



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**“EFECTO DE LA TRIGLICERIDEMIA POSTPRANDIAL SOBRE LA  
ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD ENDOTELIAL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE  
ALTA DENSIDAD (HDL) EN SITUACIONES DE ALTO RIESGO  
CARDIOVASCULAR”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

**LN. ARMANDO JAVIER QUINTANILLA CANTÚ**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ÓSCAR A. PÉREZ MÉNDEZ – FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL:  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA – INCMNSZ  
DR. MARCO A. JUÁREZ OROPEZA – FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**Ciudad Universitaria, Cd Mx.**

**Marzo de 2018**



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.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de metabolismo de lípidos de la unidad de biología molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, bajo la dirección del Dr. Óscar A. Pérez Méndez.

Este proyecto fue aprobado por la comisión científica y de bioética del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” con el registro de proyecto No. INC/DI/CI/007/2014.



---

## RECONOCIMIENTOS

COMITÉ TUTORAL:

**Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza**

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

UNAM

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Se reconoce la asesoría y colaboración de la **Dra. María del Roc.o Bautista-Pérez** del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” en los ensayos asociados a la función vascular.

**Se reconoce el apoyo técnico de:**

LN. Paola Peña de la Sancha, QFB. Cristóbal Flores-Castillo, MC. Miriam  
Martínez-Ramírez y MC. Victoria López-Olmos.

**La realización de este proyecto fue posible gracias al apoyo del:**

Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (CONACYT),

Registro/beca: 91634/23541.

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a cada una de las personas que hicieron posible su realización, a mi familia que siempre ha brindado su apoyo y a mi fiel amiga, colega, cómplice y el amor de mi vida R. Esmeralda Enríquez Calderón quien me inspira cada día a dar lo mejor de mí.

De la misma manera, está dedicado a cada una de las personas que enriquecieron mi vida de estudiante dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, porque con sus acertados comentarios me hicieron crecer como persona, estudiante, colega y profesional en el área de la investigación, pero, especialmente, este trabajo está dedicado a todas y cada una de aquellas personas y compañeros de clase, laboratorio y del posgrado que con su ejemplo me mostraron el deber ser pero aún más importante, el no deber ser.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por todo el apoyo brindado con los que se hizo posible la construcción de este proyecto de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A ti mi amor, R. Esmeralda Enríquez Calderón, cómplice de vida, compañera y colega de estudios, gracias por compartir tu vida conmigo, por siempre estar al pendiente de mis necesidades, por siempre escucharme, entenderme y corregirme cuando es necesario. Gracias por estar dispuesta a acompañarme en todos estos años de estudios, donde no solo hemos crecido, sino también avanzado en el ámbito profesional, y de manera muy especial en el personal y sobre todo en el amor.

Gracias por esas palabras de aliento, por ayudarme a enfrentar los retos de cada día, por enseñarme a controlar mis demonios internos y por tener mucha paciencia conmigo, gracias por creer, soportar esos días de soledad y por todo el amor que me das. Por último, gracias por hacerme ver, cuando fue necesario, los momentos adecuados para ubicarme en tiempo y espacio.

A mis padres, que me inculcaron los valores de la honestidad, dedicación, responsabilidad, compromiso, lealtad, esfuerzo y el constante crecimiento personal; a ustedes que con su ejemplo del deber ser me regalaron una vida plena, llena de virtudes y también algunos defectos. Gracias por las enseñanzas que me brindaron y que ahora son parte importante de mis ángeles y demonios que me llevan constantemente en la búsqueda incansable de nuevos retos, compromisos y logros.

Dr. Óscar A. Pérez Méndez gracias por la oportunidad de aprender un poco de su conocimiento y enseñanza; gracias por tener ese extra de paciencia y tiempo para conmigo; gracias por su disposición para escuchar y dar consejos acertados, por enseñarme que algunas veces se deben tomar las vicisitudes de la vida con más calma y que con la debida preparación, dedicación y empeño no existen imposibles por lograr.

A todo el personal del Instituto Nacional de Pediatría y del Instituto Nacional de Cardiología, (a los que llegaron, los que continúan y algunos que ya no están, a todos ustedes, un enorme agradecimiento) que compartieron momentos, días inclusive años conmigo, mi más sincero agradecimiento.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas mi casa de estudios, gracias a todas las personas que me ayudaron a desarrollarme en el ámbito de la investigación, a quienes contribuyeron en mi formación académica y todas aquellas que me mostraron su amistad y colaboración. Dr. Juan Miranda Ríos y Dra. Cristina Fernández Mejía gracias por su apoyo y su amistad.

Es importante agradecer a todo el personal administrativo, de intendencia y de seguridad que alegraron con su disposición, amabilidad y sonrisa mi estancia en los Institutos de Investigaciones Biomédicas e Instituto Nacional de Cardiología, así como del Posgrado de Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Al creador por iluminarme y llenarme de bendiciones, pero sobre todo a mí, porque a pesar de las adversidades y gracias a esas ganas que me motivan, yo soy el arquitecto de mi propio destino.

---

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE SIMBOLOS / ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>19</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>22</b>
Enfermedad aterosclerosa coronaria .....	22
Metabolismo de lípidos .....	23
Lipoproteínas aterogénicas.....	26
Triglicéridos y enfermedad aterosclerosa coronaria.....	27
Hipertrigliceridemia postprandial.....	28
Lipoproteínas de alta densidad y el Transporte Reverso del Colesterol .....	30
Propiedades antiinflamatorias .....	34
Función antioxidante .....	34
Función endotelial.....	35
Clasificación de las HDL.....	36
Determinación de lípidos de las subclases de HDL.....	37
Controversias de las HDL .....	38
Prueba de tolerancia oral de lípidos .....	40
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
Pacientes .....	47
Criterios de inclusión.....	47
Criterios de exclusión.....	48



---

Criterios de eliminación .....	48
Intervención .....	48
Evaluación antropométrica.....	49
Parámetros metabólicos.....	49
Paraoxonasa 1 (PON-1, EC 3.1.1.2).....	50
Aislamiento y análisis de las subclases de HDL.....	51
Caracterización de las subclases de las HDL.....	51
Evaluación de la función endotelial .....	54
Análisis de la abundancia del ARN mensajero .....	55
Análisis estadístico.....	56
Área bajo la curva incremental .....	57
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
Perfil bioquímico .....	58
Fluctuaciones en los niveles plasmáticos después de la prueba oral de lípidos .....	58
Análisis de las subclases de las HDL.....	63
Análisis del área bajo la curva incremental de triglicéridos .....	68
Estudios de la respuesta de la vaso relajación in vitro .....	71
Análisis de la abundancia del ARN mensajero.....	73
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>91</b>
Características de las apolipoproteínas que conforman las HDL.....	91
<b>Anexo II.....</b>	<b>92</b>
Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas .....	92

---

---

<b>Anexo III</b> .....	<b>93</b>
Referencias bibliográficas tabla 2 .....	93
<b>Anexo IV</b> .....	<b>95</b>
Determinación de proteínas por el método de Lowry .....	95
<b>Anexo V</b> .....	<b>96</b>
Determinación de la actividad paraoxonasa con fenilacetato .....	96
<b>Anexo VI</b> .....	<b>97</b>
Ultra centrifugación secuencial para obtención y purificación de HDL .....	97
<b>Anexo VII</b> .....	<b>98</b>
Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas .....	98
<b>Anexo VIII</b> .....	<b>99</b>
Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de HDL en fase semisólida (sobre gel PAGE) .....	99
<b>Anexo IX</b> .....	<b>102</b>
Ensayos de abundancia de ARNm.....	102

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Síntesis, exportación, captación y oxidación de lípidos en el hígado..	24
<b>FIGURA 2.</b> Representación esquemática de la estructura de las HDL. ....	31
<b>FIGURA 3.</b> Representación gráfica del transporte reverso de colesterol y subclases de HDL. ....	33
<b>FIGURA 4.</b> Distribución del alimento diseñado para este estudio.....	49
<b>FIGURA 5.</b> Migración de una muestra de HDL en un gel de poliacrilamida nativo, teñido con azul de coomassie y su análisis densitométrico.....	53
<b>FIGURA 6.</b> Concentración sérica de triglicéridos determinada a intervalos de 2 horas durante un período de 8 horas.....	59
<b>FIGURA 7.</b> Actividad Arilesterasa (ARE) de la PON-1.....	61
<b>FIGURA 8.</b> Concentraciones totales de C-HDL, Triglicéridos-HDL y Fosfolípidos-HDL se determinaron a intervalos de 2-h durante un período de 8-h.....	62
<b>FIGURA 9.</b> Efecto de las HDL sobre la vasorelajación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (Ach), en anillos aórticos aislados.....	72
<b>FIGURA 10.</b> Abundancia relativa de los genes codificantes denominados NOS3 y SCARB1, normalizados con respecto al gen codificante denominado GADPH.....	74

---

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las HDL con base en su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico .....	37
<b>Tabla 2.</b> Descripción de alimentos utilizados en pruebas orales de tolerancia de grasa. ....	43
<b>Tabla 3.</b> Características generales de la población de estudio agrupadas por IMC y ABCi de triglicéridos.....	60
<b>Tabla 4.</b> Proporción relativa de las subclases de las HDL expresadas como porcentaje de la proteína total de HDL.....	64
<b>Tabla 5.</b> Contenido de lípidos, y proporciones triglicéridos - fosfolípidos y colesterol total - fosfolípido en las subclases de las HDL en los períodos basal y postprandial.....	67
<b>Tabla 6.</b> Contenido de lípidos, y proporciones triglicéridos - fosfolípidos y colesterol total - fosfolípido en las subclases de las HDL en los períodos basal y postprandial en pacientes agrupados por el ABCi de triglicéridos. ....	70

## LISTA DE SIMBOLOS / ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1
ACC1	Acetil-CoA Carboxilasa 1
Ach	Acetilcolina
ADNc	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
AGPAT	Acil glicerol fosfato acil transferasa
Apo	Apolipoproteína
Apo-AI	Apolipoproteína A-I
ARNm	Mensajero del ácido ribonucleico
Asc	Área de superficie corporal
ATPIII	Guía para el tratamiento en adultos III. Panel de expertos sobre detección, evaluación y tratamiento para la hipercolesterolemia.
ABC	Área bajo la curva
ABCi	Área bajo la curva incremental
C	Centígrado
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL	Colesterol de alta densidad
CL	Citrato liasa
COX2	Ciclooxigenasa-2
CT	Umbral del ciclo (cycle threshold)
DAG	Diacilglicerol
DE	Desviación estándar
DGAT	Diacil glicerol acil transferasa
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Densitometría óptica
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
EL	Lipasa endotelial
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenina di nucleótido reducido
FAS	Ácido graso sintasa
g	Gramos
Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosín mono fosfato cíclico
GPAT	Glicerol fosfato acil transferasa
H	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidad
ICC	índice cintura-cadera
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular
IDR	Ingesta diaria recomendada
IMC	índice de masa corporal
Kcal	kilocalorías
KCl	Cloruro de potasio

---

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico
l	Litros
LCAT	Lecitina: colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-ox	LDL oxidadas
rLDL	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LH	Lipasa hepática
Lp	Lipoproteínas
Lp (a)	Lipoproteína A
LPL	Lipoproteínlipasa
LRP-1	Proteína asociada al receptor LDL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HSPG	Proteoglicanos de heparán sulfato
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NF-κB	Factor nuclear kappa de las células B activadas
NADH+H	Nicotinamida adenina di nucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Di nucleótido-Fosfato
nm	nanómetros
NO	Óxido nítrico
μg	Micro gramos
ME	Enzima málica
MGAT	Monoacil glicerol acil transferasa
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
Min	Minutos
μl	Microlitro
M	Molar
ml	Mililitro
mmol	mili moles
PDH	Piruvato deshidrogenasa
pH	Potencial de hidrógeno
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON-1	Paraoxonasa-1
PDZK1	Dominio PDZ N-terminal el cual interactúa con los residuos del extremo C-terminal de SR-BI
QM	Quilomicrones
SDC	Estearil CoA desaturasa
SM	Síndrome metabólico
SR-BI	Receptor "scavenger" clase B tipo I
Tm	Temperatura de alineamiento
TLRs	Remanentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos
Tris-HCl	Clorhidrato de trisaminometano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción reversa de la transcriptasa para la reacción en cadena de la polimerasa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VCAM-1	Moléculas de adhesión celular vascular
2-ΔΔCT	Doble delta-CT

---

---

## ABSTRACT

High density lipoproteins (HDL) are particles that, due to their physicochemical properties, have antiatherogenic, antioxidant, antiapoptotic, anti-inflammatory and antithrombotic properties, as well as playing a leading role in endothelial function and cholesterol reverse transport. A mechanism that prevents the atheroma's formation is the cholesterol reverse transport, a process by which the excess of cholesterol from peripheral cells returns to the liver for recycling and excretion.

However, in this process HDLs exchange triglyceride cholesterol esters of different Apo-B-containing lipoproteins, which is why the modifications carried out in these metabolic processes may alter their antiatherogenic properties, their ability to mediate the nitric oxide synthesis and mainly its protective effect on vascular endothelium.

In this work, we designed an oral lipid test in the form of a sandwich to study postprandial triglyceride clearance. We analyzed the effect of the hypertriglyceridemia postprandial magnitude on the five HDL subclasses structure, classified by their flotation density in conjunction with their hydrodynamic radius; particularly in the lipid content modifications in patients at high cardiovascular risk by an 8-hour kinetic. At the same time, we evaluated whether these modifications caused critical changes in the antioxidant and endothelial functions.

The activity of the paraoxonase-1 aryl esterase enzyme was determined using a phenylacetate assays as a substrate to measure the antioxidant function. The promotion of endothelial function in relation to nitric oxide synthesis was studied through the vasorelaxation response in vitro. Finally, the mRNA abundance was analyzed by RT-PCR to determine the transcriptional implications level of the coding genes called *NOS3* (endothelial nitric oxide synthase), *SR-BI* (SR-BI receptor) and *Pdzk1*.

The increase in postprandial triglyceridemic expressed as the incremental area under the curve (iAUC) doubled fasting concentrations in patients with metabolic syndrome. We observed changes in HDL triglyceride concentration in the large subclasses (2b) and in the cholesterol levels of subclasses (2a, 3a and 3b) towards the end of the kinetics.

---

The HDL size distribution shifted towards large subclasses; however, small subclasses (3a, 3b and 3c) showed a lower cholesterol content, estimated by the ratio of total cholesterol to phospholipids.

The study of paraoxonase-1 did not show fluctuations, however, in evaluating the vasorelaxation response in vitro we observed major changes in the dose-response curve to acetylcholine, rings incubated with HDL from apparently healthy subjects; pre-contracted with phenylephrine as vasoconstrictor. Triplicate analysis of mRNA abundance showed no statistical difference.

It is of utmost importance to underline the merits of this study; the configuration of the food was sufficient to double triglycerides fasting concentrations and could be used as a standardized method for Mexican adult's patients. The effects generated by the magnitude of the postprandial triglyceridemia condition a displacement of the HDL size towards large particles and a significant depletion of cholesterol content of small subclasses. A causative factor of acute endothelial dysfunction, in clinically healthy subjects. Changes in the HDL structure was not associated with alterations in the antioxidant function of PON-1.

The triglyceride incremental area under the curve used to stratify the study subjects could be applied as a new method of clinical hypertriglyceridemia selection, which proved to be a technique with a greater capacity to constitute groups more in a more homogeneous way than the algorithms currently used, such as the determination of the metabolic syndrome.

However, additional studies are required to investigate the role of the structural modifications found in other HDL antiatherogenic functions because of a sustained postprandial lipemia. Finally, these results suggest that postprandial hypertriglyceridemia is a feasible explanation of the associated risk factor for fasting hypertriglyceridemia and hypoalphalipoproteinemia.



---

## RESUMEN

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son partículas que por sus propiedades fisicoquímicas presentan características antiaterogénicas, antioxidantes, anti apoptóticas, antiinflamatoria y antitrombóticas, además de jugar un rol principal en la función endotelial y en el transporte reverso del colesterol. Un mecanismo que evita la formación de ateromas es el transporte reverso de colesterol, proceso por el cual el excedente de colesterol de las células periféricas regresa al hígado para su reciclaje y excreción.

Sin embargo, en este proceso las HDL intercambian ésteres de colesterol por triglicéridos de las diferentes lipoproteínas que contienen Apo-B, motivo por el cual las modificaciones que se llevan a cabo en estos procesos metabólicos pudieran alterar sus propiedades antiaterogénicas, su capacidad para mediar la síntesis de óxido nítrico, principalmente su efecto protector sobre el endotelio vascular.

En este trabajo diseñamos una prueba oral de lípidos en forma de un sándwich para estudiar el aclaramiento postprandial de triglicéridos. Conjuntamente, analizamos el efecto de la magnitud de la hipertrigliceridemia postprandial sobre la estructura de las cinco subclases de las HDL, clasificadas con base en su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico, particularmente en las modificaciones del contenido de lípidos en pacientes con alto riesgo cardiovascular durante una cinética de 8 horas. Al mismo tiempo, evaluamos si dichas modificaciones provocaron cambios importantes en las funciones antioxidantes y endoteliales.

La actividad de la enzima paraoxonasa-1 arilesterasa se determinó mediante ensayos con fenilacetato como sustrato para medir la función antioxidante. La promoción de la función endotelial en relación con la síntesis de óxido nítrico se estudió a través de la respuesta de la vaso relajación in vitro. Posteriormente, se analizó la abundancia del ARNm mediante qRT-PCR para determinar las implicaciones a nivel transcripcional de los genes codificantes denominados *NOS3* (óxido nítrico sintasa endotelial), *SR-BI* (receptor SR-BI) y *Pdzk1* (dominio PDZ N-terminal el cual interactúa con los residuos del extremo C-terminal de SR-BI).

---

El aumento de la trigliceridemia postprandial expresado como el área incremental bajo la curva (ABCi) duplicó las concentraciones de ayuno en pacientes con síndrome metabólico. Observamos cambios en la concentración de triglicéridos de las HDL en las subclases grandes (2b) y en el colesterol de las subclases (2a, 3a y 3b) hacia el final de la cinética. La distribución del tamaño de las HDL se desplazó hacia las subclases grandes, sin embargo, las subclases pequeñas (3a, 3b y 3c) mostraron un menor contenido de colesterol, estimado por la relación colesterol total-fosfolípidos.

El estudio de la paraoxonasa-1 (PON-1) no mostró cambios, sin embargo, al evaluar la respuesta de la vaso relajación in vitro observamos importantes cambios en la curva dosis-respuesta a acetilcolina, de anillos incubados con HDL de sujetos; aparentemente sanos; pre-contraídos con fenilefrina como vasoconstrictor. El análisis por triplicado de la abundancia del ARNm no mostró diferencias estadísticas.

Es de suma importancia subrayar las bondades de este estudio, la configuración del alimento fue suficiente para duplicar las concentraciones de triglicéridos en ayuno y puede ser utilizado como un método estandarizado para población mexicana adulta. Los efectos generados por la magnitud de la trigliceridemia postprandial condiciona un desplazamiento del tamaño de las HDL hacia partículas grandes y una importante depleción del contenido de colesterol de las subclases pequeñas, un factor causante de disfunción endotelial aguda, en sujetos clínicamente sanos.

Los cambios en la estructura de las HDL no se asociaron con alteraciones en la función antioxidante de la PON-1 (enzima vinculada a las HDL con capacidad de convertir lipoperóxidos de LDL en compuestos biológicamente inocuos).

El algoritmo del área bajo la curva incremental de triglicéridos empleado para estratificar a los sujetos de estudio puede ser aplicado como un nuevo método de selección de hipertrigliceridemia clínica, el cual resultó ser una técnica con una mayor capacidad para constituir grupos más homogéneos que los algoritmos actualmente utilizados, como la determinación del síndrome metabólico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para investigar el papel de las modificaciones estructurales encontradas en otras funciones antiaterogénicas de las HDL como resultado de una lipemia postprandial sostenida.

Finalmente, estos resultados sugieren que la hipertrigliceridemia postprandial es una explicación factible del factor de riesgo asociado para la hipertrigliceridemia de ayuno y la hipoalfalipoproteinemia.

---

## ANTECEDENTES

El gran desarrollo tecnológico e industrial en la segunda mitad del siglo XX aportó importantes avances a la medicina, salud pública y la nutrición; sin embargo, la globalización instauró drásticos cambios en el modo de vida, sobre todo en los hábitos de alimentación lo que realzó el imponente incremento del sobrepeso-obesidad y la aparición de las enfermedades cardiovasculares (ECV) [1].

La importancia de estas enfermedades radica principalmente en la falta de signos y síntomas en sus primeros estadios que las hagan evidentes, lo que las distingue como padecimientos con un alto potencial de morbimortalidad. Estas afecciones metabólicas forman parte de las enfermedades no transmisibles o crónicas-degenerativas que afectan los vasos sanguíneos y el corazón. Por lo general, se encuentran latentes desde edades tempranas y son de evolución prolongada; la forma más común y principal causa de incapacidad y muerte en el planeta es la aterosclerosis o enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) [2].

### **Enfermedad aterosclerosa coronaria**

La aterosclerosis es resultado de un proceso inflamatorio de las arterias, asociado a alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas. Se ha vinculado a concentraciones disminuidas de colesterol de alta densidad (C-HDL, por sus siglas en inglés), así como a elevadas concentraciones de triacilglicerolos (triglicéridos) y colesterol de baja densidad (C-LDL). Éste último altera la permeabilidad celular y afecta las paredes arteriales al promover una respuesta inflamatoria que genera que monocitos circulantes se adhieran a las células endoteliales que expresan selectinas y moléculas de adhesión, lo que aumenta la diapédesis hacia el espacio subendotelial [3].

Esta migración de monocitos da lugar a la conversión de éstos en macrófagos y posteriormente en células espumosas que se infiltran en las paredes arteriales y generan un engrosamiento mórbido de la íntima que induce una acumulación de ésteres de colesterol, residuos celulares, calcio y fibrina [4].

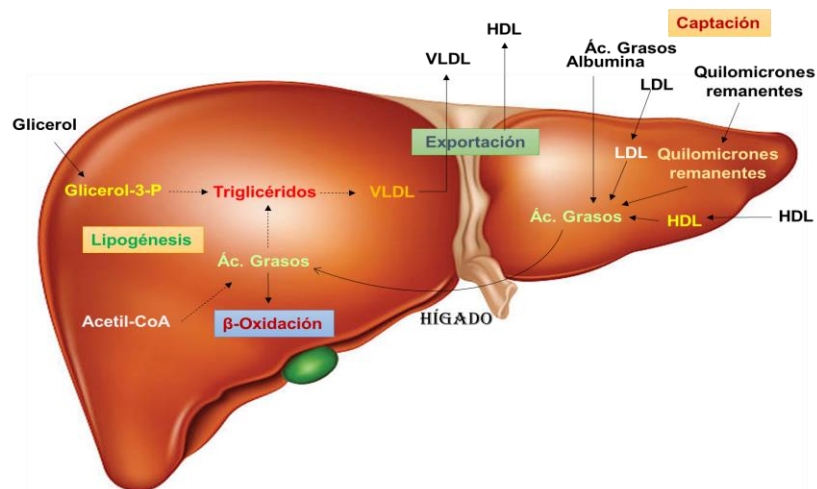
Como resultado de este proceso continuo se crea un estrechamiento del lumen del vaso y, por consiguiente, la circulación sanguínea a órganos como cerebro o corazón se ve limitada. La placa de ateroma puede romperse dando origen a un proceso trombótico que ocluye totalmente la circulación y cuyos síntomas clínicos son accidentes cerebrovasculares, infartos al miocardio y claudicación de acuerdo con la topología de la placa aterosclerótica [5].

### **Metabolismo de lípidos**

El término lípido se emplea de forma genérica para designar diversas biomoléculas de estructuras diferentes, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Los lípidos por su naturaleza hidrofóbica se transportan en plasma asociados a proteínas anfipáticas, conocidas como apolipoproteínas (Apo), para crear una partícula denominada lipoproteína. Una lipoproteína tiene un centro no polar formado de triglicéridos y colesterol esterificado (CE) y está contenida por una capa superficial de fosfolípidos y colesterol no esterificado [6].

Los lípidos poseen funciones estructurales, de señalización y son fuentes de energía, en particular los triglicéridos que aportan el mayor valor energético de todos los nutrimentos [7]. Además, sirven como almacén de ácidos grasos esenciales y no esenciales que se utilizan como precursores en la síntesis de fosfolípidos estructurales y funcionales en todas las células [8]. De igual manera, disminuyen la señalización por el diacilglicerol (DAG) debido a que el aumento continuo de sus concentraciones se asocia con alteraciones nocivas en varios tipos celulares [9].

El hígado es considerado el órgano primariamente implicado en la regulación del metabolismo de lípidos por su participación en la síntesis, exportación, captación y oxidación [10]. Estos procesos son regulados de diferentes maneras lo que incluye mecanismos alostéricos, transcripcionales y postraduccionales mediados por metabolitos y hormonas [9] [11] (Figura 1).



**Figura 1. Síntesis, exportación, captación y oxidación de lípidos en el hígado.** El hígado es el órgano más importante en la homeostasis lipídica por la cantidad de vías metabólicas en las que participa: lipogénesis,  $\beta$ -oxidación, exportación y captación.

Los lípidos que provienen de la dieta son absorbidos a nivel intestinal y ensamblados en el enterocito junto con otras apolipoproteínas en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, lo que da origen a los quilomicrones (QM). La proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP) transfiere lípidos a la Apo B-48 para ensamblar un pre-quilomicrón que de manera continua adquiere un mayor número de lípidos antes de ser secretado [12].

Durante la etapa postprandial los QM son sintetizados para transportar los lípidos de la dieta hacia la linfa y posteriormente al flujo sanguíneo dónde adquieren Apo-E (ligando para eliminación del QM remanente) y Apo-CII (activador de la enzima lipoproteína lipasa (LPL)), a partir de lipoproteínas de alta densidad (HDL) [13]. Se ha observado que el tamaño de los QM sintetizados se encuentra directamente asociado a la cantidad de lípidos y configuración de los ácidos grasos de los triglicéridos, lo que refleja la composición de lípidos de la dieta [14].

---

La lipoproteína lipasa (LPL) interviene en el proceso de lipólisis de los QM que pierden entre el 70 y 90 % de su contenido de triglicéridos a nivel endotelial de tejidos extra hepáticos, particularmente, tejido adiposo y muscular dónde los ácidos grasos libres son captados [15]. Este proceso da como resultado remanentes de QM que son endocitados por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL), la proteína asociada al receptor LDL (LRP-1) y por proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) [4].

La síntesis y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) depende en gran medida de la disponibilidad de triglicéridos y Apo B-100 [16]. Las VLDL son sintetizadas en el hígado y el ensamblaje de los lípidos endógenos, en gran parte de triglicéridos con diferentes apolipoproteínas, particularmente Apo B-100, se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Sin embargo, en casos de baja disponibilidad de lípidos la Apo B-100 es degradada por diferentes vías [17]. Los triglicéridos hepáticos se originan de ácidos grasos libres derivados de la lipólisis del tejido adiposo, captación de remanentes de VLDL y QM, y de la síntesis hepática *de novo* [18].

Los triglicéridos de las VLDL son hidrolizados por la LPL, lo que da origen a remanentes de VLDL, denominados lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Estas partículas pueden ser catabolizadas inmediatamente por el hígado o permanecer en circulación para dar origen a las LDL, que son mediadas por la lipasa hepática (LH) que las despoja de los triglicéridos y por la proteína de transferencia de colesterol (CETP) que permite la captación de CE a partir de las HDL [19].

Las LDL a su vez pueden ser captadas en mayor proporción por el hígado o por tejidos extra hepáticos; sin embargo, en ambos casos son endocitados por el rLDL que reconoce a la Apo B-100. Las HDL tienen su origen en hígado e intestino en forma de Apo-AI y juegan un papel importante en el transporte intravascular de lípidos, como se discutirá más adelante [20]. Las enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas se muestran en el anexo II).

## Lipoproteínas aterogénicas

Las LDL son consideradas las lipoproteínas con mayor aterogenicidad debido a que su configuración comprende entre el 60 y 70 % del colesterol sérico total, lo que se asocia directamente con hipercolesterolemia; además un incremento en el C-LDL constituye un factor de riesgo para las ECV [21]. Los remanentes de QM y VLDL que se originan en el proceso de lipólisis y remodelación mediada por las enzimas LPL y CETP, lo que da lugar a partículas con densidad, tamaño y configuración lipídica y proteica diferentes [22]. La acumulación de TRLs y sus remanentes es considerado un factor de riesgo cardiovascular [4].

El tamaño de las partículas es trascendental ya que se ha reportado una relación directa entre el tamaño de las lipoproteínas y su habilidad para atravesar la barrera endotelial e ingresar a la íntima arterial [23]. Como resultado del continuo enriquecimiento con colesterol y depleción de triglicéridos en plasma, los remanentes de QM y VLDL reducen su tamaño de manera progresiva y pueden atravesar hacia la íntima donde se ensamblan a la matriz extracelular, como se ha demostrado en pacientes y modelos animales [24]. La acumulación de lipoproteínas ricas en colesterol dentro de la matriz subendotelial de la pared arterial juega un papel clave en el proceso de la aterogénesis [22].

La activación del endotelio hace que éste se vuelva más permeable y se expresen factores quimio tácticos y moléculas de adhesión, lo que genera que los monocitos se puedan adherir con mayor facilidad y, por consiguiente, estas partículas atraviesen el endotelio y se almacenan en la íntima donde se oxidan, lo que las vuelven más aterogénicas [25,26]. Así, la disfunción endotelial es clave en el inicio de la aterogénesis [27].

Asimismo, el incremento en las concentraciones de triglicéridos da lugar a la presencia de moléculas de LDL pequeñas y densas, provocado por la LH que hidroliza los triglicéridos de las LDL. En este sentido, las HDL intercambian ésteres de colesterol por triglicéridos de las diferentes lipoproteínas que contienen Apo-B, por lo que este proceso pudiera alterar sus propiedades antiaterogénicas.



Asimismo, las modificaciones que se llevan a cabo en estos procesos metabólicos podrían alterar sus funciones antioxidantes, antiinflamatorias y su capacidad de estimulación en la síntesis de óxido nítrico e importantemente su efecto protector sobre el endotelio vascular [28].

### **Triglicéridos y enfermedad aterosclerosa coronaria**

Durante más de una década, los altos niveles de triglicéridos séricos en ayuno o en postprandio han sido reconocidos como un factor de riesgo para la EAC [29,30]. La concentración de triglicéridos plasmáticos recomendada en ayuno es por debajo de 150 mg/dl [31]. Sin embargo, concentraciones elevadas de triglicéridos pueden asociarse a la liberación de citocinas proinflamatorias, reclutamiento de neutrófilos y la inducción del estrés oxidativo, que puede dar lugar a una disfunción endotelial [32-34]. Por este motivo, la hipertrigliceridemia es considerada como un factor de riesgo importante y duradero [35].

Las hipertrigliceridemias pueden ser primarias como la dislipidemia familiar o secundarias, derivadas de la resistencia a la insulina/síndrome metabólico, o del consumo de dietas altas en hidratos de carbono con un consumo energético diario mayor al 60 %, por encima de la ingesta diaria recomendada (IDR). Se ha demostrado una mayor prevalencia de la aterosclerosis subclínica en pacientes con valores de triglicéridos entre 150 y 200 mg/dl, respecto a pacientes con concentraciones menores a 150 mg/dl [36]. No obstante, esto podría explicarse en gran parte por una mayor prevalencia de hiperlipemia postprandial que, también se ha demostrado tiene una relación más clara con la aparición de cardiopatía isquémica que la hipertrigliceridemia basal *per se* [37].

Rutinariamente, los triglicéridos plasmáticos se determinan bajo condiciones de ayuno para facilitar el cálculo del C-LDL. Sin embargo, el ayuno representa sólo una pequeña porción del día, por lo que subestima las concentraciones alcanzadas en el estado postprandial. La lipemia y la hipertrigliceridemia postprandial pueden afectar las mediciones tanto del C-HDL como del C-LDL [38]. Con base en estos antecedentes, estudios prospectivos han encontrado que las concentraciones de triglicéridos postprandiales pueden ser un mejor indicador de eventos cardiovasculares en la población general [39].

---

La evidencia científica actual apunta a que la aterosclerosis puede ser un fenómeno de origen postprandial y que el consumo diario de alimentos con una alta carga de lípidos a lo largo de la vida puede ocasionar daños metabólicos que favorezcan la progresión de la EAC [40]. El riesgo atribuido a las concentraciones elevadas de triglicéridos puede ser explicado por su papel significativo como origen de remanentes y por su asociación clara a una disminución de las concentraciones de C-HDL y a un aumento del colesterol no HDL [22].

### **Hipertrigliceridemia postprandial**

La hipertrigliceridemia se define como las concentraciones plasmáticas de triglicéridos por encima del percentil 95 para la edad y género de una población de referencia [41]. Es una entidad clínica compleja comúnmente asociada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (SM) [42]. En ayuno los valores esperados de triglicéridos se encuentran entre 60 y 150 mg/dl (de 0.70 a 1.69 mmol/l) [21], motivo por el cual las concentraciones en postprandio rebasan estos valores. La hipertrigliceridemia postprandial puede clasificarse como moderada con valores que van desde 400 hasta 990 mg/dl (<11.2 mmol/l) [43] y severa con valores que rondan los 1980 mg/dl (> 22.4 mmol/l) [38]. Las concentraciones de triglicéridos superiores a 875 mg/dl (10 mmol/l) se han asociado con el desarrollo de pancreatitis aguda [44].

La hipertrigliceridemia suele coexistir con una baja concentración de C-HDL y pequeñas partículas de C-LDL que son más aterogénicas. La característica de la hipertrigliceridemia se hace más relevante como riesgo cardiovascular con la presencia de otras características del SM (obesidad abdominal, hipertensión arterial e hiperglucemia) y es un patrón típico de dislipidemia de pacientes con diabetes [45].

Asimismo, las concentraciones de triglicéridos por encima de 150 mg/dl se consideran un riesgo de ECV y son un marcador asociado a una respuesta postprandial ineficaz. Pacientes con ECV muestran un tiempo mayor en la permanencia de las concentraciones elevadas de triglicéridos posterior a la ingesta de una carga alta de lípidos, lo que se ha calificado como un factor de riesgo para infarto al miocardio y eventos cardiovasculares [46].

---

El aumento postprandial de triglicéridos se debe en gran parte al complejo proceso metabólico de los lípidos, donde se ha observado en sujetos sanos que, de manera posterior a la ingesta de 30 a 60 g de lípidos, las concentraciones basales se alcanzan en las siguientes 5 a 8 horas [46, 47].

Un estudio llevado a cabo en sujetos aparentemente sanos reportó que las concentraciones postprandiales de triglicéridos aumentan considerablemente y muestran un pico máximo entre las 2 y las 5 horas. A partir de las 6 horas, los triglicéridos regresan a valores basales después de una ingesta alta en lípidos [47]. Sin embargo, sujetos con alto riesgo cardiovascular presentan un retardo en alcanzar el pico máximo y requieren hasta 8 horas para regresar a concentraciones basales. [48].

En este sentido, diversos estudios proponen que la capacidad de aclaramiento de triglicéridos circulantes por las lipoproteínas que los transportan de manera eficiente, después de la ingesta de alimentos con alto contenido de lípidos, es un reflejo de la eficacia metabólica de su regulación de asimilación y absorción [49]. De igual manera, una lipemia postprandial elevada es considerada un signo de anormalidad metabólica, lo que se asocia con mayor riesgo de futuros eventos cardiovasculares, enfermedad vascular periférica y eventos cerebrovasculares. La presencia de estas patologías favorece el desarrollo del SM, lo cual incrementa aún más el riesgo cardiovascular [50].

La hipertrigliceridemia postprandial es una condición clínica que ocurre con mucha frecuencia. Su etiología incluye la combinación de predisposición genética y factores de comportamiento personal [51]. La incidencia sigue aumentando y contribuye significativamente a la morbimortalidad global y la carga socioeconómica en todo el mundo [52]. Existe una probabilidad muy alta de que su prevalencia aumente en los próximos años debido al aumento de casos de obesidad y diabetes en todo el mundo [42].

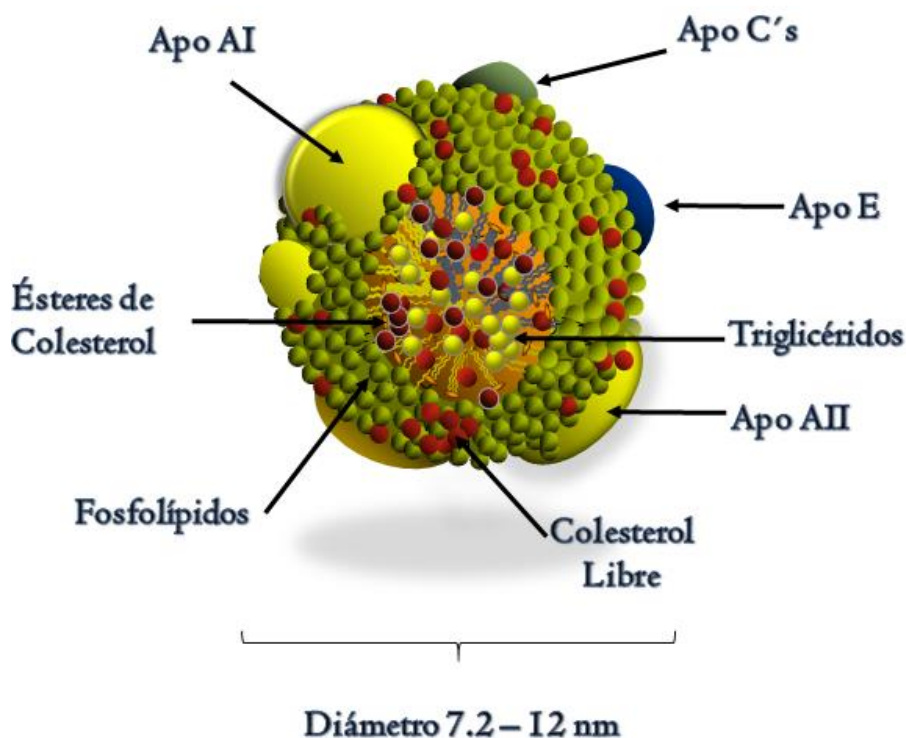
---

## Lipoproteínas de alta densidad y el Transporte Reverso del Colesterol

Desde hace más de 35 años se ha asegurado que el C-HDL es un buen predictor de riesgo cardiovascular, donde se ha puesto de manifiesto la existencia de una relación inversa entre el C-HDL y la EAC. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos clásicos demostraron que concentraciones séricas elevadas de C-HDL correlacionan directamente con una menor incidencia de ECV [53, 54]. Actualmente, el C-HDL es reconocido como un factor cardio-protector fundamental asociado a la aterosclerosis. Sin embargo, otros estudios clásicos han demostrado que el C-LDL conserva una asociación directa con la ECV y que altas concentraciones en adultos jóvenes pronostica la aparición de EAC en el transcurso de sus vidas [55-57]. En este sentido, las HDL juegan un papel relevante ya que poseen características antiaterogénicas, antioxidantes, antiinflamatorias y endoteliales esenciales.

Las HDL tienen un tamaño comprendido entre 7.2 y 12 nm, son partículas discoidales y esféricas de alta densidad (1.063-1.21 g/ml), que poseen entre el 45 y 55 % de su masa seca de proteínas. Dicha fracción proteica está constituida por diversas apolipoproteínas entre las que destaca la Apo-AI. Esta apolipoproteína es la de mayor abundancia y estructuralmente fundamental para las HDL [58]. De igual forma, otras apolipoproteínas son componentes estructurales de las HDL como la AII, AIV, CI, CII, CIII y E; sus características se puntualizan en el Anexo I [59].

Las HDL están conformadas por lípidos hidrofóbicos (triglicéridos y ésteres de colesterol) en su interior y lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) así como apolipoproteínas en el exterior (figura 2). La Apo A-I, es de vital importancia para el proceso de reciclaje y/o excreción del colesterol de las células periféricas; así como de la función de activación de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), enzima clave en el metabolismo intravascular de las HDL.



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura de las HDL.**

Un mecanismo que evita la formación de ateromas es el metabolismo intravascular de las HDL o transporte reverso de colesterol (TRC), proceso por el cual el excedente de colesterol de las células periféricas regresa al hígado para su reciclaje o excreción a través de las vías biliares [60]. La biosíntesis de las HDL inicia con la síntesis y secreción hepática al sistema vascular de la Apo AI que se asocia fácilmente con fosfolípidos, lo que genera una estructura discoidal denominada partícula pre- $\beta$ , la cual posee una alta afinidad por el colesterol [61]. Estas partículas captan colesterol libre de las células periféricas a través de la interacción con un transportador de membrana dependiente de ATP, (ABCA-1) ubicado en hígado, macrófagos e intestino [62].

Las partículas pre- $\beta$  captan colesterol y evolucionan como pequeñas partículas esféricas ricas en apolipoproteínas y escaso contenido de lípidos, denominadas HDL<sub>3</sub>. Las HDL<sub>3</sub> por acción de la enzima LCAT subsecuentemente se expanden a partículas de mayor tamaño, mediante un proceso de esterificación del colesterol libre. Esta enzima clave cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la fosfatidilcolina (lecitina) al colesterol libre presente en las HDL.

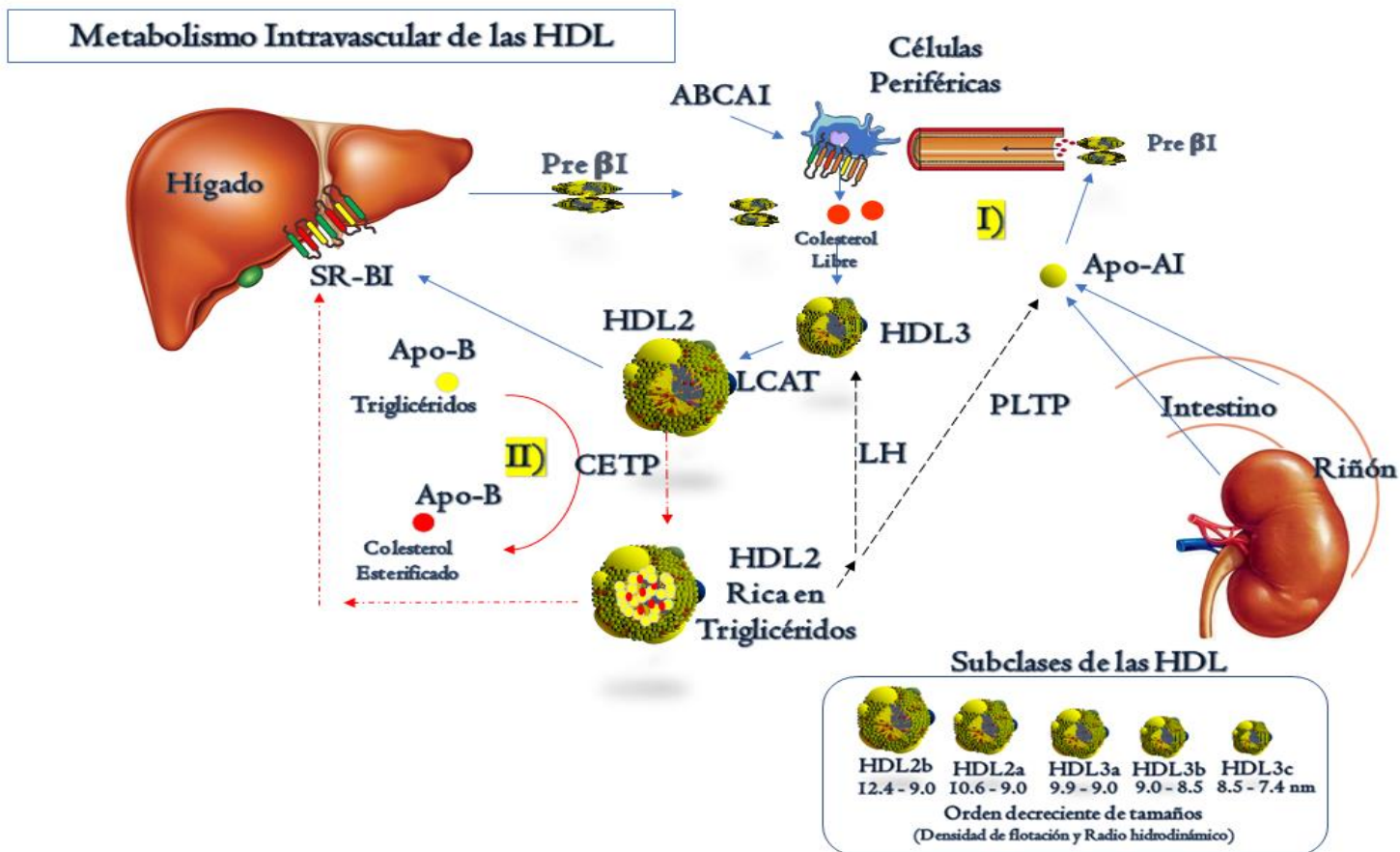
En este último paso, las partículas de HDL reciben el nombre de HDL<sub>2</sub> lo que da como resultado partículas que cuentan con la capacidad de interacción con la proteína CETP y con otro receptor de membrana de gran afinidad, el receptor “scavenger” clase B tipo I (SR-BI). Las HDL<sub>2</sub> son partículas que presentan un mayor tamaño, pero menor densidad que las HDL<sub>3</sub>, como se simplifica en la figura 3.

La captación selectiva de ésteres de colesterol de las HDL en los hepatocitos ocurre vía el receptor SR-BI, remodelando las partículas a HDL<sub>3</sub>, que pueden reiniciar el eflujo de colesterol. Conjuntamente, la proteína CETP participa en el intercambio de ésteres de colesterol por triglicéridos de las diferentes lipoproteínas que contienen Apo B, lo que da origen a partículas HDL<sub>2</sub>, que ahora son enriquecidas con triglicéridos.

Paralelamente, las Apo C y E son transferidas a los quilomicrones y a las VLDL, para mantener estable la estructura de las HDL. La hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos por la enzima LH da origen a una partícula remanente que puede ser reformada en partículas pre- $\beta$  y HDL<sub>3</sub>, mediante la acción de la proteína PLTP. Estas nuevas partículas poseen la capacidad de reiniciar el ciclo de captación de colesterol, una vez más [63].

Por otra parte, además del papel clásico que juega el SR-BI, la unión de las HDL a este receptor media la activación directa del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), paso inicial de la síntesis de óxido nítrico (NO); la ausencia de la expresión global de SR-BI en modelos murinos exagera la presencia de aterosclerosis, sin embargo, su sobreexpresión hepática hace que esta se atenúe [64].

Asimismo, PDZK1 es una proteína que contiene el dominio PDZ N-terminal el cual interactúa con los residuos del extremo C-terminal de SR-BI esencial en la traducción de señal de este receptor [64]. Por consiguiente, la señalización de SR-BI activa la síntesis de NO por las HDL, lo que mantiene la integridad de la capa íntima del endotelio vascular; sin embargo, se desconoce si modificaciones en las HDL pudieran afectar su expresión.



**Figura 3. Representación gráfica del transporte reverso de colesterol y subclases de HDL.** Lp-B: Lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL. lipoproteínas de baja densidad); LCAT: Lecitina: colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I; ABCA1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo I. Las subclases de HDL se muestran en orden decreciente de tamaños con base en su densidad de flotación y radio hidrodinámico.

---

## **Propiedades antiinflamatorias**

Las HDL impiden los procesos inflamatorios vasculares, a través de la regulación de las moléculas VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina, por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), así como por la inhibición de la expresión de interleucinas, entre ellas, la IL-8 [65].

A pesar de ello, en estados fisiopatológicos con procesos inflamatorios como en la artritis reumatoide, síndrome coronario agudo y aterosclerosis, las HDL modifican su composición, capacidad enzimática y oxidativa, convirtiéndose en moléculas pro-inflamatorias, lo que sugiere que las HDL pueden volverse, en ciertas condiciones, pro-aterogénicas [66]. Por consiguiente, la estructura de las HDL es el resultado de un intercambio dinámico de lípidos entre lipoproteínas y con los tejidos a través del TRC. Este proceso da lugar a una gama heterogénea de partículas que pueden diferenciarse por su diámetro, densidad, composición lipídica y contenido de apolipoproteínas. En este proceso intervienen una gran variedad de enzimas, proteínas plasmáticas y de membrana que se describen en el Anexo II.

## **Función antioxidante**

El proceso oxidativo de las lipoproteínas provoca un curso inflamatorio, disfunción endotelial y apoptosis celular. En virtud de ello, las HDL juegan un papel esencial en la prevención de este proceso, a través de la enzima LCAT, y la Apo-AI, pero principalmente por acción de la enzima paraoxonasa-1 (PON-1).

La PON-1, es una enzima vinculada a las HDL que tienen la capacidad de convertir lipoperóxidos de LDL en compuestos biológicamente inocuos. Su interacción está asociada con la estructura y composición de las HDL, razón por la cual se ha propuesto que la composición es crucial para mantener a la PON-1 unida a su superficie; en efecto, el tamaño de las HDL es inversamente proporcional con la afinidad por esta enzima, es decir, mientras más pequeña la partícula, mayor afinidad presenta [66].



---

Se ha observado una función antioxidante deficiente en pacientes con diagnóstico de SM y DMT2 que presentan dislipidemias con concentraciones bajas de C-HDL. Además, en este mismo estudio se ha observado que en situaciones en la que la PON-1 se encuentra inhibida, la función de las HDL puede verse afectada, ya que estas partículas se oxidan fácilmente, lo que origina una reducción en su capacidad de captación de colesterol [67].

De igual manera, este mismo estudio encontró que pacientes con EAC, poseen concentraciones bajas de esta enzima. Sin embargo, también identificaron que las HDL transportan otro tipo de compuestos que poseen funciones antioxidantes, como los tocoferoles, que, aunque representan una fracción muy pequeña del contenido de la partícula podrían actuar como coadyuvantes en dicha actividad [67].

### **Función endotelial**

Las HDL promueven la síntesis de ON, disminuyen la expresión del factor tisular y suprimen la expresión de moléculas de adhesión celular. De igual manera, participan en la regulación del tono vascular mediante la síntesis de la ciclooxigenasa-2 (COX2), que incrementa la secreción de prostaciclina en las células endoteliales [66]. Adicionalmente, disminuyen la síntesis de ROS, factores clave en el desarrollo de la EAC, lo que se ha asociado a una menor progresión de aterosclerosis [51].

Además, se ha postulado que la protección de la función endotelial mediada por las HDL está asociada a su capacidad para inactivar los efectos perjudiciales de las LDL oxidadas (LDL-ox), a nivel de la síntesis del NO. De hecho, la gran cantidad de LDL-ox aumentan la síntesis de la proteína caveolina-1, que inactiva la eNOS y, por consiguiente, disminuye la síntesis de NO [68]. Por otra parte, las HDL participan activamente en la protección del endotelio vascular, mediante la inactivación del sistema del complemento.

Son diversas las evidencias que asocian a las HDL con la protección de la homeostasis del endotelio vascular que favorece la disfunción endotelial propia de la enfermedad cardiovascular.

En este sentido, la labor de preservar la función endotelial se vería comprometida de existir cambios en la estructura de las HDL, de tal forma que modificaciones en la composición de estas lipoproteínas, indirectamente modificarían la función endotelial [69].

Por ende, la disfunción endotelial se define como una alteración de la homeostasis vascular. Este desequilibrio genera que, ante estímulos vasodilatadores, exista una respuesta de vasoconstricción contradictoria, o con escasa vasodilatación. Además de una activación plaquetaria, predisposición a adherencia leucocitaria, mitogénesis, trombosis, inflamación vascular y finalmente aterosclerosis [70].

### **Clasificación de las HDL**

La clasificación de las HDL se lleva a cabo a través de diversas técnicas de aislamiento y separación, sin embargo, la mayoría de los métodos se fundamentan en la determinación de uno de los elementos estructurales de las lipoproteínas. Asimismo, se ha postulado que las subclases de HDL poseen capacidades diferentes en sus funciones antioxidantes, antiaterogénicas y de potencial para promover el eflujo de colesterol [71] [72] [73].

Las HDL con base en su densidad de flotación se puede separar en dos subclases por su densidad de flotación ( $r$ ): HDL<sub>2</sub> ( $1.063 < r < 1.12$  g/ml) y HDL<sub>3</sub> ( $1.12 < r < 1.21$  g/ml). Las HDL<sub>2</sub> poseen un mayor tamaño y mayor contenido de colesterol esterificado y triglicéridos, en comparación con las HDL<sub>3</sub>, principalmente constituidas por fosfolípidos y proteínas [74].

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, las HDL se clasificaron con base en la densidad de flotación en conjunto con el radio hidrodinámico. El diámetro hidrodinámico incluye la medida del diámetro de la partícula y la carga eléctrica de la superficie. La clasificación de las HDL con base en su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico se muestra en la tabla 1.

## Determinación de lípidos de las subclases de HDL

Estudios recientes plantean que las subclases de las HDL poseen diferentes actividades ateroprotectoras, por lo que su análisis, así como la caracterización de su composición química pueden mejorar la capacidad de evaluar el riesgo de presentar EAC [75]. En este sentido, en años recientes se han diseñado métodos químicos de laboratorio que permiten caracterizar la composición lipídica de las HDL al estimar el contenido de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos de cada una de las subclases [73, 76].

**Diferencias de las propiedades fisicoquímicas de las HDL en sujetos normolipémicos sanos.**

<b>Características</b>	<b>HDL<sub>2b</sub></b>	<b>HDL<sub>2a</sub></b>	<b>HDL<sub>3a</sub></b>	<b>HDL<sub>3b</sub></b>	<b>HDL<sub>3c</sub></b>
Diámetro (nm)	12.4 – 10.6	10.6 – 9.9	9.9 – 9.0	9.0 – 8.5	8.5 - 7.4
Densidad (g/ml)	1.099	1.107	1.123	1.155	1.186
<b>Lípidos de superficie (mol-lípido/mol-HDL)</b>					
Colesterol libre	70	40	25	15	10
Fosfolípidos	130	140	120	45	25
<b>Lípidos del núcleo (mol-lípido/mol-HDL)</b>					
Colesterol esterificado	180	160	140	70	40
Triglicéridos	30	20	15	10	5
<b>Contenido (%)</b>					
Proteína total	35	40	45	55	65
Lípidos totales	65	60	55	45	35

**Tabla 1. Clasificación de las HDL con base en su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico.** Tomado y modificado de Rye, 2009 y Kontush-Chapman, 2006.

---

## Controversias de las HDL

Existen numerosos estudios epidemiológicos que sugieren que la concentración de C-HDL no es suficiente para explicar el efecto ateroprotector de las HDL. Con el objetivo de reducir la tasa de incidencia y mortalidad de las ECV, se propuso incrementar las concentraciones de C-HDL [48]. Una de estas estrategias para lograrlo fue el diseño de inhibidores de la CETP, capaces de incrementar eficazmente las concentraciones de C-HDL hasta en un 90 %. Sin embargo, dichos fármacos no sólo no cumplieron con su objetivo, sino que incluso incrementaron el riesgo de morbimortalidad de los pacientes a los que se les prescribió, en el caso particular del torcetrapib [77, 78].

Contradictoriamente a lo esperado, ésta fue la primera evidencia a gran escala “in vivo” de que, por sí mismo, las altas concentraciones plasmáticas de C-HDL asociadas a un aumento del tamaño de estas lipoproteínas no es sinónimo de cardio-protección y disminución del riesgo cardiovascular. Una posible explicación a estas evidencias es que el mismo fármaco genera partículas HDL2 o partículas grandes, ricas en colesterol, debido a que su mecanismo de acción es inhibir a la CETP. El resultado de inhibir a la CETP es bloquear una de las vías de salida del colesterol (el intercambio de colesterol por triglicéridos de las HDL, con las lipoproteínas que contienen Apo-B), como se muestra en la figura 3.

No obstante, a las altas concentraciones de C-HDL, las partículas de estas lipoproteínas se encuentran modificadas en su composición (enriquecidas con colesterol esterificado) y, por consiguiente, su funcionalidad se ve comprometida. De la misma manera, estas partículas se encuentran modificadas o “alteradas”, por lo que, probablemente resulta en una regulación de la salida del colesterol a la baja. De la misma forma, un metaanálisis demostró que concentraciones séricas altas de C-HDL, acompañadas de partículas de HDL grandes, se asociaron a un mayor riesgo cardiovascular [42].

---

Asimismo, individuos con bajas concentraciones de C-HDL (10 a 15 mg/dl, respecto al valor de referencia > 40 mg/dl), como es el caso específico, de los individuos que presentan las mutaciones Apo-AI<sub>Milano</sub>, Apo-AI<sub>Paris</sub> o la enfermedad del ojo de pescado (Fish Eye Disease (EFD)), no presentan eventos cardiovasculares adversos, ni historial clínico o antecedentes familiares de EAC [50, 79].

En el caso de la Apo-AI<sub>Milano</sub>, se trata de una variante de la Apo-AI humana caracterizada por la sustitución en la secuencia de aminoácidos de un residuo de cisteína por un residuo de arginina en la posición 173. La Apo-AI<sub>Milano</sub> se asocia a longevidad a pesar de las concentraciones bajas de C-HDL [46]. Si bien las partículas de las HDL no son ricas en colesterol, éstas son muy eficientes en su proceso de captación y eliminación.

En resumen, estas observaciones apuntan a que no sólo las concentraciones del C-HDL son importantes, sino que las funciones antioxidantes, antiaterogénicas, de potencial para promover el eflujo de colesterol y endoteliales dependen de la estructura de las HDL, y ésta a su vez depende de la composición lipídica y proteica de las mismas [80]. Por lo tanto, cualquier circunstancia que induzca un cambio en la estructura y/o composición de las HDL, potencialmente afectaría las capacidades antiaterogénicas de estas lipoproteínas, como potencialmente podría suceder durante la hipertrigliceridemia postprandial.

En este sentido, un estudio que data de hace más de 30 años analizó la estructura de las HDL posterior a la ingesta de 130 g de grasa en dos pacientes hipertriglicéridémicos, el cual concluyó que durante el postprandio las HDL2 se enriquecían con triglicéridos. Asimismo, la hidrólisis por la lipasa hepática generó una disminución de la masa de las HDL2 y un aumento en las HDL3 [81]. Sin embargo, la estructura de las HDL durante el postprandio no se ha investigado en un número mayor de pacientes desde ese entonces.

---

## Prueba de tolerancia oral de lípidos

Un instrumento para evaluar el aclaramiento de la lipemia postprandial es la prueba oral de tolerancia a la grasa. El cálculo de la carga de grasa es uno de los temas más críticos en la selección de esta prueba, sin embargo, existen muchas inconsistencias y diferencias en las cargas de lípidos, tiempo de las cinéticas, mediciones bioquímicas y lo más importante los tipos de alimentos utilizados. Diversos grupos de investigación han realizado diversos estudios con numerosos aportes de lípidos con el objetivo principal de conocer las variaciones en las concentraciones séricas de triglicéridos postprandiales, como se muestra en la tabla 2.

Se ha observado que aportes menores a 15 g de lípidos son insuficiente para desencadenar alteraciones metabólicas significativas; mientras que cantidades superiores a 80 g intensifican la respuesta de la depuración postprandial de triglicéridos. Sin embargo, sólo varias referencias de las mencionadas en la tabla 2 cumplen con esta declaración. Algunos estudios decidieron utilizar fórmulas de área de superficie corporal (Asc) para determinar la carga de lípidos a utilizar.

La selección de la fórmula de Asc correcta no es una tarea fácil y su determinación no es precisa, debido a la inter-individualidad y la variabilidad étnica, lo que podría conducir a errores involuntarios [82]. A pesar de los diversos estudios, las cargas de grasa siguen mostrando diferentes enfoques y no existe aún un consenso al respecto.

Las condiciones que se deben tomar antes de aplicar este tipo de ensayos clínicos incluyen la composición de los alimentos consumidos el día anterior y el ejercicio realizado los días previos a este tipo de estudios, debido a que realizar 30 minutos de ejercicio el día anterior, acelera el aclaramiento de triglicéridos ingeridos el día siguiente [83]. Sin embargo, un total de 12 min de sesión de tiempo aeróbico no mostró ningún efecto importante [84].

---

Otra cuestión esencial en estos experimentos es la medición sérica en ayuno y en uno o varios tiempos del postprandio. La duración de la mayoría de estas pruebas es de 6 a 8 horas, ya que es el tiempo requerido para que los triglicéridos vuelvan a valores basales en sujetos sanos, pero no en sujetos con alto riesgo cardiovascular. Asimismo, se han puesto a prueba métodos y cinéticas de tiempo diferentes y algunos informes sugieren incluso versiones abreviadas; sin embargo, un informe concluyó que sólo podrían utilizarse en sujetos sanos, pero no en pacientes con hipertrigliceridemia [85, 86].

Por otra parte, es bien aceptado que la composición de los alimentos y la distribución de los macro-nutrientes, contenido en fibra y colesterol también pueden alterar esta respuesta [48]. Asimismo, las concentraciones de lípidos, entre ellos las de las HDL pueden modificarse significativamente en las mujeres, debido a las variaciones hormonales que sufren durante el periodo menstrual, el embarazo, la menopausia y postmenopausia [87]. Otros factores como el empleo de fármacos hipolipemiantes, sobre todo los fibratos, aceleran el aclaramiento de la lipemia postprandial, principalmente de triglicéridos [48].

De igual manera, es importante identificar factores patológicos, hormonales o fisiopatológicos como la presencia de DMT2 y obesidad, además de otras condiciones cardio-metabólicas como concentraciones elevadas de triglicéridos en ayuno [50]. También se ha observado un retardo en el aclaramiento del pico de las concentraciones de triglicéridos cuando existe un consumo de alimentos que presentan un alto contenido de glucosa y lípidos, en comparación con los que contienen únicamente lípidos.

En la tabla 2 se presentan los datos de autores, año de publicación, configuración y características de los alimentos, carga de lípidos administrados: hidratos de carbono, proteínas y lípidos (g); colesterol (mg), kilocalorías (kcal) y kilojoules (kJ).

La relación de los alimentos es amplio y complejo. La variedad y estrategia de las comidas, el contenido de macronutrientes, la configuración organoléptica y las conductas dietéticas externas, así como el consumo de alcohol [87] podrían alterar la respuesta metabólica en el aclaramiento de los triglicéridos [88, 89].

Abreviaturas de la tabla 2

Datos estimados según informes. \* Datos originalmente reportados en porcentaje (%). ND = No hay datos disponibles; Kgbm = kilogramos de masa corporal; Ffbm = masa corporal libre de grasa; Kgbw = kilogramos de peso corporal; ‡ = gramos (g) / m<sup>2</sup> y porcentaje (%) de energía en la comida. § = dos o más comidas; Informe en Mets. Referencias bibliográficas Anexo III.



**Tabla 2. Descripción de alimentos utilizados en pruebas orales de tolerancia de grasa.**

Autor (año)	Composición de los alimentos	Gramos (g)			mg	Kcal	kJ
		Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Col		
Alcalá-Díaz JF, <i>et al.</i> (2014)	Aceite de oliva, leche descremada, pan blanco, yemas de huevo cocidas y tomates.	25 (%)	10 (%)	0.7/kgbw	5/kgbw	ND	ND
Dekker MJ, <i>et al.</i> (2007)	Bebida emulsionada aromatizada y endulzada artificialmente.	0	0	1/kgbm	ND	ND	ND
Larsen MA, <i>et al.</i> (2015)	Mantequilla de crema agria y crema doble, azúcar blanco 10 g, canela y limonada sin calorías 100 ml.	10	ND	1/kgbm	ND	ND	ND
Shannon KA, <i>et al.</i> (2008)	Helado, crema batida, nueces, chocolate y coco, mezclados.	1.65/ffbm	0.25/ffbm	1.7/ffbm	ND	22.7/ffbm	95/ffbm
Ogita K, <i>et al.</i> (2008)	Material de ensayo emulsionado (crema OFTT, industria alimentaria Jomo, Takasaki, Japón).	± 16 (%)	± 7 (%)	17 g/m2	ND	ND	ND
Weiss EP, <i>et al.</i> (2008)	Crema batida espesa (Pevely Dairy, MO) y helado de vainilla (H. agen-Dazs, Ice Cream Partners, CA) 162 g, relación masa: 1/4 crema / helado.	± 23 (%)	± 6 (%)	35 g/m2	ND	± 2.84/g	± 11.88/g
Saxena R, <i>et al.</i> (2005)	Crema batida con azúcar y fruta.	24.75/m2	5.3/m2	65.2 g/m2	240	729/m2	3050/m2
Jang Y, <i>et al.</i> (2004)	Sándwich: pan blanco, lechuga, jamón y soya a base de aceite de mayonesa.	69	20	28	ND	610	2545
Noguchi K, <i>et al.</i> (2015)	Galleta (Saraya Co., Osaka, Japan).	75	8	28.5	ND	590	2470
Tiihonen K, <i>et al.</i> (2015)	Hamburguesa 219 g, papas fritas 114 g, y bebidas gaseosas 400 ml.	124	32	42	ND	1025	4290
Alsema M, <i>et al.</i> (2008)	Desayuno y almuerzo: dos croissants, mantequilla 10 g, queso rico en grasa 40 g & leche rica en grasa 300 ml.	56	28	50	ND	800	3350
Almeda-Valdes P, <i>et al.</i> (2014).	Hamburguesa quarter pounder de queso con mayonesa 5 g, papas fritas 71 g (McDonald's), y leche 250 ml.	75	40	51	ND	920	3845
Hall WL, <i>et al.</i> (2016)	Muffin, crema (Bird's Eye, Premier Foods, Reino Unido) y un batido de leche.	81	15	52	ND	830	3480
Cazeau RM, <i>et al.</i> (2016)	Gran desayuno (Big Breakfast) de McDonald & Sprite lata de 12 onzas.	94	ND	52	555	940	3935
Bae JH, <i>et al.</i> (2001)	Arroz 10 g, barbacoa coreana 100 g, huevo 20 g, leche 200 ml, aceite 8 g, mayonesa 25 g y vegetales 50 g.	50	30.7	53.4	ND	805	3360
Matikainen N, <i>et al.</i> (2016)	Pan, mantequilla, queso, jamón, huevos duros, pimienta roja fresco, leche baja en grasa (1%), zumo de naranja y té o café.	63	40	56	ND	930	3890
Clemente-Postigo M, <i>et al.</i> (2010)	Preparación comercial (Supracal, SHS International, Liverpool, UK).	ND	ND	60	ND	ND	ND
de Ugarte MT, <i>et al.</i> (2005)	Leche / café 200/100 ml, azúcar 16 g, huevos revueltos 50 g, salchicha 15 g, aceite de soya 10 ml, pan 50 g, margarina 10 g, jamón 30 g, queso 25 g & aguacate 100 g.	67.5	37.5	64	300	1000	4185

Tiret L, <i>et al.</i> (2000)	Bebida de leche 500 ml.	56.2	21.6	65.5	416.6	1495	6245
Dallongeville J, <i>et al.</i> (2002)	Crema de grasa 200 g y mezcla de proteína de origen de leche de vaca (35 g de Protifar Plus, Nutricia, Rueil Malmaison, Francia)	5.9	35.8	70.9	ND	805	3370
Matikainen N, <i>et al.</i> (2007)	Pan, mantequilla, queso, salchichas en rodajas, huevo cocido, pimentón fresco, leche entera, jugo de naranja y café.	50	35	72	490	1000	4185
Minicocci I, <i>et al.</i> (2016)	Muffin con aceite de oliva, huevos, queso ricota, nueces, cacao, trigo y leche desnatada 100 g.	52	22	73	145	950	3975
Zemánková K, <i>et al.</i> (2015)	Crema batida 225 ml.	ND	ND	75	ND	675	2830
Ceriello A, <i>et al.</i> (2002)	Crema batida.	5 g/m <sup>2</sup>	6 g/m <sup>2</sup>	75	ND	700/m <sup>2</sup>	2930/m <sup>2</sup>
Petersen KF, <i>et al.</i> (2010)	Comida líquida rica en grasa.	20.9	29	76.2	ND	ND	ND
Maraki M, <i>et al.</i> (2011)	Batido de leche: crema batida, helado de vainilla y jarabe.	70 ± 1	14 ± 0	79 ± 1	ND	1045 ± 12	4370 ± 50
Anderson RA, <i>et al.</i> (2001)	Batido de leche homogenizado	24.75	5.3	80	240	1480	6195
Carstensen M, <i>et al.</i> (2003)	Sopa sin calorías enriquecida con 250 ml de grasa, pan blanco y finas rodajas de puerro crudo.	50	20	80	ND	1005	4200
Cortés B, <i>et al.</i> (2006)	Sándwich: pan blanco 100 g, salami 75 g, queso graso 50 g y yogur rico en grasa 125 ml; Además: pan con aceite de oliva (comida: aceite de oliva, 25 g) o (comida: de nuez, 40 g).	66	45	80	120	1200	5020
Karrasch T, <i>et al.</i> (2014)	Solución lipídica oral (OLI).	0	0	84.2	ND	760	3170
* Parhofer KG, <i>et al.</i> (2000)	Leche 100 ml, crema 150 ml, aceite de maíz 70 ml, huevo 90 g, azúcar 10 g y sabor de café 5 g.	19	22.8	126.1	ND	1305	5460
§ Jackson KG, <i>et al.</i> (2012)	1) Croissants con mantequilla y mermelada, cereal con leche y un vaso de jugo de naranja. 2) Sándwich de queso, paquete de papas fritas y barra de chocolate.	125 & 79	19 & 15	51 & 30	ND	960 & 570	4015 & 2385
§ Dong H, <i>et al.</i> (2016)	1) Dos croissants de mantequilla 5 g. 2) Rebanadas de pan blanco (2), queso crema de grasa completa 42 g, papas fritas 25 g y galletas de mantequilla 22 g.	64 & 80	14 & 15	51 & 31	ND	755 & 630	3160 & 2635
§ Fogarty CL, <i>et al.</i> (2015)	Dos comidas altas en grasa, ricas en energía: 1) Desayuno, 2) almuerzo.	230 & 85	180 & 24	65 & 42	ND	965 & 870	4040 & 3640
Cajka T, <i>et al.</i> (2016)	Bebida diseñada a la medida	45 (%)	9 (%)	46 (%)	ND	ND	ND
a Correa CS, <i>et al.</i> (2015)	Batido: leche, helado y crema agria.	30 (%)	10 (%)	60 (%)	ND	1·kg-1·h-1	4.1·kg-1·h-1

---

## JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos han demostrado una correlación negativa entre una baja incidencia de enfermedad cardiovascular y concentraciones séricas elevadas de C-HDL, aunque la concentración de C-HDL no es evidencia suficiente para sustentar el efecto cardio protector de las HDL [53].

No obstante, el análisis de la composición lipídica de las subclases de HDL podría ser utilizado como un marcador biológico puntual para evaluar el riesgo cardiovascular, ya que es seguramente más representativa que las concentraciones de C-HDL *per se*. Sin embargo, este análisis es aún controversial debido a que diversos factores metabólicos pueden alterar la distribución de las subclases [69].

Por otro lado, la comprensión del mecanismo por el cual los triglicéridos postprandiales ejercen sus efectos perjudiciales en la pared vascular no es del todo clara, sin embargo, podría constituir un importante objetivo terapéutico [47, 50, 79]. De la misma forma, una respuesta postprandial exacerbada ha sido reconocida como una característica de dislipidemia, a la que se le ha denominado fenotipo de lipoproteínas aterogénicas [76].

Por otra parte, una lipemia postprandial con concentraciones predominantemente altas de triglicéridos es percibida como un signo de anormalidad metabólica. Esta anormalidad se asocia con el inicio de la obesidad, SM y DMT2. De igual manera, se relaciona con un riesgo mayor de futuros eventos cardiovasculares, enfermedad vascular periférica y eventos cerebrovasculares [50].

Por todo lo anterior, teorizamos que la magnitud de la hipertrigliceridemia postprandial puede ser un factor que altera la composición de las HDL. Estos cambios pueden dar origen a importantes modificaciones en el metabolismo de estas partículas, así como afectar su funcionalidad a nivel del endotelio vascular. Por lo tanto, proponemos que existe un vínculo indirecto entre la hipertrigliceridemia postprandial y la enfermedad cardiovascular, mediado por una alteración de la estructura-función de las HDL durante el postprandio.

---

## ¿PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN?

¿Existe una asociación causal entre la magnitud de la hipertrigliceridemia postprandial, y las modificaciones en la composición, funcionalidad y metabolismo de las HDL?

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las altas concentraciones de triglicéridos postprandiales influyen en la distribución de las subclases de las HDL y su composición lipídica, lo que puede afectar su capacidad para promover el funcionamiento del endotelio vascular.

El objetivo general de este estudio fue caracterizar la estructura de las subclases de HDL que se generan durante el periodo postprandial y su capacidad de producir vaso-relajación.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron determinar en pacientes en situaciones de alto riesgo cardiovascular:

I. La proporción relativa de subclases de HDL expresada como porcentaje de la proteína de las HDL totales.

II. La concentración de lípidos: colesterol, triglicéridos y fosfolípidos de las subclases de HDL a lo largo del período postprandial.

III. La contribución de la magnitud del cambio de la trigliceridemia postprandial en las modificaciones de las subclases de HDL.

IV. La influencia de las HDL aisladas durante el periodo postprandial sobre la capacidad de vaso relajación de anillos de aorta torácica de rata *in vitro*.

V. Sí la actividad de las HDL sobre la función endotelial está asociada a cambios en la expresión del RNAm de los genes *eNOS*, *SRBI* y *PDZK1*.

---

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Pacientes**

Se reclutaron 30 pacientes por medio de invitación abierta en el banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Para establecer el cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio, los sujetos completaron un cuestionario sobre sus antecedentes médicos, factores de estilo de vida, hábitos de alimentación y tratamiento. Además, completaron recordatorios de 24 horas y de frecuencia de alimentos, con la finalidad de identificar una relación directa de la dieta con las concentraciones plasmáticas obtenidas el día del estudio.

Todos los pacientes fueron instruidos para evitar realizar cualquier tipo de ejercicio el día anterior al estudio. Las comisiones científicas, y de ética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" aprobaron el protocolo para su realización. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de iniciar el estudio y todos los estudios se realizaron en el Departamento de Biología Molecular.

### **Criterios de inclusión**

La edad para ambos grupos de estudio se estableció entre 30 y 65 años. El grupo control estuvo conformado por sujetos sanos sin enfermedad aparente, con un IMC menor o igual a  $25 \text{ kg/m}^2$ . el grupo denominado casos incluyó un índice de masa corporal (IMC) mayor a  $25 \text{ kg/m}^2$ , más dos rasgos de SM; definidos por la guía del Adult Treatment Panel III (ATPIII), como circunferencia de cintura mayor a 102 cm, concentración en ayuno de triglicéridos mayores a 150 mg/dl, c-HDL menor a 40 mg/dl y/o presión arterial mayor o igual a 130/85 mmHg [90].

La decisión de reclutar pacientes con diagnóstico de SM, en el grupo de casos, se basó en la percepción de que estos pacientes tienen altas probabilidades de generar altas concentraciones séricas de triglicéridos durante la fase postprandial, en comparación a sujetos aparentemente sanos.

---

## **Criterios de exclusión**

Dentro de los criterios de exclusión, se incluyeron hipertensión arterial no controlada, diagnóstico de DMT2 y/o cáncer; trastornos tiroideos, renales, hepáticos, así como enfermedades cardiovasculares; terapia con estatinas en las últimas 12 semanas; determinación de un pobre calibre de la vena determinado por un flebotomista; alergias conocidas, intolerancia al alimento utilizado para promover la hipertrigliceridemia postprandial; inicio de un programa de ejercicios en el último año, y el consumo de tabaco y alcohol.

## **Criterios de eliminación**

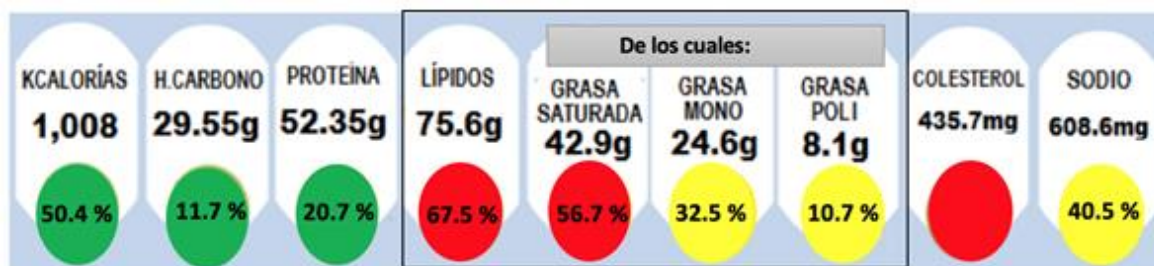
Los criterios de eliminación incluyeron a los pacientes que se diagnosticaron con diabetes durante el estudio. Asimismo, se excluyeron del estudio los pacientes que no aceptaron el alimento, las políticas y/o reglamentos previamente establecidos, y aquellos que decidieron abandonar el estudio.

## **Intervención**

Cada paciente recibió un alimento para ser consumido en un tiempo limitante no mayor a 20 min. El alimento fue diseñado de forma exclusiva para este estudio, con una cantidad total de 75 g de lípidos y 1,000 kcal, aproximadamente. El alimento consistió en 2 rebanadas de pan integral de caja; 6 g de mantequilla, sin sal; 75 g de huevo, equivalente a una pieza grande; 40 g de tocino; 136 g de queso de hebra (tipo Oaxaca) y 60 g de queso de puerco. El contenido energético del alimento se muestra en la figura 4.

El estudio se llevó a cabo entre los días martes a jueves de cada semana para evitar patrones de alimentación inusuales, como los que se presentan durante los fines de semana. Todos los participantes fueron instruidos para evitar el consumo de alcohol y ejercicio. La toma de muestras inició a las 8:00 de la mañana, después del desayuno, sólo se le permitió el libre acceso a agua embotellada. Con el fin de reducir al mínimo la actividad física y cumplir las restricciones de alimentación, todos los participantes estuvieron presentes en las instalaciones del instituto hasta la culminación del protocolo.

### Información nutrimental del contenido energético del alimento



**Figura 4. Distribución del alimento diseñado para este estudio.** El icono muestra el contenido energético del alimento. El porcentaje de la IDR (2.000 Kcal) en calorías se muestra en los globos de color verde, amarillo y rojo. Los colores muestran el porcentaje del contenido bajo, medio y alto, respectivamente.

### Evaluación antropométrica

El peso corporal, la talla, la cintura y la circunferencia de cadera fueron obtenidos para determinar el IMC y la relación cintura cadera (ICC). Asimismo, se tomaron las mediciones de la presión arterial. Todos los datos obtenidos se obtuvieron a través de procedimientos clínicos estandarizados [91].

### Parámetros metabólicos

Para obtener los parámetros metabólicos, posterior a 12-h de ayuno, se instaló un catéter intravenoso en la vena del antebrazo del paciente para la recolección de sangre, cada 2-h, durante un período de seguimiento de 8-h. Todas las muestras de sangre incluyeron una toma en ayuno y cuatro tomas de forma posterior a la administración de la prueba oral de lípidos. Las muestras de sangre recolectadas en tubos con EDTA o tubos sin anticoagulante se centrifugaron durante 12 min, dentro de los primeros 20 min posterior a cada toma. Tanto plasma como suero fueron separados en alícuotas de 1 ml, y se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

El análisis del perfil lipídico incluyó la determinación de colesterol y triglicéridos, el cual, se determinó por ensayos colorimétricos/enzimáticos disponibles comercialmente (Randox Laboratories, Reino Unido). La fosfatidilcolina de las HDL se determinó mediante un método enzimático/colorimétrico comercial (Wako Chemicals, Richmond, VA).

El método del ácido fosfotúngstico-Mg<sup>2+</sup> se utilizó para precipitar las lipoproteínas que contienen Apo-B. El sobrenadante contiene a las HDL totales; en ese sobrenadante se cuantificaron el colesterol, los triglicéridos, y las concentraciones de fosfolípidos de las HDL con las mezclas enzimáticas descritas anteriormente. El colesterol esterificado, contenido en las HDL, se calculó mediante la siguiente ecuación matemática, CE - HDL = (CT - HDL) - (CL - HDL) \* 1.68; donde, las abreviaciones “CE” es el colesterol esterificado; “CT” es el colesterol total y “CL” es el colesterol libre.

El C-LDL se estimó indirectamente con la fórmula de Friedewald (C-LDL = C Total - (C-HDL + Triglicéridos/5) en mg/dl)), en muestras con concentraciones de triglicéridos menores a 400 mg/dl [92]. Todas las concentraciones del perfil de lípidos se determinaron dentro de las primeras 24-h de su recolección. La determinación de proteínas totales se realizó por el método químico de Lowry (Anexo IV).

### **Paraoxonasa 1 (PON-1, EC 3.1.1.2)**

La actividad de la enzima paraoxonasa (PON-1) se determinó mediante ensayos con fenilacetato como sustrato (denominada actividad arilesterasa (ARE)). La tasa inicial de la hidrólisis se midió espectrofotométricamente a 270 nm. La mezcla constituida por 1 mmol/l de fenilacetato y 0.9 mmol/l de CaCl<sub>2</sub> en 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0 y 10 µl de suero diluido 1:40. El A<sub>270</sub> para la reacción fue de 1310 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. La actividad de arilesterasa expresa el número de mol de fenilacetato hidrolizado por min y por ml de suero [93] (Anexo V).



---

## **Aislamiento y análisis de las subclases de HDL**

Las partículas de las HDL se obtuvieron por ultra-centrifugación secuencial (Anexo VI). Con esta técnica se logró recuperar hasta el 85 % de la Apo AI total del plasma [75]. De manera posterior a la obtención de las partículas de las HDL, las muestras obtenidas se colocaron en una matriz de poliacrilamida con un gradiente de concentración de 3 a 30 %, en forma de gel de electroforesis, en condiciones nativas. Las subclases de las HDL se separaron con base en su diámetro hidrodinámico (Anexo VII).

## **Caracterización de las subclases de las HDL**

Los radios hidrodinámicos de las subclases (HDL2b 10.58-12.36 nm, HDL2a 9.94-10.58 nm, HDL3a 8.98-9.94 nm, HDL3b 8.45-8.98 nm, HDL3c 7.90-8.45 nm) [94] separadas en el gel, se analizaron en un densitómetro marca Bio-Rad, modelo GS-670 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Se utilizó como referencia el kit de marcadores de alto peso molecular de la marca Pharmacia, UK (tiroglobulina de 17 nm; ferritina de 12.2 nm; catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm [75]).

Para calcular la relación con la que contribuye cada subclase al total de las HDL, se consideró que el área total bajo la curva (ABC) del densitograma corresponde al total de las HDL (100%) y que las subclases de las HDL pueden dividirse al emplear los diámetros hidrodinámicos previamente reportados [76]. Los densitogramas de las bandas correspondientes para los diferentes lípidos que son componentes estructurales de las HDL y que se obtuvieron a través de una primera tinción enzimática, así como para las proteínas que se obtuvieron en una segunda tinción (Anexo VIII). Se analizaron con ayuda del programa informático Molecular Analyst Software, Versión 1.1, 1994, marca Bio-Rad.

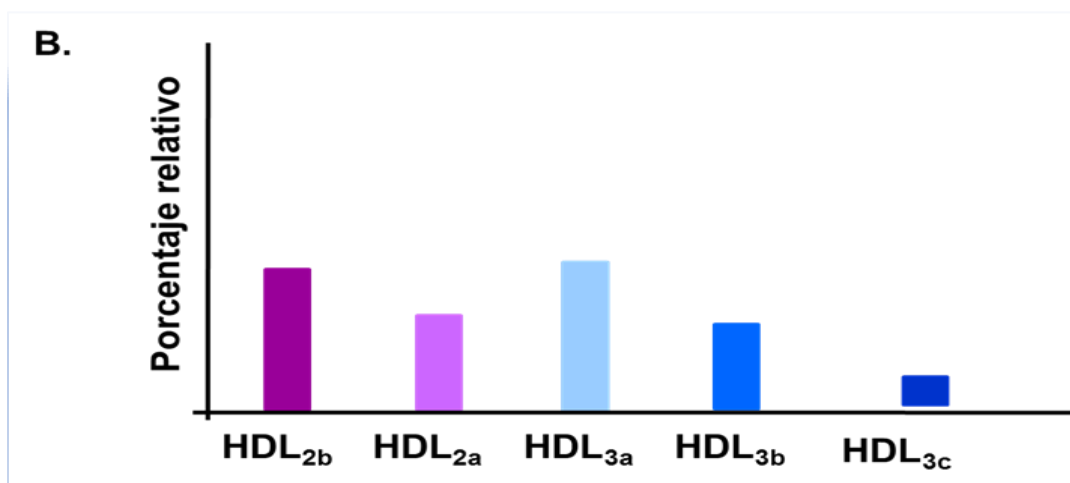
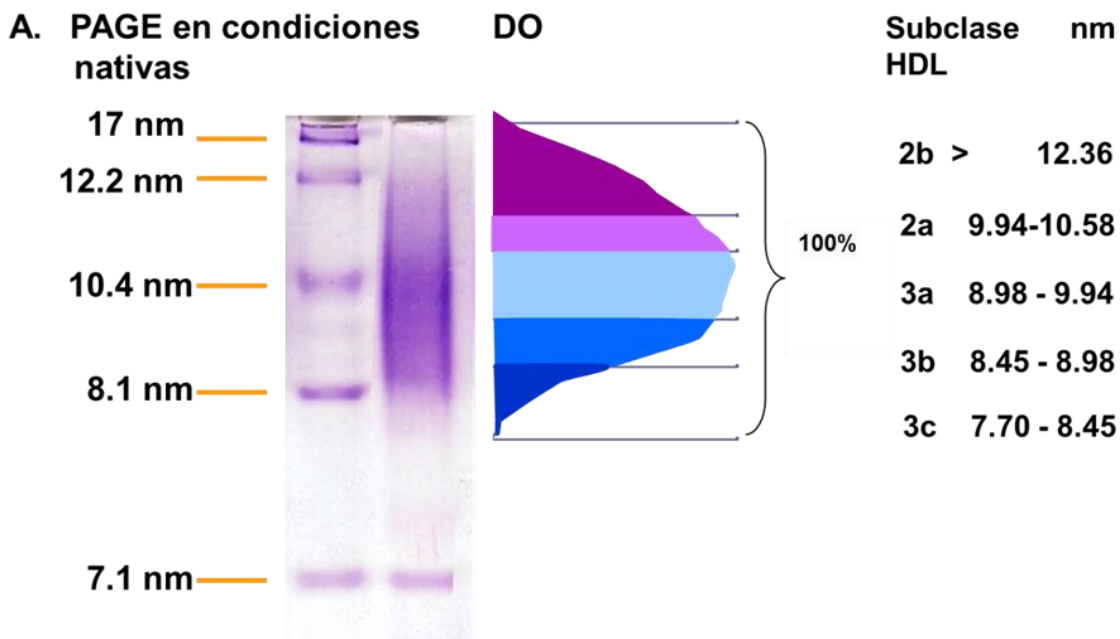
El producto de todas las reacciones enzimáticas precipitó en los geles de poliacrilamida y se analizaron a través de la técnica de densitometría óptica. Para estimar la concentración del colesterol de cada una de las subclases de las HDL, se utilizaron las distancias de migración de las proteínas de referencia y la proporción correspondiente de las subclases de las HDL en función de su contenido de colesterol.

---

El ABC del densitograma incorporó el 100 % del colesterol de las HDL, por lo que se puede resumir con la siguiente fórmula:  $HDL_n - C = (\% HDL_n \text{ determinado densitométría óptica} \times HDL-C) / 100$ , donde la letra “n” sustituye a la subclase de las HDL y la abreviación “HDL-C” es la concentración del colesterol de las HDL en plasma [76]. La concentración de los triglicéridos y fosfolípidos de las subclases de HDL se calculó de manera análoga al colesterol.

Un modelo del proceso de la migración electroforética de las partículas de las HDL, teñidas con el reactivo de azul de Coomassie, así como un densitograma y los intervalos de diámetro que definen a las subclases de las partículas de las HDL, se muestran en la figura 5.

Representación gráfica de un gel de poliacrilamida y análisis de la DMO



**Figura 5. Migración de una muestra de HDL en un gel de poliacrilamida nativo, teñido con azul de coomassie y su análisis densitométrico. A)** El primer carril muestra el desplazamiento del kit de marcadores de proteína de alto peso molecular, así como el desplazamiento de una muestra de las HDL en el segundo carril. El densitograma correspondiente que presenta la densidad óptica (DO) contra la distancia migrada se muestra a la derecha de la imagen del gel. El área bajo la curva (ABC) se considera como el 100 % de las HDL. **B)** El análisis densitométrico y la integración parcial de cada uno de los intervalos permite estimar la proporción relativa de cada una de las subclases de las HDL. El ABC estima la evolución de los triglicéridos en una prueba de sobrecarga oral.

## Evaluación de la función endotelial

Para determinar la importancia de los cambios estructurales de las subclases de las HDL, de forma indirecta, se determinó el efecto de las HDL postprandiales (tiempo 2, 4, 6 y 8-horas) sobre la promoción de la función endotelial en relación con la síntesis de óxido nítrico, a través de ensayos de función endotelial en anillos de aorta torácica de rata macho de la cepa Wistar, de 250 a 300 g y de 10 semanas de edad. Todos los experimentos fueron realizados bajo autorización del comité de investigación y cuidados de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Brevemente, el día del experimento se sacrificó el animal por dislocación cervical; rápidamente, se disecó la aorta torácica, y se removió el tejido conectivo circundante. Se cortaron 5 anillos de la aorta completa en secciones de entre 1.5 a 2.5 mm de longitud, los cuales, se colocaron en tubos Eppendorf con 300  $\mu$ l de solución Krebs (NaCl 118.1 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5, D-glucosa 11.1 mM, pH 7.4), y con HDLs de diferentes tiempos (50 mg/ml de colesterol) o QM de los sujetos de estudio; con un burbujeo continuo de una mezcla de oxígeno-dióxido de carbono ( $\text{O}_2$ - $\text{CO}_2$ ) (95 % - 5 %) a una temperatura continua de 37° C.

Después de una incubación con un tiempo de 4-h, cada anillo de aorta se montó entre 2 ganchos de acero inoxidable en una cámara para órgano aislado con una capacidad de 10 ml. Uno de los ganchos se colocó en el fondo de la cámara y el otro, a un transductor de tensión para producir una tensión de 1.5 g.

Después de un periodo de equilibrio de 1-h, se realizó una curva dosis-respuesta a acetilcolina ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M) en anillos pre-contraídos con  $3 \times 10^{-6}$  M de fenilefrina. La vaso relajación se expresó como el porcentaje de la pre-contracción con fenilefrina. Se utilizó un canal del transductor empelado para cada tiempo de la cinética, además de un canal para el control biológico, así como otro canal para el control experimental. Debido a la escasa cantidad de muestras de las HDL recuperadas de cada paciente, se decidió juntar muestras de las segunda y tercera toma (tiempo 2 y 4-h), así como muestras de la cuarta y quinta toma (tiempo 6 y 8-h) para la realización de estos ensayos.

---

Se tomaron las mismas cantidades de muestras de los sujetos del grupo control (n = 10), que posteriormente se agruparon por el área bajo la curva incremental de triglicéridos como ABCi-Bajos, así como de los pacientes del grupo SM (n = 10) que posteriormente se agruparon por el área bajo la curva incremental de triglicéridos como AUCi-Altos. Las contracciones se midieron isométricamente con un transductor de tensión modelo FT-03, acoplado a un polígrafo modelo 7D, de la marca Grass Medical Instruments, Quincy, MA, USA [95].

### **Análisis de la abundancia del ARN mensajero**

Para determinar las implicaciones a nivel transcripcional del gen codificante denominado *NOS3* (óxido nítrico sintasa endotelial), así como del gen *SR-BI* (receptor SR-BI) y por el gen *Pdzk1* en la disfunción endotelial, se analizó la abundancia del mensajero del ácido ribonucleico (ARNm). El ARN total se aisló por el método de Trizol; la cantidad y pureza del ARN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm; la pureza con la relación de absorbancias a 260/280 nm, posteriormente, se verificó la integridad en geles de agarosa al 1.5 %.

La abundancia del ARNm se determinó a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR). Brevemente, la muestra de aorta torácica proveniente de ratas de la cepa Wistar de 40 mg de tejido en promedio incubada con las partículas de las HDL de ayuno (tiempo 0-h) o del postprandio, se homogenizaron en Trizol, y se precipitaron con cloroformo-etanol.

La síntesis del ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla (ADNc) se obtuvo con 25 µg de ARN total por la reacción de transcripción reversa con la enzima retro transcriptasa reversa del virus M-MVL RT (500 U) y oligo dT para aislar el ARNm. El ADNc se mezcló con una solución *TaqMan Universal PCR Master Mix*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, y las sondas TaqMan marcadas en el extremo 5' con el fluorocromo-FAM (Anexo IX).

---

Se determinaron las temperaturas y los tiempos óptimos de los ciclos de amplificación en un termociclador para cada fragmento génico, en función de las características del fragmento y la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de los cebadores (primers) empleados. Como gen de referencia de expresión endógena se utilizó el ARN del gen codificante denominado *GAPDH* con fluorocromo-FAM.

En todos los ensayos se verificó la ausencia de contaminación mediante una reacción de control negativo a la que no se incorporó el ADNc. La detección de cada gen se realizó por triplicado para cada muestra en un instrumento modelo ABI-PRISM 7700, marca Applied Biosystems, equipado con placas ópticas de 96 pocillos cubiertas de tapas adhesivas operado bajo las especificaciones del fabricante. Para cuantificar la expresión de los genes, se calculó el valor umbral del ciclo (CT, cycle threshold) para cada gen de la parte logarítmica de la curva, mediante el método de cuantificación relativa doble delta-CT ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) [96].

### **Análisis estadístico**

La distribución normal de las variables se evaluó mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnoff. La significancia de las diferencias entre los grupos se analizó mediante la prueba estadística *t de Student* para variables distribuidas normalmente. Las comparaciones de las variables no distribuidas normalmente se llevaron a cabo con la prueba estadística de Mann-Whitney para grupos independientes.

La significancia estadística se estableció con un valor de  $P < 0.05$ . A menos que se indique lo contrario, los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) para las variables con distribución normal. Las comparaciones de más de dos grupos con distribución normal se evaluaron mediante la prueba estadística de ANOVA con un análisis post hoc tipo LDS.

## Área bajo la curva incremental

Se realizó un análisis estadístico secundario, para determinar el área bajo la curva incremental (ABCi) (zona superior de línea de base) de triglicéridos, mediante el método trapezoidal convencional, para comparar las respuestas postprandiales entre los grupos (respuesta a la prueba oral de lípidos) [97]. El ABCi fue elegido en vez del área bajo la curva total, ya que refleja el aumento postprandial de las concentraciones de metabolitos por encima del valor en ayuno distinto de cero [98].

De esta manera, se pudo categorizar de nueva cuenta, a los sujetos de estudio en dos subgrupos, una vez que se determinó la media del área bajo la curva incremental de triglicéridos de todos los sujetos. Los grupos quedaron conformados por dos grupos, un grupo con valores por encima de la media (ABCi-Altos), y el otro, con valores por debajo de ella (ABCi-Bajos).

## RESULTADOS

### Perfil bioquímico

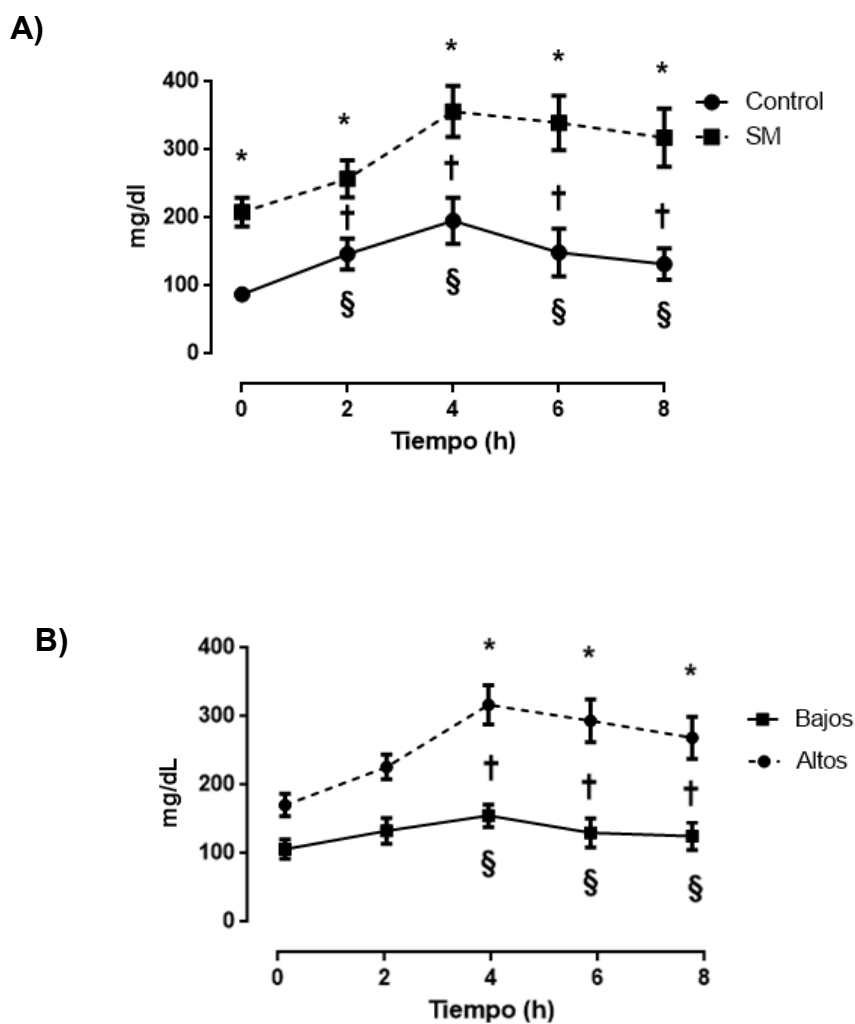
Las concentraciones séricas de C-LDL en ayuno, fueron ligeramente menores, sin embargo, no alcanzaron diferencia significativa, en los pacientes con SM que las del grupo control. Como era de esperar, la mayoría de los componentes bioquímicos en los SM presentaron una mayor concentración sérica; particularmente, en las concentraciones de triglicéridos, las cuales alcanzaron valores de hasta 2.3 veces mayores que las de los controles. La actividad de la PON-1 en ayuno, fue similar entre ambos grupos. Las características clínicas, perfil lipídico, glucosa y actividad de la PON-1, se muestran en la tabla 3.

### Fluctuaciones en los niveles plasmáticos después de la prueba oral de lípidos

Las concentraciones de triglicéridos durante el postprandio doblaron sus valores de concentración de ayuno a las 4-h en el grupo control (de  $87.66 \pm 37.90$  mg/dl, a  $195.66 \pm 130.99$  mg/dl, respectivamente) mientras que el grupo SM mostró un aumento del 75 % ( $208.42 \pm 80.75$  mg/dl y  $356.47 \pm 144.91$  mg/dl, respectivamente) a la misma hora de tiempo. Estos incrementos mostraron diferencias significativas en ambos grupos. La magnitud de la trigliceridemia a lo largo del período postprandial se expresó como el área incremental bajo la curva (ABCI,  $555.60 \pm 249.88$  y  $155.12 \pm 98.19$  mg/h/dl para los controles y SM, respectivamente, ( $P = 0.0001$ ), como se muestra en la figura 6.



**Cinéticas de concentraciones séricas de triglicéridos por grupo de análisis**



**Figura 6. Concentración sérica de triglicéridos determinada a intervalos de 2 horas durante un período de 8 horas.** Los valores se muestran como media  $\pm$  EE. \* $P < 0.05$  entre grupos en el mismo tiempo;  $P < 0.05$  dentro del grupo control; y  $P < 0.05$  dentro del grupo SM comparado contra los valores basales. La figura **A)** muestra los valores agrupados por el IMC de los sujetos de estudio y **B)** por el área bajo la curva incremental de triglicéridos.

**Características generales de la población de estudio agrupadas de acuerdo con el Índice de masa corporal (IMC) y al Área bajo la curva incremental de triglicéridos (ABCi)**

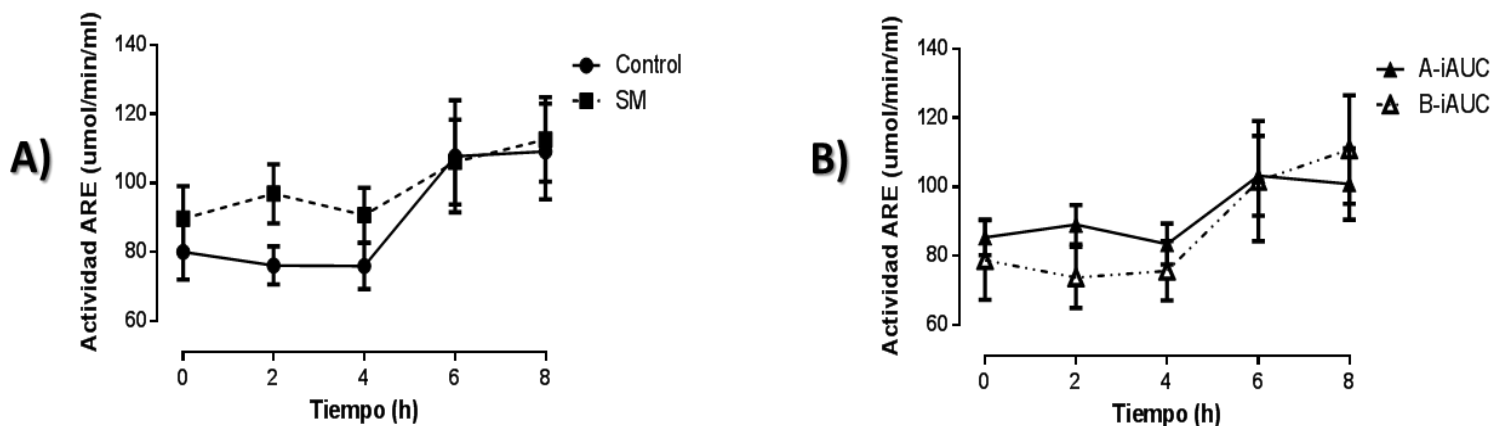
N	Grupo		P	Grupo <sup>1</sup>		P
	SM 15	Control 15		ABCi-B 15	ABCi-A 15	
Edad (años)	54.13 ± 10.37	54.27 ± 8.03	0.8780	55.73 ± 6.84	52.67 ± 10.97	0.7507
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.92 ± 4.58	22.49 ± 1.94	0.0001	23.65 ± 3.68	27.89 ± 6.49	0.0040
PAS (mmHg)	131.12 ± 19.78	113.93 ± 11.90	0.0036	124.73 ± 18.43	120.40 ± 18.52	0.0844
PAD (mmHg)	88.33 ± 17.38	78.20 ± 8.24	0.0368	86.20 ± 17.72	80.33 ± 9.64	0.2694
Triglicéridos (mg/dl)	208.42 ± 80.74	87.66 ± 37.90	0.0001	105.91 ± 71.10	190.17 ± 83.13	0.0056
Colesterol total (mg/dl)	174.18 ± 35.83	172.64 ± 37.93	0.9103	163.64 ± 37.98	183.18 ± 32.81	0.1428
Colesterol-LDL (mg/dl)	100.32 ± 32.68	117.24 ± 24.00	0.1174	105.58 ± 25.39	111.97 ± 33.62	0.5620
Colesterol-HDL (mg/dl)	30.59 ± 9.01	35.62 ± 7.75	0.1123	35.26 ± 7.09	30.94 ± 9.72	0.1749
HDL-Triglicéridos (mg/dl)	23.54 ± 13.95	19.88 ± 14.46	0.5464	15.72 ± 7.81	27.70 ± 16.54	0.0170
HDL-Fosfolípidos (mg/dl)	89.98 ± 35.20	99.84 ± 31.58	0.4259	100.47 ± 21.49	89.35 ± 41.97	0.3689
Glucosa (mg/dl)	88.73 ± 15.50	87.63 ± 7.76	0.8077	83.69 ± 10.05	92.66 ± 12.53	0.0391
Actividad PON-1 (μmol/min/ml)	80.01 ± 30.78	84.48 ± 36.30	0.7274	83.35 ± 42.51	80.82 ± 20.91	0.8432

**Tabla 3. Los valores se muestran como media ± DE. IMC, PAS. Las concentraciones séricas de triglicéridos son significativamente diferentes en el grupo síndrome metabólico (SM).** Grupo 1: **ABCi-Bajos:** (n=15) con área incremental bajo la curva de triglicéridos > la mediana de los 30 pacientes incluidos en el estudio (289.5 mg h/dl). **Grupo ABCi-Altos:** (n=15) con ABCi de triglicéridos < 289.5 mg h/dl. IMC= Índice de masa corporal; PAS= Presión arterial sistólica; PAD= Presión arterial diastólica; ABCi-Bajos= Grupo de área bajo la curva incremental de triglicéridos-bajos; ABCi-Altos= Grupo de área bajo la curva incremental de triglicéridos-altos.

El colesterol total, así como la actividad de la PON-1 no mostraron cambios significativos durante el período postprandial entre los grupos (Figura 7). Las concentraciones plasmáticas de C-HDL (A) y fosfolípidos-HDL (B) en ayuno, no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Por el contrario, los datos de los cursos de concentración del C-HDL mostraron diferencias significativas a los 6 y 8-h, entre los grupos (A).

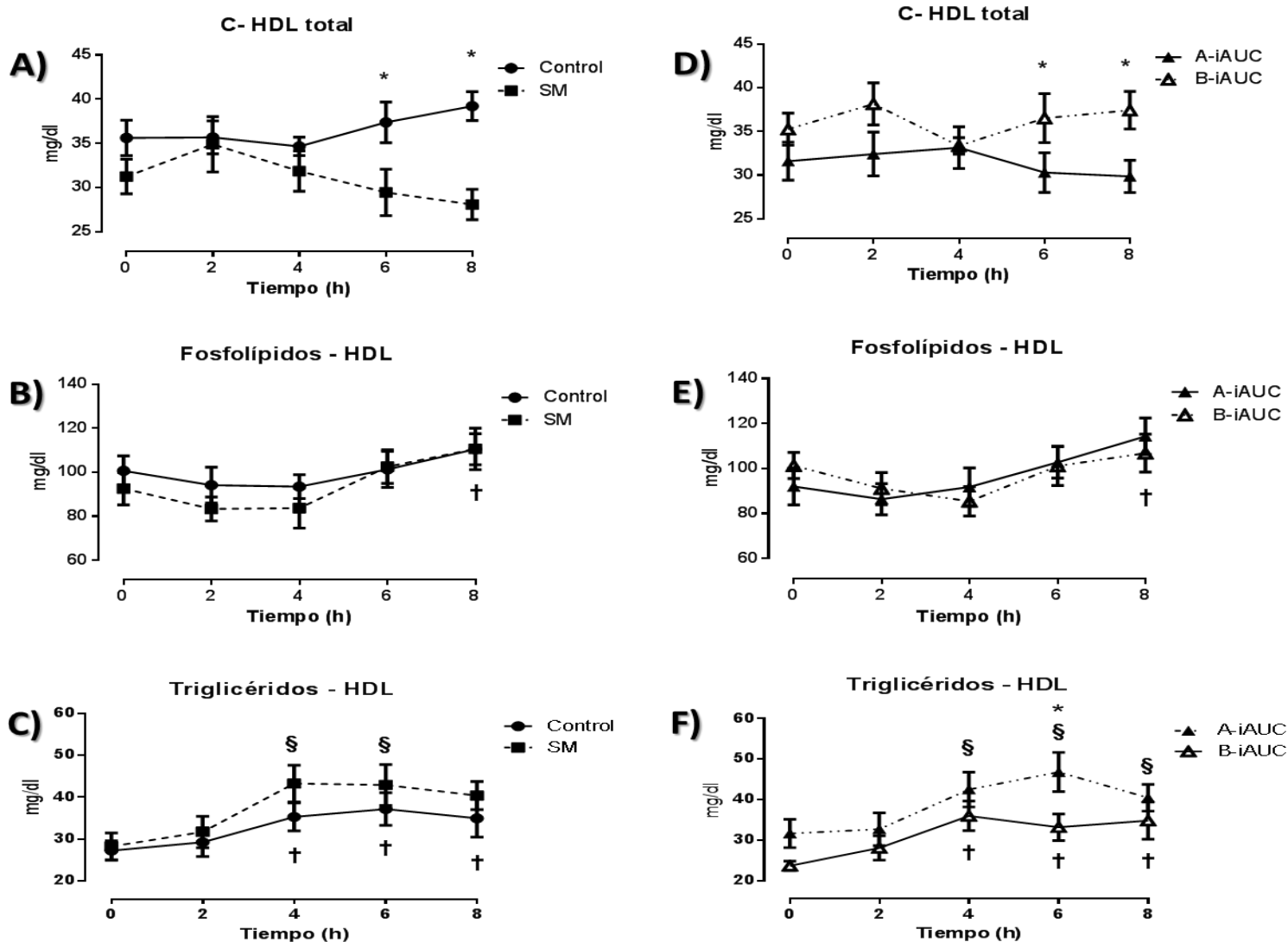
Asimismo, se encontraron diferencias significativas a las 4, 6 y 8-h, en comparación con las concentraciones de ayuno en el grupo control; así como los valores de ayuno en comparación con las 4 y 8-h, en el grupo SM (A). Las concentraciones plasmáticas de fosfolípidos-HDL (B), también fueron significativamente mayores a las 8-h, en comparación con los valores de ayuno en el grupo SM (Figura 8).

#### Cinéticas de concentraciones séricas de arilesterasa por grupo de análisis



**Figura 7. Actividad Arilesterasa (ARE) de la PON-1.** La figura **A)** muestra los valores agrupados por el IMC de los sujetos de estudio y **B)** por el área bajo la curva incremental de triglicéridos.

### Cinéticas de concentraciones séricas de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos de HDL por grupo de análisis



**Figura 8. Concentraciones totales de C-HDL, Triglicéridos-HDL y Fosfolípidos-HDL que se determinaron a intervalos de 2-h durante un período de 8-horas.** Las figuras **A, B y C** muestra los valores agrupados por el IMC de los sujetos de estudio; **D, E y F** por el área bajo la curva incremental de triglicéridos (ABCi). Los valores se muestran como media  $\pm$  EE. Las concentraciones difirieron significativamente  $P < 0.05$  (\*) entre los grupos; (§) dentro de los grupos control y "ABCi-B" (B-iAUC); y (†) en los grupos SM y "ABCi-A"(A-iAUC) (la media en mg/dl se muestra para ambos grupos). \*Grupo ABCi-A: sujetos (n = 15) con área incremental bajo la curva (ABCi) de triglicéridos > mediana de los 30 individuos incluidos en el estudio (289.5 mg h/dl). Grupo ABCi-B: sujetos (n = 15) con ABCi < 289.5 mg h/dl.

---

## **Análisis de las subclases de las HDL**

Las concentraciones plasmáticas de proteínas y lípidos de cada subclase de las HDL se obtuvieron en respuesta a una alta carga oral de lípidos, de acuerdo con la metodología. La proporción relativa de las subclases de las HDL expresadas como porcentaje de la proteína total de HDL, no mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos.

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en comparación con las concentraciones séricas de ayuno dentro de los controles, una disminución en la subclase HDL3b (2-h) y HDL3c (6 y 8-h). Mientras que el grupo SM mostró un aumento en las subclases HDL2b (4, 6 y 8-h), HDL2a (4 y 6-h) y HDL3a (2, 6 y 8-h). Asimismo, se encontró una disminución en la subclase HDL3c (2, 4, 6 y 8-h), como se muestra en la tabla 4.

Por otra parte, las concentraciones séricas de los lípidos de las subclases de HDL mostraron una tendencia general de los triglicéridos a ser más altas en el grupo SM, que en el grupo control, sin embargo, las diferencias alcanzaron diferencia significativa estadística sólo para las subclases de HDL2b (4, 6 y 8-h) y HDL2a en ayuno (Tabla 5).

Del mismo modo, en las comparaciones de las concentraciones séricas de ayuno, dentro del mismo grupo, sólo se observaron ligeras diferencias en los controles de las subclases HDL2a (2, 4 y 8-h) así como en las HDL3c, a las 6-h. De forma interesante, los triglicéridos de las subclases grandes de HDL se mantuvieron significativamente más altas que las concentraciones de ayuno al final del estudio (8-h, posterior a la prueba oral de lípidos) en el grupo SM.

**Equilibrio correspondiente a las cinco subclases de HDL indicadas como proteína total por grupo de análisis**

Tiempo	% Total de Proteína		% Total de Proteína	
	Control	SM	ABCi-B	ABCi-A
0h				
2b	24.65 ± 3.81	23.79 ± 11.73	21.96 ± 6.94	26.48 ± 9.66
2a	11.57 ± 2.01	10.25 ± 2.22	10.69 ± 2.30	11.13 ± 2.13
3a	23.41 ± 4.21	23.08 ± 2.80	22.68 ± 3.74	23.81 ± 3.32
3b	17.83 ± 2.36	16.82 ± 3.95	17.93 ± 3.07	16.73 ± 3.40
3c	23.46 ± 6.57	25.99 ± 9.68	27.88 ± 8.06	21.58 ± 7.35 <sup>a</sup>
2h				
2b	24.65 ± 4.35	24.41 ± 11.42	22.22 ± 6.59	26.84 ± 9.73 <sup>b</sup>
2a	11.53 ± 2.00	10.45 ± 2.29	10.65 ± 1.99	11.34 ± 2.38
3a	24.39 ± 2.88	23.80 ± 2.65 <sup>b</sup>	23.95 ± 2.76	24.25 ± 2.81
3b	16.85 ± 2.50 <sup>b</sup>	16.97 ± 4.19	17.15 ± 2.83	16.68 ± 3.97
3c	22.56 ± 6.24	24.50 ± 9.05 <sup>b</sup>	26.38 ± 7.09 <sup>b</sup>	20.68 ± 7.43
4h				
2b	25.71 ± 3.55	24.82 ± 11.28 <sup>b</sup>	22.69 ± 6.19	27.86 ± 9.36
2a	11.60 ± 1.55	10.74 ± 2.46 <sup>b</sup>	10.65 ± 1.75	11.69 ± 2.30 <sup>b</sup>
3a	24.01 ± 2.47	23.78 ± 2.59	23.19 ± 2.26	24.61 ± 2.59
3b	17.25 ± 2.55	17.34 ± 4.04	17.43 ± 3.03	17.17 ± 3.70
3c	23.07 ± 6.41	23.49 ± 9.38 <sup>b</sup>	26.58 ± 7.59	19.99 ± 6.96 <sup>a</sup>
6h				
2b	25.46 ± 4.37	25.46 ± 10.52 <sup>b</sup>	22.21 ± 5.50	28.71 ± 8.77 <sup>a,b</sup>
2a	11.60 ± 1.84	11.00 ± 2.18 <sup>b</sup>	10.93 ± 1.91	11.67 ± 2.10 <sup>b</sup>
3a	24.67 ± 3.42	24.62 ± 2.90 <sup>b</sup>	24.49 ± 3.34	24.81 ± 2.98
3b	16.69 ± 3.36	16.60 ± 4.38	17.50 ± 3.24	15.81 ± 4.30 <sup>b</sup>
3c	21.40 ± 5.97 <sup>b</sup>	22.30 ± 7.89 <sup>b</sup>	25.08 ± 6.70 <sup>b</sup>	18.62 ± 5.57 <sup>a,b</sup>
8h				
2b	26.08 ± 5.25	26.47 ± 10.52 <sup>b</sup>	23.41 ± 6.97	29.15 ± 8.49 <sup>b</sup>
2a	11.46 ± 1.26	10.82 ± 1.92	10.83 ± 1.29	11.46 ± 1.91
3a	25.01 ± 3.27	25.55 ± 3.00 <sup>b</sup>	24.40 ± 3.15	26.17 ± 2.87 <sup>b</sup>
3b	16.96 ± 2.73	16.13 ± 3.14	16.84 ± 2.88	16.25 ± 3.04
3c	20.90 ± 6.59 <sup>b</sup>	21.05 ± 8.78 <sup>b</sup>	24.74 ± 7.31 <sup>b</sup>	17.22 ± 6.08 <sup>a,b</sup>

**Tabla 4. Proporción relativa de las subclases de las HDL expresadas como porcentaje de la proteína total de HDL.** Los valores se expresan como porcentaje de proteína, los datos se muestran como media ± DE. Valores (n) = 30. Prueba *t de Student* no pareada, <sup>a</sup>*P* < 0.05, vs grupo control o grupo "ABCi-B". Prueba *t de Student* pareada, <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs 0-h (basal) dentro del mismo grupo y subclase. **Grupo ABCi-A:** sujetos (n=15) con área incremental bajo la curva (ABCi) de triglicéridos > mediana de los 30 individuos incluidos en el estudio (289.5 mg h/dl). **Grupo ABCi-B:** sujetos (n=15) con ABCi < 289.5 mg h/dl.

---

Las concentraciones séricas de colesterol en las subclases de las HDL fueron significativamente menores en el grupo SM, que en el grupo control; particularmente, a las 6 y 8-h. Además, se observaron diferencias significativas en las subclases HDL2a (6 y 8-h), HDL3a (0 y 8-h) y HDL3b (6 y 8-h) entre ambos grupos. Asimismo, en la subclase HDL3b a las 8-h, en los controles en comparación con las concentraciones de ayuno.

Finalmente, las concentraciones plasmáticas de fosfolípidos de las subclases de las HDL mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, en las subclases HDL2a (ayuno y 6-h), HDL3a (ayuno, 2 y 6-h) y HDL3c sólo a las 6-h. Además, las comparaciones con las concentraciones de ayuno mostraron diferencias estadísticas en el grupo control de las HDL2a y HDL3a (4-h), así como en las HDL 3c (4, 6 y 8-h); mientras que sólo en la subclase HDL2b a las 8-h, en el grupo SM.

Por otra parte, las modificaciones en las subclases de las HDL a lo largo del período postprandial sugieren una dinámica del contenido de lípidos de las HDL que es diferente entre ambos grupos. Como efecto de dicha dinámica, la estructura de las HDL se puede encontrar alterada en los pacientes con SM. Con el fin de abordar esta posibilidad, se calcularon las relaciones colesterol total-fosfolípidos, así como triglicéridos-fosfolípidos, como una aproximación de la composición de las HDL [99].

Como era de esperar, algunas subclases de las HDL se enriquecieron con triglicéridos en mayor medida en los pacientes con SM, que los sujetos control. Dicho enriquecimiento alcanzó su máximo al mismo tiempo que el pico de las concentraciones séricas de triglicéridos (4-h). Asimismo, consiguió aumentar hasta dos veces la relación triglicéridos-fosfolípidos. Sorprendentemente, las diferencias significativas entre ambos grupos se observaron en la relación triglicéridos/fosfolípidos, pero no en la relación colesterol total/fosfolípidos.

---

También, se observaron diferencias significativas en las subclases HDL2b (8-h), HDL2a (ayuno, 6 y 8-h) y HDL3c (6-h) entre ambos grupos. Igualmente, se encontraron diferencias en el grupo control, en comparación con las concentraciones séricas de las subclases HDL3b (4-h) y HDL3c (4, 6 y 8-h). Mientras que las subclases HDL2a (2, 6 y 8-h), HDL3a (2-h), HDL3b y HDL3c (4-h) en el grupo SM. Asimismo, se encontró una diferencia significativa en la proporción de colesterol total/fosfolípidos, en comparación con las concentraciones de ayuno, en las subclases HDL3c (6 y 8-h), HDL2a (ayuno) y HDL3a a las 2-h, en los controles, como se muestra en la tabla 5.



Tiempo	Triglicéridos-HDL		Colesterol-HDL		Fosfolípidos-HDL		Relación Triglicéridos / Fosfolípidos		Relación Colesterol total / Fosfolípidos	
	Control	SM	Control	SM	Control	SM	Control	SM	Control	SM
<b>0h</b>										
HDL2b	9.08 ± 3.06	9.93 ± 2.81	10.40 ± 5.03	9.35 ± 4.37	30.22 ± 11.31	29.25 ± 13.23	0.35 ± 0.18	0.46 ± 0.36	0.39 ± 0.20	0.36 ± 0.20
HDL2a	4.72 ± 1.87	<b>3.76 ± 1.71<sup>*</sup></b>	4.93 ± 1.59	3.85 ± 1.62	18.68 ± 6.57	<b>13.49 ± 6.03<sup>*</sup></b>	0.40 ± 0.14	<b>0.30 ± 0.09<sup>*</sup></b>	0.29 ± 0.14	<b>0.33 ± 0.18<sup>§</sup></b>
HDL3a	7.67 ± 3.25	6.13 ± 1.96	8.82 ± 2.26	<b>6.81 ± 2.49<sup>*</sup></b>	26.60 ± 10.53	<b>18.70 ± 6.92<sup>*</sup></b>	0.32 ± 0.16	0.40 ± 0.27	0.37 ± 0.15	0.40 ± 0.15
HDL3b	4.16 ± 1.87	3.29 ± 1.13	4.63 ± 1.42	5.17 ± 3.17	15.38 ± 3.31	13.23 ± 4.08	0.28 ± 0.13	0.27 ± 0.13	0.32 ± 0.15	0.43 ± 0.35
HDL3c	3.51 ± 2.00	3.24 ± 1.61	6.82 ± 4.10	6.07 ± 2.93	30.94 ± 10.08	33.01 ± 14.47	0.12 ± 0.08	0.11 ± 0.05	0.22 ± 0.13	0.22 ± 0.14
<b>2h</b>										
HDL2b	9.89 ± 3.95	12.23 ± 4.24	9.64 ± 4.14	11.54 ± 4.71	29.35 ± 10.00	33.78 ± 10.35	0.38 ± 0.25	0.38 ± 0.15	0.35 ± 0.16	0.36 ± 0.15
HDL2a	<b>4.43 ± 2.09<sup>§</sup></b>	4.49 ± 1.84	5.63 ± 2.48	4.50 ± 2.34	13.68 ± 5.01	11.41 ± 5.68	0.36 ± 0.28	<b>0.48 ± 0.28<sup>§</sup></b>	0.45 ± 0.24	0.52 ± 0.48
HDL3a	7.61 ± 3.81	6.35 ± 1.77	8.12 ± 2.40	8.14 ± 3.50	24.51 ± 10.43	<b>16.53 ± 8.44<sup>*</sup></b>	0.37 ± 0.30	<b>0.55 ± 0.40<sup>§</sup></b>	0.40 ± 0.22	<b>0.64 ± 0.41<sup>§</sup></b>
HDL3b	4.07 ± 1.71	3.55 ± 1.73	5.05 ± 2.13	5.59 ± 3.09	13.20 ± 3.94	11.19 ± 3.96	0.35 ± 0.24	0.33 ± 0.15	0.41 ± 0.20	0.56 ± 0.37
HDL3c	3.68 ± 1.54	2.91 ± 1.45	7.21 ± 4.71	7.13 ± 4.17	29.51 ± 8.69	31.78 ± 8.58	0.14 ± 0.09	0.10 ± 0.06	0.23 ± 0.12	0.26 ± 0.17
<b>4h</b>										
HDL2b	10.08 ± 2.90	<b>12.58 ± 2.63<sup>*</sup></b>	10.52 ± 3.56	8.49 ± 3.83	30.95 ± 12.80	28.52 ± 12.65	0.37 ± 0.14	0.56 ± 0.36	0.39 ± 0.19	0.37 ± 0.29
HDL2a	<b>4.79 ± 1.99<sup>§</sup></b>	5.59 ± 2.44	4.68 ± 1.00	4.74 ± 3.09	<b>14.26 ± 3.98<sup>§</sup></b>	14.83 ± 5.40	0.35 ± 0.14	0.49 ± 0.42	0.35 ± 0.10	0.36 ± 0.25
HDL3a	8.71 ± 3.33	8.58 ± 3.13	8.36 ± 1.74	6.82 ± 2.34	<b>23.26 ± 8.76<sup>§</sup></b>	21.34 ± 9.21	0.41 ± 0.18	0.51 ± 0.34	0.42 ± 0.20	0.37 ± 0.19
HDL3b	4.99 ± 2.61	5.22 ± 2.43	4.87 ± 1.88	4.98 ± 2.90	13.09 ± 4.82	10.78 ± 4.54	<b>0.42 ± 0.25<sup>§</sup></b>	<b>0.54 ± 0.26<sup>§</sup></b>	0.41 ± 0.18	0.52 ± 0.29
HDL3c	4.57 ± 2.63	4.60 ± 2.59	6.14 ± 3.48	6.84 ± 3.41	<b>22.29 ± 7.75<sup>§</sup></b>	28.46 ± 12.01	<b>0.22 ± 0.14<sup>§</sup></b>	<b>0.18 ± 0.12<sup>§</sup></b>	0.28 ± 0.13	0.29 ± 0.19
<b>6h</b>										
HDL2b	9.72 ± 2.10	<b>14.75 ± 4.88<sup>*</sup></b>	10.80 ± 4.64	8.39 ± 5.49	30.72 ± 13.01	32.07 ± 15.46	0.39 ± 0.21	0.61 ± 0.40	0.41 ± 0.21	0.31 ± 0.27
HDL2a	4.91 ± 2.35	5.77 ± 2.43	5.25 ± 2.44	<b>3.66 ± 1.73<sup>*</sup></b>	18.64 ± 9.55	<b>10.67 ± 3.63<sup>*</sup></b>	0.29 ± 0.17	<b>0.61 ± 0.35<sup>*§</sup></b>	0.31 ± 0.14	0.37 ± 0.24
HDL3a	9.47 ± 4.86	8.81 ± 3.81	9.46 ± 3.94	7.11 ± 3.25	26.92 ± 9.55	<b>19.95 ± 7.91<sup>*</sup></b>	0.39 ± 0.26	0.50 ± 0.24	0.41 ± 0.33	0.41 ± 0.27
HDL3b	4.78 ± 1.89	4.61 ± 2.95	5.42 ± 2.18	<b>3.86 ± 1.95<sup>*</sup></b>	16.38 ± 5.43	16.63 ± 9.63	0.31 ± 0.13	0.37 ± 0.34	0.43 ± 0.14	0.29 ± 0.20
HDL3c	<b>4.86 ± 2.52<sup>§</sup></b>	3.99 ± 2.45	6.43 ± 3.25	6.44 ± 3.07	<b>20.89 ± 11.27<sup>§</sup></b>	<b>30.13 ± 11.35<sup>*</sup></b>	<b>0.28 ± 0.18<sup>§</sup></b>	<b>0.16 ± 0.12<sup>*</sup></b>	<b>0.36 ± 0.27<sup>§</sup></b>	0.26 ± 0.18
<b>8h</b>										
HDL2b	9.91 ± 2.69	<b>14.38 ± 4.85<sup>*</sup></b>	11.16 ± 4.09	9.54 ± 3.90	34.42 ± 8.21	<b>35.95 ± 14.55<sup>§</sup></b>	0.31 ± 0.14	<b>0.48 ± 0.30<sup>*</sup></b>	0.34 ± 0.18	0.34 ± 0.27
HDL2a	<b>4.80 ± 1.94<sup>§</sup></b>	5.47 ± 2.05	5.89 ± 1.88	<b>4.24 ± 3.93<sup>*</sup></b>	17.13 ± 8.36	14.30 ± 10.79	0.32 ± 0.16	<b>0.59 ± 0.45<sup>*§</sup></b>	0.37 ± 0.14	0.39 ± 0.24
HDL3a	8.89 ± 4.50	8.79 ± 3.19	9.82 ± 2.88	<b>5.99 ± 2.16<sup>*</sup></b>	27.67 ± 9.40	21.66 ± 9.87	0.36 ± 0.23	0.50 ± 0.37	0.42 ± 0.28	0.36 ± 0.28
HDL3b	4.92 ± 2.52	4.43 ± 2.42	<b>5.96 ± 1.89<sup>§</sup></b>	<b>4.27 ± 2.01<sup>*</sup></b>	16.38 ± 5.29	14.59 ± 6.11	0.31 ± 0.17	0.34 ± 0.15	0.37 ± 0.11	0.34 ± 0.17
HDL3c	4.36 ± 3.12	4.46 ± 2.64	6.35 ± 3.20	5.38 ± 2.81	<b>22.47 ± 12.52<sup>§</sup></b>	29.52 ± 11.29	<b>0.25 ± 0.23<sup>§</sup></b>	0.18 ± 0.14	<b>0.36 ± 0.25<sup>§</sup></b>	0.22 ± 0.14

**Tabla 5. Contenido de lípidos, y proporciones triglicéridos - fosfolípidos y colesterol total - fosfolípido en las subclases de las HDL en los períodos basal y postprandial.** Los valores se expresan en mg/dl, y se muestran como media ± EE. Prueba *t de Student*, <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs grupo control. Prueba *t de Student* pareada, <sup>b</sup>*P* 0.05 vs 0-h (basal) dentro del mismo grupo y subclase.

## **Análisis del área bajo la curva incremental de triglicéridos**

Se realizó un sub-análisis para determinar el ABCi de triglicéridos, al tomar en cuenta la mediana de todos los participantes ( $n = 30$ ) como punto de corte (289.5 mg h/dl). Al utilizar este criterio, se integraron dos nuevos grupos, individuos cuyas áreas bajo la curva incremental de triglicéridos se encontraban por encima de la mediana (ABCi-A) y aquellos con una ABCi por debajo de la mediana (ABCi-B). El ABCi de triglicéridos fue de  $731.40 \pm 218.63$  y  $218.63 \pm 125.83$  mg h/dl, para el grupo Altos y para el grupo de Bajos, respectivamente.

Los datos del curso temporal revelaron que algunos sujetos inicialmente clasificados como controles, se caracterizaron por presentar picos de triglicéridos de alta magnitud ( $n = 5$ , ABCi, con una media de  $593.66 \pm 270.76$  mg h/dl). Como resultado de dicha magnitud, estos cinco sujetos fueron incluidos en el grupo de ABCi-Altos.

Por el contrario, cinco pacientes, anteriormente descritos como SM, mostraron una discreta magnitud de triglicéridos de  $240.16 \pm 82.83$  mg/dl de ABCi; por consiguiente, se incluyeron en el grupo de ABCi-Bajos. Congruentemente, la presión arterial fue comparable entre los grupos, mientras que la diferencia en las concentraciones séricas de glucosa alcanzó significancia estadística (Tabla 3). Notablemente, dicha diferencia no se observó entre los grupos SM y controles. Además, se observaron algunas diferencias en las concentraciones séricas de triglicéridos-HDL cuando se compararon ambos análisis (Figura 8).

Al agrupar a la población de estudio sobre la base del ABCi de triglicéridos, las diferencias en las subclases de HDL se hicieron más evidentes. La distribución de los tamaños de las subclases de las HDL se desplazó hacia las subclases grandes en el grupo ABCi-A, y se hizo más evidente a lo largo del período postprandial. Se observaron diferencias significativas en los triglicéridos de las subclases HDL2a (8-h) y HDL3c (ayuno) entre los grupos.

---

Del mismo modo, el grupo ABCi-B mostró una disminución gradual en las subclases pequeñas de las HDL, en particular en la subclase HDL3c, en comparación con las concentraciones de ayuno, pero los cambios son menos importantes que en el grupo ABCi-Altos. Además, la proporción relativa de la subclase HDL2b aumentó a lo largo del estado postprandial en el grupo ABCi-A.

Asimismo, el C-HDL mostró diferencias en las subclases HDL3a (8-h), HDL3b (ayuno, 2, 6 y 8-h) y HDL3c (ayuno, 2 y 8 h), entre los grupos (Tabla 6). A diferencia del primer análisis, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos que no fueron observados al utilizar el criterio de selección del SM (Tabla 4).

Los triglicéridos-HDL tendieron a aumentar en la mayoría de las subclases de las HDL al final del curso temporal en ambos grupos, pero este aumento fue más importante en el grupo ABCi-A. Correspondientemente, la relación triglicéridos-fosfolípidos mostró algunas diferencias en las subclases HDL2a (6 y 8-h), HDL3b y HDL3c en ayuno.

Del mismo modo, la relación colesterol total-fosfolípidos mostró diferencias significativas en las subclases HDL3a (8-h), HDL3b (6 y 8-h) y HDL3c (2 y 8-h).

Tiempo	Triglicéridos-HDL		Colesterol-HDL		Fosfolípidos-HDL		Relación Triglicéridos / Fosfolípidos		Relación Colesterol total / Fosfolípidos	
	ABCi-B	ABCi-A	ABCi-B	ABCi-A	ABCi-B	ABCi-A	ABCi-B	ABCi-A	ABCi-B	ABCi-A
0h										
HDL2b	9.48 ± 2.94	9.52 ± 3.01	9.09 ± 4.16	10.66 ± 5.14	28.02 ± 12.24	31.45 ± 12.14	0.43 ± 0.31	0.38 ± 0.27	0.36 ± 0.19	0.38 ± 0.21
HDL2a	4.33 ± 1.99 §	4.15 ± 1.71	4.56 ± 1.57	4.23 ± 1.81	17.43 ± 7.73	14.74 ± 5.51	0.27 ± 0.11	0.30 ± 0.10	0.30 ± 0.16	0.32 ± 0.16
HDL3a	6.39 ± 2.44	7.42 ± 3.03	8.60 ± 2.35	7.03 ± 2.58	23.88 ± 7.83	21.43 ± 11.30	0.29 ± 0.14	0.43 ± 0.26	0.39 ± 0.14	0.38 ± 0.16
HDL3b	3.39 ± 1.43	4.07 ± 1.69	5.23 ± 1.46	4.58 ± 3.14 *	15.64 ± 3.57	12.98 ± 3.68	0.23 ± 0.11	0.32 ± 0.16 *	0.35 ± 0.14	0.40 ± 0.36
HDL3c	2.67 ± 0.85	4.08 ± 2.20 *	7.79 ± 3.03	5.10 ± 3.57 *	33.49 ± 12.63	30.47 ± 12.20	0.09 ± 0.03	0.14 ± 0.08 *	0.25 ± 0.10	0.19 ± 0.16
2h										
HDL2b	10.78 ± 3.59	11.34 ± 4.85	10.06 ± 5.05	11.13 ± 3.91	30.79 ± 10.69	32.35 ± 10.10	0.37 ± 0.13	0.39 ± 0.26	0.35 ± 0.17	0.37 ± 0.14
HDL2a	4.29 ± 1.75	4.63 ± 2.15	5.54 ± 2.74	4.60 ± 2.07	11.58 ± 5.24 §	13.50 ± 5.54	0.43 ± 0.25	0.42 ± 0.31	0.59 ± 0.47 §	0.38 ± 0.22
HDL3a	6.59 ± 2.02	7.37 ± 3.75	8.94 ± 3.16	7.33 ± 2.58	21.76 ± 8.65	19.27 ± 11.66	0.35 ± 0.21	0.57 ± 0.45	0.51 ± 0.38	0.52 ± 0.33
HDL3b	3.62 ± 1.43	4.01 ± 1.99	6.11 ± 2.05	4.53 ± 2.95 *	12.76 ± 3.47	11.64 ± 4.54	0.31 ± 0.16	0.37 ± 0.22	0.52 ± 0.24	0.46 ± 0.35
HDL3c	3.00 ± 1.54	3.59 ± 1.50	8.83 ± 3.74	4.58 ± 2.80 *	30.58 ± 7.09	30.70 ± 10.08	0.10 ± 0.06	0.14 ± 0.09	0.30 ± 0.14	0.17 ± 0.12 *
4h										
HDL2b	10.86 ± 2.42	11.80 ± 3.51	8.74 ± 3.78	10.27 ± 3.74	28.90 ± 13.27	30.57 ± 12.24	0.44 ± 0.18	0.50 ± 0.37	0.36 ± 0.22	0.40 ± 0.28
HDL2a	4.58 ± 2.01	5.80 ± 2.34	4.31 ± 1.27	5.11 ± 2.93	14.18 ± 3.28	14.91 ± 5.84	0.33 ± 0.14	0.51 ± 0.41	0.31 ± 0.10	0.39 ± 0.24
HDL3a	8.29 ± 3.67	8.99 ± 2.68 §	7.85 ± 1.84	7.33 ± 2.50	20.57 ± 8.32 §	24.04 ± 9.37	0.47 ± 0.30 §	0.45 ± 0.25	0.44 ± 0.19	0.35 ± 0.20
HDL3b	5.04 ± 2.81 §	5.18 ± 2.20	5.38 ± 1.72	4.47 ± 2.92	13.17 ± 5.25	10.70 ± 3.99	0.42 ± 0.22 §	0.54 ± 0.28 §	0.48 ± 0.23	0.46 ± 0.26
HDL3c	4.47 ± 2.38 §	4.70 ± 2.81	7.07 ± 2.38	5.91 ± 4.21	26.03 ± 10.53	24.72 ± 10.62 §	0.20 ± 0.14 §	0.21 ± 0.13 §	0.30 ± 0.14	0.26 ± 0.18 §
6h										
HDL2b	11.96 ± 4.22 §	12.51 ± 4.88	9.86 ± 5.18	9.34 ± 5.28	28.19 ± 13.44	34.60 ± 14.38	0.52 ± 0.30	0.47 ± 0.38	0.39 ± 0.22	0.33 ± 0.27
HDL2a	4.28 ± 1.92 §	6.40 ± 2.40 *	4.64 ± 2.46	4.27 ± 2.04	16.45 ± 10.18	12.86 ± 5.29	0.30 ± 0.15	0.61 ± 0.36 * §	0.32 ± 0.14	0.37 ± 0.24
HDL3a	7.69 ± 3.49	10.59 ± 4.65 §	8.94 ± 3.92	7.63 ± 3.58	22.88 ± 9.27	24.00 ± 9.66	0.36 ± 0.13	0.53 ± 0.32	0.48 ± 0.36	0.35 ± 0.20
HDL3b	4.26 ± 1.87 §	5.14 ± 2.90	5.81 ± 2.24	3.47 ± 1.38 *	17.53 ± 9.24	15.49 ± 5.88	0.28 ± 0.13	0.40 ± 0.33	0.37 ± 0.16	0.26 ± 0.17 *
HDL3c	4.37 ± 2.55 §	4.48 ± 2.51	7.28 ± 3.01	5.59 ± 3.08	26.51 ± 11.55 §	24.52 ± 14.97	0.19 ± 0.14 §	0.24 ± 0.19 §	0.31 ± 0.17	0.31 ± 0.28
8h										
HDL2b	11.82 ± 4.86	12.46 ± 4.20 §	10.04 ± 4.63	10.67 ± 3.44	33.97 ± 9.97 §	36.40 ± 13.34	0.38 ± 0.23	0.40 ± 0.26	0.33 ± 0.20	0.36 ± 0.25
HDL2a	4.26 ± 1.38 §	6.01 ± 2.16 * §	5.36 ± 2.33	4.77 ± 3.85	18.04 ± 12.13	13.40 ± 5.66	0.31 ± 0.17	0.59 ± 0.44 *	0.38 ± 0.19	0.38 ± 0.21
HDL3a	8.51 ± 3.95 §	9.18 ± 3.82 §	9.23 ± 3.16	6.58 ± 2.67 *	22.14 ± 8.43	27.19 ± 10.96 §	0.48 ± 0.41 §	0.38 ± 0.16	0.52 ± 0.34	0.26 ± 0.09 * §
HDL3b	4.55 ± 2.22	4.81 ± 2.72	6.27 ± 2.05 §	3.97 ± 1.47 *	16.14 ± 5.98	14.83 ± 5.51	0.30 ± 0.14	0.35 ± 0.17	0.42 ± 0.15	0.30 ± 0.11 *
HDL3c	4.04 ± 2.97 §	4.78 ± 2.76	7.20 ± 2.54	4.54 ± 2.90 *	25.31 ± 13.25 §	26.68 ± 11.59	0.21 ± 0.23 §	0.22 ± 0.16	0.36 ± 0.24	0.20 ± 0.16 *

**Tabla 6. Contenido de lípidos, y proporciones triglicéridos - fosfolípidos y colesterol total - fosfolípido en las subclases de las HDL en los períodos basal y postprandial en pacientes agrupados por el ABCi de triglicéridos. Los valores se expresan en mg/dl, y se muestran como media ± EE. Prueba *t de Student*, <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs grupo "ABCi-B". Prueba *t de Student*, <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs 0-h (basal) dentro del mismo grupo y subclase.**

## Estudios de la respuesta de la vaso relajación in vitro

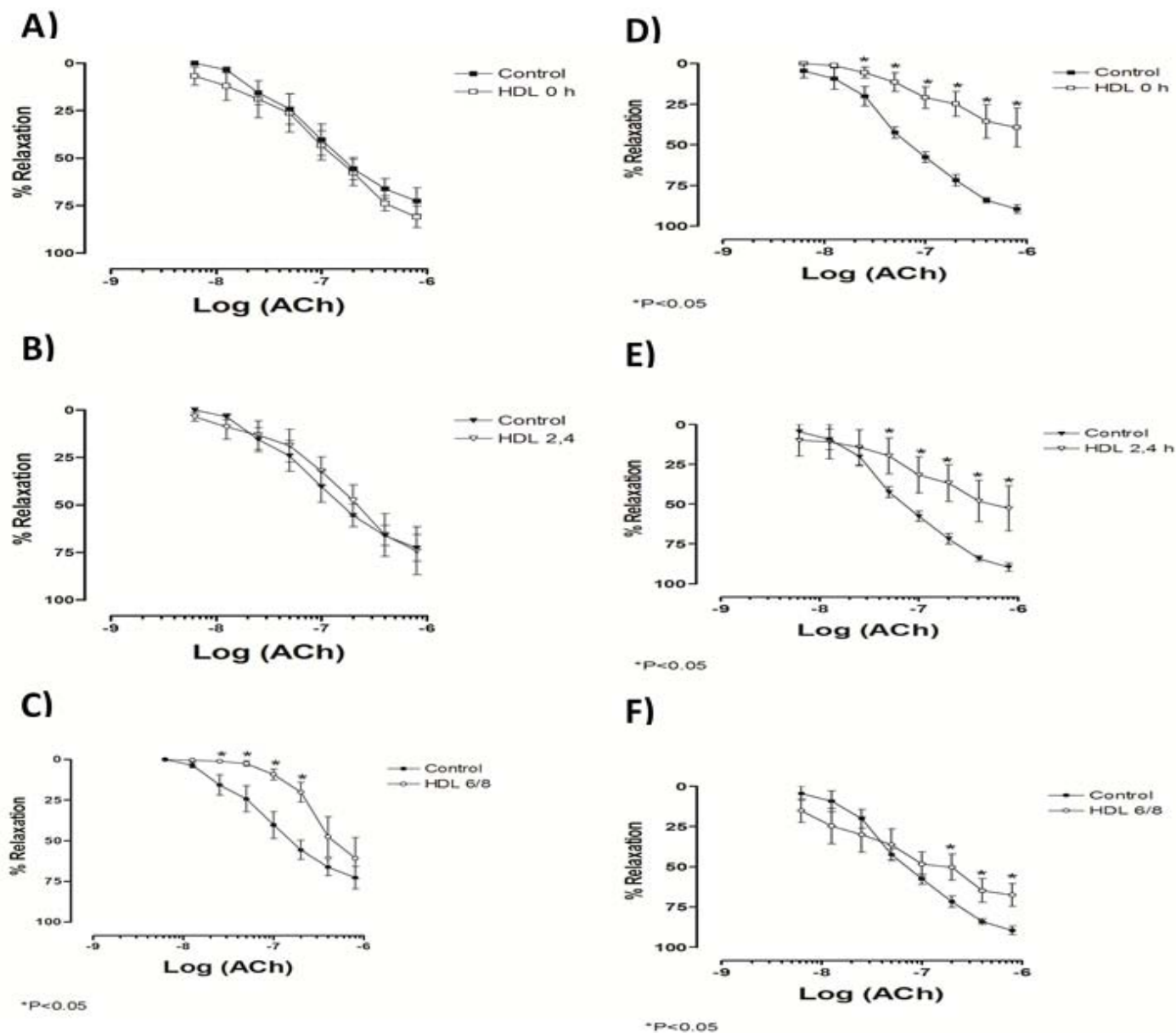
Se evaluó la función endotelial de forma indirecta al utilizar un modelo de aortas torácicas de rata de la cepa Wistar. Inicialmente se realizó una pre-contracción de los anillos de aortas con el uso de fenilefrina como vasoconstrictor, y posteriormente se realizó una curva dosis-respuesta a acetilcolina para evaluar la vaso relajación, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

Se analizaron las respuestas contráctiles de los anillos aórticos a concentraciones acumulativas de fenilefrina ( $3 \times 10^{-6}$  M). Las concentraciones moderadas de acetilcolina ( $2.5 \times 10^{-9}$  a  $2 \times 10^{-7}$  M) mostraron diferencias significativas, en todos los tiempos (ayuno (0-h), 2/4-h y 6/8-h), en la respuesta contráctil de los anillos, incubados con las HDL de sujetos del grupo SM.

Sin embargo, los anillos incubados con las HDL de los sujetos control (ABCi-B), sólo mostraron diferencias significativas en el tiempo 6/8-h como se muestra en la figura 9 letra C. El promedio del porcentaje de la relajación de los anillos de aortas de ambos grupos de estudio, comparado contra el control positivo (anillos aórticos sin incubación con HDLs) en respuesta a dosis crecientes de acetilcolina, se muestra en la figura 9.

Las respuestas de relajación dependientes del endotelio inducidas por acetilcolina mostraron una disminución de las respuestas de relajación de los anillos aórticos en el grupo SM en ayuno ( $2.5 \times 10^{-9}$  a  $6 \times 10^{-7}$  M) contra ( $6 \times 10^{-7}$  M) de la muestra; en el tiempo 2/4-h ( $5 \times 10^{-8}$  a  $6 \times 10^{-7}$  M) frente a ( $6 \times 10^{-7}$  M) de la muestra; y a las 6/8-h ( $2 \times 10^{-7}$  a  $6 \times 10^{-7}$  M), con una  $*P < 0.05$ , como se muestra en la figura 9.

Representación gráfica de la vaso relajación de aortas dependiente del endotelio por grupo de análisis



**Figura 9. Efecto de las HDL sobre la vaso relajación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (ACh), en anillos aórticos aislados.** Ensayos de vaso relajación de aortas incubadas con HDL del grupo control: A, B y C. Ensayos de vaso relajación de aortas con HDL del grupo SM: D, E y F. **(A y D)** Efecto de las HDL en ayuno. **(B y E)** Efecto de las HDL aisladas de plasma de los tiempos 2 y 4-h de postprandio. **(C y F)** Efecto de las HDL aisladas de plasma de los tiempos 6 y 8-horas del postprandio. Valores (n) =10 de cada grupo. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EE. Prueba *t* de Student, \**P* < 0.05 vs control positivo.

---

## **Análisis de la abundancia del ARN mensajero**

Para determinar si las HDL modulan la expresión genética del endotelio vascular se llevó a cabo un ensayo indirecto en aortas torácicas de rata de la cepa Wistar, donde se analizó la abundancia de ARNm de algunos genes codificantes implicados en este proceso. De manera breve, aortas torácicas de rata (40 mg de tejido en promedio) fueron incubadas, de manera separadas, con las HDL de los tiempos de ayuno (tiempo 0-h), y con tiempo del postprandio (tiempo 8-h), tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

Después de realizar los ensayos de RT-PCR por triplicado, no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa del ARNm del gen codificante denominado *NOS3*, así como del complejo proteico formado por los genes SR-BI (*Scarb1*) y *Pdzk1* en la disfunción endotelial, como se muestra en la figura 10.

Abundancia relativa de la expresión de los genes involucrados en la vaso relajación dependiente del endotelio

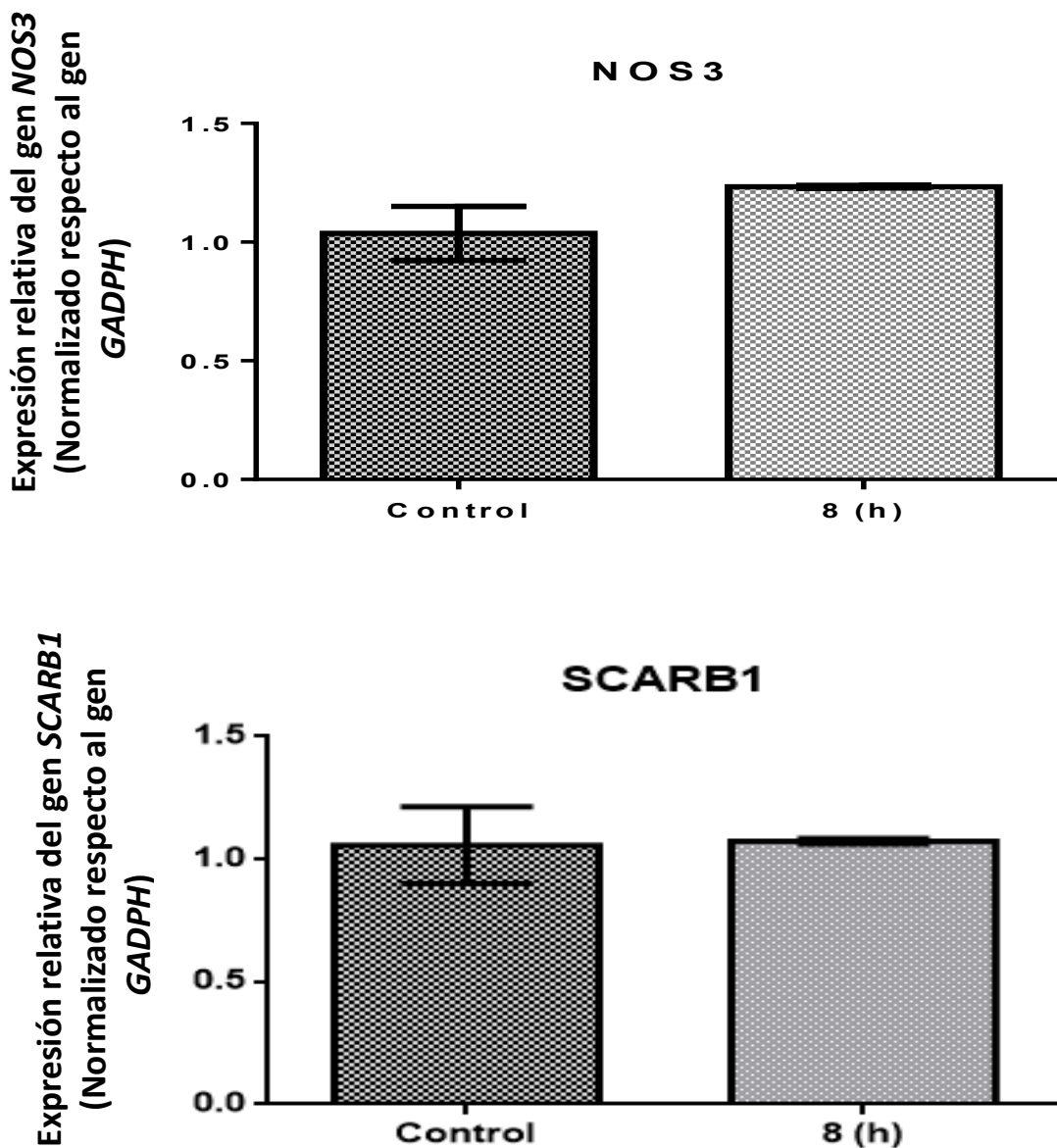


Figura 10. Abundancia relativa de los genes codificantes denominados NOS3 y SCARB1, normalizados con respecto al gen codificante denominado GAPDH. Los datos se expresan como cambios en la expresión relativa de los genes de interés contra el control. Los valores representan la media  $\pm$  EE; (n = 6).



---

## DISCUSIÓN

Este trabajo demostró que los cambios en la estructura de las HDL son directamente proporcionales a la magnitud de la trigliceridemia postprandial. Las modificaciones estructurales incluyeron, en las subclases de las HDL, concentraciones plasmáticas bajas de colesterol y un aumento de triglicéridos en aquellos sujetos que presentaron concentraciones elevadas durante la trigliceridemia postprandial, estimado por el área bajo la curva incremental (ABCI) de triglicéridos de las 8-horas.

Con el fin de poner de manifiesto los cambios estructurales en las HDL durante el período postprandial, se reclutaron pacientes cuya trigliceridemia postprandial es a menudo elevada, y que además cumplían con 3 o más de los criterios para el síndrome metabólico [100]. En la actualidad, no existe un consenso sobre la estandarización de la cantidad o el tipo de alimento con alto contenido de lípidos que produzca una respuesta específica para el estudio del metabolismo postprandial de lípidos.

Cotidianamente, existe una variedad inmensa entre los alimentos consumidos durante el día, donde además influyen factores demográficos, socioculturales y de preferencias, así como la disponibilidad de alimentos en un país con una rica cultura gastronómica como la de México. Para este estudio se diseñó un alimento tipo sándwich con un contenido de 75 g de lípidos, con el objetivo de generar una sobrecarga de lípidos, que de manera efectiva permitió aumentar hasta dos veces las concentraciones séricas de triglicéridos en ayuno (el objetivo principal de la sobrecarga de lípidos), coherente con estudios previos, sin embargo, diseñado para población mexicana [34].

Asimismo, se tomaron las previsiones necesarias en el diseño del alimento para evitar aumentos importantes en las concentraciones de colesterol; las fluctuaciones postprandiales del colesterol suelen ser muy discretas y no implican un factor de confusión [39]. Además, otra ventaja del alimento utilizado en nuestro estudio es la fácil disponibilidad de los ingredientes empleados, por lo que es altamente reproducible para futuros estudios del metabolismo postprandial de lípidos.

---

Por otra parte, se encontró un pico en las concentraciones séricas de triglicéridos en pacientes con SM, el cual se extendió entre las 6 y las 8-h; no obstante, las concentraciones no regresaron a sus valores basales. En cambio, el grupo de sujetos del grupo control mostró un pico en las concentraciones de triglicéridos que osciló alrededor de la marca de las 4-h, para regresar a valores de ayuno después de las 6-h; lo que es considerado como un indicador de una respuesta normal en el aclaramiento y/o eliminación de lípidos sanguíneos [40].

Por el contrario, un retraso, entre las 5 y las 8-h, en la depuración postprandial de triglicéridos se ha asociado a un metabolismo ineficaz de los lípidos, lo que es considerado como un factor de riesgo para la aparición de futuros eventos cardiovasculares [34, 39, 50, 79]. Las cinco subclases de las HDL, en particular las subclases grandes, presentaron una tendencia general a aumentar el contenido de triglicéridos, en ambos grupos; pero la magnitud de dicho aumento fue significativamente de mayor importancia en el grupo SM. Concomitantemente, se observó una disminución del contenido de colesterol, y nuevamente la modificación fue más evidente en los pacientes con SM que en los controles.

Estos resultados sugieren una interacción entre las HDL y los quilomicrones lo que generó un cambio en el contenido de colesterol (depleción) y de triglicéridos (aumento). En la actualidad, las concentraciones plasmáticas de triglicéridos se miden de manera posterior a un ayuno prolongado de entre 8 a 12-h, durante la noche, para permitir valores bioquímicos estables. En cambio, la trigliceridemia postprandial se puede alcanzar después de un consumo de entre 30 y 60 g de lípidos, para luego volver a las concentraciones basales en las próximas 5 a 8-h.

Con base en este dogma, se puede asumir que la etapa metabólica regular, en las sociedades modernas, en la mayor parte del día, se encuentra en la fase postprandial. De acuerdo con esta teoría, la evidencia científica actual apunta a que la enfermedad aterosclerosa puede ser un fenómeno que tiene un origen postprandial [101] y como consecuencia, los triglicéridos postprandiales son un predictor independiente para la ECV [34, 39, 50, 79].

---

Un mecanismo que podría explicar el mayor riesgo de enfermedad coronaria aterosclerosa asociado a altas concentraciones de triglicéridos postprandial es su efecto sobre la estructura de las subclases de las HDL, como se observó en el presente estudio. Las HDL se pueden clasificar por su tamaño, como en el presente estudio, y la funcionalidad antiaterogénica de las subclases de las HDL es diferente y determinada no sólo por su tamaño, sino también por su composición lipídica [65, 102-104]. Sin embargo, todavía no está claro qué subclase de las HDL juega el papel antiaterogénico más importante [99, 105].

Nuestros resultados muestran algunas diferencias sutiles de triglicéridos y colesterol de las subclases de las HDL; de acuerdo con observaciones previas en sujetos con hipertrigliceridemia [81, 106], los pacientes con SM presentaron concentraciones séricas mayores de triglicéridos de la subclase HDL2b que los controles después de 8-h posterior a la ingesta del alimento. En cambio, el colesterol de la mayoría de las HDL se encontró más bajo en el primero, que en el segundo.

Al mismo tiempo, se encontró una cinética diferente de los triglicéridos de las subclases de las HDL a lo largo de la etapa postprandial en los pacientes con SM, en comparación con los pacientes control. Estos efectos fueron más evidentes en el grupo del área bajo la curva incremental de triglicéridos altos, que en el grupo de ABCi-Bajos, lo que sugiere que cuanto mayor es la magnitud de la trigliceridemia postprandial, más importantes son las modificaciones en la estructura de las HDL.

El incremento de triglicéridos y la disminución de los niveles plasmáticos disminuidos de las subclases de las HDL en la fase postprandial tardía pueden ser el resultado de la depleción o aumento de los lípidos de las HDL, respectivamente; un cambio en el número parcial de las HDL circulantes, o ambos. En este contexto, se ha propuesto que las concentraciones plasmáticas de los fosfolípidos de las subclases de las HDL reflejan el número de partículas de las HDL [99].

---

En consecuencia, las relaciones triglicéridos-fosfolípidos y colesterol total-fosfolípidos de las subclases de las HDL indican el contenido de lípidos de las partículas de las lipoproteínas. Sobre la base de estos supuestos, los sujetos del grupo ABCi-Alto presentaron un mayor número de subclases grandes HDL2b, e intermedias HDL3a, probablemente de origen intestinal [105], mientras que la subclase HDL2a disminuyó a las 8-h, de la etapa postprandial.

Además, las subclases pequeñas, HDL3b y HDL3c, y las de tamaño intermedio HDL3a, depletaron su contenido de colesterol, y sólo la subclase HDL2a aumentó su contenido de triglicéridos en comparación con el grupo ABCi-Bajo. Asimismo, se observó un aumento de triglicéridos en las subclases grandes en los sujetos con SM.

Por el contrario, el contenido de colesterol en las subclases de las HDL permaneció constante a lo largo de todo el período postprandial entre los pacientes con SM y los controles. Por esta razón, el criterio de selección del área bajo la curva incremental de triglicéridos es un mejor predictor de las modificaciones estructurales de las HDL durante el período postprandial y puede ser un indicador independiente de un aumento del riesgo cardiovascular, sobre todo en sujetos clínicamente sanos.

Algunos estudios coinciden en la idea de que la estructura de las HDL está relacionada con su capacidad antioxidante [103], la cual puede verse afectada por modificaciones en estas lipoproteínas [107]. Por consiguiente, se exploró la posibilidad que los cambios en el contenido de lípidos en la estructura de las HDL, que ocurren durante el período postprandial, se vincularan con la actividad de la PON-1, enzima que confiere la mayoría de las propiedades antioxidantes a estas lipoproteínas.

La actividad de la PON-1 no disminuyó a lo largo de la etapa postprandial como se esperaba, pero tendió a aumentar al final del transcurso temporal del tiempo; sin embargo, los cambios no fueron estadísticamente significativos. Además, queda por dilucidar si la PON-1 se redistribuye a lo largo de las subclases de las HDL durante el período postprandial, como se ha sugerido previamente [107].

---

Asimismo, se debe señalar que otros componentes de las HDL, como la Apo-AI, también contribuyen a las propiedades antioxidantes de estas lipoproteínas, mientras que otras proteínas asociadas a las HDL, es decir, la mieloperoxidasa y el acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas, afectan esta propiedad [108]. Se requieren más estudios para determinar si la magnitud de la trigliceridemia postprandial modifica otras propiedades antioxidantes de las subclases de las HDL.

Otra de las actividades antiaterogénicas de las HDL es la de promover el funcionamiento endotelial [109]. Con la finalidad de explorar si los cambios estructurales de las HDL durante el postprandio afectan su actividad respecto a la función endotelial, se llevaron a cabo estudios de reactividad vascular.

Los resultados de estos estudios ponen en evidencia que las partículas de las HDL alteradas en su composición lipídica, obtenidas durante el postprandio afectan la vaso relajación mediada por endotelio; las partículas HDL postprandiales (6/8h) son “disfuncionales” en el grupo del ABCi-B, conformado principalmente por sujetos clínicamente sanos. No obstante, las HDL de los sujetos del grupo ABCi-A son disfuncionales desde el ayuno, en congruencia con un contenido de lípidos de las HDL en este grupo en cualquiera de los tiempos del estudio.

Además, los estudios sobre la disfunción endotelial y la relajación vascular en modelos animales muestran una relajación aórtica reducida, inducida por la acetilcolina en ratones con normo-peso y ratones obesos con una dieta alta en grasa/colesterol, que desencadenan un metabolismo alterado de las lipoproteínas caracterizado por altas concentraciones de triglicéridos y colesterol total [110, 111]. Nuestros resultados sugieren que dichas alteraciones están mediadas por HDL disfuncionales generadas durante el postprandio.

Este estudio demuestra entonces que modificaciones temporales en las partículas de las HDL de pacientes aparentemente sanos inducidas por la magnitud de la trigliceridemia postprandial, afecta la función endotelial ateroprotectora. Estos cambios no ocurren a nivel transcripcional, ya que nuestros resultados arrojaron datos negativos al respecto.

Ciertamente, se requieren más estudios para aclarar dichos cambios y explicar el mecanismo por el cual las HDL generan una disfunción endotelial aguda generada por la magnitud de la trigliceridemia postprandial.

---

## CONCLUSIONES

Este estudio revela que la hipertrigliceridemia postprandial induce un desplazamiento del tamaño de las HDL hacia partículas grandes y la importante depleción del contenido de colesterol de las subclases HDL3. Además, los cambios en la estructura de las HDL no se asociaron con la alteración de la actividad de la PON-1.

Innegablemente se requieren estudios adicionales para investigar el papel de tales modificaciones estructurales en otras funciones antiaterogénicas de las HDL como resultado de una lipemia postprandial sostenida. Estos resultados sugieren que la hipertrigliceridemia postprandial es una explicación factible del factor de riesgo asociado para la hipertrigliceridemia de ayuno y la hipoalfalipoproteinemia.

Asimismo, estos resultados fundamentan la idea de que la aterosclerosis es una enfermedad de tipo y origen postprandial, e invita a participar en la discusión sobre si los perfiles bioquímicos de lípidos deben determinarse después de una carga oral de lípidos; o bien, continuar con el estudio tradicional de realizarlos en ayuno, no obstante, sus resultados no reflejen el estado habitual del metabolismo de lípidos a lo largo del día.

Es importante subrayar que se requieren 75 gramos de lípidos para duplicar las concentraciones basales de triglicéridos para población adulta, y el alimento diseñado a la medida para este estudio los aporta sin afectar de manera importante otros lípidos postprandiales, lo que se considera como un indicador metódico del metabolismo postprandial de lípidos.

Por último, el área bajo la curva incremental de triglicéridos (ABCI) empleado para reagrupar a nuestros pacientes de estudio puede ser aplicado como un nuevo método de selección de hipertrigliceridemia clínica, el cual resultó ser una técnica con una mayor capacidad para generar grupos más homogéneos que los algoritmos actualmente utilizados, como la estratificación de pacientes de acuerdo con el diagnóstico del síndrome metabólico.

---

## PERSPECTIVAS

Los resultados de este proyecto contribuyen en el estudio de los mecanismos a través de los cuáles la hipertrigliceridemia postprandial genera cambios importantes en el contenido de lípidos en la estructura de las HDL; sin embargo, para tener una mayor comprensión de como esta modificación postprandial afecta las funciones tradicionales de las HDL, se sugiere lo siguiente:

El efecto de las HDL sobre la vaso relajación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (Ach), en anillos aórticos de rata aislados solo muestra una pequeña parte del rompecabezas, por lo que es trascendental buscar el mecanismo por el cual se genera la disfunción mediada por el endotelio. Una alternativa es incrementar el tamaño de la muestra, así como determinar la abundancia relativa de la expresión de los genes involucrados en la vaso relajación dependiente del endotelio.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res*. 2015;46(5):328-38.
- [2] Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: World Health Organization (WHO);2011.
- [3] Martin SS, Blaha MJ, Blankstein R, Agatston A, Rivera JJ, Virani SS, Ouyang P, Jones SR, Blumenthal RS, Budoff MJ, Nasir K. Dyslipidemia, coronary artery calcium, and incident atherosclerotic cardiovascular disease: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2014;129(1):77-86.
- [4] Gonzales JC, Gordts PL, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans. *J Clin Invest*. 2013;123(6):2742-51.
- [5] Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13(3):125-38.
- [6] Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci*. 2009;5(5):474-88.
- [7] David, LN, Michael, MC. Lehninger. Principles of Biochemistry Fourth Ed. Worth Publishers. In: DeGroot, LJ, Jameson, JL. (Eds.). 2000;pp787-804.
- [8] Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1483(1):37-57.
- [9] Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res*. 2004;43(2):134-76.
- [10] AbouRjaili G, Shtaynberg N, Wetz R, Costantino T, Abela GS. Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology, and treatment. *Metabolism*. 2010;59(8):1210-20.
- [11] Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2008;92(3):272-83.
- [12] Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9:14.
- [13] Vaziri ND. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. *Semin Dial*. 2009;22(6):644-51.
- [14] Hesse D, Jaschke A, Chung B, Schürmann A. Trans-Golgi proteins participate in the control of lipid droplet and chylomicron formation. *Biosci Rep*. 2013;33(1):1-9.
- [15] Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009;16(2):163-71.
- [16] Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low-density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(9):353-63.
- [17] Fisher EA. The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):778-81.

- [18] Tiwari S, Siddiqi SA. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1079-86.
- [19] Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis.* 2010;211(2):361-70.
- [20] Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. High density lipoprotein biogenesis, cholesterol efflux, and immune cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(11):2561-5.
- [21] Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
- [22] Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J.* 2011;32(11):1345-61.
- [23] Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.* 2008;54(1):24-38.
- [24] Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III15-9.
- [25] Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol.* 2010;610:403-17.
- [26] Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:714653.
- [27] Pyle AL, Young PP. Atheromas feel the pressure: biomechanical stress and atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2010;177(1):4-9.
- [28] Lee-Rueckert M, Kovanen PT. Extracellular modifications of HDL in vivo and the emerging concept of proteolytic inactivation of pre $\beta$ -HDL. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(5):394-402.
- [29] Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium and Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Boekholdt SM, Ouwehand W, Watkins H, Samani NJ, Saleheen D, Lawlor D, Reilly MP, Hingorani AD, Talmud PJ, Danesh J. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet.* 2010;375(9726):1634-9.
- [30] Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1716-25.
- [31]. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 106(25):3143-421.

- [32] Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S; American Heart Association Clinical Lipidology, Thrombosis, and Prevention Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Nursing; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(20):2292-333.
- [33] Rosenson RS, Davidson MH, Hirsh BJ, Kathiresan S, Gaudet D. Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(23):2525-40.
- [34] Noguchi K, Hirota M, Miyoshi T, Tani Y, Noda Y, Ito H, Nanba S. Single administration of vildagliptin attenuates postprandial hypertriglyceridemia and endothelial dysfunction in normoglycemic individuals. *Exp Ther Med*. 2015;9(1):84-88.
- [35] Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384(9943):626-35.
- [36] Cintora H, Altman R, Scassiota A, Cintora F, Melcon M, Machain M. Trigliceridemia basal y riesgo cardiovascular: 150-200 mg/dl como "rango crítico" con mayor riesgo aterogénico en individuos aparentemente sanos. *Clin Invest Arteriosclerosis*. 1999;11:113-20.
- [37] Vega GL. What is a healthy level of plasma triglyceride? *Clin Invest Arteriosclerosis*. 1999; 3:132-3.
- [38] Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, Stalenhoef AF; Endocrine society. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):2969-89.
- [39] 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(3):299-308.
- [40] Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriège P, Després JP. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes*. 1998;47(6):953-60.
- [41] Watts GF, Ooi EM, Chan DC. Demystifying the management of hypertriglyceridemia. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(11):648-61.
- [42] Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Descamps OS, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Santos RD, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, Wiklund O; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(8):655-66.
- [43] Boullart AC, de Graaf J, Stalenhoef AF. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(5):867-75.
- [44] Murphy MJ, Sheng X, MacDonald TM, Wei L. Hypertriglyceridemia and acute pancreatitis. *JAMA Intern Med*. 2013;173(2):162-4.
- [45] Nesto RW. Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005;5(6):379-87.

- [46] Burdge GC, Jones AE, Frye SM, Goodson L, Wootton SA. Effect of meal sequence on postprandial lipid, glucose and insulin responses in young men. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57(12):1536-44.
- [47] Gomaraschi M, Adorni MP, Banach M, Bernini F, Franceschini G, Calabresi L. Effects of established hypolipidemic drugs on HDL concentrations, subclass, distribution and function. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:593-615.
- [48] Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C. (2007). Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61(10):1145-61.
- [49] Kolovou GD, Mikhailidis DP, Kovar J, Lairon D, Nordestgaard BG, Ooi TC, Perez-Martinez P, Bilianou H, Anagnostopoulou K, Panotopoulos G. Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr Vasc Pharmacol.* 2011;9(3):258-70.
- [50] Alcalá-Díaz JF, Delgado-Lista J, Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Marín C, Quintana-Navarro GM, Gómez-Luna P, Camargo A, Almaden Y, Caballero J, Tinahones FJ, Ordovás JM, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Hypertriglyceridemia influences the degree of postprandial lipemic response in patients with metabolic syndrome and coronary artery disease: from the cordioprev study. *PLoS One.* 2014;9(5):96-97.
- [51] Barquera S, Campos I. *Dislipidemias: epidemiología, adherencia, evaluación y tratamiento.* (3a Ed). INSP, México. 2009.
- [52] Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ.* 2007;176(8):1113-20.
- [53] Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 1996;124Suppl:S11-20.
- [54] Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79(1):8-15.
- [55] Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation.* 1966;34(4):679-97.
- [56] Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med.* 1979;90(1):85-91.
- [57] Stamler J, Daviglius ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA.* 2000;284(3):311-8.
- [58] Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atheroscler Suppl.* 2003;4(1): 21-9.
- [59] Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(1):13-27.
- [60] Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R; Future Forum Editorial Board. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis.* 2003;168(2):195-211.
- [61] Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry.* 1992;27(1):25-9.

- [62] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1052-62.
- [63] Barter PJ, Rye KA. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7(2):82-7.
- [64] Saddar S, Mineo C, Shaul PW. Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(2):144-50.
- [65] Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*. 2011;(4):222-32.
- [66] Pérez-Méndez O, González-Pacheco H, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta*. 2014;429(15):111-122.
- [67] Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(4):312-8.
- [68] Quyyumi AA, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza JA, Cannon RO 3rd. Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P. *Circulation*. 1997;95(1):104-10.
- [69] Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Burillo E, Michel JB, Levoye A, Martin-Ventura JL, Meilhac O. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):493-511.
- [70] Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005;23(2):233-46.
- [71] Pérez-Méndez O. [High density lipoproteins (HDL). A therapeutic objective in the atherosclerosis prevention?]. *Arch Cardiol Mex*. 2004;74(1):53-67.
- [72] Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 2009;50Suppl:S195-200.
- [73] García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, Cruz-Robles D, Carreón-Torres E, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412:292-298.
- [74] 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(2):339-58.
- [75] Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montañón LF, Franco M, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrine Research*. 2004;(30)3:403-415.
- [76] Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Avila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res*. 2011;51(6):1610-7.

- 
- [77] Warnick GR, McNamara JR, Boggess C, Clendenen F, Williams PT, Landolt CC. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med.* 2006;26:803-46.
- [78] Serban C, Babes V, Muntean D, Toth P, Banach M. Dysfunctional HDL: the journey from savior to slayer. *Clin. Lipidol.* 2014;9(1):49-59.
- [79] Kannel WB, Vasan RS. Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights for current opinion in cardiology. *Curr Opin Cardiol.* 2009;24(4):345-50.
- [80] Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:3-51.
- [81] Patsch JR, Prasad S, Gotto AM Jr, Bengtsson-Olivecrona G. Postprandial lipemia. A key for the conversion of high density lipoprotein2 into high density lipoprotein3 by hepatic lipase. *J Clin Invest.* 1984;74(6):2017-23.
- [82] Redlarski G, Palkowski A, Krawczuk M. Body surface area formulae: an alarming ambiguity. *Sci Rep.* 2016;6:27966.
- [83] Hardman AE. The influence of exercise on postprandial triacylglycerol metabolism. *Atherosclerosis.* 1998;141Suppl1:S93-100.
- [84] Allen E, Gray P, Kollias-Pearson A, Oag E, Pratt K, Henderson J, Gray SR. The effect of short-duration sprint interval exercise on plasma postprandial triacylglycerol levels in young men. *J Sports Sci.* 2014;32(10):911-6.
- [85] Maraki M, Aggelopoulou N, Christodoulou N, Katsarou C, Anapliotis P, Kavouras SA, Panagiotakos D, Sidossis LS. Validity of abbreviated oral fat tolerance tests for assessing postprandial lipemia. *Clin Nutr.* 2011;30(6):852-7.
- [86] Weiss EP, Fields DA, Mittendorfer B, Haverkort MA, Klein S. Reproducibility of postprandial lipemia tests and validity of an abbreviated 4-hour test. *Metabolism.* 2008;57(10):1479-85.
- [87] Gill JM, Malkova D, Hardman AE. Reproducibility of an oral fat tolerance test is influenced by phase of menstrual cycle. *Horm Metab Res.* 2005;37(5):336-41.
- [88] Cohen JC, Berger GM. Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans. *J Lipid Res.* 1990;31(4):597-602.
- [89] Zemánková K, Mrázková J, Piřha J, Kovář J. The effect of glucose when added to a fat load on the response of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and apolipoprotein B-48 in the postprandial phase. *Physiol Res.* 2015;64Suppl3:S363-9.
- [90] Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation.* 2005;112:2735-2752.
- [91] González-López JJ, Gómez-Arnau Ramírez J, Torremocha García R, Albelda Esteban S, Alió del Barrio J, Rodríguez-Artalejo F. Knowledge of correct blood pressure measurement procedures among medical and nursing students. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(5):568-71.
- [92] 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: 2372-7.

- [93] Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos.* 1991;19(1):100-6.
- [94] Williams PT, Kraus 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.
- [95] Sharabi FM, Daabees TT, El-Metwally MA, Senbel AM. Effect of sildenafil on the isolated rat aortic rings. *Fundamental & Clinical Pharmacology.* 2005;19:449-56.
- [96] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- [97] Perez-Martinez P, Alcalá-Díaz JF, Delgado-Lista J, García-Ríos A, Gómez-Delgado F, Marín-Hinojosa C, Rodríguez-Cantalejo F, Delgado-Casado N, Perez-Caballero AI, Fuentes-Jiménez FJ, Camargo A, Tinahones FJ, Ordoñas JM, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Metabolic phenotypes of obesity influence triglyceride and inflammation homeostasis. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(11):1053-64
- [98] Carstensen M, Thomsen C & Hermansen K. Incremental area under response curve more accurately describes the triglyceride response to an oral fat load in both healthy and type 2 diabetic subjects. *Metabolism.* 2003;52,1034-1037.
- [99] García-Sánchez C, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, Carreón-Torres E, Rodríguez-Pérez JM, Juárez-Rojas JG, Martínez-Sánchez C, Fragoso JM, González-Pacheco H, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez Ó. Low concentrations of phospholipids and plasma HDL cholesterol subclasses in asymptomatic subjects with high coronary calcium scores. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):250-5.
- [100] van Wijk JP, Halkes CJ, Erkelens DW, Castro Cabezas M. Fasting and daylong triglycerides in obesity with and without type 2 diabetes. *Metabolism.* 2003;52:1043-1049.
- [101] Geluk CA, Halkes CJ, De Jaegere PP, Plokker TW, Cabezas MC. Daytime triglyceridemia in normocholesterolemic patients with premature atherosclerosis and in their first-degree relatives. *Metabolism.* 2004;53(1):49-53.
- [102] Denimal D, Nguyen A, Pais de Barros JP, Bouillet B, Petit JM, Vergès B, Duvillard L. Major changes in the sphingophospholipidome of HDL in non-diabetic patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2016;246:106-14.
- [103] Moren X, Lhomme M, Bulla A, Sanchez JC, Kontush A, James RW. (2016). Proteomic and lipidomic analyses of paraoxonase defined high density lipoprotein particles: Association of paraoxonase with the anti-coagulant, protein S. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10(3):230-8.
- [104] Martínez-Ramírez M, Madero M, Vargas-Alarcón G, Vargas-Barrón J, Fragoso JM, Rodríguez-Pérez JM, Martínez-Sánchez C, González-Pacheco H, Bautista-Pérez R, Carreón-Torres E, Pérez-Méndez O. HDL-sphingomyelin reduction after weight loss by an energy-restricted diet is associated with the improvement of lipid profile, blood pressure, and decrease of insulin resistance in overweight/obese patients. *Clin Chim Acta.* 2016;454:77-81.
- [105] Niesor EJ. Will Lipidation of ApoA1 through Interaction with ABCA1 at the Intestinal Level Affect the Protective Functions of HDL? *Biology (Basel).* 2015;4(1):17-38.
- [106] Patsch JR, Karlin JB, Scott LW, Smith LC, Gotto AM Jr. Inverse relationship between blood levels of high density lipoprotein subfraction 2 and magnitude of postprandial lipemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(5):1449-53.

- 
- [107] Gugliucci A. Activation of paraoxonase 1 is associated with HDL remodeling ex vivo. *Clin Chim Acta*. 2014;429:38-45.
- [108] Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta*. 2015;439: 5-13.
- [109] Riwanto M, Rohrer L, von Eckardstein A, Landmesser U. Dysfunctional HDL: from structure-function-relationships to biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:337-66.
- [110] Spady DK, Woollett LA, Dietschy JM. Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids. *Annu Rev Nutr*. 1993;13:355-81.
- [111] Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T, Nagai R, Kitamura T, Hirata Y. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(4):H1770-6.
- [\*] Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.



## ANEXOS

### ANEXO I

#### Características de las apolipoproteínas que conforman las HDL

Apo	P.M.	Localización	Sitio de síntesis	Función
A-I	29,016	HDL, Qm	- Intestino - Hígado	Componente fundamental de las HDL, activador de LCAT, estimula la salida del colesterol. Ligando de sitios de unión a HDL (SR-BI y ABCA1, entre otros).
A-II	14,414	HDL	- Intestino - Hígado	Principal proteína componente de las HDL, inhibidor de LH, ligando de sitios de unión a HDL.
A-IV	44,465	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de la LPL y estimula la salida de colesterol.
C-I	6,630	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de triacilgliceroles.
C-II	8,900	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de triacilgliceroles.
C-III	8,800	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibidor de la LPL, inhibición de la captación hepática de triacilgliceroles.
E	34,145	VLDL, HDL	Hígado	Ligando de receptores Apo-E, movilización de colesterol presente en el citoplasma de macrófagos, estimula la salida de colesterol.

P.M.: Peso molecular, Lp: Lipoproteína, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina colesterol acil transferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

## ANEXO II

### Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas

Nombre	Origen	Función
<b>LCAT</b>	Hepático	Cataliza la transferencia de un ácido graso derivado de la lecitina o fosfatidilcolina al colesterol libre presente en HDL y LDL. De igual manera favorece la maduración de HDL en la formación de ésteres de colesterol.
<b>LH</b>	Hepático	Hidroliza triacilgliceroles y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL, además de ser cofactor de SRBI para procesos de captación selectiva, así como generación de Apo A-I libre de lípidos.
<b>LPL</b>	a) Tejido adiposo y muscular b) Pared endotelial c) Pulmón	Hidroliza triacilgliceroles de VLDL y Qm a través de C-II como activador; asimismo, favorece la generación de precursores de HDL.
<b>CETP</b>	a) Tejido adiposo b) Hepático c) Intestino delgado	Intercambia ésteres de colesterol por triacilgliceroles entre las HDL2 y lipoproteínas que contienen Apo B.
<b>Receptores y proteínas de membrana</b>		
<b>SR-BI</b>	a) Hepatocito b) Tejido esteroideogénico	Receptor para HDL, con acción de intercambio de colesterol entre las células y HDL.
<b>ABCA-1</b>	a) Hígado b) Macrófagos c) Intestino	Transportador de la salida de colesterol y fosfolípidos. Además, favorece la maduración de HDL.
<b>Apo-B/E r</b>	Hígado	Receptor para lipoproteínas que contienen Apo B y E. De la misma manera, incrementa la salida de colesterol a través de la vía biliar.

LCAT: Lecitina: colesterol acil transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoproteica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger clase B tipo I, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1; Apo-B/E r: Receptor para lipoproteínas que contienen Apo B y E.

## ANEXO III

### Referencias bibliográficas tabla 2

En orden de aparición

- [] Alcalá-Díaz JF, Delgado-Lista J, Pérez-Martínez P, García-Ríos A, Marín C, Quintana-Navarro GM, Gómez-Luna P, Camargo A, Almaden Y, Caballero J, Tinahones FJ, Ordovas JM, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Hypertriglyceridemia influences the degree of postprandial lipemic response in patients with metabolic syndrome and coronary artery disease: from the CORDIOPREV study. *PLoS One*. 2014;9(5):e96297.
- [] Dekker MJ, Wright AJ, Mazurak VC, Graham TE, Marangoni AG, Robinson LE. New oral fat tolerance tests feature tailoring of the polyunsaturated/saturated fatty acid ratio to elicit a specific postprandial response. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(6):1073-81. Erratum in: *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008;33(1):230.
- [] Larsen MA, Goll R, Lekahl S, Moen OS, Florholmen J. Delayed clearance of triglyceride-rich lipoproteins in young, healthy obese subjects. *Clin Obes*. 2015;5(6):349-57.
- [] Shannon KA, Shannon RM, Clore JN, Gennings C, Warren BJ, Potteiger JA. Aerobic exercise alters postprandial lipemia in African American versus White women. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2008;18(1):37-48.
- [] Allen E, Gray P, Kollias-Pearson A, Oag E, Pratt K, Henderson J, Gray SR. The effect of short-duration sprint interval exercise on plasma postprandial triacylglycerol levels in young men. *J Sports Sci*. 2014;32(10):911-6.
- [] Ogita K, Ai M, Tanaka A, Ito Y, Hirano T, Yoshino G, Shimokado K. Serum concentration of small dense low-density lipoprotein-cholesterol during oral glucose tolerance test and oral fat tolerance test. *Clin Chim Acta*. 2008;387(1-2):36-41.
- [] Weiss EP, Fields DA, Mittendorfer B, Haverkort MA, Klein S. Reproducibility of postprandial lipemia tests and validity of an abbreviated 4-hour test. *Metabolism*. 2008;57(10):1479-85.
- [] Saxena R, Madhu SV, Shukla R, Prabhu KM, Gambhir JK. Postprandial hypertriglyceridemia and oxidative stress in patients of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Clin Chim Acta*. 2005;359(1-2):101-8. Erratum in: *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):203. Prabhu, Keshav M [corrected to Prabhu, Krishna M].
- [] Jang Y, Kim JY, Kim OY, Lee JE, Cho H, Ordovas JM, Lee JH. The -1131T-->C polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with postprandial hypertriglyceridemia; elevated small, dense LDL concentrations; and oxidative stress in non-obese Korean men. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(4):832-40.
- [] Noguchi K, Hirota M, Miyoshi T, Tani Y, Noda Y, Ito H, Nanba S. Single administration of vildagliptin attenuates postprandial hypertriglyceridemia and endothelial dysfunction in normoglycemic individuals. *Exp Ther Med*. 2015;9(1):84-88.
- [] Tiihonen K, Rautonen N, Alhoniemi E, Ahotupa M, Stowell J, Vasankari T. Postprandial triglyceride response in normolipidemic, hyperlipidemic and obese subjects - the influence of polydextrose, a non-digestible carbohydrate. *Nutr J*. 2015;14:23.
- [] Alsema M, Schindhelm RK, Dekker JM, Diamant M, Nijpels G, Teerlink T, Scheffer PG, Kostense PJ, Heine RJ. Determinants of postprandial triglyceride and glucose responses after two consecutive fat-rich or carbohydrate-rich meals in normoglycemic women and in women with type 2 diabetes mellitus: the Hoorn Prandial Study. *Metabolism*. 2008;57(9):1262-9.
- [] Almeda-Valdes P, Cuevas-Ramos D, Mehta R, Muñoz-Hernández L, Cruz-Bautista I, Pérez-Mendez O, Tusie-Luna MT, Gómez-Pérez FJ, Pajukanta P, Matikainen N, Taskinen MR, Aguilar-Salinas CA. Factors associated with postprandial lipemia and apolipoprotein A-V levels in individuals with familial combined hyperlipidemia. *BMC Endocr Disord*. 2014;14:90.
- [] Hall WL, Iqbal S, Li H, Gray R, Berry SE. Modulation of postprandial lipaemia by a single meal containing a commonly consumed interesterified palmitic acid-rich fat blend compared to a non-interesterified equivalent. *Eur J Nutr*. 2016. [Epub ahead of print] PubMed PMID:27511058.
- [] Cazeau RM, Rauch L, Huang H, Bauer JA, Hoffman RP. Increased Pre- and Post-Meal Free Fatty Acid Levels in Black, Obese Adolescents. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016;14(7):340-6.
- [] Bae JH, Bassenge E, Kim KB, Kim YN, Kim KS, Lee HJ, Moon KC, Lee MS, Park KY, Schwemmer M. Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis*. 2001;155(2):517-23.
- [] Matikainen N, Björnson E, Söderlund S, Borén C, Eliasson B, Pietiläinen KH, Bogl LH, Hakkarainen A, Lundbom N, Rivellese A, Riccardi G, Després JP, Alméras N, Holst JJ, Deacon CF, Borén J, Taskinen MR. Minor Contribution of Endogenous GLP-1 and GLP-2 to Postprandial Lipemia in Obese Men. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145890.
- [] Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño M, Valdivielso P, Tinahones FJ, Cardona F. Effect of apolipoprotein C3 and apolipoprotein A1 polymorphisms on postprandial response to a fat overload in metabolic syndrome patients. *Clin Biochem*. 2010;43(16-17):1300-4.
- [] de Ugarte MT, Portal VL, Dias AA, Schaan BD. Metabolic response to oral lipid overload in diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;69(1):36-43.

- [] Tired L, Gerdes C, Murphy MJ, Dallongeville J, Nicaud V, O'Reilly DS, Beisiegel U, De Backer G. Postprandial response to a fat tolerance test in young adults with a paternal history of premature coronary heart disease - the EARS II study (European Atherosclerosis Research Study). *Eur J Clin Invest*. 2000;30(7):578-85.
- [] Dallongeville J, Harbis A, Lebel P, Defoort C, Lairon D, Fruchart JC, Romon M. The plasma and lipoprotein triglyceride postprandial response to a carbohydrate tolerance test differs in lean and massively obese normolipidemic women. *J Nutr*. 2002;132(8):2161-6.
- [] Matikainen N, Mänttari S, Westerbacka J, Vehkavaara S, Lundbom N, Yki-Järvinen H, Taskinen MR. Postprandial lipemia associates with liver fat content. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3052-9.
- [] Minicocci I, Tikka A, Poggiogalle E, Metso J, Montali A, Ceci F, Labbadia G, Fontana M, Di Costanzo A, Maranghi M, Rosano A, Ehnholm C, Donini LM, Jauhiainen M, Arca M. Effects of angiopoietin-like protein 3 deficiency on postprandial lipid and lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 2016;57(6):1097-107.
- [] Zemánková K, Mrázková J, Piňha J, Kovář J. The effect of glucose when added to a fat load on the response of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and apolipoprotein B-48 in the postprandial phase. *Physiol Res*. 2015;64Suppl3:S363-9.
- [] Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002;106(10):1211-8.
- [] Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2010;362(12):1082-9.
- [] Maraki M, Aggelopoulou N, Christodoulou N, Katsarou C, Anaplotis P, Kavouras SA, Panagiotakos D, Sidossis LS. Validity of abbreviated oral fat tolerance tests for assessing postprandial lipemia. *Clin Nutr*. 2011 Dec;30(6):852-7.
- [] Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):475-83.
- [] Carstensen M, Thomsen C, Hermansen K. Incremental area under response curve more accurately describes the triglyceride response to an oral fat load in both healthy and type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. 2003;52(8):1034-7.
- [] Cortés B, Núñez I, Cofán M, Gilbert R, Pérez-Heras A, Casals E, Deulofeu R, Ros E. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(8):1666-71.
- [] Karrasch T, Leszczak S, Bala M, Ober I, Martin J, Schmid A, Kopp A, Schaffler A. Short-term regulation of Visfatin release in vivo by oral lipid ingestion and in vitro by fatty acid stimulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(2):126-34.
- [] Parhofer KG, Barrett PH, Schwandt P. Atorvastatin improves postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4224-30.
- [] Jackson KG, Walden CM, Murray P, Smith AM, Lovegrove JA, Minihane AM, Williams CM. A sequential two meal challenge reveals abnormalities in postprandial TAG but not glucose in men with increasing numbers of metabolic syndrome components. *Atherosclerosis*. 2012;220(1):237-43.
- [] Dong H, Rendeiro C, Kristek A, Sargent LJ, Saunders C, Harkness L, Rowland I, Jackson KG, Spencer JP, Lovegrove JA. Addition of Orange Pomace to Orange Juice Attenuates the Increases in Peak Glucose and Insulin Concentrations after Sequential Meal Ingestion in Men with Elevated Cardiometabolic Risk. *J Nutr*. 2016;146(6):1197-203.
- [] Fogarty CL, Nieminen JK, Peräneva L, Lassenius MI, Ahola AJ, Taskinen MR, Jauhiainen M, Kirveskari J, Pussinen P, Hökkö S, Mäkinen VP, Gordin D, Forsblom C, Groop PH, Vaarala O, Lehto M. High-fat meals induce systemic cytokine release without evidence of endotoxemia-mediated cytokine production from circulating monocytes or myeloid dendritic cells. *Acta Diabetol*. 2015;52(2):315-22.
- [] Cajka T, Davis R, Austin KJ, Newman JW, German JB, Fiehn O, Smilowitz JT. Using a lipidomics approach for nutritional phenotyping in response to a test meal containing gamma-linolenic acid. *Metabolomics*. 2016;12:127.
- [] Correa CS, Teixeira BC, Cobos RC, Macedo RC, Kruger RL, Carteri RB, Radaelli R, Gross JS, Pinto RS, Reischak-Oliveira A. High-volume resistance training reduces postprandial lipaemia in postmenopausal women. *J Sports Sci*. 2015;33(18):1890-901.

## ANEXO IV

### Determinación de proteínas por el método de Lowry

(Lowry OH, 1951) \*

#### FUNDAMENTO

En medio alcalino los aminoácidos de las proteínas se unen a los iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), formando un complejo azul, que absorbe a 750 nm. La sensibilidad de esta coloración incrementa al adicionar el reactivo de Folin Ciocalteu. El uso de SDS como detergente permite exponer las zonas hidrófobas de las proteínas.

#### Soluciones

Solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :	al 20 % en $\text{H}_2\text{O}$
Solución de Tartrato de sodio y potasio:	1 g + 0.5 g $\text{CuSO}_4$
Solución de NaOH 0.8 M:	16 g en 500 mL $\text{H}_2\text{O}$
Solución de SDS	al 10 % en $\text{H}_2\text{O}$
Solución patrón de albúmina:	1 mg/ml

#### Solución A (preparar al momento)

1 volumen de Tartrato de Na y K	1 volumen de $\text{Na}_2\text{CO}_3$
2 volúmenes de NaOH	2 volúmenes de SDS
2 volúmenes de $\text{H}_2\text{O}$	

#### TÉCNICA

##### CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
Muestra ( $\mu\text{l}$ )	0	0	0	0	0	0	20
Estándar ( $\mu\text{l}$ )	0	10	20	40	80	100	0
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	100	90	80	60	20	0	80

Agregar 1 ml de solución A y mezclar las soluciones, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, agregar 500  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Incubar esta mezcla de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se analiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

#### DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia con los datos de la curva patrón. Interpolar la absorbancia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

---

## ANEXO V

### Determinación de la actividad paraoxonasa con fenilacetato

#### Material

- Suero de muestra
- Suero control
- Fenilacetato
- **Buffer ARE 1x: (pH 8.0)**
  - Tris 20 mM - 0.315 g
  - CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM - 0.010 g
  - H<sub>2</sub>O - 100 ml

#### Procedimiento:

1.- Preparar buffer ARE 1x:

1 ml de buffer ARE 10x + 9 ml de ddH<sub>2</sub>O.

2.- Agregar 1.27 µl de fenilacetato a los 10 ml de buffer ARE 1x. Esperar 30 minutos en frío.

3.- Preparar dilución con el suero y ARE 1x en una proporción de:

- Muestra 1:8
- Control proporción 1:4

#### Ejemplo:

50 µl de suero de muestra + 350 µl de buffer ARE 1x.

50 µl de suero control + 150 µl de buffer ARE 1x.

4.- Encender espectrofotómetro a una longitud de onda de 270 nm en intervalos de 180 segundos y oprimir blanco.

5.- Agregar 10 µl de plasma de muestra o control.

6.- Añadir 1 ml de buffer ARE 1x.

7.- Después de 1 minuto hacer la medición.

8.- Repetir la medición por duplicado con cada muestra.

---

## ANEXO VI

### Ultra centrifugación secuencial para obtención y purificación de HDL

#### FUNDAMENTO

✚ El método clásico para la separación de las subfracciones de lipoproteínas es la densidad.

Se utiliza la ultra centrifugación para su separación de otros componentes del plasma, las HDL2 (densidad entre 1,063 y 1,125 g/ml) y las HDL3 (densidad entre 1,125 y 1,210 g/ml). Una clasificación más fina de las HDL en función de su tamaño, las dividen en 5 subclases, HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL 3b y HDL 3c.

#### TÉCNICA

- 1) Se ajusta la densidad de 1 ml de plasma ( $d= 1.005$ ) a una densidad de 1.063 g/ml con bromuro de potasio sólido (KBr).
- 2) Se ultracentrifuga durante 2 horas y 35 minutos a una velocidad de 100,000 r.p.m. En este paso se separan por flotación las lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL, LDL, IDL).
- 3) Se retira el sobrenadante (lipoproteínas que contienen Apo B) y se recupera el sedimento (pellet) del tubo.
- 4) Se cuantifica el volumen recuperado y se ajusta la densidad del plasma a 1.21 g/ml con KBr sólido en un tubo de policarbonato limpio. Se centrifuga a 100,000 r.p.m. por 3 horas y 5 minutos. En estas condiciones se recupera por flotación entre el 80 y 85 % de la apolipoproteína Apo A-I del total del plasma.
- 5) Por último, se ajusta la densidad del sobrenadante con solución de KBr a 1.25 g/ml y se vuelve a centrifugar por 3 horas y 5 minutos a 100,000 r.p.m. para disminuir la cantidad de albúmina residual presente en la muestra.
- 6) De forma posterior al aislamiento, las HDL recuperadas se colocan en membranas de diálisis +Spectrum Labs® para ser dializadas en solución amortiguadora TBE (Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH= 8.4), con el fin de retirar de la muestra el KBr restante.
- 7) Con la muestra purificada, se realiza la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Lowry.

## ANEXO VII

### Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

#### Soluciones

##### Solución amortiguadora de muestra:

Sacarosa 50 % + Azul de bromo-fenol al 0.05 % - c.b.p. 20 ml

**Solución A:** Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3 mM (TBE 1X) pH 8.35

**Solución B:** 48 g acrilamida + 1.28 g bis acrilamida c.b.p. 100 ml

**Solución C:** Per sulfato de amonio 10 %

	<u>3%</u>	<u>30%</u>
volumen total	5 mL	5 ml
Solución A	500 µL	500 µL
Solución B	300 µL	3 ml
H <sub>2</sub> O destilada	4.2 mL	750 µL
Glicerol	-----	750 µL
TEMED	4 µL	4 µL
Solución C	20 µL	20 µL

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 vierte entre las placas para formar el gel en presencia de los catalizadores (TEMED y per sulfato de amonio, solución C).

**Una vez polimerizado el gel, se “pre - corre” 15 minutos a 60 V para estabilizarlo.**

A continuación, se cargan las muestras de la siguiente manera:

- 1) Depositar 25 µg de proteína HDL con 3 µl de amortiguador de muestra en cada carril.
- 2) Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

La separación electroforética se realiza primero durante 30 minutos a 90 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este periodo, la separación se continua durante 22 horas a 180 V. Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda y se tiñe según el método seleccionado (proteína o lípidos).



## ANEXO VIII

### Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de HDL en fase semisólida (sobre gel PAGE)

Todos los geles junto con la mezcla de reacción se incuban durante 45 minutos a 37° C protegido de la luz, se limpian (enjuagan) en PBS con gran cuidado transcurrido el tiempo y se escanean. Después de la decoloración de la tinción de lípidos con una mezcla de ácido acético/metanol, los geles se tiñen para proteína con una solución de colorante azul de coomassie R250 al 0.1 % en metanol 25 %, ácido acético 10 % y agua. El producto de todas las reacciones precipita en los geles y se analiza por densitometría óptica.

#### Reactivo para colesterol total y colesterol esterificado

Reactivo	Concentración	
	Colesterol total	Colesterol libre
Solución Salina Isotónica (0.9%)	7456 µl	7474 µl
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µl	1000 µl
Solución Stock (Calato de sodio 3 mM y tritón de sodio al 0.1%)	500 µl	500 µl
Carboximetilcelulosa*	120 mg	120 mg
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 minutos antes de aplicar la mezcla en el gel).		
<b>**Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM</b>	400 µL	400 µL
<b>**Fenazin meta sulfato (FMS) 0.04 mM</b>	600 µL	600 µL
**Agregar hasta el momento del uso del reactivo, homogeneizando vigorosamente.		

✚ **Reactivo para triacilgliceroles y fosfolípidos**

Reactivo	Concentración	
	Triglicéridos	Fosfolípidos
<b>Solución salina isotónica (0.9%)</b>	5500 µl	5500 µl
<b>Buffer PBS 10X (100 mM) pH=7.4</b>	1000 µl	1000 µl
<b>Carboximetilcelulosa*</b>	120 mg	120 mg
<b>Lipasa (37.5 µU/ml)</b>		
<b>Glicerol cinasa (0.1µU/ml)</b>	Reactivo comercial	—
<b>Glicerol -3-fosfato oxidasa (0.4 µU/ml)</b>	2500 µl	
<b>Peroxidasa (0.13 µU/ml)</b>		
<b>ATP (0.25 µmol/L)</b>		
<b>Fosfolipasa D (0.12 µU/MI)</b>		
<b>Colina Oxidasa (62 µU/ml)</b>	—	Reactivo Comercial
<b>Peroxidasa (1.1 µU/ml)</b>		2500 µl
<b>Amino piridina (0.24 mmol/ml)</b>		
<b>N-etil-N-DAOS (0.77 mmol/ml)</b>		
* Mezclar hasta homogenizar sin dejar (añadir aprox. 15 minutos antes de aplicar la mezcla en el gel).		
<b>**Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM</b>	400 µl	400 µl
<b>**Fenazin meta sulfato (FMS) 0.04 mM</b>	600 µl	600 µl
**Agregar hasta el momento del uso del reactivo, homogeneizando vigorosamente.		

✚ Colocar reactivo sobre el gel homogéneamente. Incubar 45 minutos a 37° C protegido de la luz.

**Determinación de lípidos en las subclases**

**Colesterol total**

La tinción del colesterol total en gel se obtiene de acuerdo con métodos de nuestro laboratorio. Se utiliza una mezcla enzimática compuesta de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4. Conjuntamente, se agrega colato de sodio 3 mM y Tritón 100X al 0.1 % para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas.

---

Para garantizar un contacto homogéneo del reactivo con la superficie del gel y evitar la difusión de los reactivos y productos de reacción, se emplea como agente viscosante, carboximetilcelulosa al 1.4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas, es estequiométricamente proporcional al colesterol total en la muestra. Para poner en evidencia el colesterol se utiliza peroxidasa, azul de tetrazolium (MTT), y fenazina metasulfato (FMS) como donadores de electrones.

### **Colesterol libre y colesterol esterificado**

Se utiliza el mismo procedimiento de la determinación de colesterol total, con la excepción de la enzima colesterol esterasa para garantizar la cuantificación específica del colesterol libre. El colesterol esterificado se calcula por la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.

### **Triacilglicerolos (triglicéridos)**

Se emplea una mezcla enzimática compuesta de lipasa, glicerol cinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, ATP 1 mM, colato de sodio 3 mM y Tritón 100X al 0.1%; además se agrega el agente viscosante. Para poner en evidencia el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se utiliza MTT y FMS.

### **Fosfolípidos**

Para realizar la detección selectiva de fosfatidilcolina sobre el gel se emplea una mezcla enzimática compuesta de fosfolipasa D y colina oxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, colato de sodio 3 mM y Tritón 100X al 0.1 %. Se agrega conjuntamente el agente viscosante. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas se pone en evidencia con peroxidasa, MTT y FMS.

---

## **ANEXO IX**

### **Ensayos de abundancia de ARNm**

Para determinar la abundancia de los mensajeros del ARN, se utilizó la técnica de RT-PCR. La extracción de ARN total se llevó a cabo a partir de tejido de aorta torácica de rata Wistar incubadas durante 4 horas con HDL de diferentes tiempos tanto en ayuno como postprandio.

#### **A) Extracción y visualización de ARN total**

- Trizol (Invitrogen)
- Cloroformo (SIGMA)
- Etanol (SIGMA)
- Dietilpirocarbonato (DEPC) (SIGMA)
- Gel de agarosa al 1.5 % (0.3 gr/20 ml de agua bidestilada con DEPC 0.1 %)
- Solución de Tris-boratos (10X) (Ácido bórico 900 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 900 mM, agua bidestilada c.b.p 1000 ml y ajustar el pH a 8.3)
- Solución de carga de ARN 10X (MOPS 10X, 95 % formamida, SDS 0.25%, azul de bromo fenol 0.025%, bromuro de etidio 0.025 %)
- Bromuro de etidio (10 mg/ ml de agua bidestilada) (SIGMA)

#### **B) Retro transcripción y PCR en tiempo real**

- Retro transcriptasa reversa del virus M-MVL RT (Invitrogen)
- Oligo dT (Invitrogen)
- Solución TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)
- Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (200  $\mu$ M, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Invitrogen)
- Cloruro de magnesio ( $Cl_2Mg$ ) (SIGMA)
- Sondas TaqMan marcadas en el extremo 5' con el fluoro cromo-FAM (Nos3 Rn 02132634\_s1; Scarb1 Rn01481225\_m1; Pdzk1 Rn00668935\_m1, Applied Biosystem)
- Sonda del gen de referencia Gapdh Rn 99999916\_s1 marcada con fluoro cromo-FAM (Applied Biosystem)