupus erythematosus (SLE).¹ The aetiology and pathogenesis of atherosclerosis of SLE are multifactorial, and the increased rates of coronary heart disease (CHD) in these patients are only partly explained by the increased levels of traditional risk factors.² In recent years, several studies have reported on non-traditional markers of increased risk for atherosclerotic cardiovascular disease in SLE patients. Higher prevalences of hyperinsulinemia and insulin resistance,^{3,4} increased levels of small dense low-density

lipoproteins (LDL) and increased LDL oxidizability³ and higher proportions of proinflammatory high-density lipoproteins (HDL) associated with elevated levels of oxidized LDL⁵ are some of the new biomarkers of risk found in lupus patients. In non-SLE patients, these abnormalities in insulin, LDL and HDL are known to be associated with CHD.^{4,5} Interestingly, the finding of a higher proportion of proinflammatory HDL in the presence of normal HDL cholesterol (HDL-C) levels⁵ gives support to the current concept that plasma HDL-C levels do not reflect either the concentration of circulating HDL particles or their biological function.^{6,7}

Plasma HDLs are heterogeneous in size, density, lipid composition and possibly in atheroprotective activities.^{7,8} Using non-denaturing gradient gel electrophoresis, HDL may be classified by decreasing size in HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} and HDL_{3c}.⁹ An abnormal distribution of HDL subclasses characterized by low large HDL levels and

Correspondence to: Carlos Posadas-Romero, MD, Juan Badiaro No. 1, Col Sección XVI, Del. Tlalpan, C.P. 14080.

Email: cposadasr@yahoo.com

Received 2 February 2008; accepted 10 April 2008

high small HDL plasma levels has been reported in patients with insulin resistance states, such as obesity,¹⁰ metabolic syndrome¹¹ and type 2 diabetes mellitus.¹² Moreover, it has been shown that in patients with low HDL-C, HDL particles are enriched in triglycerides and depleted of cholesteryl esters (CE).¹¹ These HDL abnormalities may result in HDL attenuated oxidative activity,¹³ reduced anti-inflammatory effect¹⁴ and lower capacity to promote cholesterol efflux,¹⁵ the first step in reverse cholesterol transport (RCT). Furthermore, individuals with this shift toward smaller HDL particles have been found to be at a higher risk for coronary events.¹⁶

Because insulin and lipid-lipoprotein abnormalities in SLE resemble those observed in subjects with insulin resistant,¹⁰⁻¹² we hypothesized that patients with SLE may have HDL qualitative abnormalities. Although Delgado Alves, *et al.*¹⁷ showed lower total HDL, HDL₂ and HDL₃ in SLE patients with respect to controls, they did not report total subclasses distribution and HDL chemical composition. Furthermore, the relationship of HDL subclasses with inflammatory markers and insulin sensitivity is also indeterminate in these patients. Therefore, the aim of this study was to investigate the HDL subclasses distribution and HDL particle chemical composition in adult premenopausal women with SLE and in sex- and age- matched control subjects. We also studied the associations of HDL characteristics with insulin and adiponectin plasma levels.

Patients and methods

Patients

Thirty premenopausal women with SLE, older than 18 years, attending the outpatient rheumatology clinic at the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" (Mexico City; Mexico) were studied. All fulfilled the American College of Rheumatology criteria for the classification of SLE.¹⁸ No patient had clinical evidence of diabetes, thyroid dysfunction, hepatic or liver disease, personal history of high blood pressure, CHD, cerebrovascular events, chronic or acute infections, malignancy or history of chronic alcohol abuse. None of the patients was pregnant at the time of the study nor was taking lipid-regulating drugs. The control group consisted of 18 age-matched women, healthy by self-report, without clinical evidence of lupus or any other rheumatic disease. Subjects were included in the study after they signed the informed consent form for participation. The protocol was

approved by the Institutional Review Board of our hospital.

Clinical assessment

In all participants, information about drug therapy or any disease was obtained through a questionnaire and physical examination. Height (m), weight (kg) and blood pressure were measured, and body mass index (BMI) was calculated by dividing weight by height squared (kg/m²). For the patients, current and cumulative drug therapy was also noted, and SLE disease activity was assessed using the Mexican modification of the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (MEX-SLEDAI).¹⁹ Based on the MEX-SLEDAI, at time of the evaluation, patients were considered to have active disease when the score was more than 5.

Laboratory methods

Venous blood samples were obtained after a 12-h overnight fast. Ethylenedinitrilotetracetate (EDTA) plasma was prepared by centrifugation at 4 °C at 2500 rpm for 20 min, and used for glucose, lipids, and lipoprotein measurements, or stored frozen until their analysis at -70 °C, using aprotinin (100 KIU/mL) and benzamidine (1 mM) as protease inhibitors. Plasma glucose, total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDL-C were measured using standardized enzymatic procedures in a Hitachi 902 analyzer (Hitachi LTD, Tokyo, Japan). Accuracy and precision in our laboratory are under periodic surveillance by the Centers for Disease Control and Prevention service (Atlanta, Georgia, USA). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated by using the Friedewald formula as modified by De Long, *et al.*²⁰ Total high-sensitive C-reactive protein levels (CRP), apolipoprotein B-100 (apo B-100) and apolipoprotein AI (apo AI) were determined by immunonephelometry on a BN Pro Spec nephelometer (Dade Behring Marburg GmbH, Germany) according to the manufacturer method. Inter-assay coefficients of variation were less than 6%. Plasma insulin concentrations were determined by a radioimmunoassay (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, California, USA). Insulin resistance was estimated with use of the homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR).²¹ Adiponectin was determined by ELISA (R & D System, Quantikine Human Adiponectin) in whole serum, according to the manufacturer's guidelines. The intra-assay and interassay coefficients of varia-

tion were less than 10%. The minimum detectable dose was 0.25 ng/mL.

HDL subclasses distribution

HDL separated from plasma by ultracentrifugation in density of 1.21 g/mL was loaded into a native 4–30% polyacrylamide gradient gel. After polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PAGE), gels were stained for proteins with Coomassie brilliant blue R-250 and scanned and digitalized in a GS-670 Bio-Rad densitometer, and the software Molecular Analyst™ was used for the analysis. Migration distance intervals of each gel was calculated by computing a standard curve of the protein-stainable high molecular weight (HMW) standards (thyroglobulin, 17 nm; ferritin, 12.2 nm; catalase, 10.4 nm; lactate dehydrogenase, 8.2 nm and albumin, 7.1 nm) as a function of their relative migration distance.^{22,23} The relative proportion of each HDL subclass was estimated with the following size intervals: HDL_{3c} 7.21–7.76 nm; HDL_{3b} 7.76–8.17 nm; HDL_{3a} 8.17–8.77 nm; HDL_{2a} 8.77–9.71 nm and HDL_{2b} 9.71–12.93 nm. The coefficient of variation for each subclass was less than 10%. The average HDL particle size represents the overall distribution of the HDL subclasses^{22,23} and was calculated as the average size of each HDL subclass interval (nm), multiplied by its relative area under the densitometric scan. Coefficient of variation for this determination was less than 1%.

Composition of HDL

Total protein, TC, free cholesterol (FC), phospholipid (PL) and TG contents of isolated HDL were determined using commercially available enzymatic assays in a Hitachi 902 analyzer. CEs were calculated by multiplying the difference between total and free cholesterol by 1.67.²⁴ Apolipoprotein content (apo A-I, apo A-IV, apo-E and apo-Cs) was evaluated semi quantitatively by SDS-PAGE.²³

Statistical analysis

All analyses were carried out using statistical software SPSS 9.0 for WINDOWS (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and non-normally distributed data were transformed by use of the natural logarithm to approach a Gaussian distribution. Between-group differences were analyzed by Student's *t* test for independent groups. Pearson correlation coefficients were calculated to evaluate relationship between variables. Multivariate stepwise linear regression analysis was

performed to determine the relative contribution of the variables studied to the mean HDL size. All results with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Clinical and biochemical characteristics showed no differences in age, BMI and blood pressure between the two groups (Table 1). On the contrary, the lipid profile in SLE patients was characterized by lower plasma levels of TC (–13%), LDL-C (–17%), HDL-C (–19%) and apo AI (–9.2%). No statistical differences were observed in triglycerides and apo B-100. Although plasma glucose levels were similar in the two groups, patients were distinguished by a marked degree of insulin resistance, with higher plasma insulin levels (+105%) and HOMA-IR (+149%) relative to healthy women. SLE patients also had higher levels of plasma CRP (+329%), but unexpectedly, their plasma adiponectin levels were not different to those of controls. However, when patients were divided into two subgroups, one with BMI > 25 ($n = 13$; mean BMI = 32.8 ± 3.2) and the other with BMI ≤ 25 ($n = 17$; mean BMI = 21.6 ± 2.1), we found that those with excess body weight had lower adiponectin concentrations (8.3 ± 2.9 vs 10.9 ± 3.7 ; $P = 0.051$), higher levels of fasting insulin (12.7 ± 9.1 vs 5.36 ± 4.0 ; $P = 0.008$) and of HOMA-IR (3.2 ± 3.0 vs 1.2 ± 1 ; $P = 0.02$) compared with normal weight patients. In addition, when patients were divided into steroid users (76.6%) and non-users (23.4%) no differences in clinical or biochemical parameters were found (data not shown).

The analysis of the HDL subclasses distribution showed that, compared with controls, SLE patients had significantly lower proportions of HDL₂ (–9%) and significantly higher proportions of HDL₃ (+10%) particles (Figure 1). These changes in the two major HDL subclasses were because of a decrease of HDL_{2b} (–15%) and by an increase in the proportions of HDL_{3b} (+9%) and particularly of the smallest particles HDL_{3c} (+23%). This shift in the subclasses distribution toward smaller particles resulted in an HDL size significantly smaller in SLE patients (9.13 ± 0.17 nm vs 9.29 ± 0.15 nm in controls; $P = 0.002$).

HDL chemical composition expressed as a percentage of total lipoprotein mass was different in patients and controls. A significantly lower proportion of CE was found in HDL from SLE patients than in HDL from control women (11.0 ± 2.2 vs 13.4 ± 2.3 ; $P = 0.002$). Moreover, patients' HDL was enriched in TG (5.8 ± 2.4 vs 4.4 ± 1.4 ; $P = 0.031$). No

Table 1 Clinical and biochemical characteristics of SLE and control women^a

	Control (n = 18)	SLE (n = 30)	P
Age (years)	30.3 ± 8.1	31.2 ± 8.7	NS
BMI (Kg/m ²)	24.3 ± 4.4	26.2 ± 6.3	NS
SBP (mm Hg)	105.3 ± 7.5	108.4 ± 15.1	NS
DBP (mm Hg)	68.6 ± 7.1	71.7 ± 11.2	NS
TC (mg/dL)	167.6 ± 34.1	144.6 ± 32.4	0.027
LDL-C (mg/dL)	97.0 ± 26.9	80.2 ± 23.6	0.036
HDL-C (mg/dL)	51.8 ± 10.6	41.8 ± 12.7	0.005
Triglycerides (mg/dL) ^b	116.8 ± 57.3	149.1 ± 77.3	NS
Apo AI (mg/dL)	158.4 ± 22.4	143.9 ± 25.1	0.045
Apo B-100 (mg/dL)	86.8 ± 23.4	85.7 ± 23.1	NS
CRP (mg/L) ^c	1.7 ± 3.0	7.3 ± 9.2	<0.001
Adiponectin (µg/mL)	9.3 ± 2.9	10.9 ± 3.1	NS
Glucose (mg/dL)	79.9 ± 6.9	85.5 ± 13.7	NS
Insulin (µU/mL) ^c	4.3 ± 2.3	8.8 ± 7.1	0.028
HOMA-IR ^b	0.83 ± 0.48	2.07 ± 2.13	0.015

Abbreviations: SLE: systemic lupus erythematosus; BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; TC: total cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; Apo, apolipoprotein; CRP: C-reactive protein; HOMA-IR: homeostasis model assessment-insulin resistance; NS: non-significant.

^aMean ± SD; ^cP values were determined by Student's *t*-test.

^bValues were log transformed for comparisons.

significant differences in percent contents of FC, PL and total protein were found (data not shown). Similar to the lower levels of total apo AI in plasma from SLE patients, the analysis of apolipoprotein HDL composition showed that patients' HDL had a lower proportion of apo AI (-9.2%) relative to controls (46.2 ± 4.7 vs 50.9 ± 7.0; *P* = 0.012). In addition, a higher proportion of apo E was observed in SLE group (5.7 ± 1.7 vs 4.8 ± 0.9; *P* = 0.026). The relative contents of apo A-II, apo A-IV and apo-C's were similar in the two groups (data not shown).

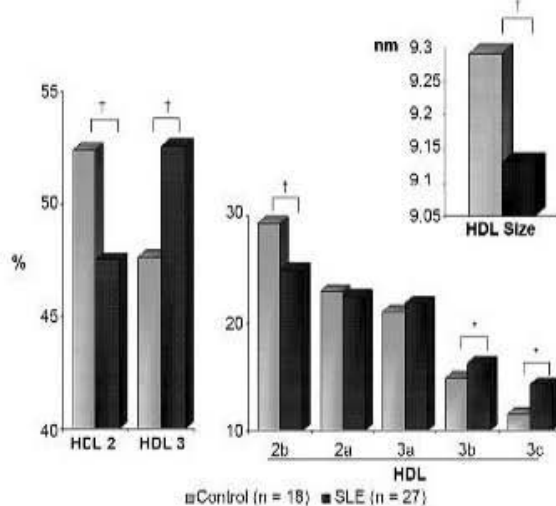


Figure 1 Mean percent values of HDL subclasses and HDL size in SLE and control women. HDL = high-density lipoprotein; SLE = systemic lupus erythematosus; HDL 2 = Sum of HDL_{2b} and HDL_{2a}; HDL 3 = Sum of HDL_{3a}, HDL_{3b} and HDL_{3c}. **P* < 0.05; †*P* < 0.005; ‡-Student.

The associations of HDL mean size with clinical and biochemical variables were determined by simple correlation analysis. Among the SLE patients, average HDL size was positively related with plasma total apo AI (*r* = 0.388; *P* = 0.045) and negatively with plasma glucose (*r* = -0.462; *P* = 0.015), CRP (*r* = -0.439; *P* = 0.022) and HOMA-IR (*r* = -0.461; *P* = 0.02). No relationships were found between HDL size and drug therapy (use and dosage of prednisone and chloroquine), disease activity, disease duration time and other clinical and biochemical characteristics. Figure 2 shows the results of the correlation analyses between average HDL size and clinical and biochemical parameters in the whole population studied. The HDL size showed a significant positive correlation with HDL-C and plasma total apo AI and was inversely related to BMI, systolic blood pressure, glucose, CRP, insulin and HOMA-IR. Stepwise regression analysis (Table 2) was performed in the pooled study sample to determine the independence of these associations. Age, BMI, systolic and diastolic blood pressure, glucose, TC, TG, LDL-C, HDL-C, total apo AI, apo B-100, CRP, insulin and HOMA-IR were used as independent variables, and HDL size was entered as the dependent variable. Insulin concentrations and plasma total apo AI accounted for 44.1% of the variance in HDL size (Table 2).

Discussion

High TG levels and low HDL-C are lipoprotein abnormalities characteristic of insulin resistance states and of patients with SLE. Insulin resistance favours

Table 2 Multivariate stepwise linear regression analysis using HDL size as dependent variable in SLE and control women pooled as a whole^a

	β	R ² (%)	P
Insulin	-0.527	32.7	<0.001
Apo AI	0.341	11.4	0.011

Abbreviations: HDL: high-density lipoprotein; SLE: systemic lupus erythematosus; β : standardized coefficient; R²: adjusted variance as explained by the variable.

^aModel included the following independent variables: age, body mass index, systolic and diastolic blood pressure, glucose, total cholesterol, triglycerides, low and high-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein AI and B-100, C-reactive protein, insulin and HOMA-IR.

the release of free fatty acids (FFA) by the adipocyte.²⁵ These FFA are used by the liver for triglyceride synthesis. As a consequence of this accelerated hepatic triglyceride synthesis, there is an increase in very low density lipoprotein (VLDL) secretion, which combined with a low VLDL clearance, by a decrease in the activity of lipoprotein lipase,²⁶ results in high TG plasma levels. Mediated by the action of the cholesterol ester transfer protein, an important amount of TG within VLDLs is exchanged for CE with LDL and HDL.²⁷ As a result of this exchange, LDL and HDL particles are enriched in TG and depleted in CE. This TG enrichment makes LDL and HDL in more favourable substrates for the action of the hepatic lipase, which during the TG hydrolysis process forms dense and small particles. This metabolic model seems to adequately explain the condition of our SLE patients, who in addition to having low

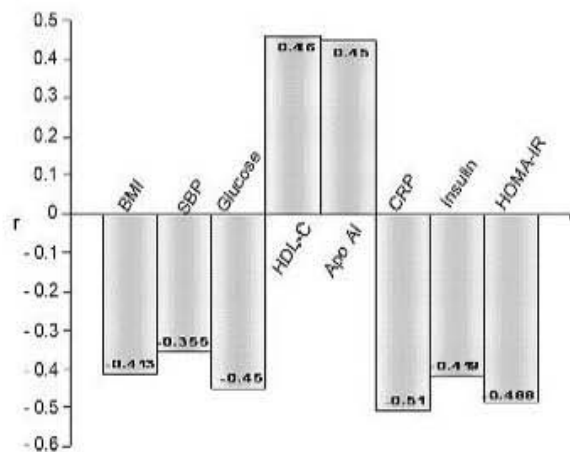


Figure 2 Pearson correlation coefficient (r) between HDL size and clinical and biochemical characteristics, in SLE and control women pooled as a whole. SLE = systemic lupus erythematosus; BMI = body mass index; SBP = systolic blood pressure; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; Apo = apolipoprotein; CRP = C-reactive protein. *P* < 0.05 for all.

HDL-C levels, slightly elevated TG levels and an increase in insulin and HOMA-IR with respect to controls and also had a smaller proportion of HDL₂ particles, a higher proportion of HDL₃ and an altered chemical composition of these HDL particles with an increase in TG content and a decrease in CE. Moreover, on the multiple lineal regression analyses, insulin concentration was the variable with the highest independent effect on HDL size variance. However, given our small sample size, some caution should be used in interpreting the data.

Although it is a widely accepted notion that low HDL-C levels constitute an independent risk factor for premature atherosclerosis and CHD, recent evidence indicates that other biomarkers related with HDL seem to be more useful in predicting cardiovascular events. It has been showed that subjects with low HDL-C have low concentrations of large HDL particles and high levels of small HDLs compared with control normolipidemic subjects.²⁸ After adjusting for traditional risk factors, this abnormal pattern of HDL subclasses distribution has been associated with CHD²⁹ and is more useful than HDL-C levels alone to predict the recurrence of coronary events in patients with CHD and low HDL-C.¹⁶ The precise mechanisms by which the preponderance of small HDL particles can increase CHD risk have not been clearly defined. However, this relationship might well be explained, at least in part, by the attenuation in the antioxidant,^{12,13} anti-inflammatory¹⁴ and HDL promoting cholesterol efflux¹⁵ activities found in patients with low HDL-C.

The reduction of the atheroprotective properties of HDL in metabolic diseases suggests the possibility of an indirect proatherogenic effect of these particles. For example, the decreased capacity of HDL to promote cholesterol efflux could result in an increase in cholesterol accumulation within the vessel wall by a decrease in the RCT. It is thought, although it has not been showed, that this decrease in the efficiency of RCT explains the epidemiological relationship between low HDL-C levels and a greater incidence of cardiovascular disease.^{30,31} It has been postulated that lipoprotein oxidation in the vessel wall (particularly of LDL) and the subsequent inflammation are key elements in atherogenesis.³² Therefore, the deficiency of HDL's antioxidant and anti-inflammatory properties also may favour accelerated atherosclerosis. In normal conditions, the smaller and more dense particles are the most active in promoting cholesterol efflux,³³ in protecting LDL against oxidation⁸ and in attenuating inflammation.³⁴ However, in subjects with low HDL-C levels, the small HDL particles are the most

affected in their antioxidant capacity, which is related with the TG enrichment and CE depletion of HDL, as well as with the increase in oxidative stress and a chronic inflammatory state as expressed by high CRP levels.^{11,13} Given that an increase in oxidative stress has been shown in SLE,^{35,36} and that, in addition to low HDL-C levels, our patients showed HDL subclasses distribution with a shift toward smaller particles, a decrease in the average HDL size, abnormal HDL chemical composition and elevated CRP levels, it is possible that even in the absence of diabetes, hypertension, kidney disease, or other complications, atheroprotective HDL functions could be decreased in lupus patients. This notion is supported by the study of McMahon, *et al.*⁵ showing increased proportions of proinflammatory HDL with impaired ability to protect LDL from oxidation in SLE patients.

Adiponectin is a cytokine synthesized in the adipose tissue inversely associated with the degree of adiposity and insulin resistance.³⁷ Low levels of adiponectin have been found in patients with obesity, DM and CHD.³⁸ As a group, our SLE patients had similar adiponectin levels as the control group; however, when patients were divided by BMI, we observed that those with a BMI > 25 showed significantly higher insulin and HOMA-IR levels, as well as lower adiponectin levels ($P = 0.051$) compared with those with BMI < 25. These data are consistent with those reported previously in subjects with obesity and insulin resistance.³⁸

In conclusion, premenopausal SLE women without diabetes, high blood pressure, renal, hepatic or neurologic complications show abnormalities in HDL chemical composition, as well as in the subclasses distribution, that are associated with hyperinsulinemia. These HDL abnormalities have been found to be associated with an altered HDL function and a greater cardiovascular risk. Then, it is possible that low HDL-C levels and HDL with altered function could act together to accelerate atherosclerosis in patients with SLE. Our results indicate that, as in the general population, in patients with SLE a promotion of a healthy diet, regular exercise and the avoidance of obesity and thus of insulin resistance should be advocated to ultimately improve HDL in terms of concentration and quality.³⁹ The use of niacin or fibrates, useful drugs for decreasing triglycerides, increasing HDL-C levels and favourably modifying the chemical composition and function of HDL,³⁹ could be a promising therapeutic approach to improve the lipoprotein profile, to reduce inflammation and to attenuate atherosclerosis in patients with metabolic abnormalities as those observed in SLE.

Acknowledgements

Grant supporters: This work was partially supported by grant 57997 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", Mexico (Protocol number 05-487 and 05-488).

References

- 1 Wajed, J, Ahmad, Y, Durrington, PN, Bruce, IN. Prevention of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus—proposed guidelines for risk factor management. *Rheumatology (Oxford)* 2004; **43**: 7–12.
- 2 Jimenez, S, Garcia-Criado, MA, Tassies, D, *et al.* Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2005; **44**: 756–761.
- 3 Posadas-Romero, C, Torres-Tamayo, M, Zamora-González, J, *et al.* High insulin levels and increased low-density lipoprotein oxidizability in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 160–165.
- 4 Tso, TK, Huang, WN. Elevated soluble intercellular adhesion molecule-1 levels in patients with systemic lupus erythematosus: relation to insulin resistance. *J Rheumatol* 2007; **34**: 726–730.
- 5 McMahon, M, Grossman, J, FitzGerald, J, *et al.* Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54**: 2541–2549.
- 6 Kontush, A, Chapman, MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 342–374.
- 7 Barter, P, Kastelein, J, Nunn, A, Hobbs, R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis: the unanswered questions. *Atherosclerosis* 2003; **168**: 195–211.
- 8 Kontush, A, Chantepie, S, Chapman, MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 1881–1888.
- 9 Williams, PT, Krauss, RM, Nichols, AV, Vranizan, KM, Wood, PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; **31**: 1131–1139.
- 10 Perez-Mendez, O, Torres-Tamayo, M, Posadas-Romero, C, *et al.* Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; **376**: 17–22.
- 11 Hansel, B, Giral, P, Nobecourt, E, *et al.* Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**: 4963–4971.
- 12 Garvey, WT, Kwon, S, Zheng, D, *et al.* Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 2003; **52**: 453–462.
- 13 Kontush, A, de Faria, EC, Chantepie, S, Chapman, MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis* 2005; **182**: 277–285.
- 14 Calabresi, L, Gomarachi, M, Villa, B, Omoboni, L, Dmitrieff, C, Franceschini, G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22**: 656–661.
- 15 Brites, FD, Bonavita, CD, De 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.
- 16 Asztalos, BF, Collins, D, Cupples, LA, *et al.* Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovas-

- cular events in the veterans affairs HDL intervention trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 2185-2191.
- 17 Delgado Alves, J, Ames, PRJ, Donohue, S, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and β_2 -glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; **46**: 2686-2694.
 - 18 Tan, EM, Cohen, AS, Fries, JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**: 1271-1277.
 - 19 Guzman, J, Cardiel, MH, Arce-Salinas, A, Sanchez-Guerrero, J, Alarcon-Segovia, D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; **19**: 1551-1558.
 - 20 DeLong, DM, DeLong, ER, Wood, PD, Lippel, K, Rifkind, BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *JAMA* 1986; **256**: 2372-2377.
 - 21 Matthews, DR, Hosker, JP, Rudenski, AS, Naylor, BA, Treacher, DF, Turner, RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412-419.
 - 22 Perusse, M, Pascot, A, Despres, JP, Couillard, C, Lamarche, B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res* 2001; **42**: 1331-1334.
 - 23 Blanche, PJ, Gong, EL, Forte, TM, Nichols, AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; **665**: 408-419.
 - 24 Chapman, MJ, Goldstein, S, Lagrange, D, Laplaud, PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981; **22**: 339-358.
 - 25 Sniderman, AD, Scantlebury, T, Cianflone, K. Hypertriglyceridemic hyperapob: the unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2001; **135**: 447-459.
 - 26 Panarotto, D, Remillard, P, Bouffard, L, Maleux, P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 2002; **32**: 84-92.
 - 27 Taskinen, MR. Insulin resistance and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995; **6**: 153-160.
 - 28 Asztalos, BF, Roheim, PS, Milani, RL, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 2670-2676.
 - 29 Asztalos, BF, Cupples, LA, Demissie, S, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the framingham offspring study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 2181-2187.
 - 30 Assmann, G, Nofer, JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003; **54**: 321-341.
 - 31 Navab, M, Ananthramiah, GM, Reddy, ST, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; **45**: 993-1007.
 - 32 Steinberg, D, Witztum, JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation* 2002; **105**: 2107-2111.
 - 33 Ohta, T, Saku, K, Takata, K, Nakamura, R, Ikeda, Y, Matsuda, I. Different effects of subclasses of HDL containing apoA-I but not apoA-II (LpA-I) on cholesterol esterification in plasma and net cholesterol efflux from foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; **15**: 956-962.
 - 34 Ashby, DT, Rye, KA, Clay, MA, Vadas, MA, Gamble, JR, Barter, PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 1450-1455.
 - 35 Michel, P, Eggert, W, Albrecht-Nebe, H, Grune, T. Increased lipid peroxidation in children with autoimmune diseases. *Acta Paediatr* 1997; **86**: 609-612.
 - 36 Ames, PR, Alves, J, Murat, I, Isenberg, DA, Nourooz-Zadeh, J. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38**: 529-534.
 - 37 Arita, Y, Kihara, S, Ouchi, N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **257**: 79-83.
 - 38 Kumada, M, Kihara, S, Sumitsuji, S, et al. Osaka CAD Study Group. Coronary artery disease. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**: 85-89.
 - 39 Morgan, J, Carey, C, Lincoff, A, Capuzzi, D. High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep* 2004; **6**: 359-365.

13. ANEXO 2 (ARTÍCULO SEGUNDO):

Endothelial Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus: Evaluation with ^{13}N -Ammonia PET

Erick Alexanderson^{1,2}, Juan M. Ochoa², Rodrigo Calleja², Juan G. Juárez-Rojas³, John O. Prior⁴, Rodrigo Jácome², Edgar Romero², Aloha Meave^{1,2}, and Carlos Posadas-Romero³

¹Department of Nuclear Cardiology and Cardiac Imaging, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," México City, México; ²PET/CT Cyclotron Unit, Facultad de Medicina, UNAM, México City, México; ³Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," México City, México; and ⁴Department of Nuclear Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois et Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

Systemic lupus erythematosus (SLE) affects multiple organs and systems, severely involving the cardiovascular system. The aim of this study was to evaluate the presence of endothelial dysfunction with ^{13}N -ammonia PET in asymptomatic SLE patients. **Methods:** We enrolled 16 women with SLE and 16 healthy women. Myocardial blood flow (MBF) was quantified in a 64-slice PET/CT scanner at rest, during a cold pressor test (CPT), and during stress. Endothelium-dependent vasodilation index, $\% \Delta \text{MBF}$, and myocardial flow reserve (MFR) were calculated. **Results:** There were 16 women in the SLE group (mean age \pm SD, 31.4 \pm 8.3 y) and 16 women in the healthy control group (31.5 \pm 11.1 y). Mean endothelium-dependent vasodilation index and $\% \Delta \text{MBF}$ were significantly lower in SLE patients (1.18 \pm 0.55 vs. 1.63 \pm 0.65, $P = 0.04$, and 18 \pm 55 vs. 63 \pm 65, $P = 0.04$, respectively). MFR was also lower in the SLE group (2.41 \pm 0.59 vs. 2.73 \pm 0.77, $P = 0.20$). **Conclusion:** SLE patients who are free of active disease present abnormal coronary flow and endothelial dysfunction. It is necessary to develop and intensify treatment strategies directed to CAD in SLE patients.

Key Words: ^{13}N -ammonia PET; endothelium-dependent vasodilation index; endothelial dysfunction; MFR; systemic lupus erythematosus

J Nucl Med 2010; 51:1927–1931
DOI: 10.2967/jnumed.110.078212

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that affects multiple organs and systems and in which the cardiovascular system is severely involved; myocardial infarction and stroke constitute the main cause of death (1). In one study, after the Framingham risk factors for coronary heart disease had been taken into account, patients with SLE showed a 10- and 17-fold increase in

nonfatal myocardial infarction and death due to coronary heart disease, respectively (2).

Various studies have shown that patients with SLE have a higher prevalence of classic cardiovascular risk factors (3). Besides, there are SLE-related risk factors, such as steroid therapy (4). Despite various explanations citing vascular damage as a cause of accelerated atherosclerosis, a specific cause has not been highlighted. However, SLE itself has been shown to represent an independent risk factor for coronary heart disease secondary to endothelial dysfunction (5).

Endothelial dysfunction represents the inability of the endothelium to appropriately modulate myocardial blood flow (MBF) by the secretion of nitric oxide and is considered an early marker of atherosclerosis (6). Endothelial dysfunction has been demonstrated in SLE using brachial artery Doppler ultrasound (7). However, such measurements are unable to detect subclinical atherosclerosis. Coronary microvascular dysfunction has previously been detected with PET in patients with rheumatoid arthritis and SLE by assessing the integrated vasodilator capacity (myocardial flow reserve [MFR], an endothelium-independent index of coronary function (8)) but not by assessing endothelium-dependent coronary vasomotor function (a more reliable index of endothelial dysfunction (9)). Therefore, the current study might have been the first that evaluated both cardiac disease-dependent and -independent coronary endothelial function by quantifying MBF in absolute terms with ^{13}N -ammonia PET in SLE patients.

The aim of this study was, then, to use ^{13}N -ammonia PET to evaluate the presence of endothelial dysfunction in asymptomatic, uncomplicated SLE patients who were under pharmacologic treatment.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Sixteen women diagnosed with SLE were enrolled in this study. All were 18 y old or older. Throughout the study, each patient was taking low-dose steroids (56.2%) or antimalarial drugs (87.5%). All fulfilled the American College of Rheumatology Criteria for the disease and had been diagnosed with SLE for 7 \pm 4.5 y. At the

Received Apr. 15, 2010; revision accepted Sep. 8, 2010.
For correspondence or reprints contact: Erick Alexanderson Rosas, Department of Nuclear Cardiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," Juan Badiano #1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México City, D.F. 14080, México.
E-mail: alexanderick@yahoo.com
COPYRIGHT © 2010 by the Society of Nuclear Medicine, Inc.

time of the study they were asymptomatic, showing no evidence of active disease as assessed by the MEX-SLEDAI Disease Activity Index (10). According to that index, a score greater than 5 is considered to indicate active disease, and our group of SLE patients had a mean score of 2.45. The control group consisted of 16 age-matched healthy women without clinical evidence of lupus or any other disease. Because hormonal fluctuations of the menstrual cycle are known to affect coronary flow regulation, the analysis was performed within the first 8 d of the patient's menstrual cycle. Exclusion criteria included previous myocardial infarction demonstrated by electrocardiography, a history of chest pain, diabetes mellitus, hypertension, cerebral vascular disease, use of oral contraceptives, smoking or drug abuse, known hypersensitivity to any of the substances used during the study, and pregnancy or lactation at the time of the study. Patients were instructed to fast 8–12 h before the test and to avoid food or drinks containing methyl xanthenes for more than 48 h before the study. Medical history, physical examination, and laboratory examinations were obtained before the PET study. The ethics committee of the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" approved the protocol, and each patient gave written consent before participating in the study.

Image Acquisition

MBF was quantified at rest and during a cold pressor test (CPT), as well as during adenosine-induced hyperemia, using dynamic ^{13}N -ammonia PET/CT in a 64-slice scanner (Biograph TruePoint; Siemens). All data were acquired in list-mode format (11).

After the first intravenous administration of ^{13}N -ammonia (740 MBq), resting serial transaxial dynamic images were acquired in a sequence of 16 image frames (12×10 s, 2×30 s, 1×60 s, and 1×900 s) (12). The CPT was performed 30 min later by immersing the left hand of the patient in ice-cold water (4°C) for 2 min. The ^{13}N -ammonia (740 MBq) injection and PET sequence were initiated 1 min into the hand immersion. Finally, 30 min after the end of CPT, a $140 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ intravenous infusion of adenosine was administered over 6 min. ^{13}N -ammonia (740 MBq) was administered at the end of the second minute of the adenosine-infusion phase, and serial images were recorded in the same sequence. Vital signs and a 12-lead electrocardiogram were monitored continuously throughout the study. The acquisition protocol is depicted in Figure 1.

Image Processing

Regional MBF was quantified for the rest phase and, separately, for the adenosine-stress phase. The sinograms were corrected for attenuation and reconstructed on a dedicated workstation using standard iterative algorithms. The images were analyzed using the PMOD software package (version 3.0, PMOD Technologies Ltd.). Myocardial images were then generated directly from the dynamic ^{13}N -ammonia study, using the last 900-s image. After the myocardial images had been reoriented along the heart axis to form

vertical long-axis, horizontal long-axis, and short-axis slices, regions of interest were drawn within the left ventricle on 4–6 consecutive image planes and were projected onto the dynamic ^{13}N -ammonia images to generate blood time-activity curves (input function) and onto the right ventricle to correct for spillover of the septum. Similarly, myocardial regions of interest were drawn on the short-axis slices within the left ventricular myocardium for at least 12 consecutive image planes and were projected onto the dynamic ^{13}N -ammonia images to obtain tissue-activity curves. Time-activity curves were used to calculate mean MBF from the first 12 serially acquired, short-axis slices after myocardial regions of interest had been assigned to the myocardial territories of the left anterior descending, left circumflex, and right coronary arteries on 3 midventricular slices. Both arterial and tissue-activity curves were corrected for physical decay and fitted to a previously validated 2-compartment tracer kinetic model to give values of regional and global MBF ($\text{mL}/\text{min}/\text{g}$), as previously described (13).

Data Interpretation

Mean values of global MBF are given in $\text{mL}/\text{min}/\text{g}$ of myocardium. Rest and CPT MBF were corrected for their corresponding rate-pressure product (RPP) using the following equation: $(\text{MBF}/\text{RPP}) \times 10^4$ (14). Endothelium-dependent vasodilatation index (MBF during CPT/MBF at rest), $\%\Delta\text{MBF}$ ($\%\Delta\text{MBF}$ of CPT from rest), and MFR (stress MBF/rest MBF) were also calculated using RPP-corrected values. The ΔMBF (difference in flow between CPT and baseline) was calculated using uncorrected MBF values, because they have been shown to be independent of the baseline RPP (15).

Statistical Analysis

Results from the SLE group were compared with those from the healthy control group.

Endothelium-dependent vasodilatation index, MFR, $\%\Delta\text{MBF}$, and ΔMBF were used to evaluate endothelial dysfunction (16). Values are presented as mean \pm SD and were compared using the Student 2-tailed unpaired *t* test. Statistical analysis was performed using SPSS, version 17. A *P* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

The 16 women in the SLE group had a mean age of 31.4 ± 8.3 y. The 16 age-matched women in the healthy control group were 31.5 ± 11.1 y old. Study population characteristics are shown in Table 1. During the study, no important electrocardiography changes were observed. The hemodynamic findings, shown in Table 2, highlight the differences in hemodynamic RPP response between the 2 study groups, as demonstrated by the δ -RPP result (0.37 ± 0.26 in the SLE group vs. 0.16 ± 0.20 in the control group, $P = 0.01$) (Table 2).

FIGURE 1. Dynamic list-mode PET acquisition protocol. CTAC = CT attenuation correction; LM = List mode. *Wait time for radionuclide decay.

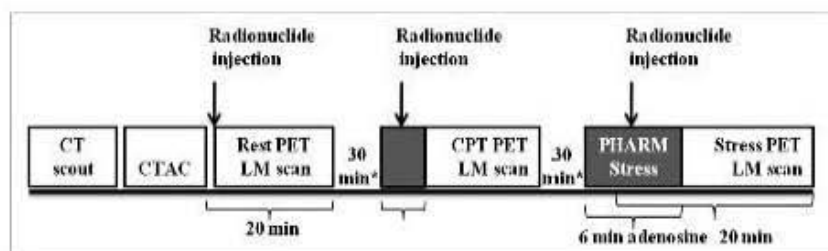


TABLE 1
Study Population Characteristics

Characteristic	SLE	Healthy control	P
No. of patients	16	16	—
Age (y)	31.4 ± 8.3	31.5 ± 11.1	0.62
Sex, female (%)	100%	100%	—
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 3.6	22.2 ± 1.6	0.52
Fasting glucose (mg/dL)	87.2 ± 4.9	77.6 ± 5.2	0.0001
Total cholesterol (mg/dL)	130.1 ± 20.6	159.6 ± 27.2	0.02
LDL-C (mg/dL)	67.1 ± 22.2	88.1 ± 18.4	0.007
HDL-C (mg/dL)	47.6 ± 9.4	54.7 ± 6	0.16
LDL-C/HDL-C index(mg/dL)	1.4	1.6	0.43
Triglycerides (mg/dL)	107.4 ± 62.5	118.4 ± 35.1	0.54
Creatinine (mg/dL)	0.83 ± 0.1	0.85 ± 0.1	0.65
Basal heart rate (beats/min)	67 ± 11	70 ± 6	0.33
Basal blood pressure (systolic/diastolic; mm Hg)	107 ± 9/74 ± 7	101 ± 10/68 ± 5	0.92/0.14

BMI = Body mass index; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C = low density lipoprotein cholesterol. Data are mean ± SD.

Uncorrected and corrected MBF values during rest, CPT, and adenosine stress are shown in Table 3. Individual flow responses from rest to CPT, as well as individual responses to adenosine administration, are shown in Figure 2. Rest MBF was similar between the groups (0.71 ± 0.15 vs. 0.73 ± 0.27 , $P = 0.7$). Uncorrected CPT MBF was statistically similar (1.07 ± 0.33 vs. 1.45 ± 0.85 , $P = 0.11$); however, when corrected for differences in RPP, CPT MBF was significantly lower in the SLE group than in the healthy control group (1.16 ± 0.48 vs. 1.94 ± 1.15 , $P = 0.01$). Interestingly, there was a trend toward decreased stress MBF in the SLE group (2.34 ± 0.39 vs. 2.96 ± 1.18 , $P = 0.058$).

Mean endothelium-dependent vasodilatation index, % Δ MBF, Δ MBF, and MFR are shown in Table 4. Mean endothelium-dependent vasodilatation index and %

Δ MBF were significantly lower in the SLE group than in the healthy control group (1.18 ± 0.55 vs. 1.63 ± 0.65 , $P = 0.04$, and 18 ± 55 vs. 63 ± 65 , $P = 0.04$, respectively). Δ MBF was lower in the SLE group than in the healthy control group, but the difference was not statistically significant (0.37 ± 0.35 vs. 0.71 ± 0.63 , $P = 0.06$).

MFR was also lower in the SLE group—lower than the cutoff of normality (>2.5)—although the difference between groups was not statistically significant ($P = 0.2$). That being said, if uncorrected rest MBF is used to determine MFR, there is a significant difference between the SLE group and the healthy control group (4.11 ± 1.02 vs. 3.37 ± 0.64 , $P = 0.02$, respectively) (Table 4).

Possible associations between MBF and disease duration, steroid treatment, or disease activity indices were assessed. However, no statistical correlations were found between these variables.

TABLE 2

Hemodynamic Findings in Both Study Groups During Rest, CPT, and Pharmacologic Stress

Parameter	SLE	Healthy control	P
Heart rate (beats/min)			
Rest	67 ± 11	62 ± 6	0.68
CPT	81 ± 20	67 ± 8	0.01
Stress	96 ± 13	88 ± 11	0.06
Systolic blood pressure (mm Hg)			
Rest	107 ± 9	108 ± 13	0.74
CPT	120 ± 8	113 ± 9	0.03
Stress	117 ± 9	112 ± 10	0.17
RPP			
Rest	7,201 ± 1,434	6,628 ± 833	0.18
CPT	9,819 ± 2,584	7,583 ± 845	0.03
Stress	11,200 ± 1,911	9,729 ± 998	0.01
δ -RPP (%)	37% ± 26%	16% ± 20%	0.01

δ -RPP = percentage change in RPP between rest and CPT = (RPP CPT - RPP rest)/RPP rest.

Data are mean ± SD.

DISCUSSION

This study compared MBF between a group of SLE patients and a healthy control group. At rest and during CPT, MBF depends on left ventricular myocardial work and

TABLE 3
MBF During the 3 Phases of PET Study

MBF	SLE	Healthy control	P
Rest			
Uncorrected	0.71 ± 0.15	0.73 ± 0.27	0.73
Corrected	1.00 ± 0.17	1.13 ± 0.43	0.27
CPT			
Uncorrected	1.07 ± 0.33	1.45 ± 0.85	0.11
Corrected	1.16 ± 0.48	1.94 ± 1.15	0.01
Stress			
Uncorrected	2.34 ± 0.39	2.96 ± 1.18	0.05

Data are mean ± SD. Corrected MBF = (MBF/RPP) × 10⁴.

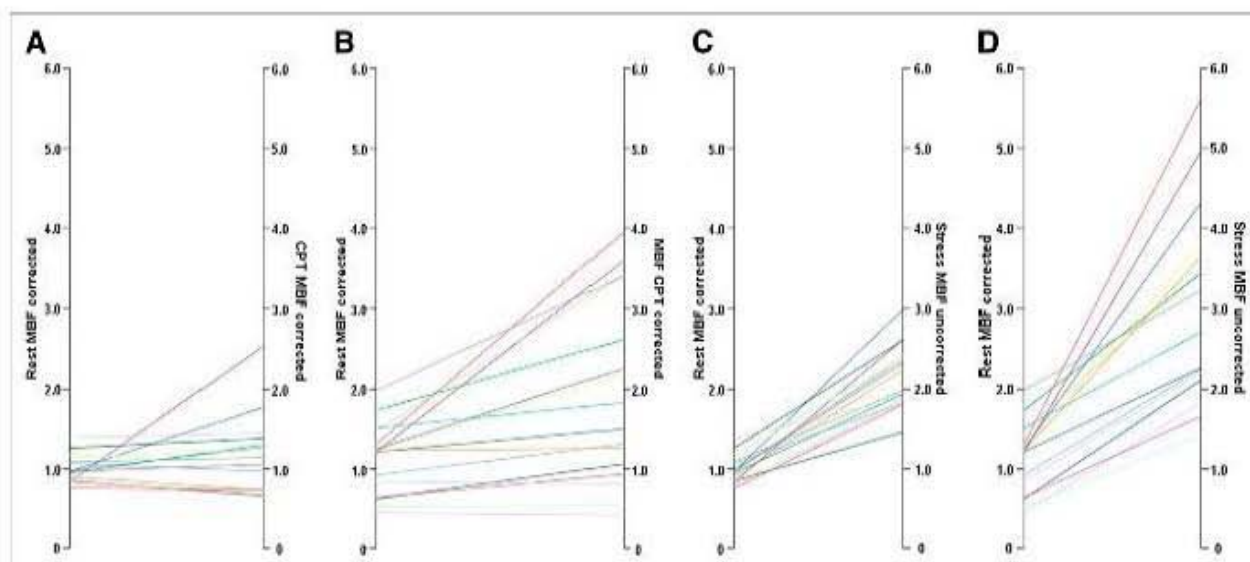


FIGURE 2. Individual MBF response from rest to CPT and stress in both groups. Shown is MBF from rest to CPT in SLE group (A) and healthy control group (B) and MBF from rest to stress in SLE group (C) and healthy control group (D).

thus on the hemodynamic state (17). Therefore, in our study MBF was normalized during rest and CPT to the RPP to confirm that the differences found between groups do reflect endothelial dysfunction and not changes in hemodynamic regulation. In this regard, the difference in the hemodynamic RPP response between groups as shown in Table 2 was significantly different, with a lower response to CPT in healthy controls. A possible reason could be that 6 of the 16 healthy controls were studied at a different time. However, differences in RPP responses to CPT would certainly not explain a decreased response in the SLE patients, compared with the response in healthy controls; in this case, we would rather expect the contrary. The difference could also be explained by differences in response to pain intrinsic to SLE secondary to CPT (18). Besides, despite the greater (though not statistically significant) hemodynamic response in the SLE group, that group had a considerably lower Δ MBF (Table 4), which, given these hemodynamic differences, shows this measure to be preferable because less dependent on baseline MBF and RPP.

The assessment of endothelium-dependent coronary vasomotor function targets the response of MBF to α -adrenergic stimulation with CPT; a diminished MBF response to CPT is strongly associated with endothelial dysfunction (19). MFR reflects the response of basal MBF to administration of vascular smooth muscle-relaxing agents, reducing the resistance of flow and thus generating an increase in MBF. The total hyperemic response to pharmacologic stress reflects the combined vasodilator effect of vascular smooth muscle and endothelium and is defined as the total integrated vasodilator capacity (9). In our study, we found 2 interesting situations: SLE patients had a statistically lower endothelium-dependent vasodilatation index than did healthy controls, allowing us to affirm that endothelial

dysfunction exists, and there was a trend toward a decrease in the total vasodilation capacity in patients with SLE, highlighted by the lower but not statistically significant MFR. In this regard, it is true that about 36% of the hyperemic response depends on endothelium-dependent vasodilation. However, a decrease in MFR to less than 2.5 was not considered a diagnostic criterion of endothelial dysfunction because such a decrease can also indicate nonsignificant coronary artery disease or mild multivessel disease. Regarding that issue, a coronary anatomy assessment in this population could have strengthened the MFR results.

The endothelium-dependent vasodilatation index and MFR measure different aspects of coronary circulatory function, making it feasible to distinguish whether the

TABLE 4
Endothelial Function Indices

Index	SLE	Healthy control	P
Endothelium-dependent vasodilatation index	1.18 \pm 0.55	1.63 \pm 0.65	0.04
MFR			
Corrected	2.41 \pm 0.59	2.73 \pm 0.77	0.20
Uncorrected	3.37 \pm 0.64	4.11 \pm 1.02	0.02
% Δ MBF	18 \pm 55	63 \pm 65	0.04
Δ MBF	0.37 \pm 0.35	0.71 \pm 0.63	0.06

% Δ MBF = percentage change in MBF between rest and CPT; Δ MBF = difference in flow between CPT and baseline in absolute units.

Data are mean \pm SD. Corrected values of MBF were used for endothelium-dependent vasodilatation index and % Δ MBF for assessment of endothelial dysfunction. For MFR; corrected MBF rest values and uncorrected stress values were used for assessment of endothelial function.

alteration is confined to the endothelium or involves vascular smooth muscle function.

Taking into account these issues, we can assume from this study that SLE patients have both endothelial and smooth muscle dysfunction, the former being more severely involved, as it may be the result of direct damage from microvascular inflammatory disease.

It is known that changes in endothelial dysfunction happen early in the natural history of vascular disease; this study supports such a statement concerning the coronary vessels of patients with SLE. As previously mentioned, ^{13}N -ammonia PET allows detection of vascular changes that could make possible the identification of patients at risk for the progression of vascular disease and provides a means for therapy monitoring. Because the development of major adverse cardiac events and cardiac death is predicted by a low MFR despite normal perfusion (20), it might be important to detect early endothelial dysfunction in patients with SLE and to treat aggregated cardiovascular risk factors early, and the disease per se, thus slowing or halting the development of endothelial dysfunction before progression to atherosclerosis and major adverse cardiac events or cardiac death.

The relevance of this study relies on the identification of endothelial dysfunction in adequately treated SLE patients who do not demonstrate active disease by a validated SLE index. Although the current available treatment of SLE limits disease activity, one can assume that this treatment does not prevent or stop the development of cardiovascular disease. Thus, the need for new treatment strategies directed toward such relatively unattended disease-induced organ damage is evident.

One limitation of this study is the small population. An obvious drawback of PET-measured noninvasive measurement of coronary endothelial dysfunction is the limited availability of the method, and for developing countries, its expense.

CONCLUSION

Asymptomatic SLE patients who are free of active disease present an abnormal coronary flow as demonstrated by both smooth muscle dysfunction and endothelial dysfunction measured by ^{13}N -ammonia PET. It is necessary to develop and intensify treatment strategies directed toward atherosclerosis in SLE patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Juan Carlos Ceballos Cantu for skillful assistance with data acquisition and collection, and we thank

Andres Sanabria Rodriguez and Jorge Albarran Lopez for technical support.

REFERENCES

1. Rubin LA, Urowitz MB, Gladman DD. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *Q J Med*. 1985;55:87-98.
2. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2331-2337.
3. Bruce IN. 'Not only...but also': factors that contribute to accelerated atherosclerosis and premature coronary heart disease in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 2005;44:1402-1502.
4. Bulkley BH, Roberts WC. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy: a study of 36 necropsy patients. *Am J Med*. 1975;58:243-264.
5. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, et al. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation*. 2004;110:399-404.
6. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:168-175.
7. Piper MK, Raiza K, Nuttall SL, et al. Impaired endothelial function in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2007;16:84-88.
8. Recio-Mayoral A, Mason JC, Kaski JC, et al. Chronic inflammation and coronary microvascular dysfunction in patients without risk factors for coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2009;30:1837-1843.
9. Schelbert HR. Quantification of myocardial blood flow: what is the clinical role? *Circul Clin*. 2009;27:277-289.
10. Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus: prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol*. 1992;19:1551-1558.
11. Townsend D, Jakoby B, Long M, et al. Performance and clinical workflow of a new combined PET/CT scanner [abstract]. *J Nucl Med*. 2007;48(suppl):437P.
12. Nagarachi S, Czernin J, Kim AS, et al. Reproducibility of measurements of regional resting and hyperemic myocardial blood flow assessed with PET. *J Nucl Med*. 1996;37:1626-1631.
13. Hutchins GD, Schwaiger M, Rosenzweig KC, et al. Noninvasive quantification of regional blood flow in the human heart using N^{13} ammonia and dynamic positron emission tomographic imaging. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1032-1042.
14. Siegrist PT, Gaemperli O, Koepfli P, et al. Repeatability of cold pressor test-induced flow increase assessed with H^{13}O and PET. *J Nucl Med*. 2006;47:1420-1426.
15. Prior JO, Schindler TH, Ficu AD, et al. Determinants of myocardial blood flow response to cold pressor testing and pharmacologic vasodilation in healthy humans. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34:20-27.
16. Alexanderson E, Rodriguez-Valero M, Martinez A, et al. Endothelial dysfunction in recently diagnosed type 2 diabetic patients evaluated by PET. *Mol Imaging Biol*. 2009;11:1-5.
17. Czernin J, Muller P, Chan S, et al. Influence of age and hemodynamic on myocardial blood flow and flow reserve. *Circulation*. 1993;88:62-69.
18. Kozera E, Ellison MC, West S. Depression, fatigue, and pain in systemic lupus erythematosus (SLE): relationship to the American College of Rheumatology SLE neuropsychological battery. *Arthritis Rheum*. 2006;55:628-635.
19. Prior JO, Quinones MJ, Hernández-Pampaloni M, et al. Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2005;111:2291-2298.
20. Herzog BA, Husmann L, Valenti I, et al. Long-term prognostic value of ^{13}N -ammonia myocardial perfusion positron emission tomography: added value of coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:150-156.

14. ANEXO 3 (Carta de aceptación, artículo tercero):

Decision Letter (LUP-11-250.R1)

From: editorial@lupusjournal.co.uk

To: gaboy2k@yahoo.com

CC:

Subject: Lupus - Decision on Manuscript ID LUP-11-250.R1

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Mr. Juárez-Rojas:

Thank you very much for revising your manuscript entitled "PIOGLITAZONE IMPROVES THE CARDIOVASCULAR PROFILE IN PATIENTS WITH UNCOMPLICATED SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: A DOUBLE BLIND RANDOMIZED CLINICAL TRIAL". I am very pleased to let you know that this has now been accepted for publication in Lupus and you should receive proofs from the publishers within the next few weeks.

You will shortly receive a second email requesting you submit a contributor agreement online without which we cannot commence with publication.

If you would like your article to be freely available online immediately upon publication (as some funding bodies now require), you can opt for it to be published under the SAGE Choice Scheme on payment of a publication fee. Please simply follow the link to the Contributor Agreement form in the next email and you will be able to access instructions and further information about this option within the online form.


Thank you very much for your contribution to Lupus. We look forward to your continued support.

With best regards.

Yours sincerely,

Maria Laura Bertolaccini
Managing Editor

Date Sent: 04-Aug-2011

 Close Window

PAPER

Pioglitazone improves the cardiovascular profile in patients with uncomplicated systemic lupus erythematosus: a double-blind randomized clinical trial

JG Juárez-Rojas^{1,2}, AX Medina-Urrutia¹, E Jorge-Galarza¹, NA Caracas-Portilla¹, R Posadas-Sánchez¹, GC Cardoso-Saldaña¹, MV Goycochea-Robles³, [REDACTED] Silveira⁴, L Lino-Pérez⁵, J Mas-Oliva⁶, O Pérez-Méndez⁷ and C Posadas-Romero¹

¹Endocrinology Department, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", [REDACTED] Mexico; ²Doctorate Program of Biomedical Sciences from the National Autonomous University of Mexico, Mexico; ³Clinical Epidemiology Research Unit, Number 1 Regional Hospital from the Mexican Institute of the Social Security, Carlos McGregor Sánchez Navarro, Mexico; ⁴Rheumatology Department, National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", [REDACTED] Mexico; ⁵Rheumatology Department, Mexican General Hospital, Mexico; ⁶Cellular Physiology Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico; ⁷Molecular Biology Department; National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", [REDACTED] Mexico

Objective: We studied the effect of pioglitazone on insulin levels, inflammation markers, high-density lipoprotein (HDL) composition and subclasses distribution, in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods: This double-blind trial included 30 premenopausal women (30 ± 8 years old) with SLE, who were randomized to pioglitazone (30 mg/day) or placebo treatment for 3 months. Plasma and HDL lipids were determined by colorimetric enzymatic assays, insulin by radio-immunometric assay, inflammation by immunonephelometry and HDL size and subclasses distribution by a native 4–30% polyacrylamide gradient gel electrophoresis.

Results: Compared with placebo, pioglitazone significantly increased HDL-cholesterol plasma levels (14.2%), reduced fasting insulin plasma levels (23.6%) and the homeostasis model assessment-insulin resistance (31.7%). C-reactive protein (70.9%) and serum amyloid A (34.9%) were also significantly reduced with the pioglitazone use, whereas the HDL particle size was increased (8.80 nm vs. 8.95 nm; $p = 0.044$) by changes in the distribution of HDL_{2b}, HDL_{3b}, and HDL_{3c} subclasses. The change in HDL size correlated with a rise in free and cholesterol-ester content in the HDL particles.

Conclusion: Pioglitazone significantly enhanced insulin sensitivity, reduced inflammation, and modified HDL characteristics, suggesting a potential beneficial effect of this drug in patients with SLE with a risk to develop cardiovascular disease.

Trial registration: This trial is registered at ClinicalTrials.gov Protocol Registration System, with the number NCT01322308. *Lupus* (2011) 0, 1–9.

Key words: atherosclerosis; inflammation; insulin resistance; lipoproteins; systemic lupus erythematosus

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disease in which accelerated atherosclerosis and its sequelae are recognized as

one of the most frequent causes of morbidity and mortality in young women.¹ The etiology and pathogenesis of atherosclerosis in SLE are only partially explained by traditional risk factors.^{1,2} Several studies have reported non-traditional markers of increased risk for atherosclerotic cardiovascular disease in patients with SLE, as higher prevalence of hyperinsulinemia and insulin resistance,^{3,4} inflammation,⁵ abnormal high-density lipoprotein (HDL) particle size distribution and

Correspondence to: Posadas-Romero Carlos, Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico D.F.

Email: cposadasr@yahoo.com

Received 20 June 2011; accepted 4 August 2011

composition,^{6,7} as well as higher proportions of proinflammatory HDL particles.^{8,9}

Insulin insensitivity is known to be associated with accelerated atherosclerosis and appears to be a risk marker for both myocardial infarction and stroke.¹⁰⁻¹³ The impact of insulin resistance may involve proinflammatory disturbances due to dysfunctional insulin signaling in different tissues; in addition to the higher prevalence of insulin resistance in SLE patients, it is well known that autoimmune and chronic inflammatory disorders are associated with the development of accelerated cardiovascular disease.¹⁴

HDLs vary in composition, size, charge, and biological activities. It has been reported that some of these lipoprotein characteristics may be more important than [redacted] in predicting future coronary heart diseases (CHD).¹⁵ Abnormal distribution of HDL subclasses, characterized by low large HDL levels and high small HDL plasma levels, has been reported in patients with SLE,^{6,7} and in other insulin resistance states.^{16,17} Moreover, it has been reported that in SLE patients, HDL particles are enriched in triglycerides and depleted of cholesterol-esters.⁶ These abnormalities may result in HDL-attenuated oxidative activity,¹⁸ reduced anti-inflammatory effect¹⁹ and lower capacity to promote cholesterol efflux,²⁰ which is the first step in reverse cholesterol transport.

Pioglitazone is an insulin-sensitizing compound of the thiazolidinedione (TZD) type. TZD activates nuclear receptors called peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), which regulate the transcription of genes with key roles in the metabolism of carbohydrates and lipids as well as inflammation.²¹⁻²³ The qualitative effects of pioglitazone on HDL may also be important, because it has been shown to increase the mean HDL size and reduce the core triglyceride content relative to cholesterol-esters in HDLs from subjects with and without diabetes.²⁴⁻²⁶

Although it has been previously shown that pioglitazone reduces several cardiovascular risk factors and renal inflammation in a lupus-prone murine model,¹⁴ there are no studies that have examined the effect of this drug on insulin plasma levels, inflammation markers and HDL composition together with the distribution of their subclasses in patients with SLE. Therefore, the objective of this work was to study the effect of treatment with pioglitazone upon these parameters in non-diabetic patients with SLE in clinical remission and without renal compromise.

Materials and methods

Patients

This was a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel group study conducted in Mexico City. Eligible participants were premenopausal women with SLE older than 18 years, attending the outpatient Rheumatology Clinic at three Mexico City community tertiary care hospitals; the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez", the number 1 Regional Hospital from the Mexican Institute of the Social Security and the Mexican General Hospital. All fulfilled the 1982 American College of Rheumatology criteria for the classification of SLE,²⁷ and to avoid the effect of other cardiovascular risk factors, we excluded patients with clinical evidence of menopause, diabetes, thyroid dysfunction, neurological, renal or liver disease, personal history of high blood pressure, CHD, cerebrovascular events, chronic or acute infections, malignancy, and use of drugs or alcohol abuse. At the time of the study, none of the patients was smoking, pregnant, breast-feeding, or taking hormonal or lipid-regulation drugs. None of them was positive to anticardiolipin antibodies, lupus anticoagulant or antibeta-2-glycoprotein-1. Subjects were included in the study after they signed the informed consent form for participation (Figure 1). The protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of each hospital and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

The study took place at the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" from March 2007 to April 2010, where information about current and cumulative drug therapy or any disease was obtained through a questionnaire and physical examination applied to all participants. SLE disease activity was assessed using the Mexican modification of the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (MEX-SLEDAI).²⁸ Based on the MEX-SLEDAI, at time of the evaluation patients were considered to have active disease when the score was higher than 5. Height (m), weight (kg) and blood pressure were measured, and body mass index calculated by dividing weight by height squared (kg/m²).

Study protocol

The eligibility screening (visit 1) occurred 4 weeks before randomization. During this visit, qualified personnel provided dietary counseling on the American Heart Association weight-maintaining

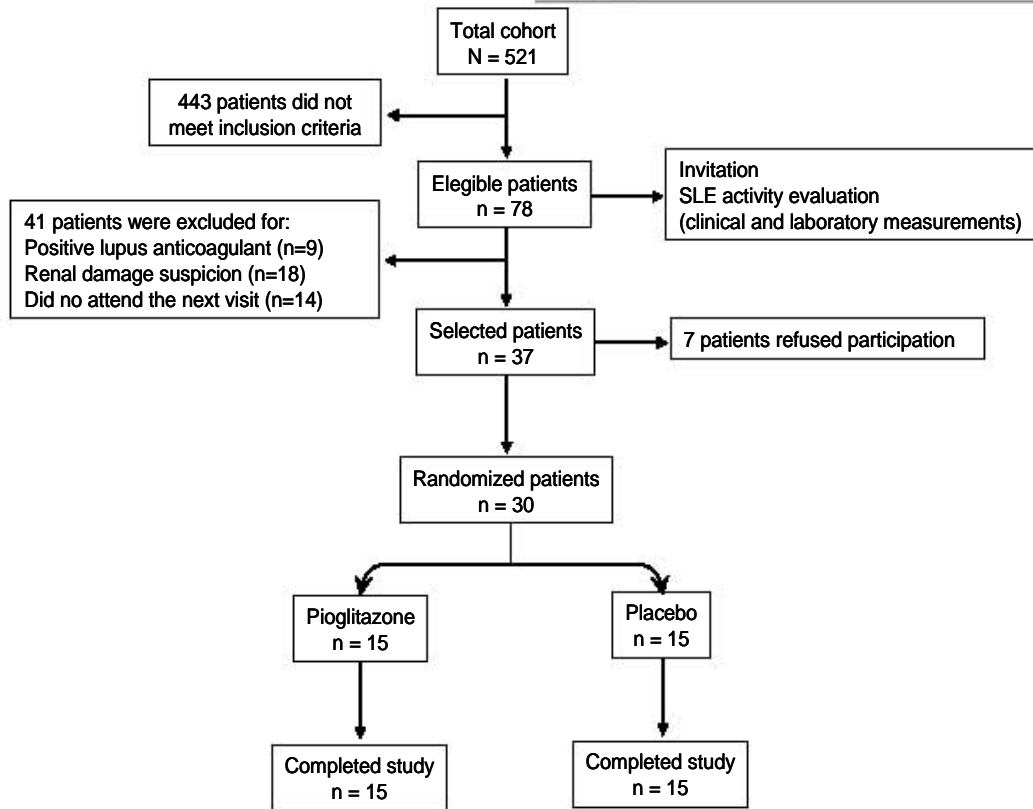


Figure 1 Flow chart for the selection and enrollment of patients.

Step 1 and selected patients instructed to follow this diet. At visit 2, selected patients were randomly assigned into two study arms; they had been informed, as part of the consent, that they would be receiving either a fixed dose of pioglitazone (30 mg) or placebo for 12 weeks once daily in the morning. Clinic visits occurred every 4 weeks from visit 3 to visit 5. At all visits, patients were received in the morning after fasting for at least 10 h. All patients use a reliable contraceptive method throughout the entire study. Pioglitazone and placebo were dispensed as pills similar in form and appearance. They were pre-packed in bottles and consecutively numbered. Each patient was assigned a treatment number and received the pills in the corresponding pre-packed bottle. An independent pharmacist dispensed the corresponding bottle according to a computer-generated randomization number list, and participants, care providers and researchers were blinded at treatment assignment. Compliance was assessed every clinic visit by tablet counting.

Laboratory methods

At visit 2 and visit 5, venous blood samples were obtained after a 12-h overnight fast.

Ethylenedinitrilotetraacetate plasma was prepared by centrifugation at 4°C at 2500 rpm for 20 min and used for glucose, lipids, and lipoprotein measurements, or stored frozen at -70°C until their analysis. Aprotinin (100 KIU/ml) and benzamidine (1 mM) were used as protease inhibitors. Plasma glucose, total cholesterol, triglycerides, and HDL-cholesterol were measured using standardized enzymatic procedures in a Hitachi 902 analyzer (Hitachi LTD, Tokyo, Japan) and were considered within a normal range when their values were < 100 mg/dl, < 200 mg/dl, < 150 mg/dl and ≥ 50 mg/dl, respectively.²⁹ Accuracy and precision in our laboratory are under periodic surveillance by the Centers for Disease Control and Prevention Service (Atlanta, GA, USA). Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was estimated by using the Friedewald formula as modified by De Long et al.³⁰ Total high sensitive C-reactive protein (hsCRP), serum amyloid A (SAA), apolipoprotein B-100 (apo B-100) and apolipoprotein AI (apo AI) levels, were determined by immunonephelometry on a BN Pro Spec nephelometer (Dade Behring Marburg GmbH, Germany) according to the manufacturer's method. Inter-assay coefficients of variation were

less than 3%. Plasma insulin concentrations were determined by a radioimmunometric assay (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, California, USA). Insulin resistance was estimated with the use of the homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR).³¹ The normal values for insulin and HOMA-IR were <6.6 and <1.3 , respectively, according to the 75th percentile from a sample of healthy women, previously described.⁶

Distribution of HDL subclasses

HDL separated from plasma by ultracentrifugation at a density of 1.21 g/ml was loaded into a native 4–30% polyacrylamide gradient gel. After polyacrylamide gradient gel electrophoresis, gels were stained for proteins with Coomassie brilliant blue R-250, scanned and digitalized in a GS-670 Bio-Rad densitometer, using the software Molecular Analyst™. Migration distance intervals of each gel was calculated by computing a standard curve of the protein-stainable high molecular weight standards (thyroglobulin, 17 nm; ferritin, 12.2 nm; catalase, 10.4 nm; lactate dehydrogenase, 8.2 nm; and albumin, 7.1 nm) as a function of their relative migration distance.^{32,33} The relative proportion of each HDL subclass was estimated with the following size intervals: HDL_{3c} 7.21–7.76 nm; HDL_{3b} 7.76–8.17 nm; HDL_{3a} 8.17–8.77 nm; HDL_{2a} 8.77–9.71 nm; and HDL_{2b} 9.71–12.93 nm. The coefficient of variation for each subclass was less than 10%. The average HDL particle size represents the overall distribution of the HDL subclasses,^{32,33} and was calculated as the average size of each HDL subclass interval (nm), multiplied by its relative area under the densitometric scan. Coefficient of variation for this determination was less than 1%.

Composition of HDL

Total protein, total cholesterol, free cholesterol, phospholipids, and triglycerides content of isolated HDL were determined in a Hitachi 902 analyzer, using commercially available enzymatic assays. Cholesteryl-esters were calculated by multiplying the difference between total and free cholesterol by 1.67.³⁴ Apolipoprotein content (apo A-I, apo A-IV, apo-E and apo-Cs) was evaluated semi-quantitatively by SDS-polyacrylamide gradient gel electrophoresis.³⁵

Sample size calculation

Sample size calculation was employed to detect changes in HDL size using pioglitazone

monotherapy.²⁵ We anticipated an increase in HDL size at 12 weeks from baseline, and calculated as $[(Z\alpha + Z\beta) SD / (\mu_0 - \mu_1)]^2 = [(1.65 + 0.84) 0.25 / (8.4 - 8.6)]^2$.²⁵ Ten patients were needed in each group to have 80% power at the 5% significance level. We recruited and randomized 15 patients in each treatment arm to allow for dropouts.

Statistical analysis

All analyses were carried out using statistical software SPSS 13.0 for WINDOWS (SPSS inc., Chicago IL, USA). Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) for normally distributed variables or median (interquartile range) for those with non-normal distribution. There were no outlier values in our study sample. Between-group differences were analyzed by Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* for independent groups, and within-group differences were analyzed by Student's *t*-test or Wilcoxon for paired samples. Spearman correlation coefficients were calculated to evaluate the relationship between all variables studied and the HDL size. All results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

All 30 randomized patients followed and finished all study. The baseline clinical characteristics were similar in both groups (Table 1). For all studied women, the median SLE duration was 5.0 years (interquartile range: 2.0–10.0) and disease activity was 2.5 (1.2–4.7). Use of prednisone (46.7%) and antimalarials (83.3%) was similar in the two groups. Three patients (20%) in the placebo group and five (33%) in the pioglitazone group were taking more than 10 mg/day of prednisone, and two patients (13%) in each group were taking more than 200 mg/day of antimalarials. Patients of every group were clinically and biochemically inactive and no changes in SLE activity, pharmacology treatment, and blood pressure levels were observed during the study. No changes in the median of body mass index (24.9 vs. 24.8; $p = \text{NS}$), hemoglobin (13.1 g/dl vs. 13.0 g/dl; $p = \text{NS}$), hematocrit (39.1% vs. 38.4%; $p = \text{NS}$), aspartate aminotransferase (21.3 U/l vs. 21.7 U/l; $p = \text{NS}$) and alanine aminotransferase (16.1 U/l vs. 17.3 U/l; $p = \text{NS}$) were observed after pioglitazone treatment. Similar results were observed in the placebo group (data not shown). According to pill count, all patients completed the study with an overall

Table 1 Baseline demographic and clinical parameters

	Total	Placebo (n=15)	Pioglitazone (n=15)	<i>p</i> ^a
Age (years)	30 ± 8	29 ± 7	32 ± 10	NS
Body mass index (kg/m ²)	24.7 (22.4–28.9)	24.5 (23.5–30.0)	24.9 (21.8–28.6)	NS
Waist circumference (cm ²)	81 (72–92)	81 (76–90)	82 (71–92)	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	107 (97–118)	110 (90–120)	107 (98–115)	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	70 (65–76)	70 (60–80)	70 (65–75)	NS
SLE diagnostic (years)	5.0 (2.0–10.0)	4.0 (2.0–11.7)	5.0 (2.9–9.5)	NS
MEX-SLEDAI Index	2.5 (1.2–4.7)	4.0 (2.0–6.0)	2.0 (1.0–3.5)	NS
Hemoglobin (g/dl)	13.2 ± 1.1	13.1 ± 1.3	13.2 ± 0.9	NS
Leucocytes (μl)	4950 (4000–6050)	5000 (4000–5400)	4900 (3700–8600)	NS
Lymphocytes (μl)	1270 (1000–1550)	1100 (1000–1500)	1300 (1000–1700)	NS
Platelet count(× 1000/μl)	237 (179–265)	236 (145–292)	238 (215–253)	NS
Erythrocyte sedimentation rate (mm/hr)	18.5 (14.2–31.0)	18.0 (14.5–27.0)	26.0 (12.0–32.0)	NS
Serum complement 4 (mg/dl)	14.1 ± 3.9	14.5 ± 3.9	13.7 ± 4.1	NS
Serum complement 3 (mg/dl)	94.8 ± 21.0	98.6 ± 22.3	91.1 ± 19.3	NS

Mean ± S.D. or median (interquartile range).

^a = Student *t*-test for mean or Mann-Whitney *U* for median.

SLE, Systemic Lupus Erythematosus; MEX-SLEDAI, Mexican Modification of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

compliance of 94% (95% in placebo vs. 93% in pioglitazone group; *p* = NS). Adverse effects were reported in three patients in the placebo group (headache, chest tightness, paresthesia, dizziness, nausea and joint pain) and in two patients in the pioglitazone group (headache and insomnia). All these adverse effects disappeared after the 4th week of treatment.

Lipids, glucose, and insulin parameters are shown in Table 2. Pioglitazone increased HDL-cholesterol levels (14.2%; *p* = 0.029) after 12 weeks of treatment. No changes were observed in the placebo group. Total and LDL cholesterol, triglycerides, apolipoproteins AI and B-100, as well as glucose levels were similar between both groups at baseline and after treatment. Fasting insulin levels and HOMA-IR were not statistically different between groups at baseline; however, both parameters were lowered by pioglitazone (23.6%; *p* = 0.006 and 31.7%; *p* = 0.008, respectively), but not by placebo use. Values for the hsCRP decreased 70.9% vs. 0.3% in the pioglitazone and placebo groups, respectively (*p* = 0.013), whereas SAA decreased 34.9% in the pioglitazone and increased 25.5% in the placebo group (*p* = 0.029).

Distribution of HDL subclasses was not different between groups before treatment. Although the proportion of HDL_{2b} was the only subfraction that showed significant increase after pioglitazone treatment (11.9% vs. 13.3%; *p* = 0.030), the percentage change in HDL_{2b}, HDL_{3b}, and HDL_{3c} was different in the pioglitazone versus the placebo group (Figure 2). Pioglitazone favored an increase in HDL particle size (8.80 nm vs. 8.95 nm; *p* = 0.044) and the mean percentage change was

significantly different than that observed in the placebo group (+0.77% vs. -0.67%; *p* = 0.018). When HDL composition was analyzed, we observed that only free cholesterol increased significantly after pioglitazone treatment compared with the placebo group (+6.82% vs. -4.87%; *p* = 0.043). HDL-cholesterol-ester showed a tendency to increase in the pioglitazone treatment compared with the placebo group (+5.03% vs. -1.68%; *p* = 0.09). The content of phospholipid and triglycerides, as well as the apolipoprotein content of HDL, was not different at the beginning and at the end of the study.

Spearman correlation analyses between anthropometric measurements, systolic and diastolic blood pressure, activity and duration of SLE, lipid variables, insulin, HOMA-IR, CRP, SAA as well as composition and size of HDL, showed that increases of free cholesterol in HDL particles (*r* = 0.573; *p* = 0.002), HDL-cholesterol plasma concentration (*r* = 0.522; *p* = 0.003), cholesterol-esters in HDL particles (*r* = 0.443; *p* = 0.023), and apo AI (*r* = 0.411; *p* = 0.027), correlated with the increase in HDL particle size.

Discussion

To the best of our knowledge, this prospective randomized controlled trial for the first time indicates significant and potentially important changes in insulin levels, inflammation, HDL-cholesterol and HDL composition as well as subclass distribution in uncomplicated non-diabetic SLE patients during treatment with pioglitazone (3 months; 30 mg/day).

Table 2 Lipidic, glucometabolic and inflammation parameters before and after treatment with placebo or pioglitazone

	Placebo (n=15)			Pioglitazone (n=15)		
	Baseline	Week 12	p ^a	Baseline	Week 12	p ^a
Total Cholesterol (mg/dl)	143 (124-160)	143 (126-160)	NS	133 (119-150)	139 (125-150)	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	76 (68-85)	78 (63-85)	NS	79 (52-85)	75 (64-82)	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	45 (43-49)	43 (40-57)	NS	46 (37-55)	52 (43-61)	0.029
Triglycerides (mg/dl)	92 (69-115)	91 (66-115)	NS	93 (83-115)	80 (74-115)	NS
Apolipoprotein A (mg/dl)	135 (118-139)	129 (119-149)	NS	130 (121-154)	136 (122-150)	NS
Apolipoprotein B (mg/dl)	62 (55-79)	66 (57-80)	NS	64 (57-78)	62 (57-73)	NS
Fasting glucose (mg/dl)	84 (78-92)	84 (75-90)	NS	85 (78-88)	79 (72-84)	NS
Fasting insulin (µU/ml)	4.92 (0.84-12.95)	3.51 (1.54-12.78)	NS	6.60 (5.11-14.37)	5.40 (3.42-10.34)	0.006
HOMA-IR	1.11 (0.19-2.49)	0.79 (0.32-2.51)	NS	1.50 (1.06-2.80)	1.00 (0.67-1.82)	0.008
hsCRP (mg/l)	1.9 (1.1-3.1)	1.9 (0.9-5.4)	NS	2.6 (0.6-4.2)	0.5 (0.4-2.1)	0.026
Serum amyloid A (mg/l)	3.83 (2.26-9.86)	4.48 (2.75-15.60)	NS	4.97 (1.78-8.39)	2.95 (2.05-7.36)	0.036

Median (interquartile range).

^a = Wilcoxon test.

LDL, Low Density Lipoprotein; HDL, High Density Lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance; hsCRP, high sensitivity C reactive protein.

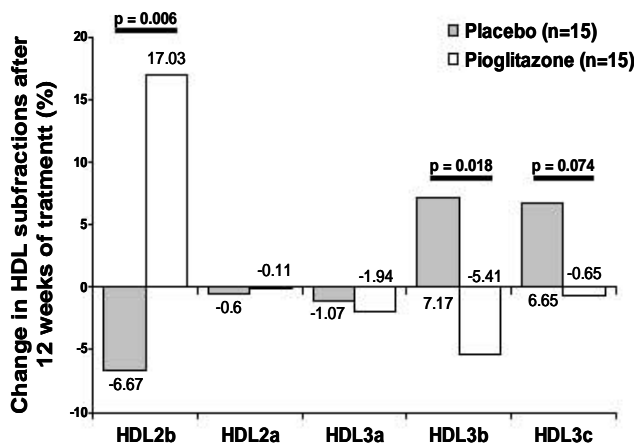


Figure 2 Change in high-density lipoprotein subfraction distributions in patients with systemic lupus erythematosus, after 12 weeks of pioglitazone (30 mg/day) or placebo treatment.

These clinical effects, in addition to extensive in vitro and in vivo studies assessing anti-inflammatory and anti-atherosclerotic effects of PPAR agonist, indicate that these drugs may be powerful agents in cardiovascular disease prevention,

beyond their classical use as regulator for glycemic control.

For a long time, it has been known that patients with lupus present substantially increased morbidity and mortality rates associated with cardiovascular disease. Traditional risk factors, or lupus itself and treatment-related factors, only partly account for the increased risk of CHD in patients with SLE.^{1,5} Insulin resistance, defined as the reduced ability of insulin to stimulate glucose uptake in skeletal muscle and fat cells, is an emerging metabolic risk factor that may play a pivotal role in atherogenesis in lupus.³⁵ We³ and others⁴ have previously shown that patients with SLE presented higher fasting plasma insulin levels as well as reduced insulin sensitivity related to cardiovascular risk factors in SLE patients.³⁵ The present study shows that pioglitazone administration leads to a significant decrease in insulin levels (23.6%) and HOMA-IR (31.7%). This finding correlates well with a study where a lupus-prone murine model showed improvement of insulin resistance and produced stable glucose levels after pioglitazone administration.¹⁴ Therefore, improving insulin sensitivity in patients at risk due to SLE may prevent the occurrence of cardiovascular complications,

independently of glucose levels, as other investigators have shown in patients with and without diabetes mellitus.^{36,37}

Observations that autoimmune and chronic inflammatory disorders are associated with the development of accelerated atherosclerosis have been increasingly recognized.³⁸ In our study, treatment with pioglitazone significantly decreased hsCRP and SAA by 70.9% and 34.9%, respectively. Previous studies have shown that pioglitazone decreases hsCRP plasma levels.²¹ However, to our knowledge, this is the first study where SAA plasma levels were decreased by pioglitazone use. SAA is the major acute-phase protein in vertebrates and is synthesized in the liver in response to infection, inflammation, injury or stress.³⁹ Although other non-specific inflammatory markers such as hsCRP also correlate with cardiovascular disease, the wider dynamic range as well as the more rapid response and easier measurement of SAA has led to the suggestion that it may be a better marker of disease,^{40,41} and has been shown to predict cardiovascular events.^{42,43} Thiazolidinediones such as rosiglitazone or troglitazone reduce SAA by about 30–50% in diabetic and non-diabetic subjects;^{44,45} however, only one previous report⁴⁶ has evaluated the effect of pioglitazone treatment on SAA. That study⁴⁶ showed that patients with diabetes mellitus did not present changes in SAA plasma levels in spite of an improvement in insulin sensitivity. Since inflammation is associated with diabetes mellitus, it is possible that the anti-inflammatory effect of pioglitazone could be more important in patients with SLE, where inflammation plays a central role in the development of atherosclerosis.^{47,48} Our results show that in addition to the improvement in insulin resistance, pioglitazone also reduces inflammation in a short time. It is important to highlight that pioglitazone might reduce the risk of CHD in patients with uncomplicated SLE, by reducing the alterations promoted by lupus itself. Longitudinal and epidemiological studies are needed to investigate the effect of this drug over long-term endpoints.

Hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels are components of insulin resistance states and of SLE dyslipidemia.⁵ In SLE, these lipidic abnormalities correlate with drug therapy, disease activity, metabolic syndrome, and inflammatory cytokines.^{1,5,37,49} Consistent with a previous study,⁹ we found that HDL-cholesterol and triglyceride levels were normal in our group of patients, possibly due to the fact that we selected subjects with uncomplicated SLE. Treatment with

pioglitazone raised HDL-cholesterol levels by 14.2%, similar to previous studies where pioglitazone increased HDL-cholesterol levels by ~10–20%.²¹ It has been suggested that PPAR signaling may play a role in stimulating expression of the gene encoding ABCA1,⁵⁰ which could increase the flux of cholesterol from cells on to apo AI.⁵¹ If PPAR were involved in regulating ABCA1 gene expression, additional effects on plasma HDL-cholesterol levels and HDL particles might be seen.

Although it is a widely accepted notion that low HDL-cholesterol levels constitute an independent risk factor for premature atherosclerosis and CHD, there is increasing evidence that HDL particle characteristics may be more important than quantity for atheroprotection.¹⁵ We⁶ and others⁷ have previously demonstrated that compared with control subjects, patients with SLE have triglyceride enrichment and cholesterol-ester depletion of HDL, as well as low concentrations of large HDLs and high levels of small HDL particles. These abnormal HDL particles have been found in other hyperinsulinemia states, and have been associated with coronary heart disease⁵² and recurrence of coronary events.¹² In fact, McMahon et al. reported that 48.2% from 276 SLE patients have proinflammatory HDLs, and that these proinflammatory HDLs contribute to a 17-fold increased odds for the presence of atherosclerosis.⁹ Our results show that pioglitazone modified HDL particle size and composition, and although we did not evaluate HDL atheroprotective functionality after pioglitazone use, several studies have shown that small HDL particles and HDLs enriched in triglycerides or depleted of cholesterol show a diminished atheroprotective function and are associated with a poor prognosis for cardiovascular disease.^{12,15,52} Therefore, our findings suggest that pioglitazone could restore the HDL atheroprotective functions in patients with SLE.

It is important to note that the small sample size may explain the lack of significant differences in plasma apo AI levels and HDL composition after pioglitazone treatment. However, the 15 patients included in the pioglitazone arm were enough to detect changes in insulin, inflammation and HDL particle size. The clinical implications of these findings are that even in SLE patients without additional risk factors, representing approximately 15% of our cohort, pioglitazone may have the potential to prevent premature CHD. We do not have hard endpoints in our study to confirm if all these qualitative and quantitative changes are reflected in a prognostic improvement of patients with SLE. Longitudinal studies are necessary to

evaluate the cardiovascular effects of long-term pioglitazone use in SLE patients with and without diabetes mellitus and other complications.

In conclusion, the findings of our study indicate that pioglitazone treatment may exert multiple beneficial cardiovascular effects in uncomplicated normoglycemic SLE patients. This drug significantly enhanced insulin sensitivity, reduced inflammation and modified HDL characteristics, suggesting that PPAR activation may lead to potential beneficial effects in patients with uncomplicated SLE at risk of cardiovascular disease.

Acknowledgment

Juárez-Rojas JG acknowledges support from Doctorate Program of Biomedical Sciences at National Autonomous University of Mexico. Authors thank Maria del Carmen Gonzalez Salazar and Lúbia Velázquez for their nutritional assistance for patients, Wendy Angelica Ocampo Arcos for her technical assistance in the SDS-polyacrylamide gradient gels preparation. All authors are in debt to patients who participated in this trial.

Funding

This work was partially supported by grant 57997 from the National Council for Science and Technology, the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" (protocol number 05-487) and Mexican Institute of the Social Security (protocol number 2006-785-031)

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Other information

The trial is registered at ClinicalTrials.gov, number NCT01322308.

References

- 1 Nikpour M, Urowitz MB, Gladman DD. Epidemiology of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2009; 11: 248–254.

- 2 Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, et al. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation* 2001; 104: 1887–1893.
- 3 Posadas-Romero C, Torres-Tamayo M, Zamora-González J, et al. High insulin levels and increased low-density lipoprotein oxidizability in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 160–165.
- 4 El Magadmi M, Ahmad Y, Turkie W, et al. Hyperinsulinemia, insulin resistance, and circulating oxidized low density lipoprotein in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006; 33: 50–56.
- 5 Reiss AB. Effects of inflammation on cholesterol metabolism: impact on systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2009; 11: 255–260.
- 6 Juárez-Rojas J, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, et al. High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008; 17: 981–987.
- 7 Chung CP, Oeser A, Raggi P, et al. Lipoprotein subclasses and particle size determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 1227–1233.
- 8 McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2541–2549.
- 9 McMahon M, Grossman J, Skaggs B, et al. Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2428–2437.
- 10 Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev* 2006; 27: 242–259.
- 11 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868–874.
- 12 Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, 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.
- 13 Pyörälä M, Miettinen H, Laakso M, Pyörälä K. Plasma insulin and all-cause, cardiovascular, and noncardiovascular mortality: the 22-year follow-up results of the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care* 2000; 23: 1097–1102.
- 14 Zhao W, Thacker SG, Hodgin JB, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone improves cardiometabolic risk and renal inflammation in murine lupus. *J Immunol* 2009; 183: 2729–2740.
- 15 Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342–374.
- 16 Perez-Mendez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17–22.
- 17 Hansel B, Giral P, Nobecourt E, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4963–4971.
- 18 Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterized by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis* 2005; 182: 277–285.
- 19 Calabresi L, Gomaschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 656–661.
- 20 Brites FD, Bonavita CD, De 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.
- 21 Erdmann E, Wilcox R. Pioglitazone and mechanisms of CV protection. *QJM* 2010; 103: 213–228.

- 22 Mudaliar S, Henry RR. PPAR agonists in health and disease: a pathophysiologic and clinical overview. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2002; 9: 285–302.
- 23 Rosenblatt S, Miskin B, Glazer NB, Prince MJ, Robertson KE; Pioglitazone 026 Study Group. The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 413–423.
- 24 Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, *et al*; Study Investigators GLAI. Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 2007; 30: 2458–2464.
- 25 Szapary PO, Bloedon LT, Samaha FF, *et al*. Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 182–188.
- 26 Hughes TA, Stentz F, Gettys T, Smith SR. Combining beta-adrenergic and peroxisome proliferator-activated receptor gamma stimulation improves lipoprotein composition in healthy moderately obese subjects. *Metabolism* 2006; 55: 26–34.
- 27 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271–1277.
- 28 Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcon-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; 19: 1551–1558.
- 29 Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, *et al*. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640–1645.
- 30 DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *JAMA* 1986; 256: 2372–2377.
- 31 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419.
- 32 Perusse M, Pascot A, Despres JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res* 2001; 42: 1331–1334.
- 33 Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408–419.
- 34 Chapman MJ, Goldstein S, Lorange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981; 22: 339–358.
- 35 Tso TK, Huang WN. Elevation of fasting insulin and its association with cardiovascular disease risk in women with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2009; 29: 735–742.
- 36 Pfützer A, Marx N, Lübber G, *et al*. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1925–1931.
- 37 Staniloue C, Mandadi V, Kurian D, *et al*. Pioglitazone improves endothelial function in non-diabetic patients with coronary artery disease. *Cardiology* 2007; 108: 164–169.
- 38 Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, *et al*. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *J Rheumatol* 2006; 33: 539–545.
- 39 Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265: 501–523.
- 40 Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340: 448–454.
- 41 Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 381–388.
- 42 Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767–1772.
- 43 Ridker P, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149–2153.
- 44 Hetzel J, Ballethofer B, Rittig K, *et al*. Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1804–1809.
- 45 Ebeling P, Teppo AM, Koistinen HA, *et al*. Troglitazone reduces hyperglycaemia and selectively acute-phase serum proteins in patients with Type II diabetes. *Diabetologia* 1999; 42: 1433–1438.
- 46 Heliövaara MK, Herz M, Teppo AM, Leinonen E, Ebeling P. Pioglitazone has anti-inflammatory effects in patients with Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 2007; 30: 292–297.
- 47 Toloza SM, Uribe AG, McGwin Jr G, *et al*. LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXIII. Baseline predictors of vascular events. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3947–3957.
- 48 Gustafsson J, Gurnarsson I, Börjesson O, *et al*. Predictors of the first cardiovascular event in patients with systemic lupus erythematosus – a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R186.
- 49 Chung CP, Avalos I, Oeser A, *et al*. High prevalence of the metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease characteristics and cardiovascular risk factors. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 208–214.
- 50 Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, *et al*. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 2607–2619.
- 51 Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesterol esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 475–482.
- 52 Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, *et al*. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 2181–2187.

16. GLOSARIO DE TERMINOS:

Apo-AI:	Apolipoproteína AI
Apo-B100:	Apolipoproteína B100
ASA:	Amiloide sérico A
BILAG:	British Isles Lupus Activity Group
CDC:	Centro Nacional para la Prevención de Enfermedades Crónicas y Promoción de la Salud
C-HDL:	Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
C-LDL:	Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
EAC:	Enfermedad arterial coronaria
ECLAM:	European community lupus activity measure
FDA:	Food and Drug Administration
FCB:	Flujo coronario basal
FCE:	Flujo coronario con estimulación farmacológica
FC-CPT:	Flujo coronario con estimulación por frío
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HOMA-RI:	Modelo de homeostasis para la valoración de la resistencia a la insulina
IL-1:	Interleucina 1
IL-6:	Interleucina 6
IVED:	Indice de vasodilatación dependiente de endotelio
LES:	Lupus eritematoso sistémico
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
MCP-1:	Proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1

MEX-SLEDAI: Índice modificado de la actividad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico mexicano

NF- κ B: Factor de necrosis κ B

PCR: Proteína C reactiva

PET: Tomografía por emisión de positrones

PPARs: Receptores activados por el proliferador de peroxisomas

RFC: Reserva de flujo coronario

SLAM: Systemic lupus activity measure

SLEDAI: Systemic lupus eritematosus disease activity index

SLICC/ACR-DI: Índice de daño orgánico o de cronicidad del Colegio Americano de Reumatología y de Clínicas Internacionales

TLRs: Receptores tipo toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α

TZD: Tiazolidinedionas

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

17. BIBLIOGRAFÍA:

- 1) ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum.* 1990;33:634-643.
- 2) Hochberg MC. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990;16:617-639.
- 3) Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
- 4) Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol.* 1992;19:1551-1558.
- 5) Ibañez D, Gladman D, Urowitz M. Summarizing disease features over time: II. Variability measures of SLEDAI-2K. *J Rheumatol.* 2007;34:336-340.
- 6) Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, y cols. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:363-369.
- 7) Yee CS, Farewell V, Isenberg DA, y cols. British Isles Lupus Assessment Group. Revised British Isles Lupus Assessment Group 2004 index: a reliable tool for assessment of systemic lupus erythematosus activity. *Arthritis Rheum.* 2006;54:3300-3305.
- 8) Wallace DJ. Advances in drug therapy for systemic lupus erythematosus. *BMC Med.* 2010;8:77.
- 9) Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, y cols. The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison. *J Rheumatol.* 2000;27:373-376.
- 10) Merrell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis.* 1955;1:12-32.

- 11) Urowitz MB, Gladman DD, Abu-Shakra M, Farewell VT. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. III. Improved survival over 24 years. *J Rheumatol.* 1997;24:1061-1065.
- 12) Gladman DD. Prognosis and treatment of systemic lupus erythematosus *Curr Opin Rheumatol.* 1995;7:402-408.
- 13) Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus *Am J Med.* 1976;60:221-225.
- 14) Gorman C, Isenberg D. Atherosclerosis and lupus. *Rheumatology.* 2004;43:943-945.
- 15) Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, y cols. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:408-415.
- 16) Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:338-346.
- 17) Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Hallett DC. Natural history of hypercholesterolemia in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1999;26:2137-2143.
- 18) Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, y cols. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2331-2337.
- 19) Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J Rheumatol.* 1995;22:1259-1264.
- 20) Kao AH, Sabatine JM, Manzi S. Update on vascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:519-527.
- 21) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
- 22) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
- 23) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-819.
- 24) Cines DB, Pollak ES, Buck CA et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91:3527-3561.

- 25) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-2018.
- 26) Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323:27-36.
- 27) Bassi N, Ghirardello A, Iaccarino L, y cols. OxLDL/beta2GPI-anti-oxLDL/beta2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients. *Autoimmun Rev*. 2007;7:52-58.
- 28) Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, y cols. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation*. 2005;112:3337-3347.
- 29) Matsuura E, Kobayashi K, Lopez LR. Preventing autoimmune and infection triggered atherosclerosis for an enduring healthful lifestyle. *Autoimmun Rev*. 2008;7:214-222.
- 30) Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:243-251.
- 31) Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-1890.
- 32) Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:437-445.
- 33) Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78:539-552.
- 34) López-Pedrera C, Aguirre MÁ, Barbarroja N, Cuadrado MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010. pii: 607084.
- 35) Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-1 receptors. *Endocrine Reviews*. 2001;22:818-835.
- 36) Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinology*. 2011;47:R1-R10.
- 37) Cohen P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7:867-873.
- 38) Baron AD. Insulin resistance and vascular function. *J Diabetes Complications*. 2002;16:92-102.
- 39) El Magadmi M, Ahmad Y, Turkie W, y cols. Hyperinsulinemia, insulin resistance, and circulating oxidized low density lipoprotein in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2006;33:50-56.

- 40) Petri M, Spence D, Bone LR, Hochberg MC. Coronary artery disease risk factors in the Johns Hopkins Lupus Cohort: prevalence, recognition by patients, and preventive practices. *Medicine*. 1992;71:291-302.
- 41) Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD, Ibañez D, Steiner G. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study. *Arthritis Rheum*. 2003;48:3159-3167.
- 42) Posadas-Romero C, Torres-Tamayo M, Zamora-González J, y cols. High insulin levels and increased low-density lipoprotein oxidizability in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50:160-165.
- 43) Chung CP, Oeser A, Solus JF, y cols. Inflammation-associated insulin resistance: differential effects in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus define potential mechanisms. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2105-2112.
- 44) Tso TK, Huang WN. Elevation of fasting insulin and its association with cardiovascular disease risk in women with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2009;29:735-742.
- 45) Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 1999;159:1104-1109.
- 46) Reilly MP, Wolfe ML, Rhodes T, Girman C, Mehta N, Rader DJ. Measures of insulin resistance add incremental value to the clinical diagnosis of metabolic syndrome in association with coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2004 ;110:803-809.
- 47) Harrop M, Caudwell J, Stojanovski C, Colman PG. Insulin autoantibodies in patients with autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract* 1992;18:107–112.
- 48) Lidar M, Braf A, Givol N, y cols. Anti-insulin antibodies and the natural autoimmune response in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001;10:81–86.
- 49) Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity*. 2010;32:488-499.
- 50) Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, y cols. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation* 2001;104: 1887–1893.
- 51) Pradhan AD, Cook NR, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. C-reactive protein is independently associated with fasting insulin in nondiabetic women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23: 650–655.

- 52)**Harper HA, Rodwell VW, Mayes PA. Review of physiological chemistry. Cap 22: Metabolism of lipids: I. Fatty Acids, pag 321. Cap. 23: Metabolism of lipids: II. Role of the tissues, pag. 343. Lange Medical Publications, Edición 17, 1979.
- 53)**Durrington PN. Hyperlipidaemia, diagnosis and management. Cap. 1: Lipids and their metabolism, pags. 4-24. Oxford:Butterworth Heinemann, Edición 2, 1995.
- 54)**Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Cap. 114: Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins, pags. 2705-2712. McGraw Hill, Edición 8, 2001.
- 55)**Zorrilla E. Lípidos Séricos. Cap. 3: Lipoproteínas y apoproteínas, pags. 30-42. Interamericana / McGraw Hill. Edición 2, 1989.
- 56)**Reiss AB. Effects of inflammation on cholesterol metabolism: impact on systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11:255-260.
- 57)**Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, y cols. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997;95:69–75.
- 58)**Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996;276:875–881.
- 59)**Agarwal S, Elliott JR, Manzi S. Atherosclerosis risk factors in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2009;11:241-247.
- 60)**Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342-374.
- 61)**McMahon M, Hahn BH, Skaggs BJ. Systemic lupus erythematosus and cardiovascular disease: prediction and potential for therapeutic intervention. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7:227-241.
- 62)**El Harchaoui K, Arsenault BJ, Franssen R, y cols. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. *Ann Intern Med.* 2009;150:84 –93.
- 63)**Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, y cols. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96:2758-2767.

- 64)**McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, y cols. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2541-2549.
- 65)**McMahon M, Grossman J, Skaggs B, y cols. Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2428-2437.
- 66)**McMahon M, Sahakian L, Skaggs B, y cols. PiHDL is a stronger predictor of atherosclerosis than other high-risk inflammatory lipids, and is associated with a 17-fold increased risk of subclinical atherosclerosis in SLE. Presented at the annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology. San Francisco, CA; October 24-29, 2008.
- 67)**Juárez-Rojas J, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, y cols. High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008;17:981-987.
- 68)**Chung CP, Oeser A, Raggi P, y cols. Lipoprotein subclasses and particle size determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27:1227-1233.
- 69)**Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145:227-238.
- 70)**Hunt BJ. The endothelium in atherogenesis. *Lupus.* 2000;9:189-193.
- 71)**Wierzbicki AS. Lipids, cardiovascular disease and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000;9:194-201.
- 72)**Manzi S. Systemic lupus erythematosus: a model for atherogenesis?. *Rheumatology.* 2000;39:353-359.
- 73)**Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168-175.
- 74)**Lima DS, Sato EI, Lima VC, Miranda F Jr, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:292-297.
- 75)**El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, y cols. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation.* 2004;110:399-404.
- 76)**Piper MK, Raza K, Nuttall SL, y cols. Impaired endothelial function in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16:84-88.

- 77)**Alexánder E, Ochoa JM, Calleja R, y cols. Endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus: evaluation with ¹³N-ammonia PET. *J Nucl Med.* 2010;51:1927-1931.
- 78)**Barac A, Campia U, Panza JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension.* 2007;49:748-760.
- 79)**Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282:H1-H5.
- 80)**Berrazueta JR. Evaluación no invasiva de la función endotelial. *Arc Card Mex.* 2004;74:S537-S541.
- 81)**Piero O, Bonetti, Lilach O, Lerman and Amir Lerman. Endothelial Dysfunction : A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:168-175.
- 82)**Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27-III32.
- 83)**Schindler TH, Schelbert HR, Quercioli A, Dilsizian V. Cardiac PET imaging for the detection and monitoring of coronary artery disease and microvascular health. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2010;3:623-640.
- 84)**Czernin J, Allen-Auerbach M, Schelbert HR. Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September 2006. *J Nucl Med.* 2007;48:78S-88S.
- 85)**Gould KL. Positron emission tomography in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol.* 2007;22:422-428.
- 86)**Alexánder E, Ricalde A, Estradas J, Alexánder EG, Meave A. Evaluation of coronary flow by means of PET in the Mexican population without coronary artery disease. *Arch Cardiol Mex.* 2005;75:23-28.
- 87)**Huang W, Glass CK. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1542-1549.
- 88)**Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18:128-133.
- 89)**Bugge A, Mandrup S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* 2010;2010. pii: 169506
- 90)**Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature.* 2000;405:421-424.

- 91)** Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 2001;142:4195-4202.
- 92)** Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:341-67.
- 93)** Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. 2000;49:497-505.
- 94)** Escher P, Wahli W. *Mutat Res*. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. 2000;448:121-138.
- 95)** Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47:507-514.
- 96)** Mudaliar S, Henry RR. PPAR agonists in health and disease: pathophysiologic and clinical overview. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 2002;9:285-302.
- 97)** Rosenblatt S, Miskin B, Glazer NB, Prince MJ, Robertson KE; Pioglitazone 026 Study Group. The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Coron Artery Dis*. 2001;12:413-423.
- 98)** Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. *Ann Intern Med*. 2001;134:61-71.
- 99)** Lawrence JM, Reid J, Taylor GJ, Stirling C, Reckless JP. Favorable effects of pioglitazone and metformin compared with gliclazide on lipoprotein subfractions in overweight patients with early type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:41-46.
- 100)** Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, y cols; GLAI Study Investigators. Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2007;30:2458-2464.
- 101)** Szapary PO, Bloedon LT, Samaha FF, y cols. Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:182-188.
- 102)** Hughes TA, Stentz F, Gettys T, Smith SR. Combining beta-adrenergic and peroxisome proliferator-activated receptor gamma stimulation improves lipoprotein composition in healthy moderately obese subjects. *Metabolism* 2006;55:26-34.

- 103)** Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ. Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs*. 2002;62:1463-1480.
- 104)** Eckland D, Danhof M. Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108:S234-S242.
- 105)** Nikpour M, Urowitz MB, Gladman DD. Epidemiology of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2009;11:248-254.
- 106)** Zhao W, Thacker SG, Hodgins JB, y cols. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone improves cardiometabolic risk and renal inflammation in murine lupus. *J Immunol* 2009;183:2729-2740.
- 107)** Tan EM, Cohen AS, Fries JF, y cols. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
- 108)** Gotto A, Powell W. Tratamiento de los trastornos lipídicos: Intervención sobre los hábitos de vida. *Los trastornos lipídicos en la práctica clínica*. Buenos Aires. Pags 91-95. Editorial Médica. 1995.
- 109)** Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, y cols. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120:1640-1645.
- 110)** DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *JAMA* 1986;256:2372-2377.
- 111)** Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
- 112)** Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, y cols. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-

- dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
- 113)** Williams MR, Westerman RA, Kingwell BA, y cols. Variations in endothelial function and arterial compliance during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5389-5395.
- 114)** Perusse M, Pascot A, Despres JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res.* 2001;42:1331-1334.
- 115)** Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:408-419.
- 116)** Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res.* 1981;22:339-358.
- 117)** Pfützner A, Marx N, Lübben G, y cols. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1925-1931.
- 118)** Staniloae C, Mandadi V, Kurian D, y cols. Pioglitazone improves endothelial function in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Cardiology.* 2007;108:164-169.
- 119)** Asanuma Y, Chung CP, Oeser A, y cols. Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors. *J Rheumatol.* 2006;33:539-245.
- 120)** Erdmann E, Wilcox R. Pioglitazone and mechanisms of CV protection. *QJM* 2010;103:213-228.
- 121)** Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999;265:501-523.
- 122)** Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-454.
- 123)** Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:381-388.

- 124)** Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767–1772.
- 125)** Ridker P, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101:2149–2153.
- 126)** Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351:1106-1118.
- 127)** Chung CP, Avalos I, Oeser A, y cols. High prevalence of the metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease characteristics and cardiovascular risk factors. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:208-214.
- 128)** Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, y cols. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol*. 2002;22:2607-2619.
- 129)** Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:475-482.
- 130)** Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, y cols. High-Density Lipoprotein Subpopulation Profile and Coronary Heart Disease Prevalence in Male Participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2181-2187.
- 131)** Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, y cols. 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.
- 132)** Tsuchiya K, Akaza I, Yoshimoto T, Hirata Y. Pioglitazone improves endothelial function with increased adiponectin and high-density lipoprotein cholesterol levels in type 2 diabetes. *Endocr J*. 2009;56:691-698.
- 133)** Forst T, Lübben G, Hohberg C, y cols. Influence of glucose control and improvement of insulin resistance on microvascular blood flow and endothelial function in patients with diabetes mellitus type 2. *Microcirculation*. 2005;12:543-550.
- 134)** Campia U, Matuskey LA, Panza JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent

dilation in nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors. *Circulation*. 2006;113:867-875.

- 135)** Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K.. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:993-1007.
- 136)** Nomura H, Yamawaki H, Mukohda M, Okada M, Hara Y. Mechanisms underlying pioglitazone-mediated relaxation in isolated blood vessel. *J Pharmacol Sci*. 2008;108:258-265.
- 137)** Kudaravalli J. Improvement in endothelial dysfunction in patients with systemic lupus erythematosus with N-acetylcysteine and atorvastatin. *Indian J Pharmacol*. 2011;43:311-315.
- 138)** Zardi EM, Afeltra A. Endothelial dysfunction and vascular stiffness in systemic lupus erythematosus: Are they early markers of subclinical atherosclerosis?. *Autoimmun Rev*. 2010;9:684-686.
- 139)** Mok CC, Poon WL, Lai JP, y cols. Metabolic syndrome, endothelial injury, and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 2010;39:42-49.
- 140)** Tănăsescu C, Jurcuț C, Caraiola S, Nițescu D, Copaci I, Jurcuț R. Endothelial dysfunction in inflammatory rheumatic diseases. *Rom J Intern Med*. 2009;47:103-108.
- 141)** Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:374-380.
- 142)** Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2470-H2477.