



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBCLASES DE LIPOPROTEÍNAS**  
**DE ALTA DENSIDAD DURANTE TRIGLICERIDEMIA**  
**POSTPRANDIAL.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**RODRÍGUEZ MARTÍNEZ NANCY**



**MÉXICO, D.F. Octubre**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: ENRIQUE MORENO SAENZ**

**VOCAL: OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ**

**SECRETARIO: GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA**

**1<sup>er.</sup> SUPLENTE: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**

**2° SUPLENTE: LUZ MARÍA DEL ROCÍO VALDÉS GÓMEZ**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE METABOLISMO DE LÍPIDOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ.**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

*Dr. Oscar A. Pérez Méndez*

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

*Dr. Elizabeth Carreón Torres*

**SUSTENTANTE (S):**

---

*Nancy Rodríguez Martínez*

## Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	2
1. <i>Lipoproteínas</i> .....	2
1.1 <i>Clasificación de las lipoproteínas</i> .....	5
2. <i>Lipoproteínas de alta densidad (HDL)</i> .....	6
2.1 <i>Las HDL y el riesgo cardiovascular</i> .....	7
2.2 <i>Actividad antioxidante de las HDL</i> .....	9
2.3 <i>Transporte reverso de colesterol (TRC)</i> .....	10
3. <i>Los triacilgliceroles postprandiales como biomarcadores de riesgo cardiovascular</i> .....	14
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVOS</b> .....	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
<i>Población de estudio</i> .....	20
<i>Criterios de inclusión</i> .....	20
<i>Criterios de exclusión</i> .....	21
<i>Alimento con alto contenido graso</i> .....	21
<i>Toma de muestras</i> .....	22
<i>Análisis de laboratorio</i> .....	22
<i>Distribución de tamaños y caracterización de las subclases de HDL</i> .....	23
<i>Análisis densitométrico de las HDL</i> .....	24
<i>Análisis estadístico</i> .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	26
<i>Diseño del alimento de alto contenido calórico</i> .....	26
<i>Características antropométricas y clínicas de los participantes</i> .....	28
<i>Cinética de triacilgliceroles y colesterol</i> .....	29
<i>Caracterización de las subclases de HDL en estado postprandial</i> .....	30
<i>Área bajo la curva incremental</i> .....	35
<i>Actividad de paraoxonasa</i> .....	39
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	41

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>48</b>
<b>Anexo 1</b> .....	<b>52</b>
<b>Anexo 2</b> .....	<b>54</b>
<b>Anexo 3</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexo 4</b> .....	<b>57</b>
<b>Anexo 5</b> .....	<b>60</b>

## **Índice de figuras**

<b>Figura 1 Estructura general de las lipoproteínas.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2 Muestra las enzimas y receptores asociados al transporte Reverso de colesterol.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3 Consecuencias metabólicas de la hipertrigliceridemia.<sup>(40)</sup> .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4 Cinética de concentraciones plasmáticas. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5 Cinética de Colesterol total (Ct) por subpoblaciones de HDL.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6 Cinética de Triacilgliceroles (Tg) por subpoblaciones de HDL.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9 Relación entre el ABCI y la concentración plasmática de Tg por participante. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 10 Distribución de las subpoblaciones de HDL por triacilgliceroles de sujetos ABCI menor y ABCI mayor.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 11 Cinética de la actividad de PON1.....</b>	<b>40</b>

## **Índice de Tablas**

<b>Tabla 1 Características de las apolipoproteínas.<sup>(2, 3)</sup></b> .....	<b>4</b>
<b>Tabla 2 Clasificación fisicoquímica de las lipoproteínas.</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabla 3 Composición química de las lipoproteínas.</b> .....	<b>6</b>
<b>Tabla 4 Características de las HDL.</b> .....	<b>7</b>
<b>Tabla 5 Enzimas, proteínas de transporte y de membrana que intervienen en el TRC<sup>(38, 39)</sup></b> .....	<b>12</b>
<b>Tabla 6 Contenido energético por porción del alimento.</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabla 7 Características antropométricas de los participantes.</b> .....	<b>28</b>
<b>Tabla 8 Perfil bioquímico de los participantes</b> .....	<b>29</b>

## **Abreviaturas**

<b>ABCA-1 tipo 1</b>	<b><i>Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1</i></b>
<b>ABCI</b>	<b><i>Área bajo la curva incremental</i></b>
<b>Apo</b>	<b><i>Apolipoproteína</i></b>
<b>CE</b>	<b><i>Colesterol esterificado</i></b>
<b>CETP</b>	<b><i>Proteína de transferencia de ésteres de colesterol</i></b>
<b>C-HDL</b>	<b><i>Colesterol de lipoproteínas de alta densidad</i></b>
<b>CL</b>	<b><i>Colesterol libre</i></b>
<b>C-LDL</b>	<b><i>Colesterol de lipoproteínas de baja densidad</i></b>
<b>Ct</b>	<b><i>Colesterol total</i></b>
<b>CE</b>	<b><i>Colesterol esterificado/ Ésteres de Colesterol</i></b>
<b>Col</b>	<b><i>Colesterol plasmático</i></b>
<b>EAC</b>	<b><i>Enfermedad aterosclerosa coronaria</i></b>
<b>ECV</b>	<b><i>Enfermedad Cardiovascular</i></b>
<b>HDL</b>	<b><i>Lipoproteínas de alta densidad</i></b>
<b>IDL</b>	<b><i>Lipoproteínas de densidad intermedia</i></b>
<b>LCAT</b>	<b><i>Lecitina colesterol acilo-transferasa</i></b>
<b>LDL</b>	<b><i>Lipoproteínas de baja densidad</i></b>
<b>LH</b>	<b><i>Lipasa hepática</i></b>
<b>Lp</b>	<b><i>Lipoproteínas</i></b>
<b>LPL</b>	<b><i>Lipasa lipoproteínica</i></b>
<b>PAGE</b>	<b><i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i></b>
<b>PLTP</b>	<b><i>Proteína de transporte de fosfolípidos</i></b>
<b>PON1</b>	<b><i>Paraoxonasa</i></b>



<b><i>PPS</i></b>	<b><i>Fosfolípidos</i></b>
<b><i>Qm</i></b>	<b><i>Quilomicrones</i></b>
<b><i>RMN</i></b>	<b><i>Resonancia magnética nuclear</i></b>
<b><i>SR-BI</i></b>	<b><i>Receptor scavenger clase B tipo I</i></b>
<b><i>Tg</i></b>	<b><i>Triacilgliceroles</i></b>
<b><i>TRC</i></b>	<b><i>Transporte reverso de colesterol</i></b>
<b><i>VLDL</i></b>	<b><i>Lipoproteínas de muy baja densidad</i></b>

## **RESUMEN**

Las enfermedades cardiovasculares han tomado gran importancia en los últimos años, ya que en México se han convertido en una de las principales causas de muerte. Así mismo las determinaciones que puedan representar un factor de riesgo de padecer alguna de estas enfermedades se ha convertido en prioridad de muchas investigaciones. Existe una gran controversia acerca de que los triacilgliceroles pueden considerarse un factor de riesgo independiente de desarrollar enfermedades cardiovasculares, ya que su metabolismo está relacionado con la composición lipídica de las HDL, a las cuales se les adjudica un efecto anti aterosclerótico y antioxidante.

El presente estudio caracterizó, por tamaño y contenido de lípidos, a las subclases de HDL de sujetos sanos después de ingerir un alimento con alto contenido en triacilgliceroles. Los resultados en la composición lipídica de las subclases de HDL no presentaron cambios estadísticamente significativos en estado postprandial. Sin embargo los datos obtenidos de los 10 sujetos de estudio nos permitieron separar en dos subgrupos, de acuerdo al incremento de Tg plasmáticos que presentaron en estado postprandial, a lo cual nombramos área bajo la curva incremental y que puede estar relacionada con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

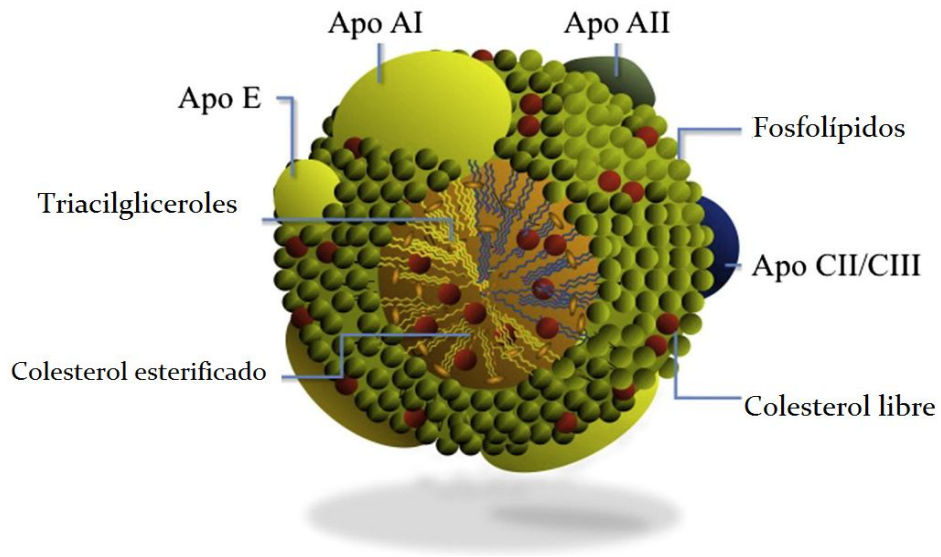
## MARCO TEÓRICO

### 1. Lipoproteínas

Las lipoproteínas (Lp) son complejos macromoleculares, formados por un núcleo hidrófobo compuesto de lípidos no polares como los triacilgliceroles y ésteres de colesterol, además de una superficie anfipática de fosfolípidos, colesterol libre y proteínas conocidas como apolipoproteínas (Apo), que estabilizan a la partícula en términos fisicoquímicos (**Figura 1**).

Las apolipoproteínas son proteínas específicas de peso molecular variable. Las funciones principales son regular los lípidos en el plasma y el transporte de las Lp, actuando como ligandos de receptores membranales y como cofactores de enzimas del metabolismo intravascular de los lípidos. (**Tabla 1**)

Todas las lipoproteínas son sintetizadas por el hígado, los intestinos y a partir de cambios metabólicos de algunas precursoras. En la circulación las lipoproteínas son muy dinámicas, transportan los lípidos absorbidos de la dieta o sintetizados por el organismo hasta los órganos o tejidos que los requieren para finalmente ser catabolizadas por el hígado, riñón o tejidos periféricos por la vía endocítica mediada por receptor.<sup>(1)</sup>



**Figura 1 Estructura general de las lipoproteínas.** <sup>(2)</sup>

Se observa el contenido de triacilglicerolos y colesterol esterificado en el núcleo hidrófobo, y la superficie de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas.

**Tabla 1** Características de las apolipoproteínas.<sup>(3, 4)</sup>

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

Apo: Apolipoproteína, Da: Daltons, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa Hepática, Tg: Triacilgliceroles, LP: Lipoproteína.

## 1.1 Clasificación de las lipoproteínas

Las lipoproteínas se han definido por sus características físicas y químicas, particularmente su densidad de flotación, su desplazamiento electroforético en geles de agarosa y su tamaño, estas características se han utilizado para su clasificación (**Tabla 2**).

La clasificación en quilomicrones (Qm), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL: del inglés very low density lipoproteins), de densidad intermedia (IDL: del inglés Intermediate density lipoproteins), de baja densidad (LDL: del inglés, low density lipoproteins) y de alta densidad (HDL: del inglés high density), está basada en su contenido de lípidos y proteínas, que determinan las densidades de estas clases de lipoproteínas (**Tabla 3**).

**Tabla 2** Clasificación fisicoquímica de las lipoproteínas.

	<b>Qm</b>	<b>VLDL</b>	<b>IDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Densidad (g/ml).</b>	<0.94	0.94- 1.006	1.006-1.019	1.006- 1.069	1.063- 1.21
<b>Movilidad electroforética.</b>	Origen.	Pre-beta.	Pre-beta Beta.	Beta.	Alfa.
<b>Tamaño (nm).</b>	>70	30- 70	20- 30	18- 30	5- 12

*Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.*

**Tabla 3 Composición química de las lipoproteínas.**

<b>Lipoproteínas</b>	<b><math>\delta</math> flotación (g/ml)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Pps (%)</b>	<b>Tg (%)</b>	<b>Cl (%)</b>	<b>CE (%)</b>
<b>Qm</b>	<0.94	1 – 2	3 – 6	90 – 95	1 – 3	2 – 4
<b>VLDL</b>	0.95 - 1.006	6 – 10	15 – 20	46 – 65	4 – 8	5
<b>IDL</b>	1.006 - 1.09	20	30	35	35	35
<b>LDL</b>	1.019–1.063	18 – 22	18 – 24	4 – 8	6 – 8	45 – 50
<b>HDL</b>	1.063-1.210	45 – 55	26 – 32	2 – 7	3 – 5	15 – 20

*Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad,  $\delta$  flotación: densidad de flotación, Pps: Fosfolípidos, Tg: triacilgliceroles, Cl: Colesterol libre, CE: Colesterol esterificado.*

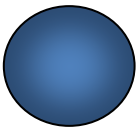
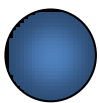



## **2. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)**

Las lipoproteínas de alta densidad son las más pequeñas y de mayor densidad de flotación en comparación con las otras lipoproteínas. El hígado y el intestino son los encargados de sintetizar y ensamblar las HDL, o bien pueden provenir de transformaciones metabólicas de otras lipoproteínas.

Las HDL pueden ser clasificadas en subpoblaciones de acuerdo a sus características fisicoquímicas. Por su contenido de apolipoproteínas pueden clasificarse en LpA-I (las que contienen sólo Apo A-I), LpA-I:LpA-II (las que contienen tanto Apo A-I como Apo A-II). Por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño se dividen en  $\alpha$ -HDL y pre $\beta$ -HDL. Por resonancia magnética nuclear se pueden clasificar en HDL pequeñas, medianas y grandes.<sup>(5)</sup>

La clasificación que manejaremos en este trabajo está determinada por su densidad de flotación donde pueden separarse en dos subpoblaciones las HDL2 y las HDL3<sup>(3)</sup> así como por su tamaño, que pueden dividirse en 5 subpoblaciones, las HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c. <sup>(6)</sup>

**Tabla 4 Características de las HDL.**

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
					
Diámetro (nm)	13.59-10.58	10.58-9.94	9.94-8.98	8.98-8.45	8.45-7.94
Densidad (g/ml)	1.063	1.107	1.123	1.155	1.210
% Pt	35	40	45	55	65
Pps (mol/mol HDL)	130	140	120	45	25
Cl (mol/mol HDL)	70	40	25	15	10
CE (mol/mol HDL)	180	160	140	70	40
Tg (mol/mol HDL)	30	20	15	10	5

%Pt: Porcentaje de proteínas totales, Pps: fosfolípidos, Cl: Colesterol libre, CE: colesterol esterificado, Tg: triacilgliceroles.

## **2.1 Las HDL y el riesgo cardiovascular.**

Es bien conocida la relación negativa que existe entre la concentración plasmática de C-HDL y el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV).<sup>(7-10)</sup> En un estudio prospectivo se observó que existe una relación inversa con el riesgo de padecer enfermedad isquémica coronaria, más fuerte con el colesterol de las HDL2 que con las HDL3.<sup>(11)</sup> Sin embargo, también hay estudios que demuestran que no existe relación alguna.<sup>(12, 13)</sup> Las controversias que existen alrededor de



este tema pueden deberse a que se ha considerado al C-HDL como un indicador de la funcionalidad de las HDL; esta consideración es correcta cuando se trata de HDL con estructura normal. Sin embargo, la estructura de las HDL no es normal en pacientes con síndrome metabólico, *diabetes mellitus* y con enfermedad cardiovascular<sup>(14-16)</sup> y por lo tanto el colesterol de HDL no es un reflejo ni de la cantidad de partículas ni de la funcionalidad de las mismas.<sup>(2)</sup>

En diversos estudios se ha observado que existe una mejor correlación entre el riesgo de desarrollar EAC con el número de partículas de HDL que con el C-HDL.<sup>(17, 18)</sup> Además, algunas investigaciones en sujetos con síndrome metabólico y *diabetes mellitus* tipo 2, sugieren que altos niveles de HDL pequeñas es un factor de riesgo para desarrollar EAC,<sup>(18-20)</sup>. Una posible explicación a estas observaciones es que las HDL pequeñas se depuran más rápidamente; en consecuencia, cuando hay una prevalencia de este tipo de partículas, las HDL se eliminan del plasma dando lugar a una hipoalfalipoproteinemia y el consecuente riesgo cardiovascular<sup>(21)</sup>.

Por otro lado Lamarche<sup>(22)</sup> y Salonen<sup>(23)</sup> proponen que el efecto cardioprotector de los niveles elevados de HDL son atribuidos a la subpoblación de HDL<sub>2</sub>. En ese mismo sentido, Stampfer<sup>(23)</sup> y Sweetnam<sup>(21)</sup> encontraron a las HDL<sub>3</sub> como el predictor más fuerte de enfermedad isquémica. La discrepancia en el papel jugado por las subclases de HDL obliga a más investigación en este ámbito.

Además, se ha sugerido que las subclases de HDL poseen diferentes características antiaterogénicas, incluyendo sus propiedades antioxidantes,<sup>(24-26)</sup> así como su capacidad de promover el eflujo de colesterol de tejidos periféricos<sup>(27-29)</sup>.

## 2.2 Actividad antioxidante de las HDL.

---

Las HDL evitan la oxidación de las LDL, y a través de este mecanismo evitan la inflamación, disfunción endotelial y muerte celular inducida por las LDL oxidadas.<sup>(30)</sup> La principal proteína asociada físicamente a las HDL que tiene como función prevenir la oxidación de lípidos o la degradación de hidroperóxidos es la Paraoxonasa 1 (PON1).

La PON1 es una enzima dependiente de calcio con actividad de esterasa y lactonasa, que fue descrita por A. Mazur en 1946.<sup>(31)</sup> Está físicamente asociada a las HDL por su dominio hidrofóbico N-terminal, dependiente de la tensión superficial de la lipoproteína.

El primer informe acerca de la capacidad antioxidante de la PON1 fue en 1991 donde Mackness y colaboradores<sup>(32)</sup> sugirieron que la enzima podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las LDL, lo cual fue de gran importancia clínica dada la relación entre la oxidación de las LDL y la aterosclerosis, ya que sólo las LDL oxidadas se unen a receptores de los macrófagos y son tomadas, para formar las células espumosas.

El papel ateroprotector de PON1 está relacionado con su capacidad de transformar los lipoperóxidos de las LDL, generados en el espacio subendotelial durante la formación de la placa aterosclerótica, en los lipohidróxidos correspondientes, que son biológicamente inocuos.<sup>(33, 34)</sup>

Algunos estudios han demostrado que las HDL son el aceptor fisiológico predominante de la PON1, sin embargo la eficiencia de este aceptor depende del tamaño y composición del mismo<sup>(24)</sup>. Estos resultados son consistentes con el hecho de que las partículas HDL pequeñas son las que transportan una mayor cantidad de PON1 por lipoproteína en comparación de las HDL grandes<sup>(24, 26)</sup>. Por lo tanto, la distribución de tamaños de HDL en principio debe determinar la

cantidad de PON1 circulante; sin embargo se sabe poco al respecto, en particular lo que ocurre con la cantidad de PON1 durante el posprandio.

### **2.3 Transporte reverso de colesterol (TRC)**

---

El transporte reverso de colesterol es el proceso fisiológico por el cual el colesterol de los tejidos periféricos es transportado mediante las HDL hacia el hígado para su excreción, lo cual supone de 6 a 9 mg/kg de peso/día.<sup>(35)</sup> Este proceso es esencial para la homeostasis del colesterol, además es un mecanismo clave para evitar la acumulación de este lípido en los macrófagos de la íntima arterial (células espumosas).

El TRC comienza con la secreción de Apo A-I al sistema vascular. Enseguida la Apo A-I se asocia con fosfolípidos para formar las HDL nacientes o HDL pre- $\beta$  con estructura discoidal (**Figura 2**).

El siguiente paso es el transporte de colesterol y fosfolípidos de las células periféricas a las HDL pre- $\beta$ , a través del transportador de membrana ABC-A1 (del inglés ATP-binding cassette A1), dependiente de ATP. La salida de colesterol mediada por ABC-A1 es crítica para el macrófago, ya que depende especialmente de este transportador, para deshacerse del exceso de colesterol.

Posteriormente el colesterol de estas partículas es esterificado por la enzima plasmática LCAT (lecitin-colesterol acil transferasa) (**Tabla 5**). El colesterol esterificado pierde su propiedad antipática y se introduce al núcleo de la HDL produciendo una partícula menos densa y de mayor tamaño conocida como HDL2.

El colesterol esterificado puede ser eliminado mediante 2 vías principalmente. Una de ellas consiste en internalizar la HDL a las células hepáticas a través del receptor SR-BI y eliminar el lípido de la lipoproteína, dando origen una partícula

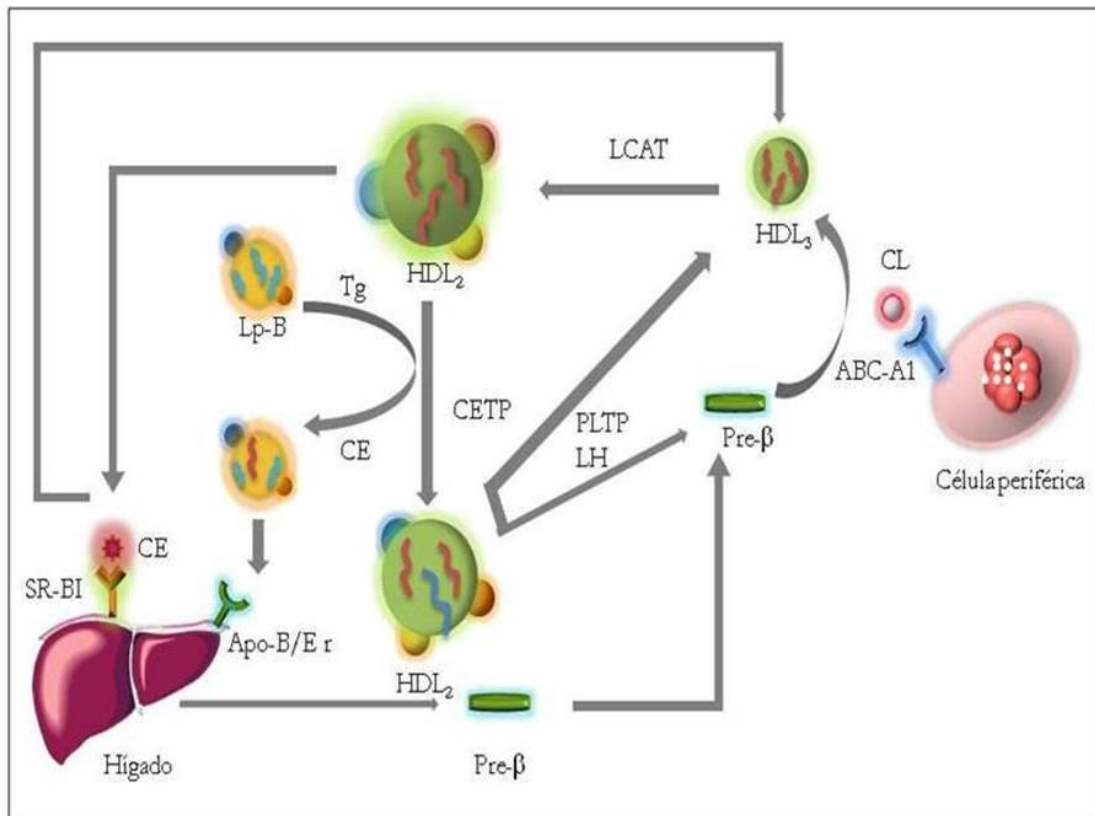
más pequeña del tipo HDL3. La otra vía consiste en intercambiar el colesterol esterificado de las HDL2 con triacilgliceroles de lipoproteínas ricas en Apo B, como las VLDL e IDL. Este mecanismo está mediado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (**Tabla 5**). Esta última se considera una ruta de eliminación proaterogénica, pues favorece la formación de LDL ricas en colesterol.<sup>(36)</sup> Asimismo, existe un intercambio aparentemente pasivo de Apo C's y Apo E de las HDL con los quilomicrones y VLDL.

El último paso del TRC es la hidrólisis de los triacilgliceroles de las HDL2, mediante la lipasa hepática (LH), que en asociación con la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) remodelan los remanentes de HDL en partículas pre- $\beta$  y HDL3, ambas con la capacidad de iniciar el ciclo.<sup>(37)</sup> (**Figura 2**)

**Tabla 5 Enzimas, proteínas de transporte y de membrana que intervienen en el TRC<sup>(38, 39)</sup>**

Nombre	Función	Origen
LCAT	Cataliza la transferencia de ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre presente en las HDL y LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático.
LH	Hidroliza los Tg y Pps de HDL, IDL y LDL. Es cofactor del SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de Apo A-I libre de lípidos.	Hepático.
LPL	Hidroliza los Tg de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia colesterol esterificado por Tg entre las HDL2 y lipoproteínas que contienen Apo B.	Tejido adiposo, hepático intestino delgado.
PLPT	Transferencia de Pps entre lipoproteínas ricas en Tg y HDL. Remodelación de las HDL.	Hígado y endotelio.
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células.	Hepatocitos, macrófagos.
ABC-AI	Modula el eflujo de colesterol y Pps. Favorece la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos, intestino.

LCAT; Lecitina colesterol aciltransferasa, LH; lipasa hepática, LPL, lipoproteína lipasa, CETP; proteína de transporte de colesterol esterificado, PLPT; proteína de transporte de fosfolípidos, SR-BI; receptor scavenger clase B tipo I, ABC-AI; transportador de membrana dependiente de ATP clase A tipo I, HDL; lipoproteína de alta densidad, LDL; lipoproteína de baja densidad, IDL; lipoproteína de densidad intermedia, VLDL; lipoproteínas de muy baja densidad, Qm; quilomicrón Tg; triacilgliceroles, Pps; fosfolípidos.



**Figura 2 Muestra las enzimas y receptores asociados al transporte Reverso de colesterol.**

ABC-A1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A tipo 1, LCAT: Lecitina colesterol acilo-transferasa, CETP: Proteína de transferencia de colesterol esterificado, PLTP: Proteína de transferencia de lípidos, LH: Lipasa hepática, SR-BI: Receptor scavenger BI, Apo-B/E r: Receptor para lipoproteínas que contienen Apo B/E. Tg: Triacilglicerol, CE: Colesterol esterificado. CL: colesterol libre. Lp-B: Lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL,IDL, Qm).<sup>(29)</sup>

### **3. Los triacilgliceroles postprandiales como biomarcadores de riesgo cardiovascular.**

Durante décadas se han buscado nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular en todo el mundo.<sup>(40)</sup> Un factor clave eran los niveles séricos de triacilgliceroles en ayuno.<sup>(41)</sup> Sin embargo el papel de estos en la promoción de enfermedades cardiovasculares ha sido debatido por más de 60 años desde que se relacionaron por primera vez.<sup>(42)</sup>

El primer trabajo que considera la aterogénesis puede ocurrir a través de un periodo postprandial, fue escrito 1979 por Zilversmit.<sup>(43)</sup> Sin embargo no fue hasta unos años más tarde que se consideró la concentración plasmática de triacilgliceroles en estado postprandial, como un mejor predictor de incidentes cardiovasculares, que los triacilgliceroles en ayuno.<sup>(44, 45)</sup>

La alteración en el metabolismo de las lipoproteínas, se verá reflejada en su estructura y función. En la hipertrigliceridemia, existe producción de Qm que son sustrato de la CETP, provocando un enriquecimiento con triacilgliceroles de las LDL y HDL (**Figura 3**). Estudios experimentales sugieren que las HDL con un alto contenido de triacilgliceroles pueden ser disfuncionales,<sup>(46, 47)</sup>. Asimismo, las LDL pequeñas y densas (consecuencia de la hidrólisis de Tg por la LH), pueden ser más susceptibles a modificaciones oxidantes<sup>(48, 49)</sup> y el aumento de estas partículas puede influir en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.<sup>(50)</sup>

Varios estudios sugieren que niveles elevados de triacilgliceroles postprandiales pueden incluso ser un mejor predictor de eventos coronarios que los niveles en ayuno<sup>(45, 51-53)</sup>. Esto es particularmente significativo dado que en las sociedades modernas, el estado postprandial en el humano es más duradero que el estado de ayuno.

Los lípidos de los alimentos después de ser absorbidos se ensamblan en quilomicrones en el retículo endoplásmico del enterocito; estas lipoproteínas están

caracterizadas por contener más del 90% de su masa seca como triacilgliceroles, una copia de Apo B48, y Apo A-I(54). Los quilomicrones son exportados por el aparato de Golgi a través de la membrana basolateral y transportados por la linfa, en donde adquieren Apo C-II y Apo E, hasta alcanzar el torrente sanguíneo. En la circulación, estas partículas son transformadas en remanentes de quilomicrones debido a la acción lipolítica de la lipasa lipoproteica (activado por la presencia de apolipoproteína C-II). La mayoría de los ácidos grasos producidos por este proceso son oxidados o almacenados en el tejido adiposo, el músculo y el hígado. Los remanentes de quilomicrones son ricos en ésteres de colesterol y contienen sólo Apo B48 y Apo E. Los hepatocitos son las células que depuran los remanentes de quilomicrones, principalmente por receptores de LDL (Apo E es el ligando) y proteoglicanos en el espacio de Disse (lipasa lipoproteica, lipasa hepática y Apo E son los ligandos). Otros receptores que parecen estar involucrados en este proceso incluyen al “scavenger receptor class B type I” (SR-BI) y el “LDL-receptor- related protein-1” (LRP-1)(55). Se ha propuesto que los quilomicrones podrían participar en el desarrollo del ateroma como se menciona a continuación.

En primer lugar, la asociación de los quilomicrones con la aterosclerosis puede ser explicada por la presencia de un número aumentado de remanentes de quilomicrón y de VLDL en estado postprandial: el contenido de colesterol en dichas partículas contribuiría a generar el ateroma. Por otra parte, el estudio de Bansal et al. arriba mencionado<sup>(44)</sup>, reportó una asociación entre los niveles de triacilgliceroles postprandiales y el riesgo para eventos cardiovasculares en un subgrupo de mujeres del universo de 26,509 incluidas<sup>(44)</sup>. A diferencia de los triacilgliceroles en ayuno, encontraron que sólo los niveles de triacilgliceroles postprandiales mantuvieron una asociación independiente con eventos cardiovasculares en modelos ajustados por múltiples factores de riesgo cardíaco. Asimismo, el Copenhagen City Heart Study concluyó que los niveles de triacilgliceroles postprandiales elevados se asocian con un riesgo elevado de infarto agudo de miocardio, enfermedad isquémica del corazón y muerte en ambos géneros<sup>(45)</sup>. Finalmente, Lindman et al.<sup>(53)</sup> mostraron que la hipertrigliceridemia



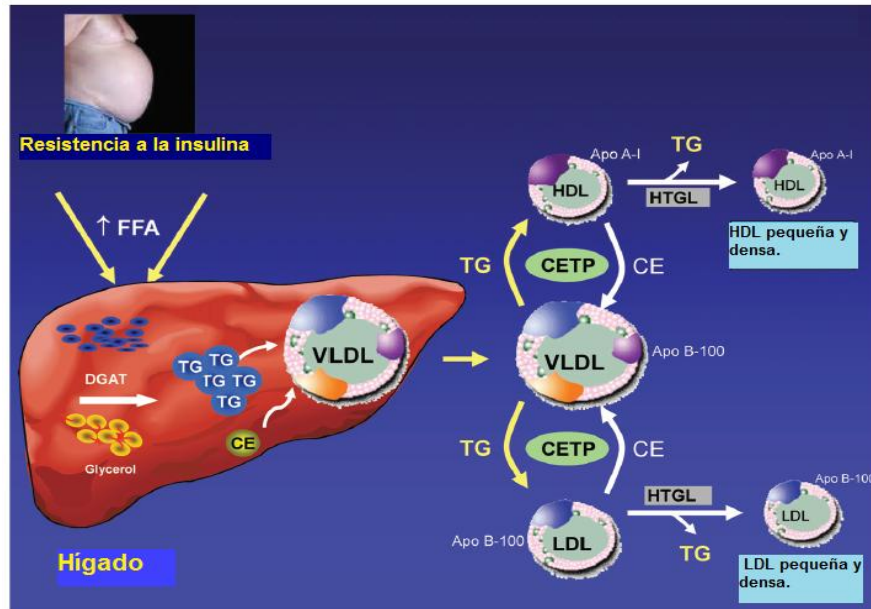
postprandial se asocia con riesgo para muerte cardiovascular en ambos géneros, aunque la asociación se atenuó cuando se ajustaron por otros factores de riesgo cardiovascular<sup>(53)</sup>.

Durante la lipemia postprandial existen cambios en el número y composición de las lipoproteínas circulantes, así como efectos inflamatorios. Éstos incluyen incremento de la expresión de genes pro-inflamatorios en las células endoteliales y activación del sistema del complemento. Con respecto a los cambios en lipoproteínas, principalmente, existe un incremento en el número de remanentes de lipoproteínas, VLDL, ácidos grasos libres y partículas de LDL pequeñas y densas.

Si un individuo tiene una predisposición para producir partículas remanentes (de quilomicrones y de VLDL) o LDL pequeñas y densas (por ejemplo, síndrome metabólico, hiperlipidemia familiar combinada), o tiene resistencia a la insulina, el aclaramiento de estas lipoproteínas estará retrasado (56). En estas condiciones, el endotelio sufrirá una exposición prolongada a dichas lipoproteínas que pueden penetrar al espacio subendotelial, resultado en la formación de células espumosas y aterosclerosis. Por ese motivo, se postula que el incremento postprandial de triacilgliceroles puede representar un factor de riesgo cardiovascular.

Otra explicación a la relación entre la hipertrigliceridemia postprandial y el riesgo de EAC, es el efecto potencial que tienen los quilomicrones sobre la estructura y función antiaterosclerosa de las HDL. En este contexto, se ha propuesto que las 5 subclases de HDL tienen funciones anti-aterogénicas diferentes (2). Por lo tanto, si la estructura de las HDL se altera durante el postprandio, la función anti-aterosclerosa será igualmente afectada. En efecto, es posible que la magnitud de la trigliceridemia postprandial a partir de una cierta concentración pueda afectar la estructura de las HDL como lo han sugerido estudios preliminares de nuestro laboratorio. De esta manera se generarían HDL disfuncionales a partir de ciertos niveles de triacilgliceroles postprandiales. No obstante, se conoce poco acerca de la relación entre la magnitud de la trigliceridemia postprandial, con la estructura y función de las HDL.

Por último, existe una variabilidad intra-individual muy importante en la medición de triacilgliceroles, especialmente en niveles postprandiales. Además, no existe un método estándar para determinar la trigliceridemia postprandial. Por ese motivo, se ha considerado como una variable inestable y a pesar de su potencial utilidad, la trigliceridemia postprandial no se utiliza actualmente en la evaluación de riesgo cardiovascular.



**Figura 3 Consecuencias metabólicas de la hipertrigliceridemia.**<sup>(40)</sup>

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, TG: triacilglicerol, CE: colesterol esterificado, FFA: ácidos grasos libres, CETP: Proteína de transporte de colesterol esterificado, HTGL: Lipasa hepática de triacilglicerol, DGAT: Diacilglicerol acilo transferasa.

## JUSTIFICACIÓN

Según el INEGI hasta el 2010 la principal causa de muerte en México eran las enfermedades del corazón, dentro de las principales se encuentra la aterosclerosis, la hipercolesterolemia, la hipetrigliceridemia, la hipoalfalipoproteinemia e hiperlipidemia mixta, siendo el padecimiento más frecuente en México la hpoalfalipoproteinemia.

Estudios realizados anteriormente se enfocaron a medir las concentraciones de C-HDL y C-VLDL, para determinar si existe riesgo de eventos cardiovasculares, pues ya es conocida la relación negativa entre estos. Sin embargo, estudios más recientes han sugerido determinar la composición lipídica de las subclases de HDL, pues se considera que proporciona mejor información de su funcionalidad y por lo tanto de su relación con las enfermedades cardiovasculares. Además, se ha sugerido desde hace tiempo que realizar la caracterización lipídica en estado postprandial permite establecer: 1) la relación entre la composición lipídica de las subclases de HDL y las enfermedades cardiovasculares; y 2) el papel que juega en el proceso aterogénico el hecho de que la mayor parte del día los humanos se encuentran en estado postprandial.<sup>(5)</sup>

Por lo tanto en el presente trabajo realizamos una caracterización de la composición lipídica de las subclases de las HDL, en estado postprandial, tomando únicamente sujetos sanos. Las observaciones que se realicen permitirán conocer si existe una variación en la composición lipídica y la funcionalidad antioxidante de las HDL, causada únicamente por el estado postprandial y no por antecedentes familiares u otros factores que pudieran predisponer una variación intrínseca de las subclases de HDL.

## **HIPÓTESIS**

El aumento en la concentración de triacilgliceroles del plasma inherente a un estado postprandial, estará relacionado con cambios en la composición lipídica y distribución de tamaños de las HDL, afectando el potencial antioxidante de estas lipoproteínas.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar las subclases de HDL de sujetos sanos después de ingerir un alimento con alto contenido en triacilgliceroles.

### **Objetivos particulares**

- Diseñar un alimento de alto contenido graso, que sea agradable a los participantes y que permita observar un incremento en los lípidos plasmáticos.
- Determinar la concentración de colesterol de las subclases de HDL durante el estado postprandial después de la ingesta de una comida con alto contenido de triacilgliceroles
- Determinar la concentración de triacilgliceroles de las subclases de HDL durante el estado postprandial después de la ingesta de una comida con alto contenido de triacilgliceroles
- Determinar la concentración de fosfolípidos de las subclases de HDL durante el estado postprandial después de la ingesta de una comida con alto contenido de triacilgliceroles
- Determinar la actividad de la paraoxonasa en sujetos sanos, después de ingerir un alimento de alto contenido lipídico.
- Establecer si existe una relación estadística entre el aumento de triacilgliceroles plasmáticos con la modificación en la estructura de las subclases de HDL.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población de estudio**

Se trata de un estudio piloto transversal, prolectivo de intervención. Para este trabajo se incluyeron 10 sujetos de sexo masculino que estuvieran dispuestos a participar en el protocolo sin remuneración alguna y permaneciendo alrededor de 6 horas en el laboratorio.

### **Criterios de inclusión.**

- Firma de consentimiento informado, para participar en el estudio.
- Género masculino.
- Edad: 18 a 30 años.
- IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>
- Clínicamente sanos
- Colesterol total < 250 mg/dL
- Triacilgliceroles < 250 mg/dL
- Glucosa en ayuno < 100 mg/dL
- No fumadores
- Que no realicen regularmente ejercicio aerobio intenso
- Que no estén bajo tratamiento hipolipemiente con fibratos, niacina, estatinas ni ácidos grasos omega-3
- Sin antecedentes personales de enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, cirugías recientes, hipertensión arterial, distiroidismo, o enfermedad renal o hepática.

## **Criterios de exclusión**

---

- Intolerancia a la lactosa.
- Alergia a algún componente del alimento a proporcionar.
- Sujetos que decidan abandonar el estudio antes de término
- Sujetos que no puedan ingerir el alimento propuesto

Siguiendo el PROY-NOM-012 “Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos”<sup>(57)</sup> los individuos fueron invitados a participar en el protocolo mediante una carta de consentimiento informado, en la cual se especificaba el fundamento, los objetivos y el alcance del protocolo. Asimismo se detallaba en tiempo y forma su participación en el mismo (anexo 1). Además este protocolo cuenta con la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

El número de sujetos incluidos fueron 10 por conveniencia.

### **Alimento con alto contenido graso.**

El alimento consistía en dos partes una líquida y la otra sólida, la primera se basaba en una malteada, para la cual se pesaron 100 g del suplemento alimenticio que se agregaron a 250 mL de bebida láctea y para facilitar la integración de los componentes se añadió agua. La segunda parte estaba formada por dos rebanadas de pan con 40 g de margarina y azúcar, la margarina se agregó líquida al pan. La preparación del alimento se realizaba el mismo día que se realizaba el estudio para ese sujeto de investigación. El contenido total de proteínas, carbohidratos y lípidos está especificado en los resultados.

## Toma de muestras

Se recolectaron muestras de sangre venosa con sistema vacutainer, en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero, y en tubos con EDTA (1.8 mg/dL) para la obtención de plasma. Las tomas de muestra se realizaron en ayuno de 12 h y posteriormente a las 1.0, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 horas después de ingerir el alimento con alto contenido lipídico. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min a 4 °C. Fue separado el suero y el plasma, para ser analizado o bien, fue dividido en alícuotas para ser congelado a -20 °C, para un uso posterior.

## Análisis de laboratorio.

Se determinó la concentración plasmática de glucosa, colesterol y triacilgliceroles, mediante técnicas enzimáticas colorimétricas (reactivo: Randox, Reino unido). Se cuantificó el colesterol total, los triacilgliceroles, los fosfolípidos y el colesterol libre de HDL, para lo cual se precipitó selectivamente a las lipoproteínas que contienen Apo B con una solución de ácido fosfotúngstico/cloruro de magnesio (reactivo comercial: Randox, 100 µL/mL de plasma), se tomó el sobrenadante para hacer la determinación de dichos lípidos mediante técnicas enzimáticas colorimétricas (reactivo comercial: Randox, Reino unido, reactivo para fosfolípidos: Wako Chemicals GmbH; Alemania). Para el caso del colesterol libre se omitió la colesterol esterasa del reactivo de colesterol (ver **anexo 2.**) El colesterol esterificado se calculó multiplicando la diferencia del colesterol total menos el libre expresados en mg/dL por 1.68<sup>(36)</sup>

La actividad de la paraoxonasa fue determinada por el método de Mackness y colaboradores.<sup>(58)</sup> Brevemente, 10 µL de la muestra previamente diluida (1/4) se agregan a 1ml de solución amortiguadora ARE (Tris 20 mM y CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, pH 8) que contiene fenilacetato (1.27µl/ 10 ml ARE) como sustrato. Se midió la velocidad de hidrólisis de fenilacetato, mediante la formación de fenol ( $\lambda=270$  nm),

durante 3 min cada 30 s. La actividad se expresa como  $\mu\text{mol}$  de fenol formado/minuto/mililitro de plasma (**anexo 3**).

### Distribución de tamaños y caracterización de las subclases de HDL.

Se determinó la estructura y diámetro de las subclases de HDL a través de una electroforesis no desnaturante, con gel de poliacrilamida en un gradiente 3%-30%. (**Anexo 4**). Para este procedimiento se utilizó plasma directamente, basándonos en un estudio reciente de nuestro laboratorio.<sup>(59)</sup> Se utilizaron marcadores proteínicos de alto peso molecular que contienen las siguientes proteínas globulares, tiroglobulina (17 nm), ferritina (12.2 nm) catalasa (10.4 nm) lactato deshidrogenasa (8.2 nm) y albúmina (7.1 nm), tomados de kits comerciales (GE healthcare, Reino unido), los cuales se utilizan como referencia de diámetro para determinar la proporción relativa de los tamaños de las subclases de HDL.

Las muestras y los marcadores se corrieron en el gel de poliacrilamida (3%-30%) a 90 V por 30 min, y posteriormente 22 h a 180 V. Los geles fueron revelados con reactivos para colesterol total, colesterol libre y triacilglicerol usando una mezcla enzimática no comercial, desarrollada recientemente en nuestro laboratorio.<sup>(60, 61)</sup> (**Anexo 5**) Se dejaron 30 min en oscuridad a una temperatura de 30 °C, a continuación se retiró el excedente de reactivo y se analizó por densitometría óptica. Después los geles fueron desteñidos con una mezcla de metanol: ácido acético: agua (5:2:13 en volumen). Finalmente los geles fueron teñidos nuevamente con azul de Coomassie (R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua destilada) y analizados por segunda vez en el densitómetro GS-670.



## Análisis densitométrico de las HDL

El diámetro hidrodinámico de las HDL se obtiene usando como referencia los marcadores proteínicos de alto peso molecular que se agregan a los geles de electroforesis.

La proporción relativa de cada una de las subclases de HDL se obtiene integrando el área bajo la curva de los intervalos de tamaño analizados por densitometría óptica (Molecular Analyst Software Versión 1.1 1994 BioRad). Los intervalos considerados por subclase son: 12.36-10.58 nm para HDL 2b, 10.58-9.94 nm para HDL 2a, 9.94-8.98 nm para HDL 3a, 8.98- 8.45 nm para HDL 3b y 8.45-7.9 nm para HDL 3c<sup>(61)</sup>. La proporción de las subclases esta expresada como el porcentaje del área bajo la curva de HDL total.

## Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico Stistical Package for the Social Sciencies (SPSS Inc. Versión 18 para Windows, Chicago Illinois). Los valores de las variables clínicas se expresan como la media  $\pm$  error estándar (EE).

La comparación entre los diferentes tiempos se realizó con una prueba estadística ANOVA y un análisis *post hoc* tipo DMS (diferencia mínima significativa), considerando un valor de  $P < 0.05$  como significancia estadística.

Para conocer el incremento en la concentración de triacilgliceroles en plasma, se determinó el área bajo la curva incremental (ABCI) de cada sujeto, la cual se calculó de la siguiente manera: primero se restó la concentración en ayuno de todos los puntos de la cinética, de tal manera que ya no influía la concentración inicial en la diferencia del incremento y posteriormente a través del método de los

trapecios se calculó valor por participante permitió separarlos en dos subgrupos de estudio, los que tenían una ABCI mayor a 423 h mg/dL de los que tenían una ABCI menor de 423 h mg/dL.

Las comparaciones entre el grupo ABCI mayor con ABCI menor, se realizó utilizando prueba t no pareada con un nivel de significancia  $<0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Diseño del alimento de alto contenido calórico.**

El alimento proporcionado a los participantes fue diseñado en base a un estudio previo.<sup>(5)</sup>El contenido energético fue de 1008 kcal, conteniendo 50 g de lípidos totales; se estandarizó la cantidad de lípidos para que no fuera modificado el alimento por paciente, ya que Wojczynski y colaboradores administraron 700 Kcal por m<sup>2</sup> de superficie corporal.

La preparación del alimento fue reproducible, pues se pesaron las cantidades exactas, lo cual nos permitió estandarizar la cantidad de nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) que consumieron todos los sujetos y además es una referencia para cualquier modificación del alimento en futuras investigaciones.

La Tabla 6 contiene las cantidades por porción de cada componente así como el contenido calórico de cada nutriente.

**Tabla 6 Contenido energético (Kcal) por porción del alimento.**

	<b>Bebida láctea: 250 mL</b>	<b>Suplemento alimenticio: 100 g</b>	<b>Pan de caja: 2 rebanadas</b>	<b>Margarina: 40 g</b>	<b>Total</b>
<b>Proteínas (g)</b>	5.5	16.16	4.0	0	25.7
<b>Contenido calórico de proteínas (kcal)</b>	22.0	64.5	16.0	0	102.5
<b>Lípidos (g)</b>	7.5	14.3	1.4	26.8	50
<b>Contenido calórico de lípidos (kcal)</b>	67.5	128.0	12.6	241.2	449.3
<b>Carbohidratos (g)</b>	13.8	62.7	27.8	0	104.3
<b>Contenido calórico de carbohidratos (Kcal)</b>	55.5	250.8	111.2	0	417.5
<b>Colesterol (mg)/ % en el alimento</b>	24	4	0	0	28/ 0.056%
<b>Contenido calórico total (kcal)</b>	145	483	140	240	1008

Bebida láctea: Nutrileche, suplemento alimenticio: Ensure, pan de caja: Bimbo, Margarina: Iberia. El contenido calórico total y la masa por nutriente de cada componente, se calculó en base a la información nutricional indicada en las etiquetas de los productos. El contenido calórico por nutriente fue calculado multiplicando la masa de cada nutriente por las kilocalorías que proporcionan cada uno de ellos, según la bibliografía.<sup>(62)</sup>

## Características antropométricas y clínicas de los participantes

Se incluyeron 10 sujetos sanos que voluntariamente aceptaron participar en el protocolo, la información general de sus hábitos, como fumar, hacer ejercicio aerobio o consumir algún medicamento; así como la información de sus antecedentes familiares y personales, tales como *Diabetes mellitus*, hipertensión arterial, distiroidismo o enfermedad renal, fueron obtenidos de un cuestionario adjunto a la carta de consentimiento informado. Las características antropométricas de los participantes se muestran en la tabla 7.

Se realizó una toma de muestra sanguínea antes del consumo del alimento. Las concentraciones medias basales de los lípidos y la glucosa se muestran en la tabla 8. La media de C-HDL es menor a la recomendada (>40 mg/dL), puesto que la mitad de los sujetos de estudio presentaron valores menores.

**Tabla 7 Características antropométricas de los participantes.**

	Participantes (N=10)
<b>Edad (años)</b>	22.60± 1.07
<b>Peso (kg)</b>	70.00± 3.39
<b>Talla (m)</b>	1.76± 0.03
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22.64± 0.85

Media ± EE. IMC: Índice de masa corporal.

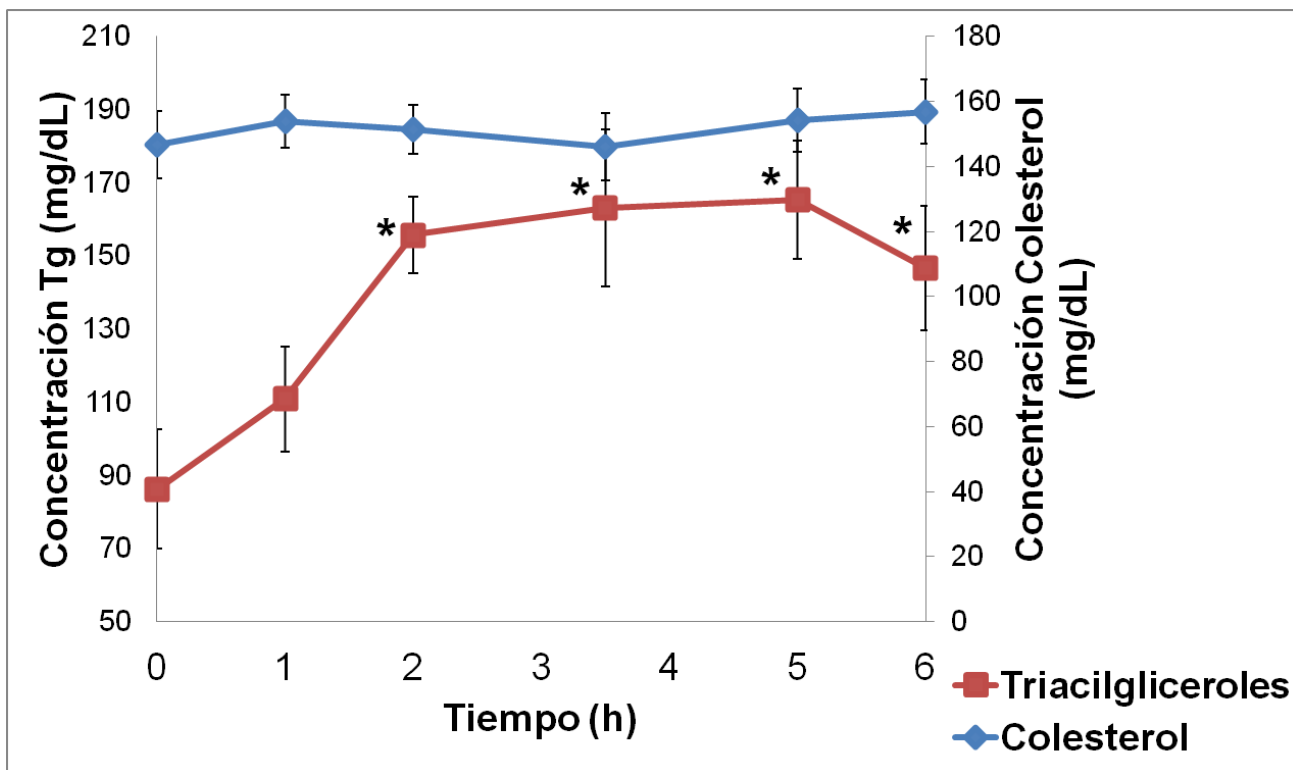
**Tabla 8 Perfil bioquímico de los participantes**

	<b>Total (N=10)</b>
<b>Triacilgliceroles (mg/dL)</b>	86.26± 16.25
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	146.77± 10.26
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	78.45± 2.33
<b>C-HDL (mg/dL)</b>	38.38± 4.08
<b>Pps- HDL (mg/dL)</b>	87.91± 3.19
<b>Tg-HDL (mg/dL)</b>	15.01± 1.79
<b>C-LDL* (mg/dL)</b>	91.14± 9.27

Media ± EE. C-HDL: colesterol de lipoproteínas de alta densidad, Pps-HDL: fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad, Tg-HDL: triacilgliceroles de lipoproteínas de alta densidad, C-LDL: colesterol de lipoproteínas de baja densidad. \* Calculo mediante fórmula de Friedwald.

### **Cinética de triacilgliceroles y colesterol plasmaticos**

Se comenzó a medir el tiempo de la cinética al momento de terminar el alimento. Las tomas de muestra sanguínea se realizaron 1.0, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 horas después. La concentración máxima de triacilgliceroles fue distinta por participante entre las 2.0 3.5 y 5.0 horas posteriores al consumo del alimento, la concentración media máxima (165.4 mg/dL) fue a las 5 h, al finalizar la cinética no se alcanza la concentración basal. Las concentraciones de colesterol no cambiaron con respecto al tiempo.



**Figura 4** Cinética de concentraciones plasmáticas.

Muestra las concentraciones de triacilglicerol ■ y colesterol ◆ con respecto al tiempo. Media ± EE,  $p < 0.05$  \* vs basal, ANOVA con prueba post hoc.

### Caracterización de las subclases de HDL en estado postprandial

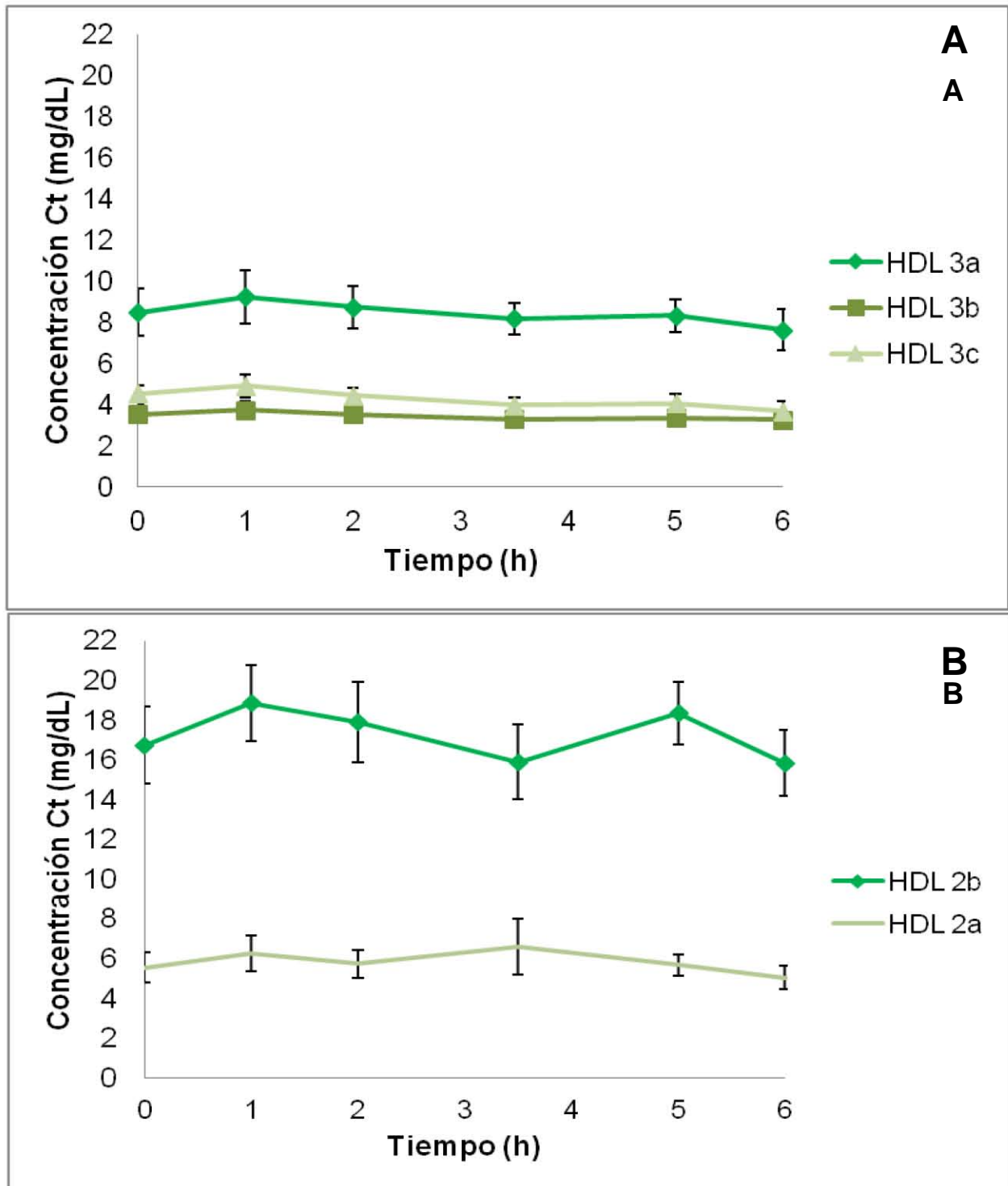
Se determinó la composición lipídica de las subclases de HDL en respuesta al alimento de alto contenido de triacilglicerol. La figura 5 muestra la concentración media de Colesterol total Ct por subclases con respecto al tiempo, como se puede observar no hay variaciones en la concentración de este lípido en las subclases de HDL, como tampoco hubo diferencia en la concentración de Colesterol plasmático.

La figura 6 muestra la cinética de triacilglicerol por subclases, cuyas concentraciones son oscilatorias, teniendo 2 picos de concentración a las 2.0 y 5.0 horas de la cinética, con un aumento del 50% y 47% de la concentración basal de

las subclases grandes la 2b y 2a respectivamente, así mismo las subclases HDL3 presentan un aumento en la concentración de los triacilgliceroles de 39%, 29% y 38%, en la 3a, 3b y 3c respectivamente. Ninguno de estos cambios es estadísticamente significativo, puesto que hay variabilidad en los resultados. Al término de la cinética no se alcanzan las concentraciones basales.

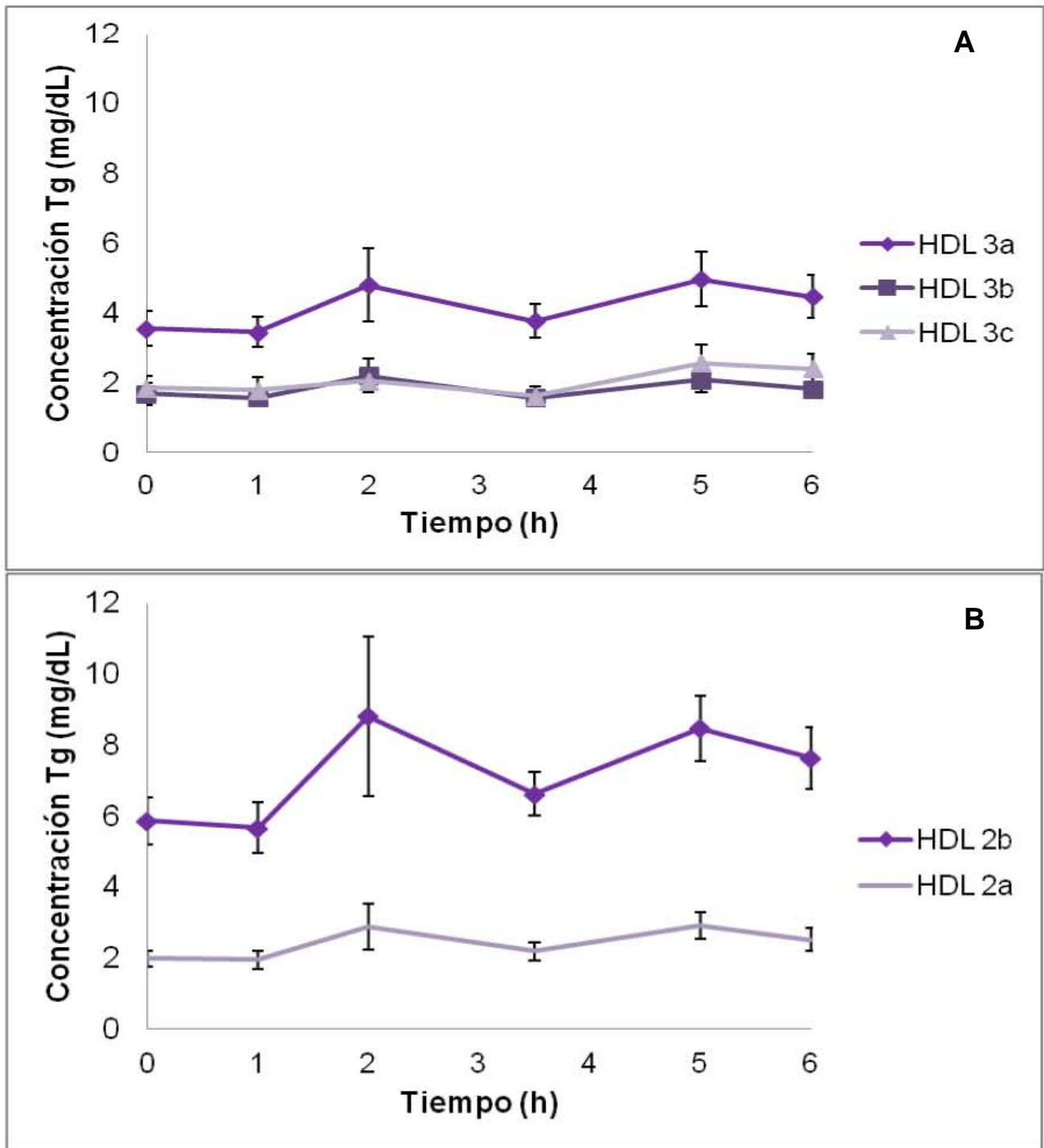
La caracterización de las subclases por fosfolípidos, se muestra en la figura 7, se observa que no hay cambio en la concentración a través del tiempo.





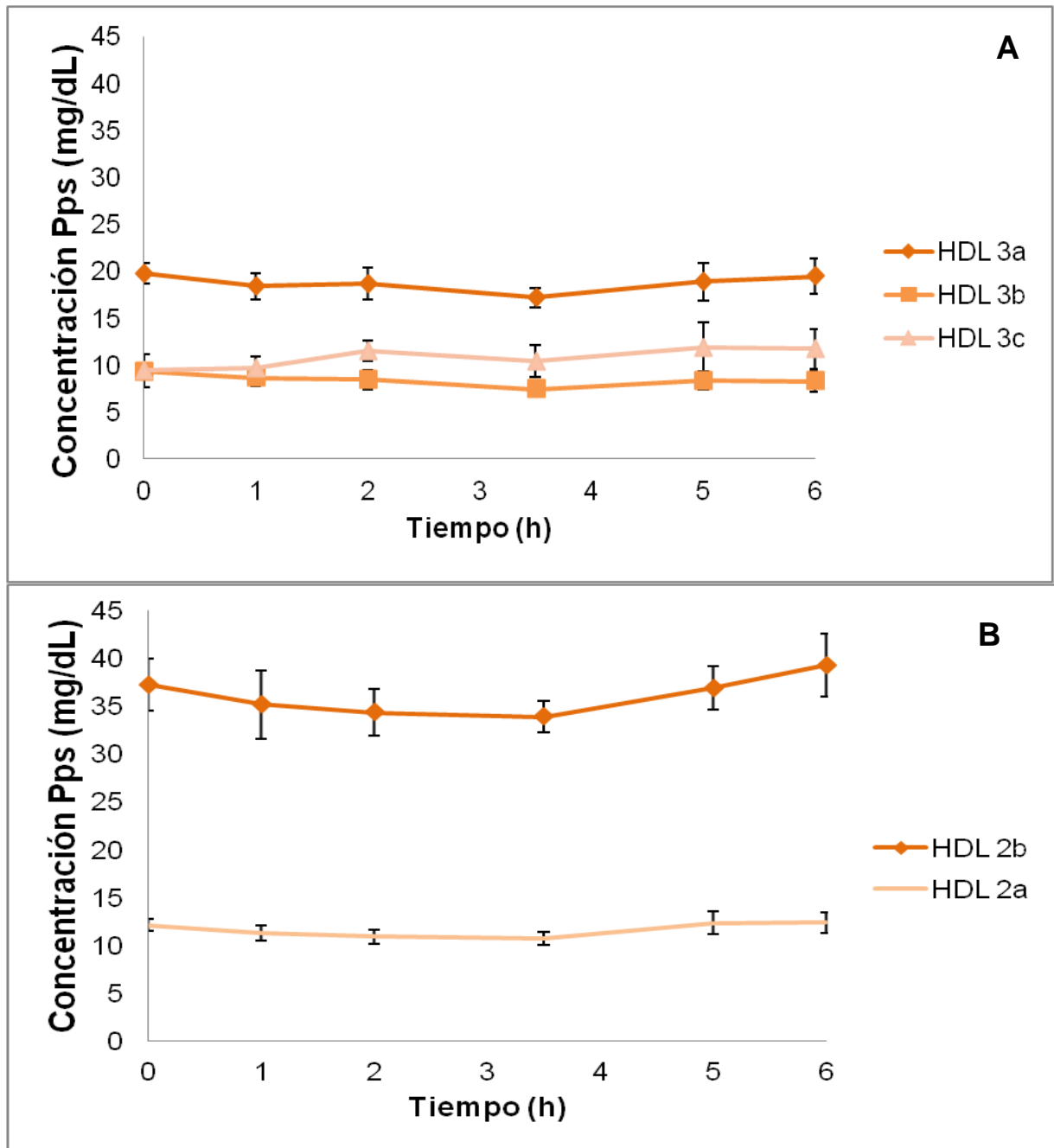
**Figura 5** Cinética de Colesterol total (Ct) en subpoblaciones de HDL.

**A**, muestra la cinética de la concentración media de colesterol total de HDL 2b  $\blacklozenge$  y HDL 2a  $\text{—}$  **B**, muestra la cinética de la concentración media de colesterol total de las subpoblaciones pequeñas, HDL 3a  $\blacklozenge$ , HDL 3b  $\blacksquare$ , HDL 3c  $\blacktriangle$ . Media  $\pm$  EE, ANOVA con prueba post hoc,  $p < 0.05$ .



**Figura 6** Cinética de Triacilgliceroles (Tg) en subpoblaciones de HDL.

**A**, muestra la cinética de la concentración media de triacilgliceroles de HDL 2b  $\blacklozenge$  HDL 3a  $\square$ . **B**, muestra la cinética de la concentración media de triacilgliceroles de las lipoproteínas pequeñas, HDL 3a  $\blacklozenge$  HDL 3b  $\blacksquare$  HDL 3c  $\blacktriangle$ . Media  $\pm$  EE, ANOVA con prueba post hoc,  $p < 0.05$



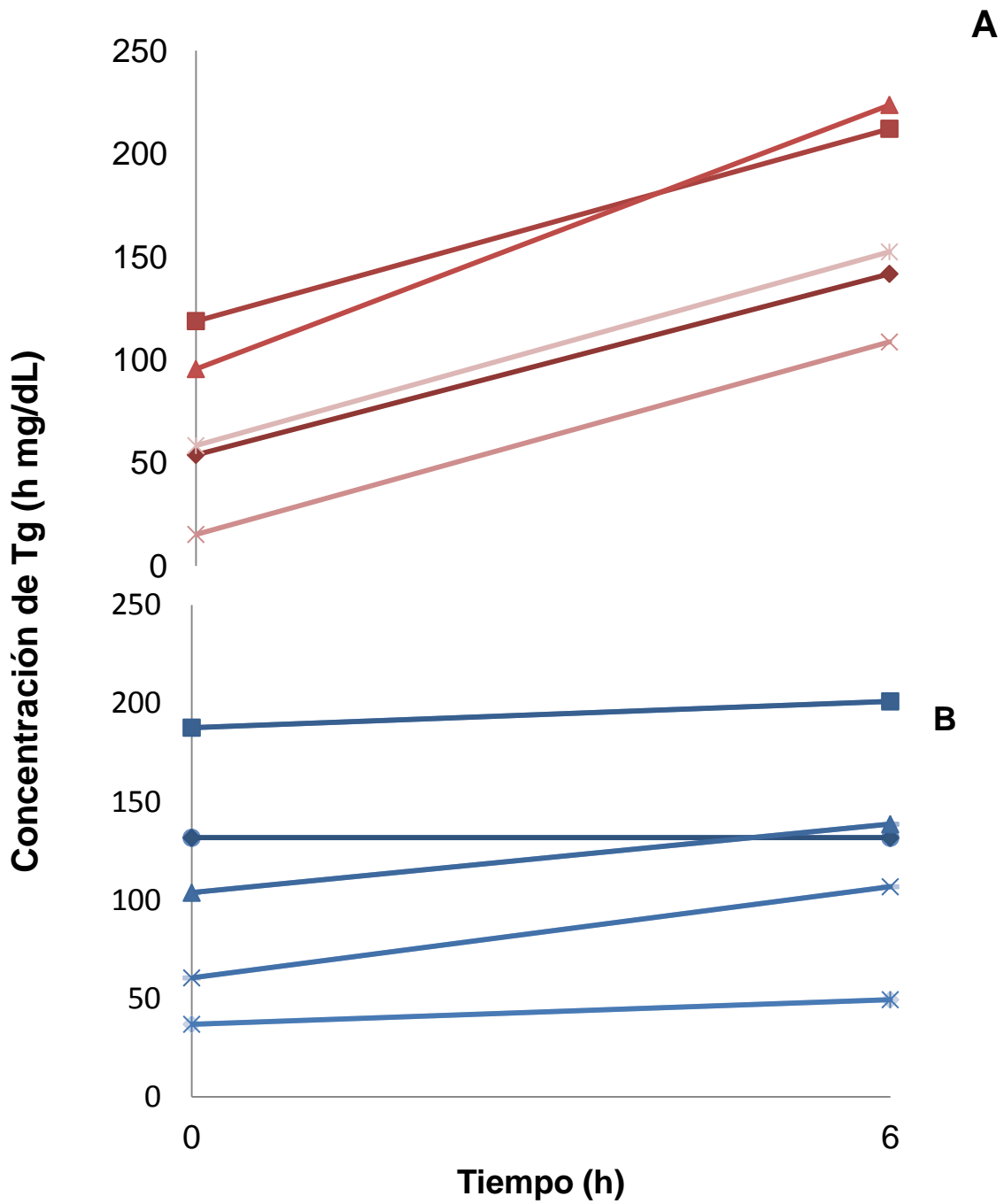
**Figura 7** Cinética de Fosfolípidos (Pps) en subpoblaciones de HDL.

A, muestra la cinética de la concentración media de fosfolípidos de HDL 2b ◆ HDL 3a ■. B, muestra la cinética de la concentración media de fosfolípidos de las lipoproteínas pequeñas, HDL3a ◆ HDL 3b ■ y HDL 3c ▲. Media  $\pm$  EE, ANOVA con prueba post hoc,  $p < 0.05$

## Área bajo la curva incremental

Para conocer como era el incremento de la concentración de triacilgliceroles en el plasma de cada sujeto, se calculó el área bajo la curva incremental. Cada sujeto presentó valores diferentes, mientras unos mostraban valores de ABCI bajos otros tenían valores muy altos, por lo tanto se tomó como punto de corte la mediana (423 h mg/dL) y se separó en dos subgrupos de 5 sujetos cada uno, el grupo de ABCI mayor (> 423 h mg/dL) y ABCI menor (<423 h mg/dL). En la figura 8 se muestra que la diferencia de ABCI se debe a que después de las 6 h algunos sujetos no regresan a su concentración basal de Tg.

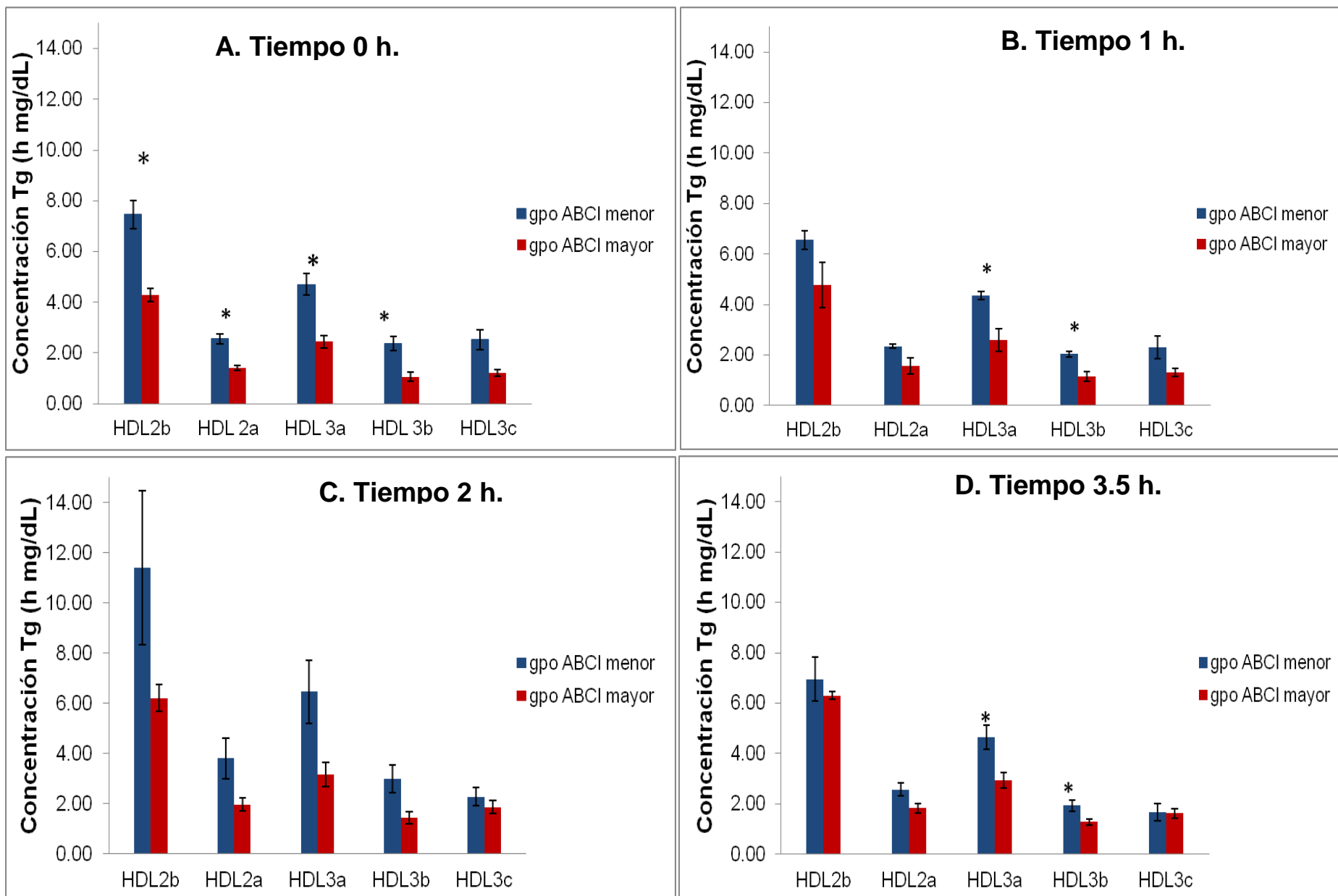
En la figura 9 se observa que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), en la composición de Tg de las subclases de HDL (excepto la HDL3c), entre el subgrupo ABCI mayor y ABCI menor. A las 0h las subclases HDL2b, 2a, 3a y 3b presentan diferencias significativas entre estos dos subgrupos (ABCI mayor vs ABCI menor), mientras que una hora después únicamente las HDL3a y 3b tienen diferencias, a las 2 horas postprandiales ninguna subclase presenta diferencias, sin embargo a las 3 horas y media una vez más las HDL 3a y 3b son diferentes estadísticamente, a las 5 horas postprandiales únicamente la HDL3b presenta diferencias, y por último a las 6 horas posteriores al consumo del alimento las subclases de HDL2a, HDL2b y HDL3c son diferentes estadísticamente entre los dos subgrupos, ABCI menor vs ABCI mayor.



**Figura 8** Relación entre el ABCI y la concentración plasmática de Tg por participante.

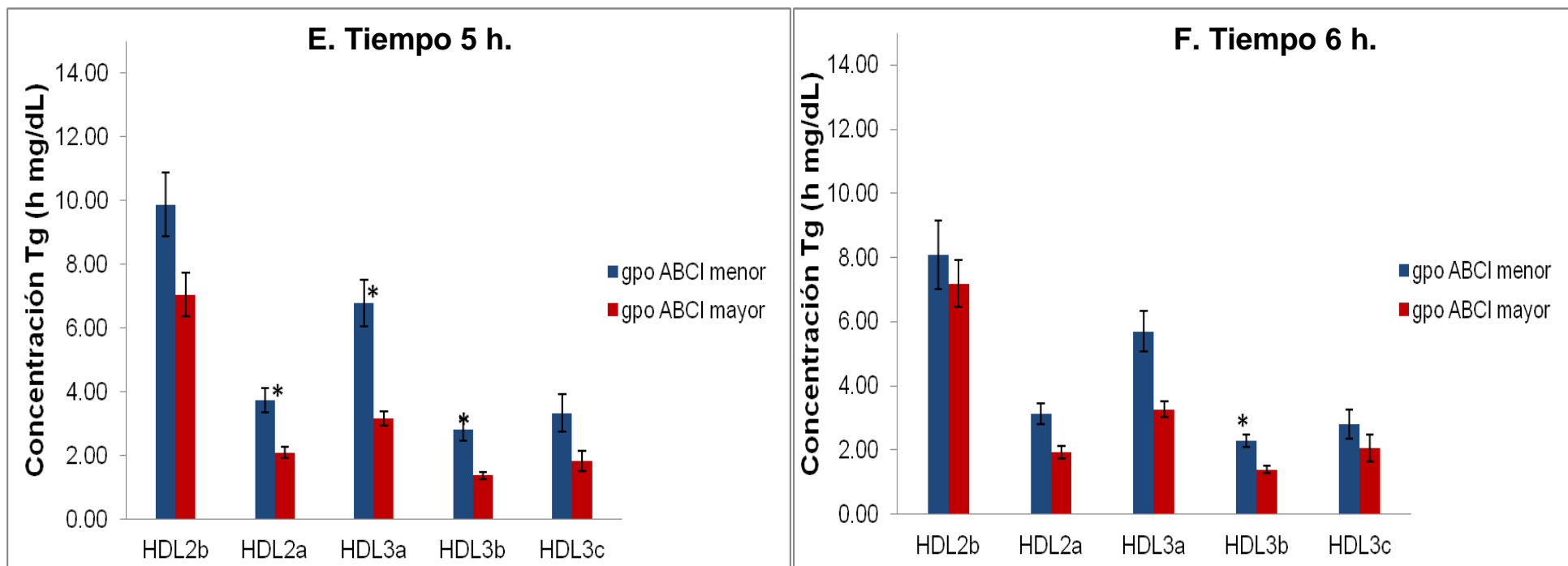
**A:** subgrupo ABCI mayor, muestra la concentración de Tg basal y postprandial de cada sujeto.

**B:** subgrupo ABCI menor, muestra la concentración de Tg basal y postprandial de cada sujeto.



**Figura 9** Distribución de las subpoblaciones de HDL por triacilgliceroles de sujetos ABCI menor y ABCI mayor.

A; muestra la composición de Tg al tiempo 0 h, B; muestra la composición de Tg al tiempo 1.0 h, C; muestra la composición de Tg al tiempo 2.0 h, D; muestra la composición de Tg al tiempo 3.5 h. Media± EE, t-student no pareada \*(p<0.05).

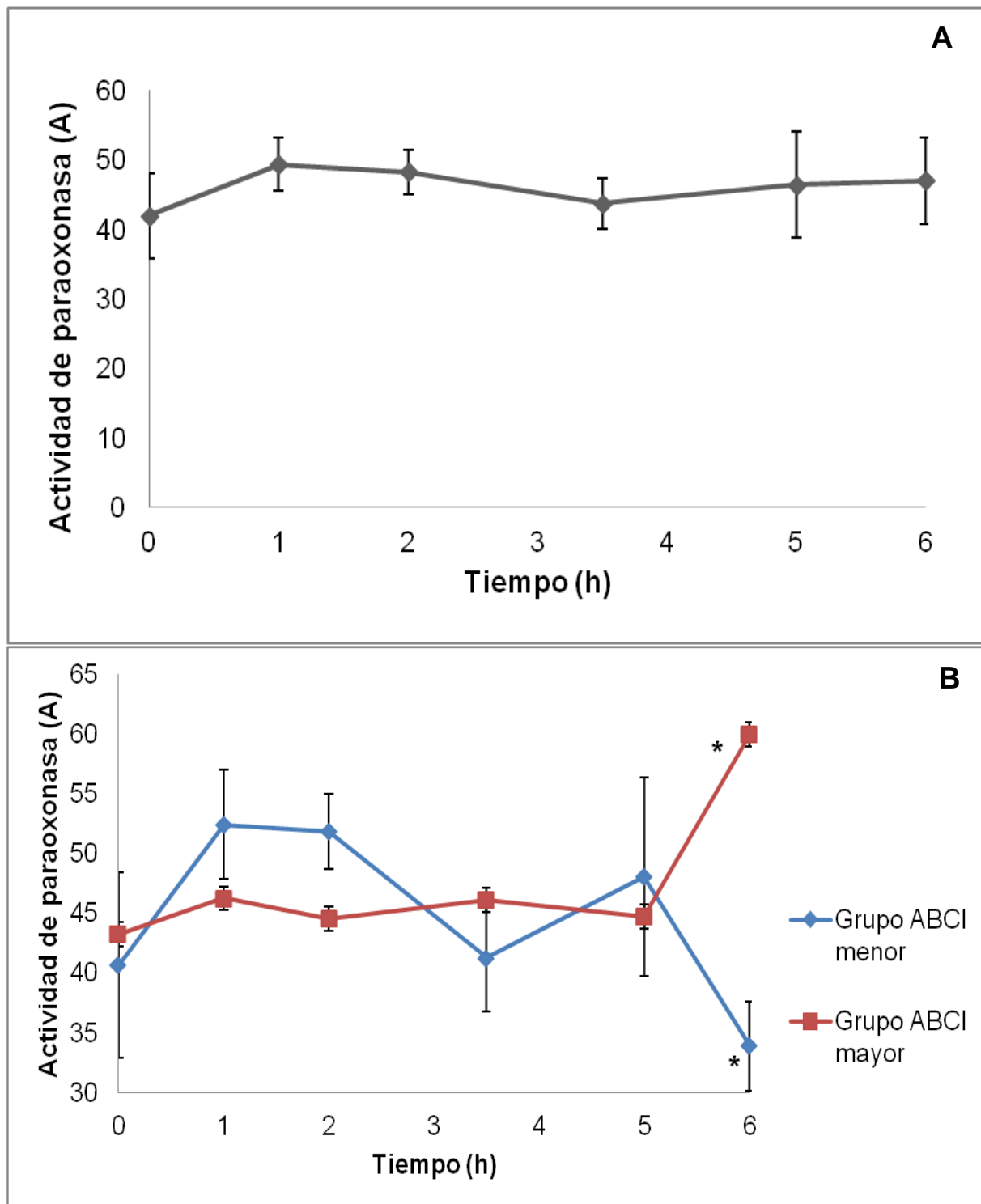


**Figura 9 (cont) Distribución de las subpoblaciones de HDL por triacilgliceroles de sujetos con ABCI menor y ABCI mayor.** E; muestra la composición de tg al tiempo 5.0 h, F; muestra la composición de tg al tiempo 6.0 h. Media± EE, t-student no pareada \*(p<0.05).

## Actividad de paraoxonasa

La actividad de la paraoxonasa se midió en el postprandio, siendo diferente el comportamiento para cada individuo, en la figura 10A se muestra que la actividad promedio aumenta un 18% inmediatamente después de la ingesta del alimento. No se observan cambios estadísticamente significativos a lo largo del periodo postprandial evaluado. Sin embargo, cuando dividimos por subgrupos, según el área bajo la curva incremental, se observa un comportamiento distinto al final de la curva postprandial; mientras el grupo de mayor ABCI presenta una disminución del 30%, los sujetos con una ABCI menor tuvieron un incremento de la misma magnitud en la actividad PON y esta diferencia fue estadísticamente significativa a pesar del limitado número de sujetos en los subgrupos (**figura 10B**).





**Figura 10** Cinética de la actividad de PON1.

A: muestra la actividad de PON1 de todos los sujetos. B: muestra la actividad de PON1 por subgrupo de ABCI. Media  $\pm$  EE, ANOVA con prueba post hoc,  $p < 0.05$

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En el presente estudio piloto se puso de manifiesto que la magnitud de trigliceridemia postprandial determina ciertos cambios de la estructura y concentración plasmática de lípidos de las subclases de HDL. Nuestro método de análisis es de reciente descripción<sup>(59)</sup> y usa plasma sin tratamiento de ultracentrifugación previo. Este procedimiento representa una gran ventaja en el tiempo de procesamiento de la muestra por una parte, y por otra parte en la recuperación completa y reproducible de las subclases de HDL.<sup>(59)</sup>

Por otra parte, el alimento que se diseñó tenía como objetivo principal, aumentar la concentración de triacilgliceroles plasmáticos en sujetos sanos. Los sujetos normotriglicéridémicos tienden a hacer picos postprandiales muy discretos,<sup>(45, 63)</sup> en nuestro grupo de sujetos de investigación las concentraciones basales de Tg plasmáticos no eran mayores a 200 mg/dL por lo que se optó administrar un alimento que contuviera una alta proporción de triacilgliceroles pero poco colesterol para evitar posibles factores confusores en la intervención, de tal manera que la margarina fue la opción para este fin. El siguiente punto a resolver fue el tiempo que estarían los participantes sin consumir ningún alimento, por lo que se ofreció un suplemento alimenticio que aportaría nutrientes a los participantes y permitiría hacer reproducible el alimento. El pan de caja, el azúcar y la leche sólo fueron complemento para mejorar la palatabilidad de alimento prueba.

Los participantes del estudio fueron únicamente varones, dado que las mujeres presentan una relación entre la concentración de lípidos y de hormonas<sup>(64, 65)</sup> lo cual no era conveniente para los resultados.

Las características antropométricas y bioquímicas de los participantes fueron homogéneas, con excepción de la concentración plasmática de triacilgliceroles y colesterol, en los que sí hubo variabilidad entre los sujetos. El hecho de que las áreas bajo la curva incrementales nos permitieran segregar en dos subgrupos a

nuestros sujetos, sugiere que las variaciones en la concentración de lípidos, principalmente los triacilgliceroles, se deben únicamente a variaciones intrínsecas a cada individuo en cuanto al metabolismo de lipoproteínas.

La concentración media de triacilgliceroles con respecto al tiempo forma una curva con valores máximos entre las 3 y 5 horas posteriores al consumo del alimento prueba. En este sentido, Borge y col., estudiaron un grupo de individuos dentro de los cuales habían un subgrupo que presentaba concentraciones basales de triacilgliceroles fuera y dentro de los valores de referencia y cuya concentración máxima se presentaba a las 4 h.<sup>(45)</sup> En el presente estudio, únicamente se evaluaron sujetos sanos, cuyas concentraciones de triacilgliceroles, y Colesterol se encontraban dentro de los valores de referencia. El aumento en la concentración de triacilgliceroles en ese estudio fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a las 2, 3.5 y 5 h respecto a la concentración basal; la concentración a las 6 h fue estadísticamente diferente a la concentración basal, lo que implica que el nivel de triacilgliceroles postprandiales requiere de más de 6 h para normalizarse, en sujetos normotriglicéridémicos. La lipemia postprandial es una respuesta fisiológica que ocurre desde las 2 hasta y puede llegar a las 12 horas posteriores al consumo de un alimento<sup>(5)</sup>. Sin embargo, estudios de lipemia postprandial de más de 6 horas no son útiles desde el punto de vista práctico para la evaluación del riesgo cardiovascular. El presente estudio piloto pone de manifiesto que el análisis de la lipemia postprandial en 6h puede aportar información importante referente a la relación entre la triglicéridemia postprandial y la composición lipídica de las subclases de HDL, a pesar de que no se alcance el retorno de la concentración de Tg a los niveles basales.

La curva de concentración de Colesterol no presenta variaciones significativas; por una parte, el alimento diseñado contenía una proporción pequeña de colesterol (0.056%) del contenido calórico total del alimento prueba. Por otra parte, los cambios postprandiales de colesterol son habitualmente muy discretos en cualquier paciente<sup>(66)</sup>. Así, el colesterol no fue un factor de confusión en nuestro estudio.

Aunque trabajos anteriores ya han tratado el tema de la lipemia postprandial<sup>(2, 5, 44, 45, 53)</sup>, en nuestro laboratorio decidimos trabajar con las subpoblaciones de las lipoproteínas de alta densidad, ya que la relación de cada subclase de HDL en la promoción o protección de las enfermedades cardiovasculares no ha sido bien identificada. Wojczynski y col. realizaron un estudio de lipemia postprandial, en el que utilizaron RMN para identificar el número de lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL y Qm) posteriores al consumo de un alimento prueba, encontrando como resultado un menor número de LDL y VLDL pequeñas y medianas, un incremento de las partículas VLDL grandes y Qm, sin embargo en las partículas de HDL los cambios fueron mínimos<sup>(5)</sup>. El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar las subclases de HDL, en cuanto a su contenido de lípidos, puesto que algunos estudios sugieren que las HDL ricas en triacilgliceroles pierden sus propiedades antiaterogénicas<sup>(67)</sup>. En nuestro trabajo, las HDL grandes parecen tener valores variables a lo largo del posprandio, sin embargo la variación es muy pequeña y la desviación de los datos es grande. Las HDL 3a, 3b y 3c, igualmente mantienen valores variables sin ser estadísticamente representativos. Estos resultados sugieren un rearrreglo dinámico de las subclases de HDL a lo largo del posprandio. Estos cambios transitorios de estructura durante el posprandio podrían afectar las funciones de eflujo de colesterol, mejoramiento de la función endotelial y antiinflamatorias de las HDL. Más estudios específicamente diseñados son necesarios para demostrar tales afectaciones potenciales.

Al caracterizar las subclases de HDL se determinó la concentración de Colesterol total y fosfolípidos con respecto al tiempo; el Ct de las HDL 2b y HDL2a parece tener un comportamiento oscilatorio con respecto al tiempo, sin embargo, las aparentes diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este estudio no tiene potencia para este tipo de comparaciones, hecho que explica probablemente la falta de significado en los cambios posprandiales de colesterol y fosfolípidos. Además, es importante enfatizar que no esperabamos cambios importantes en el contenido de colesterol de la lipoproteínas puesto que el alimento que ingirieron los participantes contenía solamente 28 mg de colesterol.

Esperabamos una disminución en el colesterol de algunas subclases de HDL con respecto al tiempo de posprandio debido al intercambio de Ct por Tg de las VLDL y los quilomicrones a través de la CETP<sup>(40)</sup>; sin embargo, en nuestros resultados no se observa una relación entre la concentración de estos dos lípidos en las subclases de HDL. A pesar de que el Ct de la HDL2b disminuye a las 3.5 h, este resultado no es significativo pero sugiere que deben realizarse más estudios con un número de participantes que permita alcanzar la significancia estadística en este parámetro en específico.

El área bajo la curva fue una estrategia matemática que nos permitió analizar cómo era el incremento de la concentración plasmática de Tg con respecto al tiempo. Cuando se observó que había diferencias estadísticamente significativas entre los individuos clasificados por área incremental, se decidió analizar un poco más a detalle. De los 10 sujetos de investigación, 5 de ellos presentaban valores de ABCI menores a 400 hmg/dL y los otros 5 sujetos valores mayores, por lo tanto se dividió nuestro grupo de estudio en dos subgrupos. Primeramente se identificó la razón por la que el ABCI era diferente; el ABCI es menor se debe a que la concentración plasmática de Tg en ayuno y a las 6 horas posteriores al consumo del alimento, son muy similares en los 5 sujetos, lo que sólo demuestra que al finalizar la cinética de Tg los sujetos llegan a sus niveles basales. En cambio los sujetos con ABCI mayor a 400 hmg/dL, presentan diferentes concentraciones de Tg a las 6 horas con respecto a las concentraciones en ayuno, este resultado es coherente dado que el aumento en el ABCI se debe a que al terminar la cinética los sujetos no alcanzan sus niveles basales. Es conocido que los sujetos con mayores valores basales de triacilgliceroles generan picos mayores de trigliceridemia postprandial<sup>(44, 66)</sup>. Sin embargo, nuestro estudio demuestra que los valores basales de Tg no están en relación con el comportamiento postprandial de los mismos, en sujetos normotriglicéridémicos<sup>(5, 45, 66, 68)</sup>. El diferente comportamiento postprandial en sujetos con concentraciones de triacilgliceroles < 150 mg/dL, da soporte adicional a la idea de que determinar los valores de Tg en estado postprandial puede contribuir a evaluar mejor el riesgo de EAC<sup>(44)</sup> que

apoyan la idea de determinar los Tg en posprandio<sup>(44, 45, 53, 66)</sup> en comparación con la simple determinación en ayuno.

Cuando analizamos los subgrupos y la composición de las subclases de HDL, se encontraron diferencias importantes. Las HDL3 son las que presentaron diferencias significativas en prácticamente todos los tiempos (excepto 2.0h); estos cambios estructurales sugieren alteraciones en la capacidad antiaterogénica de estas lipoproteínas<sup>(21, 69)</sup> que deben ser exploradas en estudios posteriores.

Es importante enfatizar que el subgrupo ABCI menor es el que presenta los valores más altos de Tg de las subclases de HDL. Como se mencionó previamente, algunos estudios sugieren que las HDL ricas en Tg son disfuncionales<sup>(46, 47)</sup>. Esta aparente paradoja puede tener respuesta en el metabolismo de triacilglicérolos por parte de las HDL; a este respecto se conoce poco; es posible que las HDL tengan un papel mucho más importante de lo que se piensa en cuanto al manejo de los triacilglicérolos. Si las HDL promueven el transporte reverso de triacilglicérolos o participan de otra manera más activa en el metabolismo intravascular de estos lípidos, es una nueva pregunta de investigación que surge de manera indirecta del presente estudio y amerita ser analizada.

Cuando se diseñó este estudio se planeó medir la actividad de alguna de las enzimas involucradas con las HDL, de las cuales consideramos más importante a la PON1, debido a la poca información que existe alrededor de su función cardioprotectora y su actividad en estado postprandial. A cada sujeto de estudio se le realizó una toma de muestra de suero y plasma, la única determinación que se realizó en suero fue la actividad de paraoxonasa debido a que es un enzima Calcio dependiente<sup>(32, 70)</sup>. La actividad media de PON1 no presentó variaciones significativas con respecto al tiempo. Sin embargo, cuando agrupamos los sujetos de acuerdo a su ABCI, observamos que existe diferencia estadísticamente significativa entre estos grupos pero únicamente a las 6 horas postprandiales. Se considera que la actividad de la PON1 está relacionada directamente con la antiaterogénesis<sup>(24)</sup> y que por lo tanto entre mayor sea la actividad de PON1

mayor es el efecto protector y antioxidante. De esta manera, los sujetos con mayor ABCI tenderían a ser transitoriamente más vulnerables al daño oxidativo por disminución de la actividad PON1 al final del periodo postprandial. Aunque los resultados no pueden ser concluyentes por el número de sujetos en cada grupo, esta observación abre una nueva perspectiva de estudio para el futuro.

En resumen, la composición lipídica de las subclases de HDL no presenta cambios estadísticamente significativos en estado postprandial. Sin embargo, al separar en dos subgrupos, de acuerdo al área bajo la curva incremental a nuestros sujetos de estudio, de acuerdo al incremento de triacilgliceroles plasmáticos que presentaron la cual sí presenta cambios desde la primera hora después de la ingesta, sugiriendo que el ABCI de los Tg plasmáticos en un estado postprandial puede ser un indicador de riesgo cardiovascular. Sin embargo, el presente estudio cuenta con una limitante principal que es el número de sujetos participantes. A pesar de que el presente estudio piloto estableció diversas perspectivas de investigación que serán motivo de estudios en nuestro grupo de investigación.

## **CONCLUSIONES**

Los sujetos normotriglicéridémicos presentan variaciones muy discretas de los lípidos y de la estructura de las HDL y actividad paraoxonasa durante el estado postprandial de 6h. Sin embargo, en función del área bajo la curva incremental de triacilglicéridos se presentan diferencias estructurales de las HDL y de actividad PON1 en estado postprandial.

Las observaciones de este estudio piloto son la base de investigaciones sobre la estructura y función de las HDL a realizar en el futuro.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Vance E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 2008:485-506. Epub 5th edition.
2. Méndez ÓP, Pacheco HG, Sánchez CM, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: Function or structure? *Clinica Chimica Acta*. 2014;429:111-23.
3. Kwiterovich PO. *Fundamental aspects of dyslipidemia and atherosclerosis*. Lippincott Williams and Wilkins. 2010.
4. Eckardstein VA. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:404-16.
5. Wojczynski MK, Glasser SP, Oberman A, Kabagambe EK, Hopkins PN, Tsai MY, et al. High-fat meal effect on LDL, HDL, and VLDL particle size and number in the Genetics of Lipid-Lowering drugs and diet network (GOLDN): an interventional study. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10:181.
6. Rye K, Brsill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and antiatherogenic properties of HDL. *Journal of lipid reserch* 2009;50:195-200.
7. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2001;104:1108-13.
8. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High-density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham Heart Study. *Am J Med*. 1977;62:707-14.
9. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison JR. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.
10. Barter P, Gotto AM, Rosa JCL. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007;357(1301-1310).
11. Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation*. 1966;34:679-97.
12. Wiklund O, Wilhelmsen L, Elmfeldt D, Wedel H, Valek J, Gustafson A. Alpha-lipoprotein cholesterol concentration in relation to subsequent myocardial infarction in hypercholesterolemic men. *Atherosclerosis*. 1980;37:47-53.
13. Levy RI, Klimov AN. High density lipoprotein cholesterol and mortality in USSR and US middle-aged men: The Collaborative US/USSR Mortality Follow-up Study (abstract). *Circulation*. 1987;IV:76-67.
14. McLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Green T, Barakat HA. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans. *Obes Res*. 2000;8:62-70.
15. Festa A, William K, Hanley AJ. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insuline Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2005;111:3465-72.
16. Sánchez CG, Tamayo MT, Meavepeña MJ. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011;412:292-8.
17. Rosenson RS, Freedman DS, Otvos JD. Relations of lipoprotein subclass levels and LDL size to progression of coronary artery disease in the PLAC-I trial. *American Journal Cardiology*. 2002;90:89-94.

18. Otvos JD, Collins D, Freedman DS. LDL and HDL particle subclasses predict coronary events and are changed favorably by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation*. 2006;113:1556-63.
19. Mora S, Otvos JD, Rosenson RS, Pradhan A, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type2 diabetes in women. *Diabetes* 2010;59:1153-60.
20. Curb JD, Ueshima H, Rodriguez BL. Differences in lipoprotein particle subclass distribution for Japanese Americans in Hawaii and Japanese in Japan: the INTERLIPID study. *Journal Clinical Lipidol*. 2011;5:30-6.
21. Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JWG, Bainton D, Baker IA, Elwood PC, et al. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in British men: the Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease studies. . *Circulation*. 1994;90:769-74.
22. Benoit L, MoorjaniSital, Bernard C, R DG, Paul L, DesprésJeane-Pierre. Associations of HDL 2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. . *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1997;17:1098-105.
23. Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction: a prospective study in eastern Finnish men. *Circulation*. 1991;84:129-39.
24. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically Active Paraoxonase-1 Is Located at the External Membrane of Producing Cells and Released by a High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2002;277(Issue of February 8):4301-8.
25. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Current Opinion in Lipidology*. 2010;21:312-8.
26. Kontush A, Chantepie S, MJ C. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23:181-8.
27. Khera AV, Cuchel M, Llera-Moya Mdl. Cholesterol efflux capacity, highdensity lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364:127-35.
28. M dIL-M, D D-S, BF A, M C, DJ R, GH R. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30:796-801.
29. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- $\beta$ migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry*. 1988;27:25-9.
30. M N, ST R, BJ VL, AM F. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature Reviews Cardiology*. 2011;8:222-32.
31. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *Biological Chemistry*. 1946;164:271-89.
32. MI M, S A, PN D. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*. 1991;286:152-4.
33. M A, M R, CL B, RS N, SL P-P. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Jorunal Clin Invest*. 1998;101:1581-90.
34. M K, S S, M K. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids* 2013;48:569-78.
35. Cáceres GC. Salida celular y transporte reverso de colesterol. *Clínica e Investigación en aterosclerosis*. 2010;22 (Supl 1):12-6.

36. Torres EC, Meavepeña MJ, Saldaña GC, Gómez CH, Franco M, Fievet C. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high - density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis*. 2005;181:233-40.
37. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161:245-54.
38. Von EA, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21:13-27.
39. Salinas CA, Pérez FG. Lipoproteínas y aterogénesis 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán*. 2005;181:233-40.
40. Miller M, J N, M S, Chair V, Ballantyne C, Bittner V. Triglycerides and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123:2292-333.
41. MD C, DA L, PD S, JI C, DJ G, M W, et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults. *JAMA*. 2005;294:1773–81.
42. Moreton JR. Atherosclerosis and alimentary hyperlipemia. *Science*. 1947;106:190-5.
43. Zilversmit DB. Atherogenesis: A Postprandial Phenomenon. *Circulation*. 1979;60:473-85.
44. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298:309–16.
45. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298:299–308.
46. Greene DJ, Skeggs J, Morton RE. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biological Chemistry*. 2001;276:4804–11.
47. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *Journal Lipid Research*. 2002;43:1264–74.
48. Kwiterovich PO. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *American Journal Cardiology*. 2002;90:30i-47i.
49. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *American Journal Cardiology*. 1993;94:350–6.
50. Lichtenstein AH, Chung M, Lau J, Balk EM. Systematic review: association of low-density lipoprotein subfractions with cardiovascular outcomes. *Annals of internal medicine*. 2009;150:474–84.
51. N S, N S. Triglycerides and coronary heart disease: have recent insights yielded conclusive answers? *Current opinion in lipidology*. 2009;20:275-81.
52. Stalenhoef AFH, Graaf JD. Association of fasting and nonfasting serum triglycerides with cardiovascular disease and the role of remnant-like lipoproteins and small dense LDL. *Current opinion in lipidology*. 2008;19:355-61.
53. Lindman AS, Veierød MB, Tverdal A, Pedersen J, Selmer R. Nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular death in men and women from the Norwegian Counties Study. *European Journal of Epidemiology*. 2010;25:789-98.
54. Fujioka Y, Ishikawa Y. Remnant lipoproteins as strong key particles to atherogenesis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009;16:145-54.

55. Williams JK, Chen K. Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake. *Current opinion in lipidology* 2010;21:218-128.
56. McBride PE. Triglycerides and risk for coronary heart disease. *JAMA*. 2007;298:336-8.
57. PROY-NOM-012-SSA3-2007, Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos., (2009).
58. MI M, D H, D B, PH W, S A, M I, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86:193-9.
59. Castillo CF. Caracterización de las subpoblaciones de HDL por su contenido de lípidos en una población pediátrica de sujetos con obesidad y asma. México DF: Universidad Autónoma de México; 2013.
60. Sánchez CG, Tamayo MT, Meavepeña MJ, Osorio CL, Ibelles PT, Garrido MM, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clinica chimica acta*. 2011;412:292-8.
61. Ibelles PT, Sánchez CG, Vazzini NA, Torres EC, Romero CP, Alarcón GV, et al. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *Journal Lipid Research*. 2010;51:1610-7.
62. Audesirk T, Audesirk G, Byers EB. *Biología: la vida en la Tierra.: Prentice Hall, hispanoamericana.*; 2008.
63. Patsch J R, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn J K, et al. Relation of Triglyceride Metabolism and Coronary Artery Disease. *Studies in the Postprandial State. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1992;12:1336-45.
64. Pacheco J. Actualización sobre endometriosis. *Ginecología y obstetricia*. 1999;45:235-48.
65. Beek v, Ruijter-Heijstek, Erkelens DW, Bruin TW. Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19:2737-41.
66. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Fasting Compared With Nonfasting Lipids and Apolipoproteins for Predicting Incident Cardiovascular Events. *Circulation*. 2010;118:993-1001.
67. Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *Journal Lipid Research*. 1986;27:361-7.
68. Oka R, Kobayashi J, Miura K, Nagasawa S, Moriuchi T, Hifumi S, et al. Difference between Fasting and Nonfasting Triglyceridemia; the Influence of Waist Circumference. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2009;16:633-44.
69. MJ S, FM S, S S, WC W, CH H. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. . *The New England journal of medicine*. 1991;325:73-81.
70. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *The journal of biological chemistry*. 2002;277:4301-8.
71. Draganov DI. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2004;369 (1):78-88.

Instituto Nacional de cardiología "Ignacio Chávez"

Hipertrigliceridemia posprandial y caracterización de subpoblaciones de HDL



**Consentimiento informado para participar en proyecto de investigación.**

Protocolo: TRIGLICERIDEMIA POSPRANDIAL Y CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE HDL

Investigadores: Oscar Armando Pérez Méndez  
Nancy Rodríguez Martínez

Sede: Instituto Nacional de cardiología "Ignacio Chávez" ubicado en calle Juan Badiano 1 sección 16; cp. 14080 Tlalpan, México D.F.

Nombre del paciente. \_\_\_\_\_

*Esta siendo invitado a participar en un estudio de investigación. Es necesario que lea, comprenda los siguientes apartados y pregunte si tiene alguna duda; de tal manera que pueda tomar una decisión acerca de su colaboración.*

La trigliceridemia posprandial, es un término utilizado para caracterizar los niveles de triglicéridos en el organismo después de consumir un alimento, principalmente alto en grasa.

En últimas fechas se ha sugerido que, la cantidad de grasa y el tiempo que se encuentra en sangre después de consumir un alimento, está relacionado con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, por lo tanto es necesario realizar estudios en humanos sanos que nos permitan encontrar dicha relación.

A usted se le está invitado a participar en un estudio de investigación que tiene por objetivos buscar las variaciones en la composición de HDL (partículas involucradas en el transporte y metabolismo de las grasas, que usted adquiere después de comer) y los niveles de triglicéridos, posteriores al consumo de alimentos ricos en grasa.

Su contribución permitirá, que en un futuro y por el conocimiento generado otros pacientes puedan beneficiarse; además se le proporcionaran los correspondientes estudios de gabinete (perfil de lípidos y ecocardiograma). Cabe mencionar que por su participación en este estudio usted no recibirá remuneración alguna.

En caso de que decida colaborar con este protocolo se le realizarán una serie de preguntas relacionadas con sus hábitos alimenticios, sus actividades físicas y algunos antecedentes médicos de usted y su familia. Se necesitará de su presencia en el instituto un solo día durante 6 horas, en las cuales se le realizará un ecocardiograma para conocer el estado de su corazón; posteriormente se le realizará una toma de muestra sanguínea y se le dará a consumir una malteada y un pan con mantequilla. El paso siguiente será tomarle muestras de sangre a las 1.0, 2.0, 3.5, 5.0 y 6.0 horas posteriores al consumo de dicho alimento. Las tomas de muestra pueden causarle molestia, moretón y dolor, sin llegar a presentar ningún riesgo para su salud.



**Aclaraciones**

- Su decisión de participar en este protocolo es meramente voluntaria, siéntase con la libertad de rechazar el ofrecimiento.
- Si ya ha decidido participar en el estudio, puede también retirarse en el momento que lo desee, informando de su salida, que será respetada.
- No necesitará hacer algún gasto durante el estudio, ni cambiar su alimentación o hábitos.
- La información obtenida durante este estudio será mantenida con estricta confidencialidad.

Si considera que ha quedado todo entendido, que no hay dudas ni preguntas, puede si usted quiere, firmar esta carta de consentimiento informado que forma parte de este estudio.

**Carta de conocimiento informado**

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

He explicado al Sr(a). \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Firma del investigador

\_\_\_\_\_  
Fecha

## Determinación de colesterol libre de HDL en microplaca.

### Fundamento:

**Muestra:** Suero o plasma fresco.

### Soluciones

- Reactivo A.  
4-amino fenol.....0.088 g  
Fenol.....0.04 g  
Colato.....0.126 g  
Tritón.....100 µl  
Buffer PBS 100mM (pH=7.4).....c.b.p 10 mL
- Reactivo de color (uso al momento).  
Reactivo A.....1 ml  
Solución isotónica.....c.b.p. 10 mL  
Colesterol peroxidasa (0.25 µU/mL).....15 µl  
Colesterol oxidasa (0.05 µU/mL).....30 µL

### Procedimiento

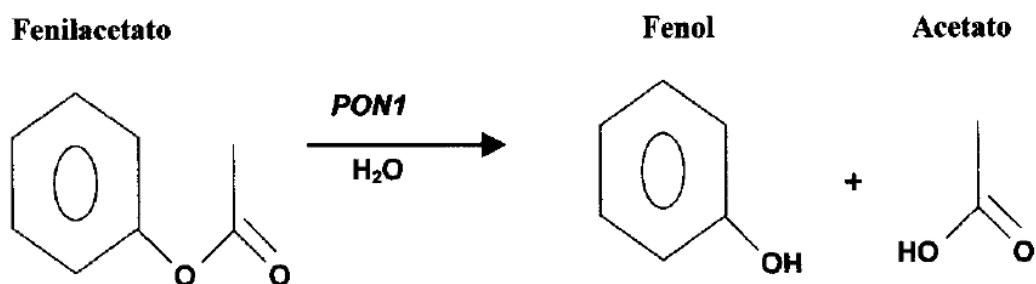
- Realizar una curva patrón

## Determinación de la actividad de Paraoxonasa

### Fundamento

Reacción de hidrolisis del fenilacetato. Imagen tomada de Draganov y La Du.<sup>(71)</sup>

Reacción de hidrolisis del fenilacetato. Imagen tomada de Draganov y La Du.<sup>(71)</sup>



Reacción de hidrolisis del fenilacetato. Imagen tomada de Draganov y La Du.<sup>(71)</sup>

**Muestra:** Suero fresco o congelado.

### Soluciones

- Buffer ARE
 

Tris 20 mM.....	0.315g
CaCl <sub>2</sub> 0.9 mM.....	0.010 g
H <sub>2</sub> O.....	c.b.p. 100ml
  
- Sustrato ARE
 

Buffer ARE.....	10 ml
Fenilacetato.....	1.27µl

### Procedimiento



- Preparar 30 min antes el sustrato ARE, colocar en oscuridad y en frío.
- Diluir la muestra 1/4 con buffer ARE y mantener en frío.
- Colocar en una celda de cuarzo 10  $\mu$ l de la muestra diluida y 1ml de sustrato ARE, mezclar.
- Colocar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 270 nm. Ajustar como blanco.
- Esperar 1 min.
- Correr la cinética. Medir la absorbencia cada 30 s durante 3 min.
- Calcular la actividad de paraoxonasa con la siguiente fórmula:

## Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

### Fundamento:

Tanto las HDL como los marcadores de alto peso molecular, se desplazan a través del gel por sus propiedades de tamaño, siendo las partículas más pequeñas las que se desplazan más (acrilamida al 30%) y las partículas pequeñas se quedan en la menor concentración de acrilamida.

**Muestra:** Plasma fresco o congelado.

### Soluciones

- Solución buffer de muestra.  
Sacarosa 50%  
Azul de bromofenol al 0.05%.....c.b.p. 20 mL
- **Solución A**  
Tris 0.09 M,  
Ácido bórico 0.08M,  
EDTA 3mM (TBE 1X) pH 8.35
- **Solución B**  
Acrilamida.....48 g  
Bisacrilamida.....1.28g  
H<sub>2</sub>O.....c.b.p. 100mL
- **Solución C**  
Persulfato de amonio 10%

- **Solución de acrilamida 3% (5 mL)**

Solución A.....	500 µL
Solución B.....	300 µL
H <sub>2</sub> O destilada.....	4.2 mL
Glicerol.....	0
Temed.....	4 µL
Solución C.....	20 µL

- **Solución de acrilamida 30 % ( 5 mL)**

Solución A.....	500 µL
Solución B.....	3 mL
H <sub>2</sub> O destilada.....	750 µL
Glicerol.....	750 µL
Temed.....	4 µL
Solución C.....	20 µL

### **Procedimiento.**

- Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se colocan por separado en los compartimentos de la cámara generadora de gradiente y se mezclan lenta y progresivamente con agitación constante mientras se va vertiendo entre las placas para formar el gel en presencia de los catalizadores (Temed y persulfato de amonio, solución C).
- Una vez polimerizado el gel, éste se precorre 15 min a 60 V para estabilizarlo.
- Depositar 7µL de plasma con 3 µL de amortiguador de muestra dejando un carril entre cada muestra.
- Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

- La separación electroforética se realizó primero durante 30 min a 90 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este periodo, la separación se continuó durante 22 h a 180 V. Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda y se tiñe según el método seleccionado.

**Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de HDL en fase semisólida (sobre el gel de poliacrilamida)**

- Preparación de reactivo para Colesterol Total y Colesterol libre.

Reactivo	Concentración	
	<i>Colesterol total</i>	<i>Colesterol libre</i>
Solución Salina Isotónica (0.9%)	7456 µL	7474 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
Solución Stock (Colato de Sodio 3mM/Tritón de sodio 0.1% )	500 µL	500 µL
Carboximetilcelulosa	120 mg	120mg
Peroxidasa (0.25 µU/mL)	12 µL	12 µL
Colesterol Esterasa (0.075 µU/mL)	10 µL	
Colesterol Oxidasa (0.05 µU/mL)	13 µL	13 µL
Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel)		
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 µL	400 µL
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 µL	600 µL

- Preparación del reactivo para Triacilgliceroles y Fosfolípidos

Reactivo	Concentración	
	Triacilgliceroles	<i>Fosfolípidos</i>
Solución Salina Isotónica (0.9%)	5500 µL	5500 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL

Carboximetilcelulosa	120 mg	120 mg
Lipasa (37.5 $\mu$ U/mL)	Reactivo Comercial 2500 $\mu$ L	
Glicerol Cinasa (0.1 $\mu$ U/mL)		
Glicerol -3-fosfato oxidasa (0.4 $\mu$ U/mL)		
Peroxidasa (0.13 $\mu$ U/mL)		
ATP (0.25 $\mu$ mol/L)		
Fosfolipasa D ( 0.12 $\mu$ U/MI)		Reactivo Comercial 2500 $\mu$ L
Colina Oxidasa (62 $\mu$ U/mL)		
Peroxidasa (1.1 $\mu$ U/mL)		
Aminopiridina (0.24 mmol/mL)		
N-etil-N-DAOS (0.77 mmol/mL)		
Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel)		
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 $\mu$ L	600 $\mu$ L

- Colocar reactivo sobre gel, Incubar durante 30- 40 min a 36 °C