



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Estructura y funcionalidad de las lipoproteínas de alta densidad en pacientes  
con diabetes mellitus tipo 2 después del tratamiento con estatinas”**

**TESIS**

Que para optar por el grado de

**Doctor en Ciencias Médicas**

**PRESENTA**

Linda Liliana Muñoz Henandez

**TUTOR**

Dr. Carlos A. Aguilar Salinas

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

**COMITÉ TUTOR**

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Dr. Oscar Pérez Méndez

Instituto Nacional de Cardiología

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Diciembre 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.

## CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO
2. LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.
3. HDL: ESTRUCTURA, METABOLISMO Y SUS FUNCIONES
4. DISLIPIDEMIA DEL PACIENTE CON DM 2
5. DISFUNCIONALIDAD DE HDL EN PACIENTES CON DM 2
6. ESTATINAS. MECANISMO DE ACCIÓN. ESTUDIOS DE INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS HDL DESPUES DEL TRATAMIENTO CON HIPOLIPEMIANTES
7. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
8. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN
9. HIPÓTESIS DE TRABAJO
10. OBJETIVOS
  - a. Objetivo general
  - b. Objetivos específicos
11. DISEÑO DEL ESTUDIO
  - a. Tipo de estudio
  - b. Variables de medición
  - c. Cálculo de Tamaño de muestra y análisis estadístico
  - d. Metodología y logística.
12. RESULTADOS
13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES
14. ANEXOS. PROTOCOLO PARA MEDIR FLUJO EN REVERSA DE COLESTEROL

## RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) es una condición clínica con alta prevalencia en México y es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECA), que a su vez está considerada una de las primeras causas de mortalidad alrededor del mundo.

Un factor determinante y obligado para el desarrollo de enfermedad aterosclerótica es la dislipidemia, particularmente la presencia de concentraciones altas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que están contenidas principalmente, aunque no únicamente en el colesterol-LDL. La oxidación de las LDL en el endotelio da origen a las células espumosas y eventualmente a una placa de ateroma.

La dislipidemia típica de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, es un fenotipo caracterizado por una concentración moderadamente alta de triglicéridos, bajas concentraciones de colesterol HDL (C-HDL) y la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas; existe evidencia suficiente, de que estas últimas tienen particular susceptibilidad de adherirse al endotelio y oxidarse.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) juegan un papel relevante para frenar la aterogénesis, al participar en el primer paso de un mecanismo llamado transporte en reversa del colesterol, que tiene por objetivo llevar el colesterol desde las células periféricas, incluido el endotelio, hacia el hígado. En este primer paso, llamado flujo en reversa de colesterol, las HDL maduras actúan como aceptores del colesterol, recibéndolo a través de varios receptores como los ABCA-1, ABCG, SRB-1, pero también por un mecanismo independiente de receptores llamado difusión pasiva.

Actualmente las estrategias para disminuir el riesgo de ECA, están dirigidas a disminuir la concentración de colesterol LDL (C-LDL), pues esta medida ha mostrado ser efectiva. Sin embargo, pacientes de riesgo alto con C-LDL en concentraciones consideradas como óptimas siguen presentando una incidencia de eventos coronarios varias veces mayor a la de la población de bajo riesgo, lo que se ha denominado riesgo residual, esto sugiere que disminuir las concentraciones de C-LDL si bien es efectivo, no es suficiente.

Diversos estudios epidemiológicos con alto nivel de evidencia han mostrado que las concentraciones bajas de C-HDL son un factor de riesgo cardiovascular independiente.

Interesantemente, la asociación negativa entre las concentraciones de C-HDL y riesgo cardiovascular, dista de ser perfecta cuando se aplica a un nivel individual, ya que pacientes con concentraciones normales de C-HDL presentan eventos ateroscleróticos y viceversa. De esta discrepancia, surgió la hipótesis de que eran las actividades biológicas intrínsecas de las HDL más que la concentración sanguínea de C-HDL, lo que explica sus efectos ateroprotectores. Un ejemplo de esto, son sujetos con concentraciones bajas o muy bajas de C-HDL debido a condiciones genéticas (variantes genéticas en ABCA-1, deficiencia de LCAT, entre otras) sin

riesgo cardiovascular incrementado, lo opuesto también se ha observado, ya que no en todos los casos, sujetos con concentraciones muy altas de C-HDL muestran menor incidencia de ECA. Actualmente se considera que la relación entre C-HDL y eventos cardiovasculares tiene una relación en U, pues también concentraciones muy altas de C-HDL se han asociado a un incremento del riesgo de ECA.

Surgió así una interesante línea de investigación orientada a explorar la estructura y actividades biológicas de las HDL, como propiedades antioxidantes, antitrombóticas, antiinflamatorias, en la función endotelial, inmunidad, coagulación y homeostasis de la glucosa. A la par de estos hallazgos, también se observó que estas propiedades pueden estar disminuidas ante ciertas condiciones, todas ellas caracterizadas por un estado inflamatorio de bajo grado sostenido, como la obesidad, diabetes e incluso algunas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide. Este estado inflamatorio de bajo grado condiciona que las HDL cambien su fenotipo ateroprotector hacia uno inflamatorio.

Por otro lado, las estatinas son los fármacos de primera línea para el manejo de hipercolesterolemia y disminución del riesgo de ECA. El mecanismo de acción de las estatinas consiste en inhibir la acción de la enzima hidroximetil-CoA reductasa, bloqueando de esta manera un paso temprano en la síntesis de colesterol. Como clase, las estatinas tienen la capacidad de disminuir las concentraciones de colesterol total, así como el C-LDL, y aunque está descrito que aumentan las concentraciones de C-HDL en forma discreta (hasta 10%), estudios recientes han encontrado que simvastatina y atorvastatina pueden disminuir el C-HDL hasta en 3%. Atorvastatina es una estatina liposoluble de las más prescritas en México y EUA.

Existen estudios que han evaluado el efecto del tratamiento hipolipemiente sobre la función y estructura de las HDL, esencialmente con estatinas y fibratos. Algunos de estos estudios incluyen pacientes con DM 2 y los resultados han sido controversiales, indicando en algunos casos, que actividades biológicas como el flujo en reversa del colesterol puede mejorar, y en otros casos, efectos nulos sobre las diversas propiedades de las HDL.

Esta investigación se centró en estudiar el efecto de dosis moderada de atorvastatina (20 mg por 10 semanas) sobre la capacidad de flujo en reversa de colesterol desde macrófagos. Además, evaluó si existen cambios en la composición de lípidos y proteínas después del tratamiento por 10 semanas con atorvastatina, mediante el análisis de los componentes bioquímicos de las HDL aisladas a partir de una ultracentrifugación única por gradiente de potasio. Conocer el efecto que tienen las estatinas, sobre estas características, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, ayudará a comprender mejor la fisiopatología de las HDL disfuncionales asociadas a esta enfermedad. Ampliar el conocimiento de esta línea de investigación, puede ayudar a generar potenciales blancos terapéuticos que permitan retrasar o evitar las complicaciones derivadas de la ECA.

## LAS HDL COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

La ECA es la causa principal de mortalidad en países industrializados y la Diabetes Mellitus tipo 2 se considera un equivalente de ésta. En las últimas décadas, los estudios epidemiológicos han mostrado que la desproporción entre las lipoproteínas aterogénicas y ateroprotectoras es uno de los principales contribuyentes hacia la aterosclerosis, de lo cual surgió el concepto hasta hoy vigente de que el aumento en las concentraciones séricas del colesterol LDL (C-LDL) y la disminución del colesterol HDL (C-HDL) son dos factores de riesgo cardiovascular independientes [1]

La asociación del C-HDL como factor de riesgo negativo para ECA se ha comprobado en importantes estudios epidemiológicos en poblaciones a gran escala, sin embargo, a nivel individual, el valor predictivo de un valor sérico de colesterol HDL es difícil de aplicar y ha sido cuestionado debido a los siguientes factores: 1. Pacientes con niveles normales de C-HDL presentan enfermedad cardiovascular, el estudio Framingham, uno de los pioneros en describir la asociación inversa entre los niveles séricos del C-HDL y el riesgo cardiovascular, a lo largo de su seguimiento evidenció que hasta 40% de pacientes con concentraciones normales de C-HDL presentan enfermedad coronaria; 2. Falla de los nuevos fármacos dirigidos a aumentar la concentración de C-HDL para lograr una disminución de eventos clínicos ateroscleróticos a pesar de que cumplen con su objetivo de incrementar las concentraciones séricas de este tipo de colesterol[2][3]; 3. No todas las mutaciones con pérdida parcial de la función del gen ABCA1 (que codifica para la proteína del mismo nombre y que es un transportador que juega un papel esencial para el ensamblaje de las HDL y el adecuado funcionamiento del mecanismo de transporte en reversa del colesterol ) se asocian a riesgo cardiovascular, pese a que condicionan concentraciones séricas disminuidas de C-HDL, lo mismo se puede decir para otras mutaciones que provocan un nivel de colesterol HDL bajo; y 4. Falta de evidencia sólida de que un manejo dirigido a aumentar las concentraciones de colesterol HDL como complemento del manejo actual que se basa sólo en las concentraciones de C-LDL mejore o disminuya la incidencia de eventos ateroscleróticos clínicos, no obstante de lograr disminuir la severidad de algunos subrogados clínicos como el engrosamiento de la íntima carotídea y 5.- Algunos estudios han encontrado un aumento del riesgo de ECA en pacientes con C-HDL mayor a 70 mg /dL[4][5]. De estas observaciones se introdujo el concepto que existen factores adicionales a la concentración sérica del C-HDL que intervienen para que las HDL protejan a ciertos individuos de la aterosclerosis y que la relación entre riesgo cardiovascular y C-HDL tiene una relación en U[6][7]

## ESTRUCTURA Y METABOLISMO Y FUNCIONES

Las HDL son una mezcla compleja de macromoléculas con densidades que van del rango de 1.063 a 1.21 g/mL. Según la composición de lípidos, pueden ser discoides o esféricas (también llamadas HDL nacientes o HDL maduras, respectivamente). La forma madura, contiene 45-55% (el % representando masa) de proteínas, de las cuales la principal es la apo A-I, 26 a 32% de fosfolípidos, 15-20% de colesterol esterificado, 3-5% de colesterol libre y aproximadamente 5% de triglicéridos<sup>9</sup>. Su heterogeneidad estructural, fisicoquímica y capacidad de migración en geles de electroforesis, así como las diversas técnicas de aislamiento, ha condicionado las diferentes clasificaciones de esta lipoproteína[8]

La apoproteína A-I, componente esencial de las HDL tiene un papel central en la biogénesis y función de las HDL. La apo A-I contiene 22- y 11- aminoácidos repetidos, los cuales, según estudios de cristalografía de rayos x y fisicoquímicos, están organizados en  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Cuando las HDL nacientes son esterificadas por la enzima lecitin:colesterol-aciltransferasa (LCAT) se convierten a su forma esférica y la estructura de la apoA-I cambia para adaptarse a esta nueva superficie, sus dominios  $\alpha$ -hélice son los que le dan la propiedad de unión a lípidos. Los estudios in vitro, así como modelos animales, muestran que la biogénesis de las HDL ocurre a través de una vía compleja que incluye al transportador de lípidos ABCA1 (ATP-binding cassette) y a la LCAT.[9][10]

Durante la formación de una HDL, el paso inicial comienza con la producción de la apoA-I en el hígado (70%) y en el intestino (30%), la cual interactúa con el transportador ABCA-1 (que es activado por medio del receptor hepático C, llamado LXR, a través de los oxisteroles), lo que le permite adquirir colesterol y fosfolípidos, formándose así una HDL pobremente lipidada, con una forma discoidea que conforme va adquiriendo lípidos a través de la LCAT, se convierte en su forma madura, esférica. Tanto la forma esférica como helicoidal de las HDL, interactúan con el receptor scavenger clase B tipo 1 (SR-BI), también conocido como receptor de HDL para su depuración[10]

Estudios recientes de proteómica han identificado hasta 75 proteínas distintas asociadas con las HDL aisladas por medio de ultracentrifugación, la mayoría de ellas apolipoproteínas y enzimas (ver cuadro 1)[11][12] De forma interesante, la abundancia plasmática de la mayoría de estas proteínas es insuficiente para permitir una copia por cada partícula de HDL, lo que sugiere que existen proteínas específicas que pueden estar unidas a diferentes sub-poblaciones de la partícula y que están distribuidas en el espectro de densidad de las HDL. El potencial para considerar que existen diferentes sub-poblaciones de las partículas es consistente con el hecho de que las HDL ejercen múltiples actividades biológicas. Hasta ahora no están claros los mecanismos que dirigen la segregación de las proteínas de las HDL entre las sub-partículas, aunque dos posibilidades incluyen interacciones específicas proteína:proteína en la superficie de la partícula, o la atracción de ciertas proteínas a una partícula de características biofísicas particulares. Datos de Davidson y col apoyan el concepto de que las HDL pueden servir como

una plataforma para el ensamblaje de ciertos componentes de proteínas, los cuales tienen funciones específicas, mientras que las apolipoproteínas forman la base de la heterogeneidad funcional de las HDL[13][14]

### *Lipidoma de las HDL*

Los fosfolípidos constituyen la principal clase de lípidos de las HDL, formando la monocapa de lípidos y confiriendo una estructura específica a la partícula. Predominan en el lipidoma constituyendo el 50% del peso total de todos los lípidos. Fosfatidilcolina y esfingomielina predominan como las clases principales de fosfolípidos, pero además las HDL contienen cantidades significativas de fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamida, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ceramida y otros fosfolípidos menores

Otros lípidos que forman parte del lipidoma de las HDL son los esteroides, que también se localizan en la monocapa lipídica y regulan su fluidez, los esteroides son dominados por el colesterol, otros esteroles presentes, aunque en cantidades mucho menores son los oxisteroles y estrógenos. Los ésteres de colesteryl son formados como resultado de la trans-esterificación de fosfolípidos y colesterol, mediada por la LCAT y están ubicados en el centro de las HDL's debido a su hidrofobicidad. Los triglicéridos derivan de las lipoproteínas ricas en TG, como resultado de los efectos de la CETP y también se encuentran en el centro de las HDL los triglicéridos son dominados por especies que contienen ácido oleico, palmítico y linoleico. Finalmente la ceramida, aunque está presente en cantidades menores, juega un papel importante como molécula de señalización involucrada en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celular[15][16][17][18]

Las HDL tienen diversas actividades biológicas, la más conocida de ellas, es retirar el exceso de colesterol de los tejidos periféricos y transportarlo al hígado para su catabolismo, proceso conocido como transporte en reversa del colesterol (TRC) y en su primer paso, llamado flujo en reversa de colesterol, las HDL tienen un papel muy importante como aceptores de colesterol, para la remoción de éste de los macrófagos lipidados que se depositan en las lesiones ateroscleróticas de la pared arterial, evitando así la progresión de la lesión[19][20][21]

Se ha evidenciado que las HDL tienen propiedades antioxidantes gracias a la presencia de la ApoA-1. Estudios recientes demuestran que las HDL proporcionan protección directa o indirecta contra la oxidación de las LDL. Estudios in vitro, han mostrado que la ApoA1 hace a las LDL resistentes a la oxidación por la lipoxigenasa, una enzima que participa en la oxidación de ácidos grasos. La presencia de enzimas antioxidantes en las HDL, como la paroxonasa (PON) y el factor de activación de plaquetas acetil-hidrolasa (PAFAH) previenen la biosíntesis de LDL oxidadas. Se ha reportado que las HDL estimulan la sintasa de óxido nítrico endotelial, lo cual disminuye la disfunción endotelial que contribuye en gran medida a la aterogénesis[22][19].

Además, las HDL protegen de la inflamación característica en la patogénesis de la aterosclerosis. En general, las propiedades anti-inflamatorias potentes de las HDL se deben a la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión pro-inflamatorias y estimulación de la expresión de TGF $\beta$ 2 en cultivos de células endoteliales<sup>14</sup>. Además, estudios in vitro muestran que las HDL bloquean la actividad pro-inflamatoria de la proteína C reactiva (PCR), inhiben la producción de prostaglandinas pro-inflamatorias por los monocitos en el sitio de la lesión aterosclerótica y previenen y/o neutralizan los efectos pro-inflamatorios de las LDL's oxidadas en el endotelio. Por otro lado, las HDL's también reducen la producción de proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1). Estudios en ratones con lesiones avanzadas muestran que la sobreexpresión de la apo A-1 y del PAFAH reduce la adhesión de macrófagos a la pared del vaso[23]

Van Lenten y colaboradores, fueron los primeros en identificar que durante la respuesta de fase aguda (RFA) las HDL sufren cambios dramáticos en su función y adquieren un fenotipo pro-inflamatorio[24]. Actualmente, se conoce que enfermedades como la diabetes, obesidad y síndrome metabólico, se caracterizan por tener una respuesta de fase aguda sostenida, a lo cual se le denomina “respuesta de fase aguda crónica”, esto modifica las propiedades anti-inflamatorias que normalmente tienen las HDL. El fenotipo pro-inflamatorio que adquieren, ha sido caracterizado en estudios del grupo de Fogelman, quienes describieron una medida para estimar la capacidad anti-inflamatoria de las HDL, a esta medición la llamaron índice inflamatorio y lo estandarizaron en dos ensayos, uno de ellos, libre de células, mide mediante fluorescencia la oxidación de las LDL en presencia y ausencia de las HDL y el segundo mide la actividad quimiotáctica de monocitos en cultivos de células endoteliales. Una de las aportaciones más interesantes de este grupo, fue discriminar mediante este índice a pacientes con enfermedad cardiovascular (índice inflamatorio pro-aterogénico mayor de 1) de sujetos sanos (índice inflamatorio atero-protector menor de 1). [25][26]

## DISLIPIDEMIA DEL PACIENTE CON DM 2

Los pacientes con diabetes tipo 2, frecuentemente cursan con una dislipidemia que incluye concentraciones altas de triglicéridos, bajas de C-HDL y LDL's pequeñas y densas, y ha este fenotipo se le ha llamado “dislipidemia diabética”[27][28]

La concentración baja de C-HDL está asociada con la presencia de partículas HDL más pequeñas y densas de lo normal. Aunque el mecanismo preciso de las concentraciones bajas de C-HDL no se conoce, hay evidencia de la interacción de una concentración alta de lipoproteínas ricas en triglicéridos con la CETP y la lipasa hepática. La acción de la CETP genera partículas de HDL que están depletadas en esteres de colesterol y enriquecidas en triglicéridos, condicionando HDL's con el sustrato preferencial de la lipasa hepática que hidroliza las HDL, lo que resulta en una disminución del volumen del core de las HDL y por tanto reducción en el tamaño su tamaño lo que conduce a disociación de la ApoA-1. La ApoA-1 disociada puede ser excretada en la orina.

## DISFUNCIONALIDAD DE HDL EN PACIENTES CON DM 2

Existe evidencia del deterioro de algunas de las actividades biológicas de las HDL en presencia de DM 2. Las HDL de pacientes con DM2 y síndrome metabólico tienen una disminución sustancial de los efectos protectores a nivel endotelial comparado con sujetos sanos[29]

El estrés oxidativo elevado, la hiperglucemia y dislipidemia de pacientes con diabetes son factores proaterogénicos ya que incrementan la producción de LDL oxidadas. Kontush y col, mostraron que la actividad antioxidativa de las subfracciones densas, 3b y 3c, de las HDL es significativamente menor en pacientes con diabetes al compararse con controles sanos. En el mismo estudio, encontraron que la actividad de la paraoxonasa 1 estuvo consistentemente baja y se correlacionó positivamente con la actividad antioxidante en las HDL3. Finalmente, la composición química alterada, depleción de ésteres de colesterol y enriquecimiento de triglicéridos, también se correlacionó con una actividad antioxidativa disminuida[30] [31]

Esta evidencia, sugiere que el enriquecimiento de las HDL en TG y depleción de ésteres de colesterol genera cambios conformacionales en la ApoA-1, que en conjunto con la glicación y modificación oxidativa de lípidos, apolipoproteínas y/o enzimas asociadas a las HDL's, conducen a una disminución de sus actividades biológicas, esto hallazgo refuerza la importancia de alcanzar un buen control de la glucosa en estos pacientes[32]

## ESTATINAS. MECANISMO DE ACCIÓN Y ESTUDIOS DE INTERVENCIÓN FARMACOLÓGICA CON ESTATINAS SOBRE LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS HDL.

Los estudios clínicos aleatorizados han mostrado de forma consistente, que los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (estatinas) reducen la incidencia de eventos cardiovasculares[33][34][35] Logran sus efectos al inhibir la enzima 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que impide el paso de Hidroxi-metilglutaril CoA a mevalonato bloqueando así un paso temprano en la síntesis de colesterol.

Los efectos favorables de las estatinas se extienden a un rango de niveles de colesterol LDL sin un umbral inferior de beneficio. Los estudios de imagen han mostrado que los regímenes intensivos con estatinas disminuyen la progresión de la aterosclerosis coronaria y pueden incluso resultar en regresión de la enfermedad en algunos pacientes[36]

De acuerdo con esto, diferentes guías para la prevención de la enfermedad cardiovascular enfatizan que disminuir los niveles de colesterol LDL es la meta primaria de tratamiento y que se puede alcanzar con estatinas como medicamentos de primera línea. En cualquier guía que se revise, los pacientes con DM 2 son candidatos a recibir tratamiento con estatinas después de los 40 años de forma independiente a sus niveles de colesterol [37][38] Las estatinas disponibles

difieren considerablemente en su capacidad para reducir los niveles de lípidos aterogénicos e incrementar los niveles de colesterol HDL, atorvastatina y rosuvastatina son las más efectivas en disminuir los niveles de colesterol LDL (50% y un poco más del 50%, respectivamente)[33]

Respecto a los efectos adversos de las estatinas, el riesgo de miopatía, definido como la aparición de dolor y fatiga muscular, más el aumento de la creatinina fosfocinasa (CPK) a más de 10 veces su valor normal, se presenta en menos del 1% de los pacientes tratados con atorvastatina, aunque con simvastatina el riesgo es un poco mayor. En general, la tasa de eventos adversos, como aquellos relacionados con el músculo, alteraciones cognitivas (principalmente en la memoria) y elevación de enzimas hepáticas, es menor del 5% en la mayoría de los ensayos aleatorizados, aunque en la práctica clínica pueden presentarse hasta en el 20%[39][40]

Uno de los trabajos pioneros en evaluar la funcionalidad de HDL después del tratamiento con estatinas, fue el publicado por Ansell en 2003, que midió las propiedades inflamatorias/anti-inflamatorias de las HDL a través del índice inflamatorio, este índice se determinó al medir la habilidad de las HDL para alterar la actividad quimiotáctica de los monocitos inducida por las LDL en la pared arterial. En este estudio de caso y controles, se le dio al grupo de pacientes con alto riesgo cardiovascular simvastatina 40 mg por 6 semanas. Se encontró un índice inflamatorio en los casos de  $1.38 \pm 0.91$  previo al tratamiento con estatinas, comparado con  $0.38 \pm 0.14$  en el grupo control ( $P = 1.5 \times 10^{-5}$ ). Después del tratamiento con estatinas el índice inflamatorio disminuyó a  $1.08 \pm 0.71$ , sin lograr bajar de 1 (un valor menor a 1 traduce un fenotipo anti-inflamatorio). Interesantemente, las concentraciones de colesterol HDL estuvieron por encima de 50 mg/dL (57 mg/dL y  $61 \pm 14$  mg/dL antes y después del tratamiento con estatinas). El estudio concluyó que el índice inflamatorio distingue con más precisión que las concentraciones de colesterol HDL a sujetos con alto riesgo cardiovascular de sujetos control y que el tratamiento con estatinas corrige, aunque no normaliza dicho índice[41]

El efecto en la capacidad de eflujo de colesterol también ha sido estudiado en pacientes que reciben estatinas. Un estudio que incluyó pacientes con riesgo alto de presentar eventos cardiovasculares valoró el efecto de pravastatina a dosis de 40 mg y atorvastatina a dosis de 10 y 80 mg, en el transporte en reversa de colesterol a partir de la línea celular J774 y con ABCA-1 regulado a la alta, y no encontró diferencias significativas[7]

En México, el grupo de Posadas, reportó en el 2012 los resultados de un estudio que determinó la capacidad de flujo en reversa de colesterol a partir de una línea celular derivada de hepatoma de rata, FUH5, en pacientes de alto riesgo coronario (pertenecientes a la cohorte de pacientes con enfermedad coronaria del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”) en tratamiento con estatinas y con una concentración de C-LDL en un blanco apropiado (menor de 70 mg/dL), pero con colesterol HDL bajo y triglicéridos altos, y los comparó con pacientes en el mismo contexto pero con colesterol HDL y triglicéridos en concentración normal. Los autores encontraron que existe un riesgo residual, manifestado con una capacidad de flujo en reversa de colesterol disminuida entre los pacientes con C-HDL bajo y TG altos, a pesar del manejo con

estatinas y mantener el colesterol LDL debajo de 70 mg/dL. Este riesgo se atribuyó a la presencia de parámetros del síndrome metabólico[42]

En 2014, un grupo holandés, publicó un estudio de diseño cruzado, de 14 hombres con diabetes tipo 2, a los cuales se asignó en forma aleatorizada a recibir simvastatina 40 mg/d o bezafibrato 400mg/d y posteriormente la combinación de ambas. Encontraron un incremento significativo en el flujo en reversa de colesterol a partir de macrófagos TPH-1, al comparar cualquiera de los tratamientos vs placebo[43]

En 2018 se reportó el resultado de un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, acerca de los efectos de pemafibrato (k.877) en flujo en reversa de colesterol y lipemia postprandial. Se aleatorizó 33 pacientes hombres y mujeres post-menopausicas para recibir pemafibrato primero o placebo por 4 semanas y el tratamiento opuesto otras 4 semanas después de un periodo de lavado. Se encontró que el tratamiento con pemafibrato mejoró el flujo en reversa en colesterol desde macrófagos J774 hacia HDL aisladas por ultracentrifugación y que el efecto dependía del cambio en C-HDL y Apo-A1 sericas.[44]

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica representa una de las principales causas mortalidad en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 a pesar de los nuevos enfoques de manejo “multi-dimensional”.

Se ha evaluado en estudios previos si las estatinas mejoran las actividades biológicas de las HDL en pacientes con DM2, sin embargo la literatura es escasa y en algunos casos con resultados contradictorios y limitantes metodológicas. Esto indica que la brecha en el conocimiento del efecto de las estatinas sobre la función y estructura de las HDL es amplia y amerita más estudios.

## JUSTIFICACION

Ampliar el conocimiento de esta línea de investigación, puede generar hipótesis sobre potenciales blancos terapéuticos que ayuden no sólo a optimizar el perfil de lípidos medible en la práctica clínica, sino también a mejorar la función de las lipoproteínas para retrasar o evitar las complicaciones derivadas de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en las funciones de las HDL totales y subfracciones 2b y 3c, medidas por la capacidad de flujo en reversa de colesterol a partir de macrófagos, después del tratamiento de 10 semanas con 20 mg de atorvastatina en pacientes con DM 2?

¿Existen cambios significativos en la composición química de las diferentes subfracciones de la HDL, medidas por la masa y porcentaje de colesterol libre, colesterol esterificado, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas en las subfracciones 2b, 2a, 3a, 3b, y 3 c, después del tratamiento de 10 semanas con 20 mg de atorvastatina en pacientes con DM 2?

## HIPOTESIS DE TRABAJO

La masa, composición química y flujo en reversa de colesterol de las HDL de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mejora después del tratamiento por 10 semanas con 20 mg de atorvastatina.

## OBJETIVOS

### a. Objetivo General

Identificar si existen diferencias significativas en la capacidad de flujo en reversa del colesterol o en la masa o composición química de las HDL de pacientes con DM 2 después de tratamiento por 10 semanas con 20 mg de atorvastatina.

### b. Objetivos específicos

1.- Aislar HDL y subfracciones 2b, 2a, 3a, 3b y 3c a partir del plasma y suero por medio de ultracentrifugación única por gradiente, de pacientes con DM 2 antes y después del tratamiento con 20 mg de atorvastatina por 10 semanas.

2.- Medir la composición química de las subfracciones de las HDL aisladas de suero y una reconstitución de HDL totales, en pacientes con DM 2 antes y después del tratamiento con 20 mg de atorvastatina por 10 semanas.

3.- Medir la capacidad de flujo en reversa de colesterol % a partir de macrófagos derivados de una línea celular de monocitos humanos (TPH-1) hacia las HDL totales y subfracciones 2b y 3c aisladas del plasma, en pacientes con DM 2 antes y después del tratamiento con 20 mg de atorvastatina por 10 semanas

## DISEÑO DEL ESTUDIO

### a) Tipo de estudio

Estudio longitudinal, prospectivo, antes-después, de intervención farmacológica.

### b) Variables de medición

#### **Independiente**

-Tratamiento con atorvastatina 10 semanas.

Definición: prescripción de 20 mg de atorvastatina a pacientes sin uso previo de dicho fármaco, esperando una respuesta clínica, medida como cambios en el perfil de lípidos (las concentraciones de Colesterol total, C-LDL y Apo B)

#### **Dependientes**

-Capacidad de flujo en reversa del colesterol de las HDL.

Definición: flujo de colesterol tritiado desde monocitos THP-1 hacia las HDL-totales y las subfracciones 2b y 3c. Medida en porcentaje.

-Composición química de las HDL.

Definición: Concentración de colesterol libre, colesterol esterificado, proteínas, fosfolípidos y triglicéridos contenidos en las HDL y subfracciones 2b, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 3b, 3c. Medida en mg/dL y porcentajes.

#### **Confusoras**

-Cambios en el peso

Definición: Cambios en el peso corporal como “efecto protocolo”. Medido en kg/m<sup>2</sup>

-Cambios en el control de glucosa

Definición: Cambios en la concentración de glucosa como “efecto protocolo”. Medido mg/dL

-Cambios en perfil de lípidos

Definición: Cambios en el perfil de lípidos como respuesta normal del tratamiento con estatinas.  
Medida en mg/dL

c) Cálculo de Tamaño de muestra

Se calculó de acuerdo con los datos del estudio de Annema, Dullart, 20014<sup>41</sup>, donde se midió el flujo en reversa de colesterol en pacientes con DM2 antes y después de tratamiento con 40mg de simvastatina. De forma basal los pacientes presentaban un promedio de eflujo de  $3.65 \pm 0.65\%$  y después de simvastatina  $4.11 \pm 0.81$

Como variable independiente el tratamiento con atorvastatina y como independiente, la capacidad de eflujo de colesterol%.

Se uso la fórmula para dos medias dependientes

**Estimated sample size for one-sample comparison of mean to hypothesized value**

**Test Ho: m = 3.65, where m is the mean in the population**

**Assumptions:**

alpha = 0.0500 (two-sided)  
power = 0.9000  
alternative m = 4.11  
sd = .81

**Estimated required sample size:**

n = 33

d) Análisis estadístico

1.- Descriptivo

Las variables dimensionales se describieron como media y desviación estándar o mediana y rango intercuartil 25-75, de acuerdo a las pruebas de normalidad que se corrieron en todos los casos.

Las variables no dimensionales se describieron como frecuencia y porcentaje.

2.- Inferencial.

Para variables dimensionales se hicieron pruebas de hipótesis para variables dependientes. EN caso de normalidad de aplicó T pareada y en caso de ausencia de normalidad se aplicó prueba de rangos señalados de Wilcoxon.

Para variables no dimensionales se aplicaron pruebas de X cuadrada de Pearson o prueba exacta de Fisher.

También se hicieron pruebas de correlación entre el flujo en reversa del colesterol y variables previamente asociadas con este desenlace como edad, actividad física, grado de control de diabetes, obesidad, resistencia a insulina y concentración de triglicéridos.

### 3.- Análisis multivariado.

Se buscaron determinantes del flujo en reversa de colesterol por medio de una regresión lineal donde se usaron el flujo en reversa de colesterol de HDL total y flujo en reversa de las subfracciones 3c y 2b como variables dependientes. Como variables independientes se incluyeron todas aquellas que se sabe que pueden afectar el flujo en reversa de colesterol, como actividad física, edad, concentración de triglicéridos, glucosa y hemoglobina glucosilada.

#### e) Metodología

##### 1.- Criterios de inclusión.

-Hombres y mujeres (postmenopaúsicas) con diabetes mellitus tipo 2 por los criterios vigentes de la ADA, sin complicaciones crónicas, sin uso previo de estatinas.

##### 2.-Criterios de exclusión

-Alcoholismo (más de 2 raciones al día)

-Obesidad grado II en adelante (índice de masa corporal mayor a 35kg/m<sup>2</sup>)

-Enfermedades crónicas que alteren la concentración de HDL (a excepción de diabetes para los casos)

- Fármacos que alteren la concentración de C-HDL.

-Tabaquismo en el último año

-Enfermedades genéticas que condicionen valores bajos de C-HDL.

-Complicaciones crónicas de la diabetes tipo 2, a excepción de neuropatía diabética (para los casos)

-Enfermedades reumatológicas.

-Embarazo.

-Infecciones crónicas o agudas.

-Estados catabólicos crónicos o agudos.

-Uso previo de estatinas.

##### 3.-Criterios de eliminación.

-Retiro voluntario del paciente.

-Necesidad de retirar estatinas por efectos secundarios.

##### Logística general:

-Se invitó a participar a los sujetos que reúnan los criterios de selección. Se les pidió que firmaran consentimiento informado.

-Se registró la historia médica, la alimentación y la actividad física con cuestionarios previamente estandarizados. Cada paciente acudió a 4 visitas en un periodo de 10 semanas

-Se obtuvieron 40 ml de sangre, 30 mL en tubos que contienen EDTA, y 10 mL en tubos sin anticoagulante, se mantuvieron en frío a 4 C y se centrifugaron a 3,000 revoluciones hasta obtener el plasma, el cual se colectó en crioviales de 3.5ml, se congeló a -70 grados.

Se midió perfil de lípidos con apoproteínas A y B, glucosa, insulina, hemoglobina glucosilada, proteína C reactiva, CPK, TGO, TGP en la visita basal y final, y perfil de lípidos en las visitas intermedias.

## EXPERIMENTOS PARA EVALUAR LA FUNCIONALIDAD DE LAS HDL

### 1. EFLUJO DE COLESTEROL CON LA LINEA CELULAR TPH-1. VER ANEXOS

## RESULTADOS

Se reclutaron 70 pacientes en el INNCMNSZ que reunieron los criterios de inclusión. 60 pacientes terminaron el estudio (Ver figura 1). EL cuadro 1 muestra un resumen de seguimiento del estudio.

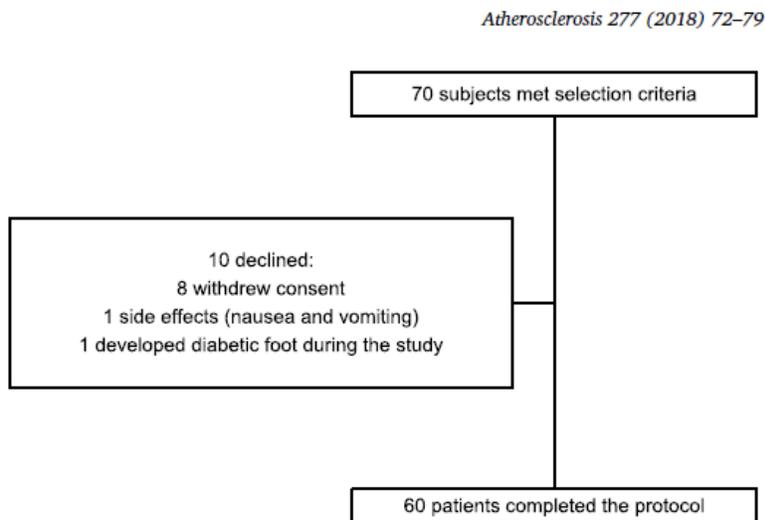


Fig. 1. Flujograma de selección de pacientes

| <b>VISITA 1</b><br><b>SEMANA</b><br><b>MENOS 3</b><br><b>(SCREENING)</b>   | <b>VISITA 2</b><br><b>BASAL,</b><br><b>SEMANA 0</b>   | <b>VISITA 3</b><br><b>SEMANA 4</b>  | <b>VISITA 4 4</b><br><b>SEMANA 8-10</b>   |
|--|---|---|---|
| <b>N = 60</b><br><b>reclutados</b>   | <b>60</b>   | <b>60</b>   | <b>N = 60</b>   |
| Evaluación Médica (criterios de selección)   | Prescripción de Atorvastatina 20 mg/día<br><br>Colección de muestra de sangre (plasma y suero) para evaluación basal  | Evaluación de adherencia a tratamiento, mediante interrogatorio, conteo de píldoras y medición de perfil de lípidos | Evaluación y recomendaciones finales<br><br>Colección de muestra de sangre para evaluación final (plasma y suero)   |
| Evaluación de escrutinio:<br><br>1. Glucosa, hemoglobina glucosilada, transaminasas (AST y ALT), GGT y perfil de lípidos<br><br>2. Consulta y recomendaciones de nutrición 50-20-30% | Evaluación bioquímica basal/<br><br>1 Glucosa, perfil de lípidos, Apo A, apo B, Insulina<br><br>2 almacenamiento a -70 grados de 7 ml de plasma y 3.5 ml de suero | Perfil de lípidos para evaluar adherencia a tratamiento   | Evaluación bioquímica final:<br><br>1. Glucosa, perfil de lípidos, Apo A; Apo B, Insulina, Transaminasas, GGT.<br><br>2 almacenamiento a -70 grados de 7 ml de plasma y 3.5 ml de suero<br><br>3. Recomendaciones finales Nutrición |

Cuadro 1. Logística del estudio

Las características basales se muestran en el cuadro 2. El promedio de edad fue de  $58 \pm 10.4$  años, con predominio en el género femenino de 62%. La población de estudio presentaba un adecuado control glucémico con A1C% de 7.01%, todos los pacientes se encontraban en tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes, principalmente metformina (93%) y un 19% recibía algún esquema de insulina. La prevalencia de hipertensión fue de 32.6% y todos los pacientes presentaron un buen control de la presión arterial. El índice de masa corporal fue de  $28.6 \pm 3.7$  m<sup>2</sup>/kg.

#### Clinical characteristics of the study population.

|  |                |
|--|----------------|
| N  | 60             |
| Women/men %                              | 62/38          |
| Age yr                                   | $58 \pm 10$    |
| BMI kg/m <sup>2</sup>                    | $28.6 \pm 3.7$ |
| SBP mmHg                                 | $127 \pm 16$   |
| DBP mmHg                                 | $78 \pm 10$    |
| Age at diagnosis yr                      | $50 \pm 10$    |
| Diabetes evolution years                 | 8 (4–12)       |
| Metformin treatment %                    | 95             |
| Insulin treatment %                      | 30             |
| Other anti-diabetic drugs <sup>a</sup> % | 25             |
| Cardiovascular disease history %         | 39             |
| Smoking history <sup>b</sup> %           | 21             |

N = 60. Data are presented as mean  $\pm$  SD or median and interquartile range (10–90) and as a percentage.

<sup>a</sup> Except thiazolidinediones.

<sup>b</sup> At least one year after smoking withdrawal, Stata 13.

Cuadro 2. Características basales de la población de estudio.

\* Se incluyeron sólo mujeres postmenopausicas <sup>oo</sup> No se investigó el antecedente de isquemia silente

\*\* Ser fumador activo fue un criterio de exclusión (pacientes ex-fumadores tenían al menos 6 meses de suspensión del tabaco).

Después del tratamiento con 20 mg de atorvastatina por un periodo de 10 semanas, se observaron cambios significativos en todos los parámetros de lípidos, incluyendo en las concentraciones de ApoA-1 y C-HDL (ver cuadro 3), el porcentaje de HbA1c y la concentración de glucosa sérica no se modificaron.

Serum biochemistry before and after the atorvastatin treatment of patients with T2DM.

|                         | Before <sup>a</sup> | After <sup>a</sup> | Change % | p value        |
|-------------------------|---------------------|--------------------|----------|----------------|
| Total cholesterol mg/dL | 184 ± 32            | 127 ± 27           | -32      | > <b>0.001</b> |
| LDL-cholesterol mg/dL   | 98 (82-117)         | 49 (39-62)         | -50      | > <b>0.001</b> |
| HDL-cholesterol mg/dL   | 47 (42-54)          | 45 (39-56)         | -4       | <b>0.02</b>    |
| ApoB mg/dL              | 91 (82-120)         | 60 (49-76)         | -34      | > <b>0.001</b> |
| ApoA-I mg/dL            | 147 (129-163)       | 143 (124-165)      | -3       | <b>0.02</b>    |
| Triglycerides mg/dL     | 154 (113-228)       | 125 (103-169)      | -19      | > <b>0.001</b> |
| Glucose mg/dL           | 125 (108-145)       | 127 (105-161)      | +1.6     | 0.08           |
| Insulin Ui/L            | 11.9 (8.4-18.1)     | 13.2 (9.8-19.3)    | +11      | 0.16           |
| HbA1c %                 | 6.98 ± 0.83         | 6.91 ± 0.99        | -2       | 0.89           |
| Creatinine              | 0.72 ± 0.16         | 0.69 ± 0.16        | -5       | <b>0.005</b>   |
| AST                     | 24 (21-30)          | 23(21-28)          | -4       | <b>0.02</b>    |
| ALT                     | 23 (19-32)          | 25 (19-30)         | +8       | 0.53           |
| GGT                     | 20 (15-27)          | 19 (15-26)         | -5       | 0.11           |

HbA1c, glycated hemoglobin; apo B, apolipoprotein B; apo A-I, apolipoprotein A-I.

AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; GGT, gamma glutamil transaminase.

Statistically significant results are presented in bold in this table.

<sup>a</sup> Data are presented as mean ± SD or median (interquartile range 10-90).

Cuadro 3. Cambios bioquímicos de los pacientes después del tratamiento por 10 semanas con 20mg de atorvastatina.

No se observaron cambios en el peso, presión arterial u otra variable clínica durante el estudio, ver cuadro 4. Los pacientes llevaron una dieta isocalórica durante el estudio y no presentaron cambios en su patrón alimentario durante el estudio, ver cuadro 5.

Clinical parameters before and after the atorvastatin treatment of patients with T2DM.

| Characteristics             | Before <sup>a</sup> | After <sup>a</sup> | p value |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------|
| Weight kg (F/M)             | 66.2 (59.5-71.6)    | 65.7 (59.5-71.6)   | 0.27    |
|                             | 80.8 (74.5-86.7)    | 81.4 (73.8-86.0)   | 0.78    |
| BMI Kg/m <sup>2</sup> (F/M) | 29.1 (26.1-31.1)    | 28.4 (25.9-30.7)   | 0.29    |
|                             | 28.4 (26.7-32.5)    | 29.1 (25.8-32.9)   | 0.70    |
| SBP mmHg                    | 127 ± 16            | 121 ± 18           | 0.06    |
| DPB mmHg                    | 78 ± 10             | 76 ± 9             | 0.09    |
| Waist cm (F/M)              | 94.5 (88.5-99)/     | 91.8 (88.5-99.8)   | 0.08    |
|                             | 99.5 (95-104.2)     | 97.5 (95.104.5)    | 0.06    |

<sup>a</sup> Data are presented as mean ± SD or median and interquartile range (10-90).

Cuadro 4 Cambios clínicos de los pacientes después del tratamiento por 10 semanas con 20mg de atorvastatina.

### Energy intake through the study.

|                    | Before <sup>a</sup> treatment | After <sup>a</sup> treatment | <i>p</i> value |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| Energy intake kcal | 1596 ± 439                    | 1666 ± 438                   | 0.21           |
| Carbohydrates gr   | 206 ± 66                      | 221 ± 62                     | 0.10           |
| Proteins gr        | 80 ± 19                       | 83 ± 24                      | 0.30           |
| Fat gr             | 50 ± 21                       | 50 ± 16                      | 0.99           |
| Fiber gr           | 27.4 ± 7.6                    | 29.4 ± 8.3                   | 0.09           |
| Carbohydrates %    | 51 ± 6                        | 53 ± 6                       | 0.14           |
| Proteins %         | 20 ± 2                        | 19 ± 3                       | 0.56           |
| Fat %              | 28 ± 6                        | 27 ± 5                       | 0.23           |

<sup>a</sup> Data are presented as mean ± SD.

### Cuadro 5. Ingesta de energía durante el estudio.

Se aislaron las HDL por el método de ultracentrifugación única por gradiente (3 mL de suero), se obtuvieron 800 µL de las subfracciones 2b, 2a, 3a y 3b y 540 µL de la subfracción 3c. Se tomó de forma proporcional un volumen de cada subfracción para constituir una HDL total. Se midió la composición de triglicéridos, colesterol libre, colesterol esterificado, proteínas y fosfolípidos (Diasys y bioMérieux \*R) y se calculó la masa total de las HDL y subfracciones.

La masa total de las HDL permaneció sin cambios, excepto en la subfracción HDL 3-a, con un incremento de 65.7 a 69.2 mg/dL ( $p=0.01$ ) (ver figura 2). En contraste, la atorvastatina modificó de forma significativa la concentración de varios componentes de las subfracciones de HDL. El colesterol libre de la subfracción HDL 3c disminuyó de 0.29 (0.22-0.39) a 0.20 (0.15-0.28) mg/dL ( $p=0.0001$ ). Los triglicéridos en las HDL 3c disminuyeron de 0.49 (0.38-0.80) a 0.34 (0.20-0.56) mg/dL ( $p=0.0001$ ). El contenido de proteínas totales incrementó en las HDL 3<sup>a</sup> de 29.5 (27.2-35.21) a 32.3 (29-38.5) mg/dL ( $p=0.0008$ ) (Fig 2A, B y E, respectivamente). Esos cambios condujeron a modificaciones significativas en la distribución proporcional de los componentes químicos, de tal manera que los componentes lipídicos tendieron a disminuir mientras que los de proteínas a aumentar.

Con las HDL totales y la subfracción 2b y 3c obtenidas del plasma de los pacientes antes y después del tratamiento se llevaron a cabo los experimentos de flujo en reversa de colesterol tritiazado partir de monocitos THP-1, usando como vehículo LDL acetiladas. No se observó un efecto de atorvastatina en la capacidad de flujo en reversa del colesterol en ninguna de las subfracciones de HDL (ver figura 3). Tampoco se encontró correlación entre el flujo en reversa del colesterol y los diferentes parámetros clínicos y bioquímicos que en estudios previos se han asociado con la capacidad de flujo en reversa del colesterol.

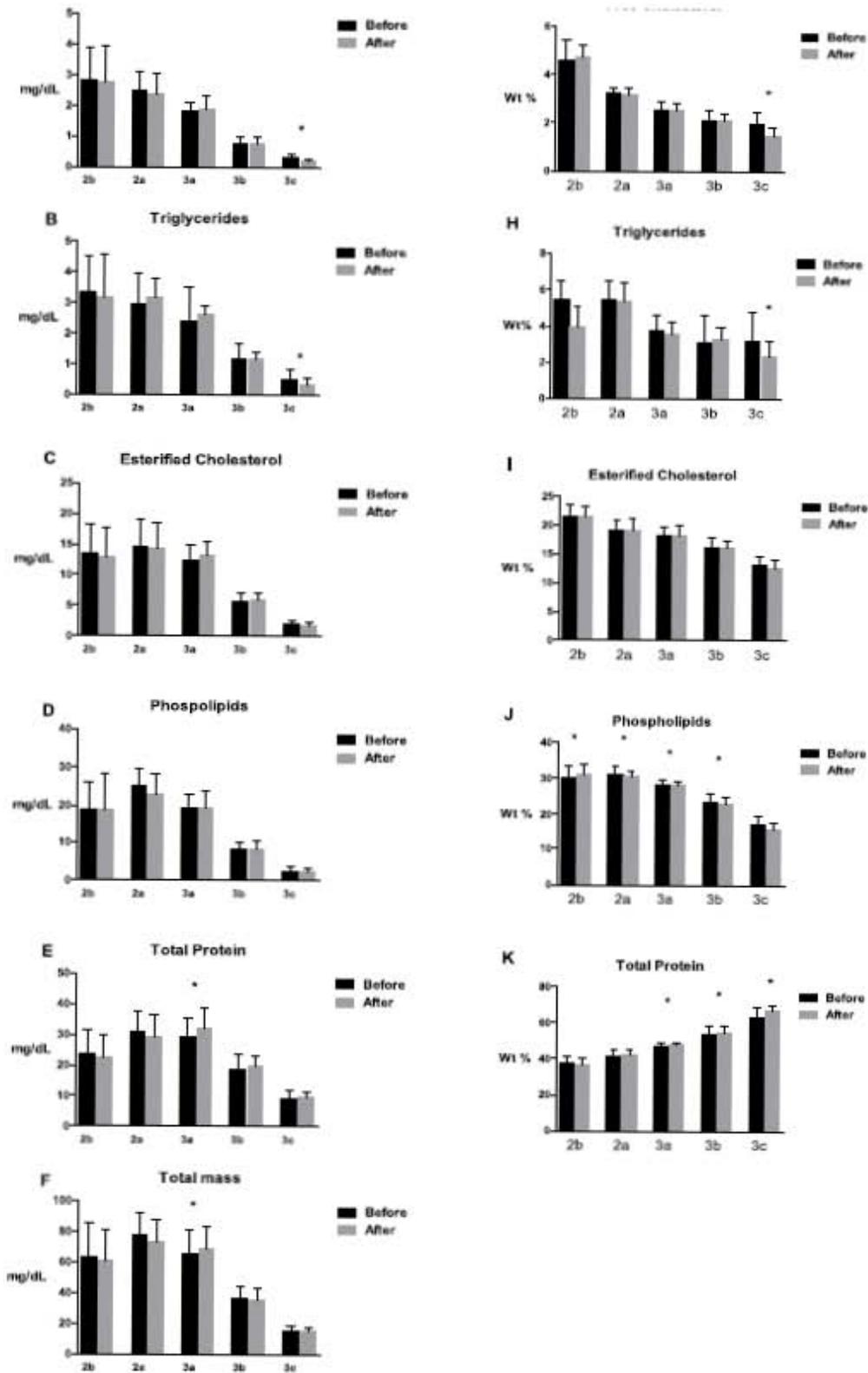


Figura 2.- Cambios en masa y composición química de las HDL después de 10 semanas con 20 mg de atorvastatina.

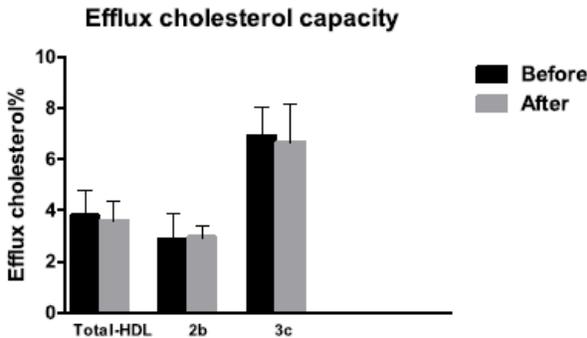


Fig. 3. Cholesterol efflux from THP-1 cells to total HDL and to HDL2b and 3c subpopulations before and after atorvastatin treatment in patients with T2DM.

Figura 3. Gráfica de cajas que muestra los cambios en el eflujo de colesterol después del tratamiento con 20 mg/d de atorvastatina por 10 semanas.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Nuestro estudio no encontró alguna diferencia en el flujo en reversa del colesterol hacia las HDL totales o las subpoblaciones grandes HDL 2b o las pequeñas HDL 3c después de un curso corto de 10 semanas con dosis de 20 mg de atorvastatina en pacientes con Diabetes tipo 2 controlada. Aunque otros hipolipemiantes como simvastatina y bezafibrato habían sido probadas en su capacidad de flujo de colesterol en pacientes con DM 2, este es el primer estudio en evaluar esta métrica con atorvastatina. Además, hemos evaluado por primera vez el efecto de una estatina en subpoblaciones de HDL, que se sabe, tienen actividades biológicas distintas entre ellas.

Haciendo uso de monocitos humanos THP-1, dos estudios previos mostraron mejoría en el flujo en reversa de colesterol en pacientes con diabetes después del tratamiento con simvastatina y en pacientes sin diabetes pero con dislipidemia tratados con pitavastatina [43][45], lo cual contrasta con nuestros resultados. Estos estudios usaron plasma depletado en Apo-B como aceptores de colesterol, como consecuencia, la mejoría en el flujo en reversa del colesterol de estos estudios se podría explicar por el incremento en las concentraciones de C-HDL que también documentaron los investigadores. Nosotros usamos HDL aisladas por ultracentrifugación, esto entre otras variables metodológicas pudiera explicar la diferencia con los estudios citados. Existen diferentes metodologías para estudiar el flujo en reversa de colesterol pero en todas debe haber una célula donadora de colesterol, un vehículo para el colesterol y un aceptor, en nuestro caso fueron la línea celular THP-1, LDL acetiladas marcadas con colesterol tritiado y HDL

totales, 2b y 3 C, respectivamente[46][47]. También es posible manipular o no, la participación de los receptores involucrados en el transporte en reversa del colesterol, lo cual en nuestro experimento no se hizo. Nuestra técnica inherentemente ajusta para cambios en la concentración de C-HDL o en el contenido de fosfolípidos, estos últimos tienen una contribución mayor al flujo en reversa del colesterol[15]. El uso de otro tipo de estatina también explicaría las diferencias respecto a lo publicado previamente, pues se sabe que los diferentes tipos y dosis de estatina pueden ocasionar efectos diferenciados en la función y metabolismo de lípidos[34].

Hasta nuestro conocimiento hay dos estudios previos que evalúan la atorvastatina en las actividades biológicas de HDL, aunque no en pacientes con diabetes mellitus. Uno de ellos, evaluó el proteoma de HDL y encontró que este cambia después de un año de tratamiento con atorvastatina[48]. Rader y col, estudiaron pacientes con cardiopatía isquémica pre-existente, evaluaron el flujo en reversa de colesterol a partir de una línea celular de macrófagos murinos J774, y en acuerdo con nuestros hallazgos, encontraron que no hay mejoría en esta actividad biológica después de dosis baja o alta de atorvastatina [49]. Estos hallazgos contradictorios de estudios con estatinas, pero en actividades biológicas diferentes de HDL, sugiere que las estatinas pueden producir efectos diferenciados y probablemente efectos nulos en actividades dependientes del contenido de lípidos pero efectos positivos en actividades donde las proteínas juegan un papel central, por ejemplo la actividad antioxidante[50]. De forma muy interesante y haciendo sentido con lo mencionado, nuestro estudio mostró una tendencia a que los componentes lipídicos de las HDL disminuyeran en algunas subfracciones de las HDL y las proteínas aumentaron en otras, encontrándose incluso un aumento significativo de proteínas en la subfracción 3-a. Estos hallazgos justifican futuros estudios en actividades biológicas de HDL dependientes de proteínas en sujetos tratados con estatinas.

Se requieren estudios para aclarar esta teoría.

Importante mencionar que nuestro estudio incluyó sólo pacientes con DM2 con concentraciones moderadamente bajas de C-HDL basalmente, esta alteración es típica y parte del fenotipo de la llamada “dislipidemia diabética”. Después del tratamiento, las concentraciones de C-HDL disminuyeron un 6%, no creemos que esta reducción haya influido en los resultados, pues como mencioné, nuestro experimento ajusta para cambios en las concentraciones de C-HDL. Típicamente, las estatinas tienen un efecto positivo sobre las concentraciones de C-HDL, sin embargo, estos efectos parecen estar alterados en pacientes con DM2. En el 2004, CARDS, un estudio multicéntrico controlado con placebo, mostró un 9% de reducción de C-HDL en pacientes con DM2 después de 4 años de tratamiento con 10mg de atorvastatina[51]. Chang (2013), reportó una alta prevalencia en disminución del C-HDL (3% de reducción), después de un año de atorvastatina en pacientes con DM2. El mecanismo de esa respuesta paradójica no se comprende bien, pero podría involucrar algunas enzimas y proteínas de transferencia como la lipasa lipoproteica, lipasa hepática, y la proteína de transferencia de fosfolípidos, que participan en el metabolismo y remodelamiento de las HDL y que se han reportado alteradas en un medio de resistencia a la insulina[52]. Además el hígado representa una fuente importante de colesterol y parte de este circula en las HDL, por lo que prolongar la inhibición de la HMGCoA reductasa

por estatinas, podría resultar en depleción de colesterol hepático y disminución de la producción de C-HDL[53].

Nuestro estudio no está exento de limitaciones. Como evaluamos un curso corto con estatinas, no podemos evaluar que una exposición más larga al medicamento pueda producir cambios diferentes, además los resultados serían aplicables sólo a pacientes con DM 2 controlada. La mayor disfunción en las actividades biológicas de HDL esta descrita en sujetos con DM2 descontrolada, entre otros fenómenos, secundario a la glicación de proteínas, enriquecimiento de TG de las HDL y modificación oxidativa de los lípidos de las HDL[29]. Por otra parte, algunas de las fortalezas de nuestro estudio es que incluye más pacientes que estudios previos con la misma pregunta de investigación, así como la homogeneidad de los pacientes incluidos. Hasta nuestro conocimiento no hay otro estudio con el mismo diseño y técnica para evaluar el flujo de colesterol de HDL en pacientes con DM2 tratados con estatinas[54]. La falta de efecto de atorvastatina en el flujo en reversa de colesterol es consistente y podría explicar el riesgo residual de pacientes de alto riesgo para enfermedad cardiovascular tratados con estatinas, incluso después de que alcanzan metas de tratamiento. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que algunas actividades biológicas de las HDL son independientes de los efectos de estatinas sobre las lipoproteínas que contienen la apo-B.

En conclusión, nuestro estudio mostró que 10 semanas de tratamiento con dosis moderada de 20 mg de atorvastatina no modifica la capacidad de flujo en reversa de colesterol de las partículas de HDL en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 bien controlada. Debido a la naturaleza del estudio, los resultados no se pueden trasladar a la práctica clínica común de prescribir estatinas a largo plazo ni tampoco en la decisión del tipo de estatina a prescribir.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Maroni *et al.*, “HDL Cholesterol, Very Low Levels of LDL Cholesterol, and Cardiovascular Events,” pp. 1301–1310, 2007.
- [2] S. E. Nissen *et al.*, “Effect of Torcetrapib on the Progression of Coronary Atherosclerosis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, no. 13, pp. 1304–1316, 2007.
- [3] M. Duong, B. A. Di, and S. J. Nicholls, “Acute high-density lipoprotein therapies,” *Curr. Opin. Lipidol. December*, vol. 26, no. 6, pp. 521–525, 2015.
- [4] W. Hancock-Cerutti *et al.*, “Paradoxical coronary artery disease in humans with hyperalphalipoproteinemia is associated with distinct differences in the high-density lipoprotein phosphosphingolipidome,” *J. Clin. Lipidol.*, vol. 11, no. 5, p. 1192–1200.e3, 2017.
- [5] A. P. Agarwala *et al.*, “High-Density Lipoprotein (HDL) Phospholipid Content and Cholesterol Efflux Capacity Are Reduced in Patients with Very High HDL Cholesterol and Coronary Disease,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1515–1519, 2015.
- [6] M. Navab, G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, and A. M. Fogelman, “HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy,” *Diabetes*, vol. 58, no. 12, pp. 2711–2717, 2009.

- [7] M. De La Llera-Moya, D. Drazul-Schrader, B. F. Asztalos, M. Cuchel, D. J. Rader, and G. H. Rothblat, "The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 796–801, 2010.
- [8] M. Rizzo, J. D. Otvos, D. Nikolic, G. Montalto, P. P. Toth, and M. Banach, "Subfractions And Subpopulations Of HDL: An Update.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [9] S. Hazen, "HDL structure, function, therapeutics, and imaging," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 2, p. 138, 2010.
- [10] L. Yvan-Charvet, N. Wang, and A. R. Tall, "Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 139–143, 2010.
- [11] P. Davidsson, J. Hulthe, B. Fagerberg, and G. Camejo, "Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 156–163, 2010.
- [12] A. N. Hoofnagle and J. W. Heinecke, "Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins.," *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 10, pp. 1967–75, Oct. 2009.
- [13] W. S. Davidson, R. A. G. D. Silva, S. Chantepie, W. R. Lagor, M. J. Chapman, and A. Kontush, "Proteomic analysis of defined hdl subpopulations reveals particle-specific protein clusters: Relevance to antioxidative function," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 870–876, 2009.
- [14] S. M. Gordon, S. Hofmann, D. S. Askew, and W. S. Davidson, "High density lipoprotein: It's not just about lipid transport anymore," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 9–15, 2011.
- [15] L. Camont *et al.*, "Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: Relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 12, pp. 2715–2723, 2013.
- [16] W. Annema and A. von Eckardstein, *High-density lipoproteins.*, vol. 77, no. 10. 2013.
- [17] M. Riwanto, L. Rohrer, and A. Von Eckardstein, *High Density Lipoproteins*, vol. 224. 2015.
- [18] X. Tong *et al.*, "The compensatory enrichment of sphingosine -1- phosphate harbored on glycated high-density lipoprotein restores endothelial protective function in type 2 diabetes mellitus.," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 13, p. 82, Jan. 2014.
- [19] H. Soran, J. D. Schofield, Y. Liu, and P. N. Durrington, "How HDL protects LDL against atherogenic modification," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 26, pp. 247–256, 2015.
- [20] C. P. Oliveira, R. C. Maranhão, M. P. Bertato, B. L. Wajchenberg, and A. C. Lerario, "Removal from the plasma of the free and esterified forms of cholesterol and transfer of lipids to HDL in type 2 diabetes mellitus patients," *Lipids Health Dis.*, vol. 11, no. 1, p. 65, 2012.
- [21] J. Wilkins, "High-Density Lipoprotein Subfractions and Cholesterol Efflux Capacity Are Not Affected by Supervised Exercise but Are Associated with Baseline Interleukin-6 in Patients with Peripheral Artery Disease," vol. 4, no. March, pp. 1–10, 2017.
- [22] M. Koren-Gluzer, M. Aviram, E. Meilin, and T. Hayek, "The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates ??-cell insulin

- release,” *Atherosclerosis*, vol. 219, no. 2, pp. 510–518, 2011.
- [23] P. J. Barter, S. Nicholls, K.-A. Rye, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, and A. M. Fogelman, “Antiinflammatory properties of HDL,” *Circ. Res.*, vol. 95, no. 8, pp. 764–72, Oct. 2004.
- [24] M. Navab, G. M. Anantharamaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, B. J. Ansell, and A. M. Fogelman, “Mechanisms of Disease: proatherogenic HDL—an evolving field,” *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. & Metab.*, vol. 2, no. 9, pp. 504–511, 2006.
- [25] A. M. Fogelman, “When good cholesterol goes bad,” *Nat. Med.*, vol. 10, no. 9, pp. 902–903, 2004.
- [26] C. G. Santos-Gallego, B. Ibanez, and J. J. Badimon, “HDL-cholesterol: Is it really good?. Differences between apoA-I and HDL,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 76, no. 4, pp. 443–452, 2008.
- [27] A. J. Nelson, S. K. Rochelau, and S. J. Nicholls, “Managing Dyslipidemia in Type 2 Diabetes,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 47, no. 1, pp. 153–173, 2017.
- [28] L. Perségol, B. Vergès, M. Foissac, P. Gambert, and L. Duvillard, “Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation,” *Diabetologia*, vol. 49, no. 6, pp. 1380–1386, 2006.
- [29] A. Kontush and M. J. Chapman, “Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes?,” *Curr. Diab. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 51–9, Feb. 2008.
- [30] L. Gomez Rosso *et al.*, “Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1862, no. 2, pp. 188–195, 2017.
- [31] E. Nobécourt *et al.*, “Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: Relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia,” *Diabetologia*, vol. 48, no. 3, pp. 529–538, 2005.
- [32] C. C. Hedrick *et al.*, “Glycation impairs high-density lipoprotein function,” *Diabetologia*, vol. 43, no. 3, pp. 312–320, 2000.
- [33] B. Mihaylova *et al.*, “The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: Meta-analysis of individual data from 27 randomised trials,” *Lancet*, vol. 380, no. 9841, pp. 581–590, 2012.
- [34] S. Lamon-Fava, “Statins and lipid metabolism: an update,” *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 24, no. 3, pp. 221–6, 2013.
- [35] B. Zhang *et al.*, “Therapeutic approaches to the regulation of metabolism of high-density lipoprotein. Novel HDL-directed pharmacological intervention and exercise,” *Circ. J.*, vol. 77, no. 11, pp. 2651–63, Jan. 2013.
- [36] A. Keraliya and R. Blankstein, “Regression of Coronary Atherosclerosis with Medical Therapy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 376, no. 14, pp. 1370–1370, 2017.
- [37] S. Jr, S. C. Sperleng, L. Virani, and S. S. Yeboah, “2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2018.
- [38] J. F. Keaney, G. D. Curfman, and J. a Jarcho, “A Pragmatic View of the New Cholesterol Treatment Guidelines,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 1–4, 2013.
- [39] P. Maningat and J. L. Breslow, “Needed: pragmatic clinical trials for statin-intolerant patients,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 365, no. 24, pp. 2250–1, 2011.
- [40] D. Chernichovsky, “New engla nd journal,” *Perspective*, vol. 363, no. 1, pp. 1–3, 2009.

- [41] B. J. Ansell *et al.*, “Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment.,” *Circulation*, vol. 108, no. 22, pp. 2751–6, Dec. 2003.
- [42] R. Posadas-Sánchez *et al.*, “Cholesterol efflux and metabolic abnormalities associated with low high-density-lipoprotein-cholesterol and high triglycerides in statin-treated coronary men with low-density lipoprotein-cholesterol <70 mg/dl,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 109, no. 5, pp. 636–641, 2012.
- [43] M. Triolo, W. Annema, J. F. de Boer, U. J. F. Tietge, and R. P. F. Dullaart, “Simvastatin and bezafibrate increase cholesterol efflux in men with type 2 diabetes,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 44, no. 3, pp. 240–248, 2014.
- [44] S. Yamashita, H. Arai, K. Yokote, E. Araki, H. Suganami, and S. Ishibashi, “Effects of pemafibrate (K-877) on cholesterol efflux capacity and postprandial hyperlipidemia in patients with atherogenic dyslipidemia,” *J. Clin. Lipidol.*, 2018.
- [45] M. Miyamoto-Sasaki *et al.*, “Pitavastatin increases HDL particles functionally preserved with cholesterol efflux capacity and antioxidative actions in dyslipidemic patients,” *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 20, no. 9, pp. 708–716, 2013.
- [46] C. P. J. Talbot, J. Plat, A. Ritsch, and R. P. Mensink, “Determinants of cholesterol efflux capacity in humans,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 69, no. September 2017, pp. 21–32, 2018.
- [47] A. Rohatgi, “High-Density Lipoprotein Function Measurement in Human Studies: Focus on Cholesterol Efflux Capacity,” *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 58, no. 1, pp. 32–40, 2015.
- [48] J. W. Heinecke, “The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease.,” *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, pp. S167–S171, 2009.
- [49] A. Rodrigues *et al.*, “Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis,” pp. 127–135, 2011.
- [50] C. J. Lee *et al.*, “Effect of two lipid-lowering strategies on high-density lipoprotein function and some HDL-related proteins: a randomized clinical trial,” *Lipids Health Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [51] C. HM *et al.*, “Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial,” *Lancet*, vol. 364, no. 9435, pp. 685–696, 2004.
- [52] S. E. Borggreve, R. De Vries, and R. P. F. Dullaart, “Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins.,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 33, no. 12, pp. 1051–69, Dec. 2003.
- [53] H. B. Brewer, A. T. Remaley, E. B. Neufeld, F. Basso, and C. Joyce, “Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1755–1760, 2004.
- [54] L. Muñoz-Hernandez *et al.*, “Cholesterol efflux capacity of large, small and total HDL particles is unaltered by atorvastatin in patients with type 2 diabetes,” *Atherosclerosis*, vol. 277, no. July, pp. 72–79, 2018.

## ANEXOS

### **I. PROTOCOLO PARA MEDIR CAPACIDAD DE EFLUJO DE COLESTEROL**

#### **Principios del eflujo de colesterol**

- Las células THP-1 provienen de monocitos humanos
- Durante el experimento, las células se diferencian a macrófagos por medio de la interacción con PMA (phorbol-12-myristate-3-acétate=ester de phorbol)
- El eflujo de colesterol celular constituye la primera fase del transporte en reversa del colesterol en el que el colesterol es transferido desde las células periféricas hacia sus aceptadores extracelulares.

#### Equipo Necesario:

##### *°Reactivos:*

- Albúmina 7.5%, fraction V GIBCO
- Cholesterol marcado con tritio
- Hexane: NORMAPUR, 5L, referencia: 203-77-6
- Isopropanolol: Propan-2-ol, NORMAPUR, 1L referencia: 200-661-7
- MEDIOS: Se necesitan 3 medios:

| Nombre              | Composición   | Marca          | uso  | referencias  |
|---------------------|---|----------------|--|--------------|
| RPMI completo       | -RPMI 1640-medium 500 mL<br>-Suero humano inactivado 50mL<br>-Glutamina 5 mL<br>Penicilina/estreptomicina 4mL             | SIGMA-aldrich  | Cuidado cotidiano de las células (cada tercer día contarlas y agregar medio, asegurando una cantidad de 1x10 <sup>6</sup> cels el día que inicia el protocolo) | R0883 (RPMI) |
| RGGB                | -RPMI 1640-medium 500 mL<br>-1 gr de albúmina<br>-2.25 gr de d-glucosa<br>-Glutamina 5mL<br>Penicilina/estreptomicina 4mL | SIGMA ALDRICHJ | Se emplea a partir del tercer día del experimento (ver abajo) hasta el día 4   |              |
| RPMI libre de suero | -RPMI 1640-medium 500 mL<br>-Penicilina/streptomicina 4 mL<br>-Glutamina 5 mL   |                | Se emplea el último día del experimento  |              |

- Plasma standar: Una alícuota con 200µL de plasma a una concentración conocida
- Scintillant: Optiphase Super Mix, PERKIN ELMER, 5 L, referencia 1200-439
- Reactivo para medir colesterol: ROCHE, referencia 11489232

**°Material:**

- Placas de cultivo de 24 pozos
- Pipetas de plástico estériles de 5, 10, 25 y 50 mL
- Tubos falcon de 50mL
- Eppendorf 1.5 y 2 mL

- Tubos de vidrio de 3mL

-LDL Acetiladas

**°Aparatos:**

-Calentador, Bloc Chauffant: Multi-bloc Heater, LAB-LINE

-Contador de células: BECKMAN COULTER

-Contador de radioactividad: Trilux, PERKIN ELMER

-Incubadora CO2: HEREAUS

-Vortex

-Campana de seguridad microbiológica: ADS tipo II

-Sorbonne: EQUIP-LABO

Protocolo:

A. Logaritmo

B. Etapa 1. Contar células y poner en las placas con 24 pozos

C. Etapa 2: Marcar con colesterol-tritio

D. Etapa 3: Equilibrio.

E. Etapa 4: Eflujo

F. Etapa 5: Tratamiento de las células

G. Exploración de resultados

**Descripción del proceso**

A. Logaritmo

| Quando?          | Que?   | Tiempos  |
|------------------|--|--|
| Dia 0 Lunes      | “Sembrar” las células en las placas de 24 pozos, 1 millón por pozo. (Considerar que cada muestra se analiza en triplicado) | 48 horas. Se dejan las células 48 horas antes de iniciar el segundo paso del experimento |
| Dia +2 Miércoles | Radiomarcaje y cargar células con LDL acetiladas   | 24 horas   |
| Dia +3 Jueves    | Equilibrio   | 24 horas   |
| Dia + 4 Viernes  | Eflujo de colesterol   | 4 horas  |

## B. Etapa 1 Sembrar las células:

Día 0. Lunes

El medio que se utiliza es RPMI completo (ver tabla 1) + PMA (para diferenciar monocitos a macrófagos)

1. Contar las células, y colocar el volumen de células que sea necesario (de acuerdo al número de placas que necesitemos sembrar, 1000 000 por pozo) en un tubo falcón de 50 ml (y centrifugarlas por 10 minutos a 200 g)
2. Aspirar el sobrenadante
3. Resuspender las células en medio RPMI completo, considerando que pondremos 0.5mL en cada pozo. (12.5 mL por placa). Es decir, calcular la dilución a realizar, a fin de tener 0.5mL de solución de células a 1 000 000 de células por pozo=  $2,0 \times 10^6$  cels/mL
4. La cantidad de PMA es de 50ng por mL de medio. (para una placa, necesitamos 0.625  $\mu$ L de PMA, porque son 12.5 mL de medio por placa)  
\*el PMA debe estar diluido a 20 000)
5. Incubar por 48 horas en CO<sub>2</sub>

## C. Etapa 2 Marcar las células con colesterol 3H y cargar con LDL acetiladas

Día + 2. Miércoles

1. Realizar una mezcla de LDL acetiladas + H3 colesterol

Se requieren 50  $\mu$ g/mL de LDL acetiladas por pozo. Por lo que para una placa de 24 pozos= 12.5mL (considerando 0.5mL de margen de error) x 50  $\mu$ g/mL = 625  $\mu$ g. Es decir, para una placa se necesitan 625  $\mu$ g de LDL acetiladas (en base proteínas en las LDL)

Se necesitan 12.5 $\mu$ L de H3 colesterol por cada placa (1  $\mu$ L de H3 colesterol por mL de medio)

Después de incubar la mezcla por 30 minutos, se centrifuga a 1000 g por 5 minutos.

2. Posteriormente se añade la mezcla al medio y se coloca 0.5mL de medio cargado con H3 y LDL acetiladas en cada pozo (inmediatamente antes a este paso, se toman las placas , se aspira el medio, se lavan los pozos 2 veces con PBS).

Se deja *exactamente* 24 horas en incubación con CO<sub>2</sub>

## D. Etapa 3 Equilibrio

Día +3. Jueves

Se toman las placas.

Se elimina (aspira) el medio

Se lava dos veces cada pozo con PBS 1x

Se vuelve a poner 0.5mL de RGGB a cada pozo

Se deja en incubación 24 horas a 37 C con CO<sub>2</sub>

## C Etapa 4 EFFLUJO

Día + 4. Viernes

1. Preparar las muestras de HDL o plasma.

Considerar:

1. Realizar la “mezcla” en función del aceptador (HDLs, subfracciones, plasma.. etc) en *TRIPLICADO*

Volumen total: 1.2 mL (margen de error 0.3mL)

- a. En este caso, el aceptador es **HDL, entonces=** 15mg/mL de HDL (del contenido de fosfolípidos)
- b. PBS 1 x. Si se tienen varias muestras, cada una con distinta concentración de fosfolípidos, se requerirán diferentes volúmenes de HDL, por lo que se ajustan todas para que sea el mismo volumen y esto se hace con PBS 1x
- c. RPMI libre de suero para alcanzar 1.2 mL (qsp, lo que sea necesario)
- d. Para el blanco, reemplazar el volumen de HDL con PBS

-Después de que la mezcla está hecha, de acuerdo a los cálculos, tendremos un eppendorf con 1.2mL de mezcla por cada muestra.

-Tomamos las placas; aspiramos el medio, lavamos una vez con RPMI libre de suero y colocamos 0.3mL en triplicado de cada muestra.

-Incubamos por 4 horas a 37 grados con CO<sub>2</sub>.

DESPUES DE 4 HORAS:

### A. Medio

-Durante las 4 horas de incubación, se etiquetan los eppendorfs que se utilizarán, 3 eppendorf por cada muestra

-Tomamos los 0.3mL de cada pozo y los ponemos en el correspondiente eppendorf. Después de que tenemos todo el medio de los pozos en los eppendorf, los centrifugamos por 10 minutos a RT (velocidad máxima)

-Durante el centrifugado del medio, se preparan las placas de lectura de 24 pozos, se le agrega 0.5mL de líquido de “centelleo” a cada pozo

- Se toman .25mL de cada eppendorf una vez centrifugadas las muestras y se ponen en cada pozo de las placas de lectura

-Se tapan las placas con un film transparente, evitando formación de burbujas, se agita ligeramente en el vortex

-Leer radioactividad en Trilux, con el protocolo previamente establecido en la PC

### B. Células

Una vez recuperado el medio de las placas, las células que están adheridas a los pozos, son lisadas al agregar 500 µL de hexan:isopropanol/hexano propan-2-ol (en una campana). esto es para recuperar los lípidos.

- Se incuban las placas con el hexan:isopropanol... por 15 minutos en agitación ligera.
- Se recupera la solución de cada pozo en tubos de vidrio (previamente etiquetados) de 3mL
- Se ponen los tubos en una placa calentadora para evaporar el líquido.
- Una vez evaporado el líquido contenido en los tubos, se retiran de la placa y se pone 250  $\mu$ L de reactivo para medir colesterol (Roche)
- se agita ligeramente cada tubo en vortex 15 segundos y luego se vacía el contenido de cada tubo en las placas de lectura que previamente ya tienen el líquido de centelleo dentro (no en la misma placa donde se puso el medio, son placas distintas)
- Se coloca un film transparente en la placa, se agita la placa ligeramente en un vortex y posteriormente se lee la radioactividad en el Trilux.