



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“ESTUDIO DE LA TRIGLICERIDEMIA  
POSTPRANDIAL EN MUJERES CON SÍNDROME  
ISQUÉMICO CORONARIO AGUDO (SICA): EFECTO  
DE LA SUPLEMENTACIÓN CON  
MICROENCAPSULADO DE GRANADA ROJA (*PUNICA  
GRANATUM L*)”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**DIEGO ESTRADA LUNA**

DIRECTOR DE TESIS  
**DR. ÓSCAR A. PÉREZ MENDEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:  
**DRA. KARLA GUADALUPE CARVAJAL AGUILERA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 265679.

Se agradece el apoyo del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por su apoyo para la realización de esta investigación. Al Bioterio y al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por facilitar el manejo de las muestras así como de las pacientes con SICA. Principalmente al Laboratorio de Metabolismo de Lípidos, del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por apoyar y proporcionar los reactivos y equipos necesarios durante la realización del doctorado.

## Índice

### Resumen

### Abstract

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Antecedentes</b>  | 1  |
| 1.1 Características generales de las lipoproteínas                                  | 2  |
| 1.2 Lipoproteínas de alta densidad y su importancia fisiológica                     | 3  |
| 1.3 Hipertrigliceridemia postprandial   | 7  |
| 1.4 Antioxidantes naturales y su relación con las HDL                               | 9  |
| 1.5 Paraoxonasa-1 (PON1) y su relación con enfermedades cardiovasculares            | 10 |
| 1.6 Disfunción endotelial y el efecto del consumo de antioxidantes                  | 11 |
| 1.7 Granada roja ( <i>Punica granatum L</i> )                                       | 14 |
| <b>2. Justificación</b>   | 18 |
| <b>3. Hipótesis</b>   | 19 |
| <b>4. Objetivos</b>   | 19 |
| 4.1 Objetivo general  | 19 |
| 4.2 Objetivos específicos   | 19 |
| <b>5. Materiales y métodos</b>  | 21 |
| 5.1 Metodología para el estudio en conejos sanos                                    | 21 |
| 5.1.1 Diseño del estudio  | 21 |
| 5.1.2 Animales de estudio   | 21 |
| 5.1.3 Administración del MEGR en conejos sanos                                      | 21 |
| 5.1.4 Concentración plasmática de lípidos en conejos sanos                          | 22 |
| 5.1.5 Aislamiento y análisis de la composición proteica de las HDL en conejos sanos | 23 |
| 5.1.6 Determinación de la actividad de PON1 en suero de conejos sanos               | 24 |
| 5.1.7 Reactividad vascular en anillos de aorta de conejos sanos                     | 24 |
| 5.2 Metodología para el estudio en mujeres con SICA                                 | 25 |
| 5.2.1 Diseño del estudio  | 25 |
| 5.2.2 Población de estudio  | 25 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 5.2.2.1   | Criterios de inclusión  | 26        |
| 5.2.2.2   | Criterios de exclusión  | 26        |
| 5.2.2.3   | Criterios de eliminación  | 26        |
| 5.2.3     | Tamaño de la muestra  | 26        |
| 5.2.4     | Implementación de una alimento alto en lípidos  | 27        |
| 5.2.5     | Suplementación del MEGR en mujeres con SICA   | 28        |
| 5.2.6     | Obtención de las muestras   | 28        |
| 5.2.7     | Concentración plasmática de lípidos en mujeres con SICA                                     | 28        |
| 5.2.8     | Aislamiento y análisis de la composición proteica de las HDL generadas en mujeres con SICA  | 29        |
| 5.2.9     | Determinación de la fracción lipídica de las HDL generadas en mujeres con SICA              | 29        |
| 5.2.10    | Determinación de la actividad de PON1 en mujeres con SICA                                   | 29        |
| 5.2.11    | Reactividad vascular en anillos de aorta de rata incubados con HDL de mujeres con SICA      | 29        |
| 5.3       | Análisis estadístico  | 30        |
| <b>6.</b> | <b>Resultados</b>   | <b>31</b> |
| 6.1       | Efecto de la administración del MEGR en conejos sanos                                       | 31        |
| 6.1.1     | Efecto del MEGR sobre el perfil lipídico y glucosa en conejos sanos                         | 31        |
| 6.1.2     | Efecto del MEGR sobre la composición proteica de las HDL de conejos sanos                   | 32        |
| 6.1.3     | Efecto del MEGR sobre la actividad de PON1 en conejos sanos                                 | 33        |
| 6.1.4     | Efecto del MEGR sobre la función endotelial en anillos de aorta de conejos sanos            | 34        |
| 6.2       | Efecto de la suplementación con MEGR en mujeres con SICA                                    | 36        |
| 6.2.1     | Parámetros fisiológicos y nutricionales de las mujeres con SICA                             | 36        |
| 6.2.2     | Efecto de la suplementación con MEGR sobre el perfil lipídico y glucosa en mujeres con SICA | 36        |
| 6.2.3     | Efecto del MEGR sobre el perfil lipídico de las HDL de mujeres con SICA                     | 39        |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.2.4 Efecto del MEGR en la distribución de los tamaños de las HDL en mujeres con SICA                           | 39        |
| 6.2.5 Efecto del MEGR en la actividad de la PON1 en plasma de mujeres con SICA                                   | 41        |
| 6.2.6 Efecto del MEGR en la función endotelial en anillos de aorta de rata incubados con HDL de mujeres con SICA | 42        |
| <b>7. Discusión</b>  | <b>44</b> |
| <b>8. Conclusión</b>   | <b>51</b> |
| <b>9. Bibliografía</b>   | <b>52</b> |
| <b>10. Anexos</b>  | <b>60</b> |

## Índice de tablas y figuras

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Figura 1</b> | Composición y clasificación de las lipoproteínas  | 3  |
| <b>Figura 2</b> | Biogénesis y catabolismo (transporte reverso de colesterol) de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)   | 5  |
| <b>Tabla 1</b>  | Principales constituyentes del fruto de la granada roja   | 15 |
| <b>Tabla 2</b>  | Información nutrimental del sándwich utilizado para la intervención en el estudio   | 27 |
| <b>Tabla 3</b>  | Efecto de la suplementación con MEGR sobre el perfil de lípidos y concentración de glucosa de conejos sanos   | 32 |
| <b>Tabla 4</b>  | Efecto de la suplementación de MEGR sobre la distribución relativa de las HDL generadas en conejos sanos determinada por el porcentaje total de proteína                            | 33 |
| <b>Figura 3</b> | Efecto de la suplementación con MEGR sobre la actividad de la PON1 en conejos sanos   | 34 |
| <b>Figura 4</b> | Efecto del MEGR sobre la relajación mediada por endotelio en anillos de aorta de conejos sanos  | 35 |
| <b>Tabla 5</b>  | Características de las pacientes con SICA   | 37 |
| <b>Tabla 6</b>  | Efectos de la suplementación con MEGR en el perfil de lípidos en plasma y concentraciones de glucosa en ayuno y a las 4 y 8 h después de haber ingerido un alimento alto en lípidos | 38 |
| <b>Tabla 7</b>  | Efecto de la suplementación con MEGR sobre el porcentaje total de proteína en HDL generadas en ayuno y postprandio en mujeres con SICA  | 40 |
| <b>Figura 5</b> | Efecto del MEGR sobre la actividad de la PON1 en suero de mujeres con SICA  | 41 |
| <b>Figura 6</b> | Efecto del MEGR sobre la relajación mediada por endotelio en anillos de aorta de rata incubados con HDL de pacientes con SICA   | 43 |

## Abreviaturas

|                |  |
|----------------|--|
| <b>ABCA1</b>   | Transportador A1 dependiente de ATP  |
| <b>ABCI</b>    | Área bajo la curva incremental   |
| <b>AGM</b>     | Ácidos grasos monoinsaturados  |
| <b>AGP</b>     | Ácidos grasos poliinsaturados  |
| <b>AGS</b>     | Ácidos grasos saturados  |
| <b>Apo</b>     | Apolipoproteínas   |
| <b>ARE</b>     | Ariesterasa  |
| <b>ATBC</b>    | Área total bajo la curva   |
| <b>CE</b>      | Ésteres de colesterol  |
| <b>CETP</b>    | Proteína transportadora de esteres de colesterol                                 |
| <b>c-HDL</b>   | Colesterol de lipoproteínas de alta densidad                                     |
| <b>c-LDL</b>   | Colesterol de lipoproteínas de baja densidad                                     |
| <b>EAC</b>     | Enfermedad arterial coronaria  |
| <b>EGCG</b>    | Epigallocatequina galato   |
| <b>eNOS</b>    | Óxido nítrico sintasa  |
| <b>ERC</b>     | Especies reactivas de cloro  |
| <b>EROs</b>    | Especies reactivas de oxígeno  |
| <b>FFL</b>     | Fosfolípidos   |
| <b>FFL-HDL</b> | Fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad                                   |
| <b>HC</b>      | Carbohidratos  |
| <b>HDL</b>     | Lipoproteínas de alta densidad ( <i>High density lipoprotein</i> )               |
| <b>ICAM1</b>   | Molécula de adhesión intracelular-1  |
| <b>IDL</b>     | Lipoproteínas de densidad intermedia ( <i>Intermediate density lipoprotein</i> ) |
| <b>IECA</b>    | Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina                            |
| <b>IMC</b>     | Índice de masa corporal  |
| <b>JG</b>      | Jugo de granada  |



|               |  |
|---------------|--|
| <b>Kcal</b>   | Kilocalorías   |
| <b>LCAT</b>   | Lecitina colesterol acetiltransferasa                                      |
| <b>LDL</b>    | Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low density lipoprotein</i> )          |
| <b>LDLr</b>   | receptor de LDL  |
| <b>LPL</b>    | Lipoproteína lipasa  |
| <b>MCP-1</b>  | Proteína quimioatrayente de monocitos-1                                    |
| <b>MEGR</b>   | Microencapsulado de granada roja   |
| <b>NO</b>     | Óxido nítrico (Nitric oxide)   |
| <b>PA</b>     | Presión arterila   |
| <b>PAF-AH</b> | Factor de activación plaquetaria de acetilhidrolasa                        |
| <b>PON1</b>   | Paraoxonasa-1  |
| <b>PPAR</b>   | Receptor activado por proliferador de peroxisomas                          |
| <b>Qm</b>     | Quilomicrones  |
| <b>S1P</b>    | Esfingosina 1-fosfato  |
| <b>SICA</b>   | Síndrome isquémico coronario agudo   |
| <b>SR-B1</b>  | Receptor Scavenger clase B tipo 1  |
| <b>Tg</b>     | Triglicéridos  |
| <b>Tg-HDL</b> | Triglicéridos de lipoproteínas de alta densidad                            |
| <b>TRC</b>    | Transporte reverso del colesterol  |
| <b>VCAM</b>   | Molécula de citoadhesión vascular  |
| <b>VLDL</b>   | Lipoproteínas de muy baja densidad ( <i>Very low density lipoprotein</i> ) |
| <b>WISE</b>   | Evaluación del síndrome isquémico en mujeres                               |

## **Resumen**

*Introducción:* Existe una relación negativa entre las concentraciones plasmáticas entre el C-HDL y el riesgo de desarrollar Enfermedad Aterosclerosa Coronaria (EAC); además, la composición de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se ve alterada por algunos componentes nutricionales y durante el estado postprandial, probablemente afectando su funcionalidad frente al endotelio. Dado que el síndrome isquémico coronario agudo (SICA) en las mujeres con frecuencia se asocia con la disfunción endotelial, es probable que las HDL son incapaces de mejorar la vasodilatación en estas pacientes. Por lo tanto, caracterizamos las HDL primero en un modelo animal sano y en mujeres con SICA, en condiciones de ayuno y en postprandio. También determinamos si el microencapsulado de granada roja (MEGR) revierte las anomalías de las HDL, ya que estudios anteriores han sugerido que el fruto mejora la funcionalidad de las HDL. *Métodos:* Seis conejos Nueva Zelanda y once mujeres con antecedentes de SICA fueron suplementados diariamente con 1g y 20 g de MEGR, respectivamente durante 30 días. Se obtuvieron muestras de plasma en ayuno antes y después de la administración en los conejos Nueva Zelanda. Se obtuvieron muestras de plasma en ayuno y en diferentes tiempos del postprandio (4 y 8 h), después de una carga de lípidos para determinar el perfil de lípidos y la actividad de Paraoxonasa-1 (PON1). Las HDL fueron aisladas por ultracentrifugación secuencial para determinar su distribución del tamaño y evaluar su efecto sobre la función endotelial directamente en anillos de aorta de conejo; mientras que en el estudio de mujeres con SICA se determinó indirectamente usando anillos de aorta de rata. *Resultados:* En ambos estudios, el MEGR mejoró el perfil lipídico e incrementó la actividad de PON1, como se reportó previamente, con el jugo fresco de granada roja. Después de la suplementación con MEGR, en las mujeres con SICA, el área incremental bajo la curva de triglicéridos disminuyó a la mitad de los valores iniciales. La distribución de las HDL cambio de las partículas grandes a partículas intermedias y pequeñas durante el postprandio en condiciones basales, estos cambios no se observaron después del consumo del MEGR. Consistentemente, en ambos estudios, las HDL aisladas de muestras en ayuno dificultaron la

vasodilatación de los anillos de aorta, en el estudio con las mujeres con SICA, se observó el mismo comportamiento durante los periodos del postprandio, y esta disfunción endotelial se revirtió con el consumo del MEGR. *Conclusiones:* el MEGR mostró los mismos efectos benéficos sobre el perfil lipídico y la actividad de la PON1 que se ha reportado previamente en el jugo de granada fresco. Además, la suplementación con MEGR revirtió los efectos negativos de las HDL sobre la función endotelial generada durante el postprandio en las mujeres con SICA.

## **Abstract**

*Introduction:* There is a negative relationship between high-density lipoprotein cholesterol (C-HDL), and the coronary artery disease (CAD); besides, the composition of high-density lipoproteins (HDL) becomes altered by some nutrimental compounds and during the postprandial state, probably affecting their functionality vis-à-vis the endothelium. Since acute coronary syndrome (ACS) in women is frequently associated with endothelial dysfunction, it is likely that HDL are unable to improve artery vasodilation in these patients. Therefore, we characterized HDL first in a healthy animal model and from women with ACS in fasting and postprandial conditions. We also determined whether microencapsulated pomegranate (MiPo) reverts the HDL abnormalities, since previous studies have suggested that this fruit improves HDL functionality.

*Methods:* Six New Zealand rabbits and eleven women with a history of ACS were supplemented daily with 1 g and 20 g of MiPo respectively, for 30 days. Plasma samples were obtained during fasting in pre and post-administration in New Zealand rabbits. Plasma samples were obtained in fasting period and at different times (4 and 8 h), after a lipid load test to determine the lipid profile and paraoxonase-1 (PON1) activity. HDL were isolated by sequential ultracentrifugation to determine their size distribution and to assess their effect on endothelial function in rabbits aorta rings directly; meanwhile in the study with SICA women were measured indirectly the endothelial function by using an in vitro model of rat aorta rings.

*Results:* In both studies, MiPo improved the lipid profile and increased PON1 activity, as previously reported, with fresh pomegranate juice. After supplementation with MiPo, in women with ACS the incremental area under the curve of triglycerides decreased to half of the initial values. The HDL distribution shifted from large HDL to intermediate and small-size particles during the postprandial period in the basal conditions, whereas such a shift was no longer observed after MiPo supplementation. Consistently, in both studies HDL isolated from fasting plasma samples hindered the vasodilation of aorta rings, in the study of women with ACS we observed the same behavior during postprandial periods and this endothelial dysfunction was reverted after MiPo consumption.

*Conclusions:* MiPo exhibited the same beneficial effects on the lipid profile and PON1 activity as the previously reported fresh pomegranate. In addition, MiPo supplementation reverted the negative effects of HDL on endothelial function generated during the postprandial period in women with ACS.

## 1. Antecedentes

La enfermedad arterial coronaria (EAC) contribuye con aproximadamente con un tercio de la muertes en sujetos mayores de 35 años (1). La tasa de muerte por EAC es 3 veces mayor en hombres que en mujeres en el intervalo de edad de 25 a 34 años, y decrece a 1.6 veces en el intervalo de edad de 75 a 84 años (1, 2). Además, alrededor de la mitad de la población masculina y un tercio de las mujeres en edades entre los 30 a los 60 años padecen EAC (1).

La mayoría de los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA) están relacionados con la presencia de placa ateromatosa que ocluyen la luz del vaso. La aterosclerosis es una de las principales afecciones cardiovasculares, es progresiva y está caracterizada por el desarrollo de una placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias en el espacio subendotelial de arterias de ciertos territorios (3). El ateroma se establece en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (iliacas y femorales) (4). Otra de las principales enfermedades cardiovasculares es la hipertensión arterial, desorden heterogéneo que resulta de la interacción de factores genéticos y ambientales como el estrés, la dieta y la actividad física. Aunque no se tiene una etiología definida, se ha descrito que se caracteriza básicamente por la existencia de una disfunción endotelial y la ruptura del equilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores. La disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones tanto de la hipertensión como de la aterosclerosis, entre otras enfermedades vasculares (5-7). Además, las lipoproteínas contribuyen de manera activa al desarrollo del ateroma.

### *1.1 Características generales de las lipoproteínas*

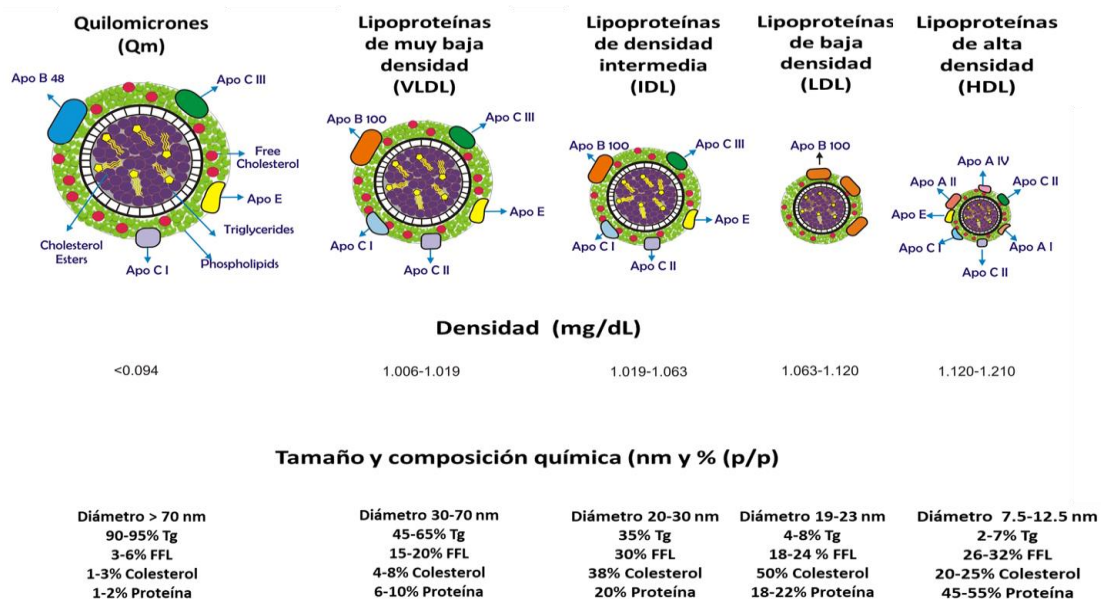
Las lipoproteínas son complejos macromoleculares y su estructura se divide en 2 elementos: núcleo y superficie. En el núcleo se encuentran los lípidos no polares, como los ésteres de colesterol, los triglicéridos y pequeñas cantidades de

vitaminas liposolubles, lo que hace que el núcleo sea muy hidrofóbico. La superficie de las lipoproteínas se encuentra constituida por lípidos anfipáticos como el colesterol libre y fosfolípidos (esfingomielina y fosfatidilcolina) que exponen sus grupos polares hacia el medio acuoso, mientras que sus extremidades hidrofóbicas quedan orientadas hacia el núcleo. Esta monocapa se encuentra estabilizada por un conjunto de proteínas denominadas apolipoproteínas (8-10).

Las lipoproteínas son clasificadas con base a sus propiedades fisicoquímicas una de las más utilizadas es de acuerdo a su densidad de flotación dividiéndose en 5 clases: Quilomicrones (**Qm**), lipoproteínas de muy baja densidad (**VLDL**), lipoproteínas de densidad intermedia (**IDL**), lipoproteínas de baja densidad (**LDL**) y lipoproteínas de alta densidad (**HDL**) (10, 11). Cada una de estas clases difiere del contenido de apolipoproteínas y en su composición química (**Figura 1**). Otras formas de clasificar a las lipoproteínas de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas: 1) *Por su movilidad electroforética*: 3 clases que son  $\alpha$  (HDL),  $\beta$  (LDL) y las pre- $\beta$  (VLDL). 2) *Por su contenido de apolipoproteínas*: Las lipoproteínas que contienen Apo B100 (VLDL, IDL y LDL) y las lipoproteínas que contienen Apo B48 (Qm); el tercer grupo que conforma la clasificación son las HDL que contienen Apo AI (12). Estas apolipoproteínas además de proporcionar estabilidad a las partículas, tienen funciones como cofactores de enzimas, reguladoras del contenido de colesterol intracelular y capacidad de solubilizar lípidos en la sangre, además de un papel importante en la síntesis de nuevas lipoproteínas (13).

Debido a su importancia en el transporte de triglicéridos y colesterol en el organismo, se ha incrementado durante las últimas el interés en el estudio de las lipoproteínas y su relación con el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas, lo que ha llevado al desarrollo de tratamientos reguladores de la concentración de lípidos dirigidos principalmente a la regulación de los niveles plasmáticos del c-LDL. Sin embargo, la reducción del riesgo relativo (incluso disminuyendo los niveles de c-LDL por debajo de lo recomendado) es aproximadamente del 25-35% (14, 15), lo que indica que los eventos coronarios se

siguen presentando, esto posiblemente a la presencia de otras complicaciones como concentraciones bajas de c-HDL y/o valores altos de triglicéridos, que son también factores de riesgo independientes para la enfermedad arterial coronaria (EAC) principalmente (16, 17).



**Figura 1. Composición y clasificación de las lipoproteínas.** El criterio de clasificación está basado en la densidad de flotación de las lipoproteínas; la proporción en el contenido de lípidos, apolipoproteínas y el diámetro de las partículas se presenta debajo de cada lipoproteína. Los quilomicrones (Qm) son los más grandes y ricos en triglicéridos, la remoción de triglicéridos por parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) resulta en la formación de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) la cuales son consideradas como pro-aterogénicas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportan la mayoría del colesterol y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son las más pequeñas y enriquecidas en proteínas. TG= triglicéridos; FFL= fosfolípidos; Apo= apolipoproteína.

### 1.2 Lipoproteínas de alta densidad y su importancia fisiológica

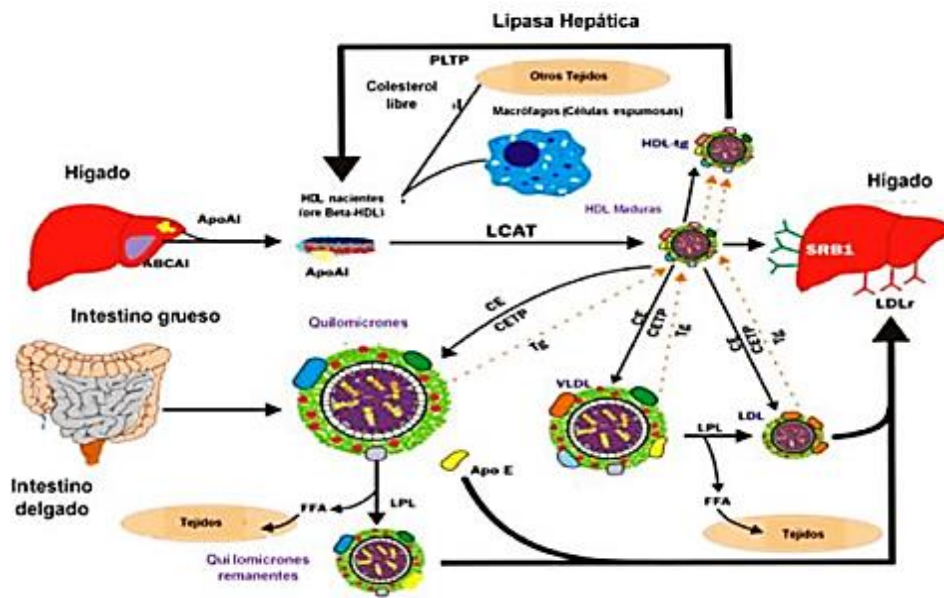
Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son un grupo heterogéneo de partículas esféricas, presentan una movilidad electroforética principalmente en la fracción  $\alpha$  del plasma y son las más pequeñas y densas de las lipoproteínas debido a su alto contenido proteico (13, 18). La síntesis de las HDL depende de la síntesis de su mayor componente proteico que es Apo A1. Las HDL se han separado y



caracterizado por su carga, densidad y tamaño a partir de diversas técnicas como la ultracentrifugación, resonancia magnética nuclear, electroforesis, cromatografía líquida de alta resolución y movilidad iónica (18-20).

Las funciones de las HDL son diversas e incluyen, la inhibición de la oxidación de las LDL, la mejora de la función endotelial, la estabilización de la síntesis de óxido nítrico (NO), la inhibición de la adhesión de los monocitos hacia el endotelio y el transporte del colesterol de tejidos extrahepáticos hacia el hígado para ser reciclado o eliminado, proceso que se le conoce como transporte reverso de colesterol (TRC) y que es la principal función cardioprotectora que se les han atribuido a las HDL (**Figura 2**). La biogénesis de las HDL comienza en el intestino delgado y en el hígado, donde los precursores de las HDL (pre- $\beta$ 1-HDL) son liberados. A continuación, la enzima lecitin: colesterol aciltransferasa (LCAT), la cual es sintetizada en el hígado, promueve la formación de HDL maduras ( $\alpha$ -HDL) catalizando la formación de un enlace ester entre un ácido graso proveniente de la lecitina (fosfatidilcolina) y una molécula de colesterol libre. Los ésteres de colesterol son más hidrofóbicos que el colesterol libre, por lo que migran al núcleo de las HDL favoreciendo la incorporación y reacomodo de más colesterol libre en la superficie de las HDL (21, 22).

Por otra parte, la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) intercambia los ésteres de colesterol que se encuentran en el núcleo de las HDL por triglicéridos provenientes de los Qm, VLDL y LDL (19, 20), enriqueciendo con triglicéridos a las HDL (**Figura 2**).



**Figura 2. Biogénesis y catabolismo (transporte reverso de colesterol) de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).** CE= ésteres de colesterol; CETP= proteína transportadora de ésteres de colesterol; LCAT= lecitin: colesterol aciltransferasa; FFA= ácidos grasos libres; LPL= lipoproteína lipasa; PLTP= proteína transportadora de fosfolípidos; ABCA1=Transportador A1 dependiente de ATP; SR-B1= receptor Scavenger clase B tipo 1; LDLr= receptor LDL.

Estudios epidemiológicos han identificado que una baja concentración de c-HDL es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (23-25); inicialmente el *Framingham Heart Study* estableció que una concentración menor a 35 mg/dL es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de un evento cardiovascular y que una concentración de 60 mg/dL o más, es un factor protector (23). Actualmente se considera que una concentración <40 mg/dL para hombres y <50 mg/dL para mujeres representa un factor de protección. Estos datos formaron la base que llevó a la idea de que las HDL podrían tener funciones protectoras contra el desarrollo de EAC (21, 22).

Estudios prospectivos donde se evaluaron a diversos grupos étnicos y raciales confirman que el c-HDL es un importante factor de riesgo independiente de eventos cardiovasculares (26, 27), así como también el *American Heart Association* y el *American College of Cardiology* apoyan que la concentración de

c-HDL es un predictor de riesgo importante que debe evaluarse en la práctica clínica. Sin embargo, estudios prospectivos han comparado las concentraciones de Apo A1 y de c-HDL como factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, teniendo como mejor factor predictivo la concentración de Apo A1 (28). Existe una amplia variedad de factores patofisiológicos y ambientales que influyen en el metabolismo lipídico; algunos de estos disminuyen la concentración plasmática de HDL como son la obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades inflamatorias y tabaquismo. Por otra parte, existen factores que incrementan la concentración de c-HDL como los niveles de estrógenos, la regulación de la hormona tiroidea, el ejercicio y el consumo moderado de alcohol (27).

Por otra parte, las HDL se clasifican en 5 subclases propuestas por Rizzo *et al.* y que son: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c e indicaban que las HDL2b y 2a además de ser las más grandes, poseen más propiedades ateroprotectoras (20, 29, 30), y que los niveles de concentración de estas subclases son mejores predictores de riesgo cardiovascular que el c-HDL total por sí mismo (28, 31, 32). Hoy en día se estudia la participación e importancia de estas subclases en la etiología de diversas enfermedades; aproximadamente el 75% del c-HDL se encuentra asociado a las HDL3 que juega un papel importante en el TRC (13). En algunos estudios se ha descrito que en personas con infarto agudo al miocardio se encuentran asociados a niveles bajos de HDL3 en comparación a los niveles de HDL2 (13, 16, 17, 33). Sin embargo, se ha reportado que el eflujo de colesterol de las HDL2 y HDL3 se ve disminuido en personas con síndrome coronario agudo (34). Junto a este fenómeno, se ha visto que hay un cambio en la conformación que se relaciona con la pérdida de sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y una disminución de promover el flujo de salida del colesterol.

La función de las HDL es dependiente de su estructura; en estados de estrés oxidativo, infección e inflamación disminuye su actividad y existe una alteración de sus enzimas y proteínas asociadas, así como una disminución de sus niveles plasmáticos (35). Así, el término de “HDL disfuncionales” se refiere a HDL que presentan cambios en su conformación y que han perdido sus propiedades funcionales, incluso cuando los niveles de c-HDL son normales e incluso altos

(24). Los efectos adversos de las HDL disfuncionales pueden explicar cómo a pesar de tener concentraciones altas en plasma, estas lipoproteínas pueden contribuir a la desestabilización y ruptura de la placa aterosclerótica (32).

### *1.3 Hipertrigliceridemia postprandial*

La relación entre hipertrigliceridemia y el riesgo de enfermedades cardiovasculares es aún controversial. Algunos estudios muestran que la concentración de triglicéridos es un factor independiente de riesgo para desarrollar alguna enfermedad cardiovascular, aunque existen inconsistencias al respecto. Por tal razón, la mayoría de las guías clínicas continúan enfocándose en la disminución de c-LDL como meta terapéutica (11, 35). Algunas evidencias recientes apoyan los mecanismos proaterogénicos de los triglicéridos; en un estudio prospectivo con 26,509 mujeres jóvenes sanas se demostró que los triglicéridos se asocian con el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares, incluso después de ajustar por edad, presión arterial, consumo de tabaco y terapia hormonal de reemplazo (36). En un metaanálisis de 68 estudios prospectivos (302,430 personas), la hipertrigliceridemia, ajustado por género y edad, mostró una asociación significativa con la enfermedad cardiovascular y el evento vascular cerebral (32). Sin embargo, esta asociación se atenuó después de ajustar por c-HDL; además, la hipertrigliceridemia en ayuno está asociada a disminución de los niveles de c-HDL y un incremento de los niveles de partículas LDL pequeñas y densas que pueden penetrar el endotelio vascular más fácilmente y formar parte de la placa aterosclerosa (37).

En la mayoría de los estudios mencionados previamente, sólo se analizaron los niveles de triglicéridos en ayuno. Algunos estudios prospectivos sugirieron que la evaluación de riesgo de EAC utilizando los niveles de triglicéridos en ayuno podría subestimar la magnitud del riesgo asociado porque esta variable no toma en cuenta el potencial aterogénico de la lipemia postprandial (38). Varios estudios sugieren que niveles elevados de triglicéridos postprandiales pueden incluso ser un mejor predictor de eventos coronarios que los niveles en ayuno (39-42). Esto

es particularmente significativo dado que en las sociedades modernas, el estado postprandial en el humano es más duradero que el estado de ayuno.

Los lípidos de los alimentos después de ser absorbidos se ensamblan en quilomicrones en el retículo endoplásmico del enterocito; estas lipoproteínas están caracterizadas por contener más del 90% de su masa seca como triglicéridos, una molécula de Apo B48, y Apo AI (12). Los quilomicrones son exportados por el aparato de Golgi a través de la membrana basolateral y transportados por la linfa, en donde adquieren Apo CII y Apo E y se separan de la Apo AI dando lugar a HDL de origen intestinal, hasta alcanzar el torrente sanguíneo. En la circulación, los quilomicrones son transformados en remanentes debido a la acción lipolítica de la lipasa lipoproteica (LPL) activada por su cofactor proteico, la Apo CII. La mayoría de los ácidos grasos producidos por este proceso son oxidados o almacenados en el tejido adiposo, el músculo y el hígado. Los remanentes de quilomicrones son ricos en ésteres de colesterol y contienen sólo Apo B48 y Apo E. Los hepatocitos son las células que depuran los remanentes de quilomicrones, principalmente por receptores de LDL (Apo E es el ligando) y proteoglicanos en el espacio de Disse (lipasa lipoproteica, lipasa hepática y Apo E son los ligandos). Otros receptores que parecen estar involucrados en este proceso incluyen al “scavenger receptor class B type I” (SR-BI) y el “LDL-receptor- related protein-1” (LRP-1) (43) . Se ha propuesto que las lipoproteínas que contienen Apo B48 y Apo B100 son componentes de la placa aterosclerosa (44, 45).

Durante la lipemia postprandial existe cambios en el número y composición de las lipoproteínas circulantes, así como efectos inflamatorios. Éstos incluyen un incremento de la expresión de genes pro-inflamatorios en las células endoteliales y activación del sistema del complemento (39, 46). Con respecto a los cambios en lipoproteínas, existe principalmente un incremento en el número de remanentes de lipoproteínas, VLDL, ácidos grasos libres y partículas de LDL pequeñas y densas (47). En estas condiciones, el endotelio sufrirá una exposición prolongada a dichas lipoproteínas que pueden penetrar al espacio subendotelial, resultado en la formación de células espumosas y aterosclerosis. Por lo tanto, si la estructura de las HDL se altera durante el postprandio, la función anti-aterosclerosa será

igualmente afectada. En efecto, es posible que la magnitud de la trigliceridemia postprandial a partir de una cierta concentración pueda afectar la estructura de las HDL como lo han sugerido estudios recientes de nuestro laboratorio (48). De esta manera, se generarían HDL disfuncionales a partir de ciertos niveles de triglicéridos postprandiales. No obstante, se conoce poco acerca de la relación entre la magnitud de la trigliceridemia postprandial, con la estructura y función de las HDL.

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

#### *1.4 Antioxidantes naturales y su relación con las HDL*

El consumo de polifenoles proveniente de extractos de frutas y plantas, incrementa los niveles antioxidantes en plasma los cuales protegen a la vasculatura, mejoran los perfiles lipídicos, presión sanguínea y niveles de c-HDL. Se ha establecido que la oxidación de las LDL constituye una clave para el desarrollo de eventos inflamatorios y de aterogénesis. Los mecanismos de oxidación de las LDL *in vivo* involucran modificaciones en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de cloro (ERC) (49, 50). Para tratar de revertir este efecto se han administrado, en dosis fisiológicamente relevantes, antioxidantes como vitamina C y E que han demostrado proteger parcialmente de la oxidación a las LDL *in vivo* (51). Las HDL tienen importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias debido a que pueden adherirse e inhibir la propagación de lípidos oxidados. Esta propiedad puede ser atribuida a la paraoxonasa-1 (PON1), al Factor de activación plaquetaria de acetilhidrolasa (PAF-AH), la glutatión selenoperoxidasa y Apo-AI

principalmente, que pueden remover lípidos oxidados de las LDL (52). Además, se ha encontrado que pueden participar otras apolipoproteínas que están en menor proporción pero que también presentan actividad antioxidante como la Apo AII, Apo AIV, ApoE y Apo J Apo L-1 y Apo F (53). Las subclases de las HDL3 han mostrado tener una mayor actividad de PON1, PAF-AH y LCAT, así como una mayor composición de Apo J, Apo L-1 y Apo F (54), además de presentar una mayor capacidad de inhibir la expresión de moléculas de adhesión, aunque sigue siendo poco claro si esto tenga que ser directamente atribuido a su composición proteica diferente a las subclases más grandes (55-57). En consecuencia, se ha propuesto que mejorando o restaurando la función antioxidante de las HDL podrían disminuir efectos citotóxicos, apoptóticos o de liberación de citocinas; sin embargo, la elevación de las concentraciones de HDL a través de las terapias farmacológicas no han tenido impacto en la morbilidad y mortalidad en pacientes con SICA (22).

### *1.5 Paraoxonasa-1 (PON1) y su relación con enfermedades cardiovasculares*

La paraoxonasa-1 (PON1) (EC 3.1.8.1), es una esterasa dependiente de calcio que hidroliza ésteres aromáticos. Cuando la actividad enzimática es determinada utilizando paraoxón como sustrato, la actividad de la enzima se denomina actividad de paraoxonasa, mientras que la actividad determinada utilizando fenilacetato se denomina arilesterasa. La PON1 se sintetiza en el hígado de los mamíferos, circula por la sangre unida a las Apo AI y Apo J de las HDL, y su expresión se inhibe por estímulos proaterogénicos (58).

Algunos estudios sugieren que un incremento en la actividad de PON1 está asociado con la reducción de la placa aterosclerosa y que los bajos niveles de actividad enzimática son considerados como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de eventos coronarios y otras enfermedades metabólicas (59, 60). La expresión del gen *PON1* es inhibida por condiciones proaterogénicas y es alterada por factores como la dieta, actividad física, fármacos y factores genéticos (61). Se ha estudiado el posible papel de PON1 en la preservación de la integridad

y actividad antioxidante de las HDL y su papel relevante en procesos de detoxificación y de aterosclerosis, no sólo participando con las HDL sino también en otras lipoproteínas como los Qm generados en el postprandio que podrían ayudar a la remoción de lípidos oxidados (62, 63). En estudios epidemiológicos, se ha determinado que los polimorfismos de PON1, influyen sobre su actividad y concentración, además de contribuir en la variación de los niveles de HDL (64, 65), por lo que la preservación de las partículas de HDL puede tener un papel benéfico para la actividad y expresión de PON1 (66, 67). Otra acción cardioprotectora de PON1 es la capacidad de hidrolizar tiolactonas de homocisteína, la cual se ve reflejado en el desarrollo de disfunción endotelial y daño vascular (68).

A pesar de la fuerte relación de las HDL con PON1, la concentración de HDL y la actividad de la enzima no siempre se correlacionan (65). Una variedad de diversos factores no-genéticos parecen influir en la actividad y concentración sérica de PON1 por ejemplo, bajo condiciones de estrés oxidativo la actividad de PON1 disminuye significativamente y esta disminución puede ser compensada por el consumo de antioxidantes dietarios como los polifenoles u otros componentes bioactivos que probablemente mantienen la integridad de la enzima. El consumo moderado de alcohol, vitamina C y vitamina E incrementan los niveles de PON1 en humanos y animales (69, 70).

### *1.6 Disfunción endotelial y el efecto del consumo de antioxidantes*

El endotelio es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, conectada por uniones intercelulares que, entre otras cosas, restringe el tráfico de macromoléculas entre la sangre y la pared vascular (4). Puede desempeñar funciones antitrombóticas como la inhibición de la adhesión plaquetaria y la coagulación, y regula el sistema fibrinolítico; controla el tono muscular y proliferación a través del monitoreo de la actividad de las células del músculo liso. Por último, modula el tránsito de macromoléculas como las lipoproteínas y la adhesión de leucocitos a la pared arterial (71). Hay diversos



factores que pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se le conoce como disfunción endotelial; ésta se puede definir como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. El endotelio es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, conectada por uniones intercelulares que, entre otras cosas, restringe el tráfico de macromoléculas entre la sangre y la pared vascular. Puede desempeñar funciones antitrombóticas como la inhibición de la adhesión plaquetaria y la coagulación, y regula el sistema fibrinolítico; controla el tono muscular y proliferación a través del monitoreo de la actividad de las células del músculo liso (72, 73). Por último, modula el tránsito de macromoléculas como las lipoproteínas y la adhesión de leucocitos a la pared arterial (74). Hay diversos factores que pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se le conoce como disfunción endotelial; ésta se puede definir como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. Uno de los factores que se han asociado también a la disfunción endotelial son las concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), que son además un factor de riesgo de aterosclerosis y cardiopatía isquémica. Se ha observado que los valores elevados de las LDL alteran las funciones tanto de las células endoteliales como de las células del músculo liso y monocitos. Las LDL alteran la función endotelial debido a que producen una respuesta disminuida de la dilatación dependiente de endotelio (75) y un incremento de las moléculas de adhesión. En células endoteliales en cultivo, concentraciones elevadas de c-LDL (> 160 mg/dl) provocan cambios en el metabolismo del ácido araquidónico (7), alteran la producción de óxido nítrico (NO) y radicales libres (76) e incrementan la expresión de moléculas de adhesión *per se*.

La disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones tanto de la hipertensión como de la aterosclerosis (77). Uno de los factores que se han asociado también a la disfunción endotelial son las concentraciones plasmáticas elevadas de c-LDL, que son además un factor de riesgo prematuro de aterosclerosis y cardiopatía isquémica; se ha observado que los valores elevados de las LDL alteran las funciones tanto de las células endoteliales como de las células del músculo liso y monocitos. Las LDL alteran la función endotelial debido a que producen una respuesta disminuida de la dilatación dependiente de endotelio y un incremento de las moléculas de adhesión (78). Se ha propuesto que las concentraciones aterogénicas de c-LDL (> 160 mg/dl) provocan cambios en el metabolismo del ácido araquidónico y alteran la producción de óxido nítrico (NO) y radicales libres, incrementando la expresión de moléculas de adhesión per se (79). Las HDL promueven la función del endotelio vascular mediante un mecanismo anti-inflamatorio, regulando la expresión de las moléculas de adhesión celular ICAM1, VCAM y selectinas. Asimismo, las HDL favorecen la acción de la óxido nítrico sintasa (NOs) al aportar esfingosina 1-fosfato (S1P) y colesterol indispensable para las balsas lipídicas (lipids-rafts), en donde se ensambla la NOs, con lo que se incrementa la cantidad de NO (80).

Sin embargo, se ha reportado que las mujeres pueden llegar a presentar signos y síntomas cardiovasculares diferentes a los hombres, principalmente relacionados con la disfunción endotelial-vasoespasmos, es decir, llegan a presentar un infarto agudo al miocardio en ausencia estenosis aterosclerosa en cualquier arteria (81); asimismo, se ha observado que mujeres con presencia de sintomatología de isquemia miocárdica, tienen más probabilidades de tener una enfermedad coronaria no obstructiva, como se puso en evidencia con el estudio de Evaluación del Síndrome Isquémico en Mujeres (WISE, por sus siglas en inglés); en un seguimiento durante una década demostró que las mujeres sin enfermedad coronaria obstructiva, tenían un mayor riesgo de muerte o de infarto al miocardio (82).

Por otra parte, se ha evidenciado que el consumo de alimentos, principalmente ricos en antioxidantes como los polifenoles, pueden ayudar a mejorar la

vasorrelajación (83, 84). Este efecto posiblemente dependiente de las activación de la vía Akt/eNOS, una disminución en la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), disminución del daño oxidativo en las arterias coronarias y en general una disminución del estrés oxidativo sistémico (85, 86).

### *1.7 Granada roja (Punica granatum L)*

La granada es un fruto que pertenece a la familia de la punicáceas, sus partes comestibles son consumidas en fresco o usadas para la preparación de jugo fresco, bebidas enlatadas, jaleas, mermeladas, elaboración de pastas, también se usa como colorante o saborizante en diferentes productos (87). La granada ha tomado considerable importancia debido a su aporte nutricional y componentes que proveen beneficios fisiológicos y juegan un papel importante en la prevención de enfermedades o en disminuir la progresión de enfermedades crónicas (88-90). En años recientes, se ha incrementado el interés de consumidores, investigadores y de la industria alimentaria, por el fruto y su aplicación en la salud.

El fruto de la granada está constituido por corteza, semillas y arilos. Otro producto muy importante obtenido del fruto es el jugo que puede ser obtenido de los arilos o del fruto total (91). La composición química del fruto, dependerá de la región de crecimiento, el cultivo, clima, maduración, prácticas de cultivo y las condiciones del almacenamiento. En consecuencia, se han reportado variaciones significativas en los ácidos orgánicos, componentes polifenólicos, azúcares, vitaminas hidrosolubles y minerales que contiene el fruto de la granada. Diversos estudios han resaltado su capacidad antioxidante, debido a su alto contenido en polifenoles, tales como taninos hidrosolubles, flavonoides y ácido elágico (**Tabla 1**) (92, 93).

Alrededor del 50% del peso del fruto es corteza, la cual es una importante fuente de componentes bioactivos como polifenoles, elagitaninos, flavonoides y proantocianinas, son abundantes los minerales como potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio, además de contener carbohidratos complejos. La parte

comestible del fruto de granada (alrededor del 50%) consiste en 40% arilos y 10% de semillas (94). Los arilos contienen 85% agua, 10% azúcares totales, mayormente fructosa y glucosa, 1.5% pectina, ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico; componentes bioactivos como polifenoles y flavonoides (93). Las semillas son ricas en lípidos principalmente, estos comprenden del 12% al 20% del peso total de las semillas. El aceite proveniente de las semillas se caracteriza por tener un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (n-3) como el ácido linoleico,  $\alpha$ -linolénico, ácido punícico, ácido oléico, ácido esteárico y ácido palmítico. La presencia de una gran cantidad de componentes polifenólicos flavonoides y taninos del fruto de granada asegura el alto valor nutricional (95, 96).

Tabla 1. Principales constituyentes del fruto de la granada roja

| <b>Componente de la Granada</b> | <b>Constituyente</b>  |
|---------------------------------|---|
| <b>Jugo de granada</b>          | Antocianinas, glucosa, ácido ascórbico, ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico, catequina, quercetina, aminoácidos y numerosos minerales, principalmente hierro.                    |
| <b>Aceite de semilla</b>        | Ácido punícico (60-80%), ácido elágico, ácidos grasos y esteroides.   |
| <b>Pericarpio (cáscara)</b>     | Punicalaginas fenólicas, ácido gálico y otros ácidos grasos, catequina, epigallocatequina galato (EGCG), quercetina, rutina y otros flavonoides, flavonas, flavononas y antocianidinas. |
| <b>Hojas de la granada</b>      | Taninos (punicalina y punicalolina), glucósidos de flavona, incluyendo luteolina y apigenina.   |
| <b>Flor de la granada</b>       | Ácido gálico, ácido ursólico, triterpenoides, incluyendo maslínico y ácido asiático y otros constituyentes no identificados.  |
| <b>Raíz y corteza</b>           | Punicalina y la punicalagina y diversos alcaloides de piperidina.   |

Se ha reportado que la capacidad antioxidante del jugo de granada (JG) es tres veces más alta que las del vino tinto y el té verde, basado en la evaluación de búsqueda de radicales libres y la capacidad de óxido-reducción de éstos (97-99). El JG también ha mostrado tener niveles significativamente más altos de

antioxidantes en comparación con jugos de frutas comúnmente consumidas como el zumo de uva, arándano, toronja y naranja (100).

El fruto de granada puede ser considerado un alimento funcional por el valor nutricional y bioquímico que tiene cada uno de sus componentes en diferentes partes del fruto que muestran tener efectos fisiológicos (101). Éstos pueden actuar como antioxidantes principalmente y mejoran el estado cardiovascular. Gouédard *et al.* en el año 2004, mostraron que los polifenoles ingeridos en la dieta incrementa la expresión genética de PON1 por un mecanismo dependiente de un receptor arilhidrocarbonado (69). Esto se ha demostrado también en el consumo de resveratrol, que en la dieta se ha asociado con efectos benéficos en enfermedades cardiovasculares, por las propiedades antioxidantes que posee, como la modulación de la expresión genética de la PON1, incrementando la actividad de ésta (69, 102).

El consumo de JG resulta en inhibición en el desarrollo de placas ateroscleróticas en las arterias carótidas (103, 104). Por otro lado, el consumo de granada induce la relajación de endotelio mediada por NO a través de un mecanismo que involucra la activación endotelial de Akt y la fosforilación de eNOS en la Ser1177 promoviendo la vasorrelajación (105). Todos estos efectos que se han atribuido al consumo de polifenoles provenientes de la granada roja que se ven reflejados en la mejora de la isquemia miocárdica inducida por estrés y que se ha detectado en pacientes con enfermedad coronaria (106) así como la reducción de la placa aterosclerótica observada en pacientes con estenosis de la arteria carótida (107).

Esta evidencia científica muestra a la granada y a sus componentes polifenólicos como una opción para mantener la funcionalidad de las HDL y/o el tratamiento concomitante de las complicaciones de enfermedades cardiovasculares.

Sin embargo, la granada roja es un fruto de temporada y no es posible tener acceso al fruto durante todo el año; como la mayoría de los alimentos su aplicación y eficacia depende de la estabilidad y biodisponibilidad de sus componentes y es dependiente de su vida de anaquel, por lo que se han desarrollado diversas técnicas y materiales de encapsulación de compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides y vitaminas que mejoren la liberación

parcial durante su tránsito por el aparato digestivo (108, 109). En este proyecto se propuso la utilización de una microencapsulado de granada roja (MEGR) a partir del jugo y la semilla de los arilos con la finalidad de tener un producto estable y con mayor vida de anaquel que pueda conservar los compuestos de la oxidación y sus propiedades funcionales como las que se han reportado con el jugo fresco.

## **2. Justificación**

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública en México y en el mundo (1), teniendo mayor prevalencia la hipertensión y la aterosclerosis, dentro de los grupos de riesgo están las mujeres después de la transición a la menopausia, en quienes se ha encontrado un incremento en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La isquemia coronaria en este grupo de pacientes incrementa el daño oxidativo por especies reactivas de oxígeno/nitrógeno causando disfunción endotelial, proliferación y contracción muscular junto con desestabilización de la placa aterosclerótica (35). Otros estudios relacionan la transición de la menopausia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la disminución de estrógeno que resulta en cambios en el perfil lipídico en plasma, principalmente en el aumento de los niveles de c-LDL y la disminución del c-HDL (32, 37). Hoy en día existe controversia entre la relación de los niveles de triglicéridos y la aparición de enfermedades cardiovasculares; esto se debe a la alta variabilidad biológica interindividual de la concentración de los triglicéridos. Una de las hipótesis más aceptadas es la que sugiere que los triglicéridos reflejan un incremento y/o un catabolismo inadecuado postprandial de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y lipoproteínas remanentes, que ya han sido probadas como un factor de riesgo independiente para eventos coronarios recurrente y muerte cardíaca repentina (11, 35, 37, 48).

Por lo anterior, es fundamental estudiar los cambios en los procesos fisiológicos y bioquímicos que hay en mujeres premenopáusicas en relación al perfil lipídico. Asimismo, estudiar desde el punto de vista nutricional las enfermedades cardiovasculares ya que la alimentación y determinados alimentos en particular pueden ayudar a disminuir o prevenir el riesgo de desarrollar estas enfermedades. En este estudio se considera la utilización de un microencapsulado de granada roja (MEGR), como una alternativa de tener al alcance y conservar todas las propiedades antioxidantes y nutricionales del fruto de manera inocua para contribuir a la reducción del estrés oxidativo y la aterosclerosis como se ha demostrado en estudios previos en modelos humanos y murinos (69, 101-104).

### **3. Hipótesis**

Las pacientes postmenopáusicas con SICA generan HDL disfuncionales, en ayuno o en postprandio y este efecto es atenuado por la suplementación con microencapsulado de granada roja (*Punica granatum L*).

### **4. Objetivos**

#### *4.1 Objetivo general*

Caracterizar la estructura y efecto sobre el endotelio de HDL que se generan en ayuno y postprandio, aisladas de plasma de un modelo animal sano y en mujeres postmenopáusicas que hayan presentado SICA recientemente, y establecer el efecto que tiene la suplementación de microencapsulado de granada roja sobre estas lipoproteínas.

#### *4.2 Objetivos específicos*

- Evaluar los cambios en el perfil bioquímico en conejos Nueva Zelanda sanos y de las pacientes antes y después de ser suplementadas con granada roja.
- Describir la composición de las subclases de las HDL en conejos Nueva Zelanda sanos, antes y después de ser administrado el MEGR
- Describir la composición de las subclases de HDL durante la trigliceridemia postprandial en mujeres postmenopáusicas que hayan presentado SICA recientemente, antes y después de ser suplementadas con granada roja.
- Establecer la actividad de PON1 en las pacientes durante la trigliceridemia postprandial y en conejos Nueva Zelanda sanos antes y después del tratamiento con granada roja



- Estudiar el efecto de las HDL generadas en conejos Nueva Zelanda sanos sobre la contractilidad de anillos de aorta en cámara de órgano aislado, antes y después de ser suplementados con MEGR.
- Estudiar el efecto de las HDL postprandiales generadas en mujeres con SICA sobre la contractilidad de anillos de aorta de rata en cámara de órgano aislado antes y después de ser suplementadas con MEGR

## **5. Materiales y métodos**

### *5.1 Metodología para el estudio en conejos sanos*

Para probar si el MEGR conserva las propiedades del jugo fresco de granada roja, se realizó un primer estudio en conejos Nueva Zelanda machos y sin alteraciones metabólicas.

#### *5.1.1 Diseño del estudio*

Se realizó un estudio experimental controlado, prospectivo, aleatorizado y a conveniencia para el número de animales de estudio.

#### *5.1.2 Animales de estudio*

La muestra de estudio se conformó de 6 conejos Nueva Zelanda machos sanos de 6 meses de edad, con un peso de 2.5-3 kg. Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, ciclo luz-oscuridad (12 h) y recibieron alimento comercial y agua *ad libitum*.

#### *5.1.3 Administración del MEGR en conejos sanos*

Las granadas fueron recolectadas en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México, fueron seleccionadas, lavadas y peladas. Los arilos frescos de las granadas fueron molidos y tamizados en un laboratorio para remover partículas más grandes a 0.55 mm. El líquido resultante fue secado a  $50 \pm 0.5$  °C. El material seco fue pulverizado una vez más para obtener un polvo más fino. Posteriormente, se realizó una extracción con etanol: agua a una proporción de 1:1 (v/p) y el extracto fue colocado en un cuarto a temperatura ambiente durante 2 horas. El extracto fue filtrado a través de un papel filtro de microfibras de vidrio. El extracto

filtrado se evaporó utilizando un rotaevaporador a 50°C para la eliminación del etanol.

Maltodextrina-dextrosa 16.5-19.5 (Amfher Foods, S.A. de C.V., Ciudad de México, México) y goma arábica (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) fueron utilizados como componentes encapsulantes; ambos se dispersaron individualmente en agua hasta alcanzar un contenido sólido del 10%. La solución de los materiales encapsulantes se preparó mezclando la maltodextrina y goma arábica en una proporción de 4:1 (v/v). La solución encapsulante se combinó con el extracto de arilos y se homogeneizaron durante 10 minutos a 8,000 rpm a 60° C en un agitador magnético. Posteriormente, el homogeneizado se secó por pulverización en un minidesecador por atomización Büchi B-191 en un cuarto de temperatura del aire de entrada de 110°C y un flujo de bomba de 600 mL/min. El polvo del MEGR mostró tener una gran estabilidad y fue almacenado en oscuridad en un cuarto a temperatura ambiente y libre de humedad para conservar sus propiedades nutricionales hasta su uso. Una vez que las condiciones fueron estandarizadas, el MEGR fue producido a escala industrial por Granding International, S.A. de C.V., Jiutepec Morelos, México.

El MEGR se administró a los conejos en solución por vía oral usando una cánula, a una dosis de 1 g/d disuelto en 3 mL de agua, durante 30 días. Para llevar a cabo el análisis del efecto de la suplementación, se realizaron dos tomas de muestra sanguínea mediante punción en la arteria central de oreja (20 mL/ conejo). Una toma basal al inicio de la suplementación (día 0) y una final al día 30 de la suplementación. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 RPM por 15 min y se obtuvo el suero y plasma EDTA. Se almacenaron en tubos Eppendorf de 500 µL a -70° C hasta ser utilizadas en los análisis correspondientes.

#### *5.1.4 Concentración plasmática de lípidos en conejos sanos*

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total, así como triglicéridos, se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox®, Reino Unido). Para la determinación de los lípidos asociados específicamente a

las HDL se realizó mediante precipitación a partir de plasma de manera selectiva las lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL, LDL, IDL) con un reactivo comercial que contiene heparán sulfato de manganeso a razón de 100  $\mu$ L de plasma por 250  $\mu$ L de reactivo precipitante (110, 111). Se centrifugaron a 3,000 RPM durante 15 minutos. Para la determinación de la concentración en plasma de c-HDL, Tg-HDL (Randox Laboratories LTD) y fosfolípidos de HDL (FFL-HDL) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japón) por medio de los ensayos enzimáticos colorimétricos, se utilizó la fase líquida obtenida, que contenía la fracción HDL de la muestra. La absorbancia fue leída a 600 nm en un espectrofotómetro (BECKMAN COULTER DU® Uv/Vis Spectrophotometer; Alemania).

#### *5.1.5 Aislamiento y análisis de la composición proteica de las HDL en conejos sanos*

Las HDL fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial usando soluciones de densidad, como previamente se ha descrito (112). Las HDL recuperadas fueron dializadas usando 0.09 M Tris/0.08 M ácido bórico/3mM buffer de EDTA, pH 8.4. Para la separación de las fracciones aisladas por su radio hidrodinámico, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes con un gradiente 3-30% y 25  $\mu$ g de proteína de HDL (113). Los geles fueron escaneados y teñidos con azul de Coomassie R-250 en un densitómetro calibrado GS-800 para detectar proteínas (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los tamaños de las subclases de las HDL (diámetro de Stoke) fueron determinados por análisis densitométrico, considerando los siguientes intervalos de tamaños: HDL 3c, 7.94–8.45 nm; HDL 3b, 8.45–8.98 nm; HDL 3a, 8.98–9.94 nm; HDL 2a, 9.94–10.58 nm; HDL 2b, 10.58–13 nm. Para delimitar las subclases de las HDL, se utilizaron proteínas globulares como referencias de diámetro: tiroglobulina 17 nm; ferritina 12.2 nm; catalasa 10.4 nm; lactato deshidrogenasa 8.2 nm; albumina 7.1 nm; (kit de calibración de alto peso molecular, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Cada subclase

fue medida usando el programa VisionWorks version 8.20 y expresado como porcentaje total de HDL del área del densitograma (113).

#### *5.1.6 Determinación de la actividad de la PON1 en suero de conejos sanos*

Se determinó la actividad PON1 en el suero de los conejos utilizando fenilacetato como sustrato. El suero se llevó a una dilución 1:40 con amortiguador ARE (Tris 20 mM y CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, pH 8.0) y se preparó la solución de trabajo que contenía 15 mL de buffer ARE 1X + 1.9 µL de fenilacetato. Se colocaron en una celda de cuarzo 20 µL de muestra y 1mL de buffer ARE y la cinética de hidrólisis del sustrato se determinó en un espectrofotómetro (BECKMAN COULTER DU 730® UV/Vis Spectrophotometer; Estados Unidos), durante 3 minutos. Como control se utilizó suero humano.

#### *5.1.7 Reactividad vascular en anillos de aorta de conejos sanos*

El efecto de las HDL sobre la función endotelial de forma directa fue evaluada usando anillos de los conejos suplementados, colocados en cámara de órgano aislado como previamente se ha descrito (114). Los anillos de aorta fueron incubados con HDL aisladas a una concentración 50 mg/dL de colesterol en solución de Krebs (NaCl 118.1 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM, glucosa 11.1mM a un pH 7.4), con burbujeo constante con 95% O<sub>2</sub>, a 37°C durante una hora. Después del periodo de equilibrio de 2 horas, los anillos de aorta fueron pre-contráidos con fenilefrina (3x10<sup>-4</sup> M). La relajación mediada por endotelio (vasorrelajación) fue evaluada con una curva de dosis-respuesta de acetilcolina (5x10<sup>-9</sup> a 8x10<sup>-7</sup> M). Las contracciones fueron medidas isométricamente con un transductor de desplazamiento de fuerza FT-300 acoplado a un polígrafo (Model 7D, Grass Medical Instruments, Quincy, MA, USA). Todos los experimentos se corrieron por duplicado y la relajación de los anillos de aorta fueron expresados como porcentaje de pre-contracción con fenilefrina (114).

## *5.2 Metodología para el estudio en mujeres con SICA*

A continuación se evaluó la suplementación con MEGR durante 30 días en mujeres con Síndrome Isquémico Coronario Agudo (SICA), tanto en ayuno como durante el postprandio después de la ingesta de un alimento con alto contenido en lípidos.

### *5.2.1 Diseño del estudio*

Se trata de un estudio de intervención de tipo antes-después de la intervención. La muestra quedó conformada por mujeres postmenopáusicas con infarto previo. Este estudio fue desarrollado siguiendo los lineamientos de la Declaración de Helsinki y aprobación del Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con el número de registro 16-969. Todas las pacientes firmaron el un consentimiento informado correspondiente antes del inicio del estudio

### *5.2.2 Población de estudio*

Este estudio se incluyeron 11 pacientes, mujeres, diagnosticadas con Síndrome Isquémico Coronario Agudo (SICA) reclutadas en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Las pacientes completaron una historia clínica, así como cuestionarios sobre los estilos de vida, medicación a la cual estaban sometidas y hábitos dietarios que incluyeron un cuestionario de 24 horas de alimentación y frecuencia de alimentos. Se realizaron determinaciones antropométricas llevadas a cabo por personal estandarizado.

#### *5.2.2.1 Criterios de inclusión*

Mujeres postmenopáusicas del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que hayan tenido un infarto en el último año.

#### *5.2.2.2 Criterios de exclusión*

Mujeres fumadoras activas, o que presentaran afección hepática, tiroidea o renal, determinadas por alteración del perfil bioquímico o antecedentes clínicos.

#### *5.2.2.3 Criterios de eliminación*

Mujeres con retiro voluntario, con un apego menor al 50% a la dieta proporcionada y al tratamiento con el microencapsulado de granada roja.

#### *5.2.3 Tamaño de la muestra*

El tamaño de la muestra es por conveniencia y se determinó con base a las pacientes que aceptaron participar consecutivamente en el estudio hasta obtener datos que permitieran obtener diferencias estadísticamente significativas. El estudio se llevó a cabo en el banco de sangre, así como el laboratorio de “Metabolismo de lípidos” del departamento de Biología Molecular en el anexo de investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

### 5.2.4 Implementación de un alimento alto en lípidos

Las participantes realizaron dos visitas, en cada visita recibieron en una sola toma, un alimento específicamente diseñado para, generar que las concentraciones plasmáticas basales de triglicéridos dupliquen su valor durante el postprandio. Se trata de una comida de 1000 calorías, baja en carbohidratos, alta en proteínas y lípidos que fue consumido en un lapso de 15-20 minutos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Información nutrimental del sándwich utilizado para la intervención en el estudio

| Alimento             | Cantidad | Kcal | HC<br>(g) | Proteínas<br>(g) | Lípidos<br>(g) | AGS<br>(g) | AGM<br>(g) | AGP<br>(g) | Colesterol<br>(mg) | Sodio<br>(mg) |
|----------------------|----------|------|-----------|------------------|----------------|------------|------------|------------|--------------------|---------------|
| Queso de puerco      | 60g      | 223  | 0         | 6                | 22.2           | 12         | 11         | 3          | 60                 | 0             |
| Tocino               | 40 g     | 88   | 0         | 1.4              | 9.2            | 3          | 3.8        | 1          | 5.4                | 273.6         |
| Huevo                | 1 pieza  | 90   | 0.3       | 5.5              | 7.2            | 3          | 3          | 2          | 240                | 86.4          |
| Mantequilla s/sal    | 6 g      | 47   | 0         | 0                | 5.3            | 3          | 1          | 0.1        | 14.2               | 0.6           |
| Queso Oaxaca         | 136 g    | 426  | 4.05      | 34.65            | 29.7           | 21.5       | 5          | 1.2        | 116.1              | ND            |
| Pan integral de caja | 2 piezas | 134  | 25.2      | 4.8              | 2              | 0.4        | 0.8        | 0.8        | 0                  | 248           |
| <b>TOTAL</b>         |          | 1008 | 29.55     | 52.35            | 75.6           | 42.9       | 24.6       | 8.1        | 435.7              | ND            |

Kcal: kilocalorías; HC: carbohidratos; AGS: Ácidos grasos saturados; AGM: Ácidos grasos monoinsaturados; AGP: Ácidos grasos poliinsaturados.



### *5.2.5 Suplementación del MEGR en mujeres con SICA*

Se le proporcionó a cada una de las mujeres participantes en el grupo de estudio una cantidad de 600 g de microencapsulado de granada roja para 1 mes de tratamiento diario (20 g/d); además, se les capacitó para la toma adecuada y llevar un registro de la cantidad diaria consumida para disminuir en lo mayor posible el sesgo del consumo durante el mes de tratamiento.

### *5.2.6 Obtención de las muestras*

Se obtuvieron las muestras de sangre venosa de las voluntarias en ayuno y después de consumir el alimento (0, 4, y 8 h). Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA como anticoagulante para plasma y en tubos sin anticoagulante para suero. Las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 15 minutos, se separaron el suero o plasma y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su análisis.

### *5.2.7 Concentración plasmática de lípidos en mujeres con SICA*

Las concentraciones plasmáticas de colesterol total y c-HDL, así como triglicéridos, se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox®, Reino Unido) como se describió anteriormente. Además, se incluyó la concentración plasmática de colesterol de baja densidad (c-LDL) se determinó mediante la fórmula de Friedewald:

$$\mathbf{c-LDL = Colesterol\ total - Triglicéridos / 5 - c-HDL}$$

#### *5.2.8 Aislamiento y análisis de la composición proteica de HDL generadas en mujeres con SICA*

Las HDL basales y postprandiales generadas antes y después de la suplementación con MEGR fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial como previamente se describió en la sección del estudio con conejos sanos (página 22).

#### *5.2.9 Determinación de la fracción lipídica de las HDL generadas en mujeres con SICA*

El aislamiento de HDL por ultracentrifugación secuencial se realizó utilizando los mismo volúmenes de plasma sanguíneo y de reactivo precipitante de HDL descritos en el apartado metodológico del estudio con conejos; se evaluó de igual manera la concentración de c-HDL, Tg-HDL y FFL-HDL por ensayos colorimétricos enzimáticos.

#### *5.2.10 Determinación de la actividad de la PON1 en mujeres con SICA*

Se determinó la actividad PON1 utilizando fenilacetato como sustrato, como se describió anteriormente. El análisis se realizó en el suero sanguíneo de las mujeres con SICA diluido 1:10 con buffer ARE.

#### *5.2.11 Reactividad vascular en anillos de aorta de rata incubados con HDL de mujeres con SICA*

El efecto de las HDL generadas por las pacientes sobre la función endotelial fue evaluada usando anillos de aorta de rata Wistar en cámara de órgano aislado, manteniendo las mismas condiciones de oxigenación e incubación descritas anteriormente. Los anillos de aorta fueron incubados con HDL aisladas de las

pacientes a una concentración final de 50 mg/dL de colesterol en solución de Krebs.

### *5.3 Análisis estadístico*

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 24.0 (SPSS Inc. IBM, Chicago, IL, USA). Los valores con una distribución no normal de pre y post-suplementación fueron analizados como medianas con rango intercuartilar utilizando la prueba de Wilcoxon; para comparaciones múltiples se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se utilizó la Prueba T de Student para comparar las medias de pre y post-tratamiento en la función endotelial. Se consideraron valores estadísticamente significativos con una  $p \leq 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1 Efecto de la administración del MEGR en conejos sanos

#### 6.1.1 Efecto del MEGR sobre el perfil lipídico y glucosa en conejos sanos

La **Tabla 3** muestra el peso corporal, glucosa y perfil de lípidos de los conejos antes y después del mes de suplementación con el MEGR. Hubo un incremento significativo del 42% en el peso corporal de los conejos. Asimismo hubo una disminución significativa del 21%, 24% y 27% de los niveles de colesterol total, triglicéridos en plasma y Tg-HDL, respectivamente (**Tabla 3**). Además determinamos los promedios de Tg-HDL/FFL-HDL y c-HDL/FFL-HDL, como marcadores de la composición lipídica de las HDL (115); se encontró un aumento significativo del 16% de la concentración de c-HDL en plasma y aproximadamente del 8% de los niveles de FFL-HDL (**Tabla 3**). De igual manera, el cociente de Tg-HDL/FFL-HDL disminuyó significativamente en un 29% después de la suplementación con MEGR (**Tabla 3**).

Tabla 3. Efecto de la suplementación con MEGR sobre el perfil de lípidos en plasma y concentración de glucosa de conejos Nueva Zelanda

| Parámetro                       | MEGR (n=6)         |                               |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------------|
|                                 | Pre-suplementación | Post-suplementación           |
| <b>Peso corporal (kg)</b>       | 2.1 (2-2.2)        | 3 (2.9-3) <sup>a</sup>        |
| <b>Glucosa (mg/dL)</b>          | 85.0 (76.8-99.4)   | 79.9 (73.5-83.2)              |
| <b>Colesterol total (mg/dL)</b> | 52.3 (45.3-71.7)   | 41.4 (33.9-54.8) <sup>a</sup> |
| <b>Triglicéridos (mg/dL)</b>    | 65.9 (59.2-85.8)   | 50.5 (46.2-56.8) <sup>a</sup> |
| <b>C-HDL (mg/dL)</b>            | 32.6 (30.6-34.6)   | 37.6 (34-40.3) <sup>a</sup>   |
| <b>Tg-HDL (mg/dL)</b>           | 41.1 (33-49.6)     | 30.2 (23.5-33.6) <sup>a</sup> |
| <b>FFL-HDL (mg/dL)</b>          | 60.4 (56.1-64)     | 64.8 (59.3-68) <sup>a</sup>   |
| <b>Promedios</b>                |                    |                               |
| <b>C-HDL/FFL-HDL</b>            | 0.54 (0.48-0.64)   | 0.58 (0.54-0.7)               |
| <b>Tg-HDL/FFL-HDL</b>           | 0.66 (0.54-0.86)   | 0.48 (0.35-0.53) <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> p<0.05 pre vs post suplementación

### 6.1.2 Efecto del MEGR sobre composición proteica de las HDL de conejos sanos

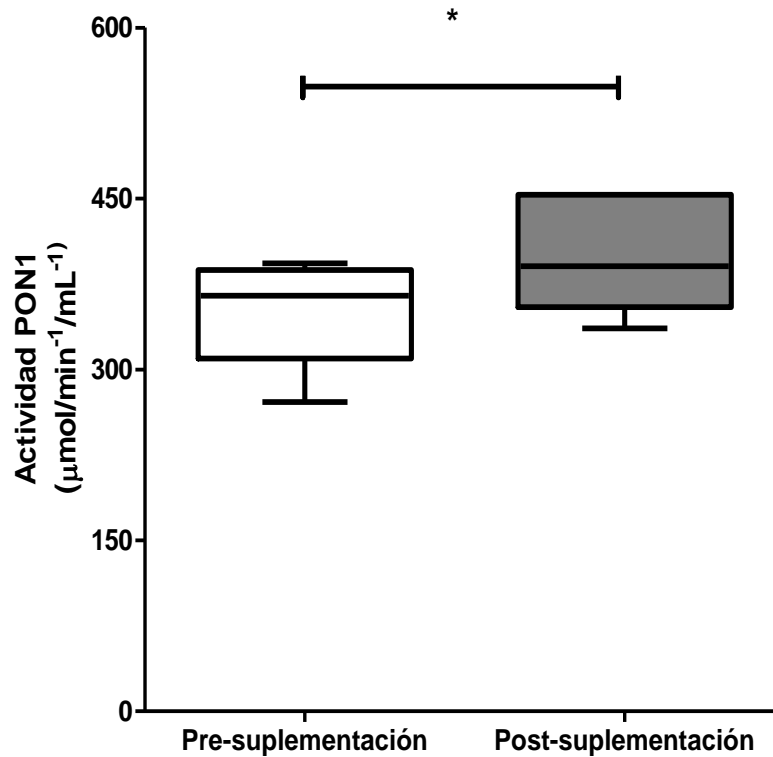
Los cambios en el perfil de lípidos asociados a las HDL sugerían un cambio en la estructura tamaño de estas lipoproteínas después del mes de suplementación con MEGR (**Tabla 4**). A pesar de que no se encontraron cambios significativos, se observaron tendencias a disminuir la proporción proteica de las subclases más grandes (HDL2b) y un aumento en las subclases pequeñas (HDL3a y HDL3b).

Tabla 4. Efecto de la suplementación de MEGR sobre la distribución relativa de tamaños de las HDL generadas por conejos Nueva Zelanda determinada por el porcentaje total de proteína.

| Subclases de HDL<br>(% proteína) | MEGR (n=6)          |                      |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|
|                                  | Pre- suplementación | Post- suplementación |
| HDL 2b                           | 40.23 (29.32-51.14) | 35.80 (25.18-46.43)  |
| HDL 2a                           | 16.91 (14.46-19.35) | 16.13 (12.28-19.97)  |
| HDL 3a                           | 28.44 (20.63-36.25) | 30.83 (26.38-35.27)  |
| HDL 3b                           | 10.26 (6.55-13.98)  | 12.25 (6.54-17.95)   |
| HDL 3c                           | 4.13 (2.37-5.9)     | 4.977 (0.87-10.04)   |

### 6.1.3 Efecto del MEGR sobre la actividad de la PON1 en conejos sanos

Después de la suplementación con MEGR se observó un incremento significativo en la actividad de la PON1 del 13.5 % comparado con la pre-suplementación (**Figura 3**).

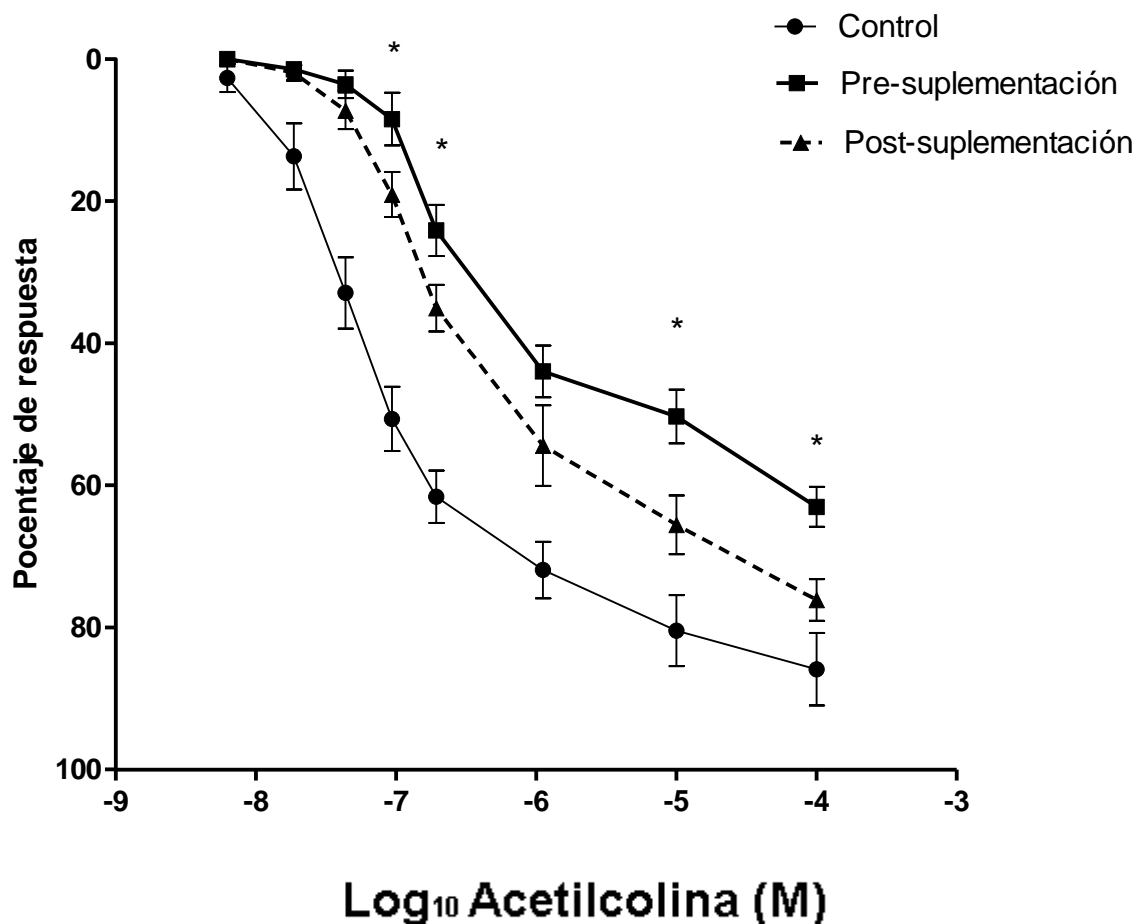


**Figura 3. Efecto de la suplementación con MEGR sobre la actividad de la PON1 en conejos sanos Nueva Zelanda.** La actividad de la PON1 fue determinada en condiciones basales (cajas blancas) y 30 días después de la suplementación con el MEGR (cajas grises). La mediana es representada con una línea horizontal y las cajas representan el rango intercuartil. \*Prueba de Wilcoxon con una  $p \leq 0.01$  entre pre y post-suplementación.

#### 6.1.4 Efecto del MEGR sobre la función endotelial en anillos de aorta de conejos sanos

Para evaluar si los cambios en la composición lipídica de las HDL y el incremento de la actividad de la PON1 después del mes de suplementación con MEGR tenía un efecto sobre la funcionalidad de las HDL, se evaluó la vasorrelajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de los conejos en presencia de sus HDL. Como se muestra en la **Figura 4**, la vasorrelajación de los anillos incubados con las HDL aisladas después de la suplementación con MEGR fue más

significativa en comparación con los anillos incubados con las HDL antes de la suplementación.



**Figura 4. Efecto del MEGR sobre la relajación mediada por endotelio en anillos de aorta de conejos Nueva Zelanda sanos.** Las curvas representan el porcentaje de relajación de los anillos de aorta pre-contraídos con fenilefrina e incubados con HDL aisladas antes de la suplementación (cuadrados negros) y 30 días después de la suplementación con MEGR (triángulos negros) en función del logaritmo de concentración de acetilcolina. Cada punto representa la media y el error estándar (EE). Una curva de 6 experimentos independientes usando anillos de aorta incubados en ausencia de HDL ha sido incluida en cada gráfica (círculos negros). Prueba t de Student utilizada para comparar pre y post-suplementación, \*p≤ 0.05.



## 6.2. Efecto de la suplementación con MEGR en mujeres con SICA

### 6.2.1 Parámetros fisiológicos y nutricionales de las mujeres con SICA

Las características clínicas y el balance de ingesta calórica de las pacientes con SICA incluidas en el estudio, se muestran en la **Tabla 5**. La ingesta calórica fue controlada y fue similar al inicio y después de la suplementación con el MEGR. Además, se observó una disminución significativa del 2.3% de circunferencia de cintura ( $p \leq 0.05$ ) después de los 30 días del consumo del MEGR. El uso de estatinas, beta-bloqueadores e inhibidores de la enzima convertidor de angiotensina se mantuvieron durante la suplementación con el MEGR.

### 6.2.2 Efecto de la suplementación con MEGR sobre el perfil lipídico y glucosa en mujeres con SICA

Antes de la suplementación con el MEGR, la concentración de triglicéridos postprandial incrementó significativamente alrededor del 80% y 61% a las 4 y 8 h después del consumo del alimento con alto contenido lipídico, respectivamente, en comparación con la condición en ayuno (**Tabla 6**). De manera similar, después de la suplementación con el MEGR se encontró un incremento significativo de la concentración de triglicéridos del 97% a las 4 h y 12% a las 8 h (**Tabla 6**). Los valores post-suplementación de triglicéridos postprandiales fueron 16%, 8% y 42% más bajos significativamente a las 0, 4 y 8 h, respectivamente, en comparación con los tiempos correspondientes de la pre-suplementación. Los niveles de colesterol total también disminuyeron significativamente entre un 8% y 15% después de la suplementación con el MEGR en los tres tiempos registrados (**Tabla 6**). La concentración del c-LDL disminuye significativamente con la suplementación del MEGR; en condiciones basales disminuyó 27%, así como 36% a las 4 h y 35% a las 8 h en el postprandio, comparado con los tiempos correspondientes de la pre-suplementación. Los niveles de glucosa mostraron una tendencia a disminuir en condiciones de ayuno después del consumo del MEGR,

pero la diferencia no alcanzó diferencia significativa (**Tabla 6**). La mediana del área bajo la curva incremental (ABCI) de triglicéridos disminuyó significativamente un 9% después del consumo del MEGR (**Tabla 6**).

Tabla 5. Características de las pacientes con SICA

| Parámetros                     | Pre-suplementación     | Post-suplementación    | P     |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|-------|
|                                | Basal<br>n=11          | Basal<br>n=11          |       |
| Edad (años)                    | 54 (40-63)             | 54 (40-63)             | 1.00  |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )       | 26.3 (24.3-30.3)       | 26.0 (23.5-29.8)       | 0.105 |
| Circunferencia de cintura (cm) | 92 (84-100)            | 91 (83-99)*            | 0.009 |
| PA sistólica (mmHg)            | 125 (112-143)          | 120 (116-125)          | 0.130 |
| PA diastólica (mmHg)           | 72(62-82)              | 74 (61-80)             | 0.404 |
| Estatinas                      |                        | 8/11                   |       |
| Betabloqueadores               |                        | 6/11                   |       |
| IECA                           |                        | 3/11                   |       |
| <b>Ingesta de nutrientes</b>   |                        |                        |       |
| Carbohidratos (%)              | 50.6 (48.4-52.3)       | 51.8 (48.9-52.2)       | 0.640 |
| Lípidos (%)                    | 19.5 (17.2-21.0)       | 20.3 (18.1-21.9)       | 0.705 |
| Proteína (%)                   | 27.3 (26.2-29.6)       | 28.1 (26.1-30.3)       | 0.810 |
| Calorías (Kcal)                | 1789.7 (1651.1-1910.3) | 1800.6 (1699.0-1953.7) | 0.705 |

Los datos están expresados en mediana (rango intercuartilar). Prueba de Wilcoxon p≤0.05. IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. IMC: Índice de masa corporal. PA: Presión arterial

Tabla 6. Efectos de la suplementación con MEGR en el perfil de lípidos en plasma y concentraciones de glucosa en ayuno y a las 4 y 8 h después de haber ingerido un alimento alto en lípidos.

| Parámetro               |      | Tiempo (n=11)                    |                                    |                                     |
|-------------------------|------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                         |      | 0h                               | 4h                                 | 8h                                  |
| <b>Glucosa</b>          | Pre  | 88.3 (76.6-125.9)                | 83.2 (67.9-113.9)                  | 88.9 (76.3-110.4)                   |
|                         | Post | 79.7 (73.2-89.0)                 | 88.0 (78.7-95.3)                   | 89.2 (78.2-92.1)                    |
| <b>Colesterol total</b> | Pre  | 157.6 (146.5-219.8)              | 150.9 (139.9-245.8)                | 141.4 (130.2-254.4)                 |
|                         | Post | 133.2 (87.1-140.7) <sup>a</sup>  | 138.9 (127.2-149.0) <sup>b</sup>   | 128.4 (103.3-148.6) <sup>c</sup>    |
| <b>C-LDL</b>            | Pre  | 85.8 (69.1-161.1)                | 73.4 (56.1-160.4)                  | 74.2 (52.1-180.0)                   |
|                         | Post | 62.7 (34.1-88.5) <sup>a</sup>    | 46.9 (40.6-63.6) <sup>b</sup>      | 48.2 (34.2-65.3) <sup>c</sup>       |
| <b>Triglicéridos</b>    | Pre  | 125.4 (119.4-182.3)              | 226.6 (190.0-344.2) <sup>a</sup>   | 202.2 (156.6-322.9) <sup>a,b</sup>  |
|                         | Post | 105.1 (83.5-120.7) <sup>a</sup>  | 207.5 (112.5-247.4) <sup>b,d</sup> | 117.2 (92.3-197.9) <sup>c,d,e</sup> |
| <b>ABCi</b>             | Pre  | 419.0 (315.3-1011.7)             |                                    |                                     |
|                         | Post | 382.8 (107.3-563.0) <sup>f</sup> |                                    |                                     |
| <b>c-HDL</b>            | Pre  | 39.4 (35.7-56.7)                 | 38.0 (31.4-47) <sup>a</sup>        | 36.6 (33.2-49.2) <sup>a</sup>       |
|                         | Post | 43.9 (40.2-62.6) <sup>a</sup>    | 39.4 (35.8-53.3) <sup>d</sup>      | 39.3 (36.8-49.3) <sup>c,d</sup>     |
| <b>Tg-HDL</b>           | Pre  | 17.0 (14.6-25.5)                 | 20.1 (15.8-28.0)                   | 25.3 (16.3-30.8)                    |
|                         | Post | 19.8 (19.4-31.4)                 | 22.9 (20.3-30.8)                   | 29.8 (23.9-36.7) <sup>c,d,e</sup>   |
| <b>FFL-HDL</b>          | Pre  | 89.4 (75.4-115.4)                | 93.2 (75.4-103.1)                  | 88.6 (72.1-122.0)                   |
|                         | Post | 95.9 (80.8-113.0)                | 90.2 (80.0-103.3)                  | 101.6 (91.2-129.3) <sup>c,d,e</sup> |
| <b>Cocientes</b>        |      |                                  |                                    |                                     |
| <b>C-HDL/FFL-HDL</b>    | Pre  | 0.489 (0.399-0.559)              | 0.433 (0.388-0.464)                | 0.424 (0.388-0.464)                 |
|                         | Post | 0.460 (0.421-0.595)              | 0.429 (0.395-0.499) <sup>d</sup>   | 0.363 (0.337-0.447) <sup>d,e</sup>  |
| <b>Tg-HDL/FFL-HDL</b>   | Pre  | 0.217 (0.146-0.287)              | 0.232 (0.166-0.301)                | 0.259 (0.201-0.339)                 |
|                         | Post | 0.255 (0.194-0.288)              | 0.234 (0.201-0.396)                | 0.278 (0.208-0.375)                 |

Los datos son presentados como mediana (rango intercuartil). Prueba de Wilcoxon <sup>a</sup> p<0.05 vs. 0h pre-suplementación. <sup>b</sup> p<0.05 vs. 4h pre-suplementación. <sup>c</sup> p<0.05 vs. 8h pre-suplementación. <sup>d</sup> p<0.05 vs. 0h post-suplementación. <sup>e</sup> p<0.05 vs. 4h post-suplementación. <sup>f</sup> p<0.05 vs. pre-suplementación.

### 6.2.3 Efecto del MEGR sobre el perfil lipídico de las HDL de mujeres con SICA

Los niveles basales de c-HDL incrementaron significativamente un 11% después de los 30 días de suplementación con el MEGR (**Tabla 6**). Durante el periodo postprandial, se encontró una disminución significativa en la concentración del c-HDL en plasma en ambas condiciones de pre y post-suplementación; sin embargo los niveles fueron más elevados después de la suplementación con el MEGR. Concomitantemente, la concentración plasmática de Tg-HDL incrementó significativamente a las 8 h del postprandio después de la suplementación con el MEGR, mientras que no encontraron modificaciones significativas antes de la suplementación (**Tabla 6**). Finalmente, después de la suplementación con el MEGR, las concentraciones de FFL-HDL incrementaron significativamente 6% a las 8 h en comparación a la concentración basal después de consumir el alimento hiperlipídico; así como un incremento significativo del 15% cuando se comparó con su tiempo correspondiente (8 h) antes y después de la suplementación. Además determinamos los promedios de Tg-HDL/FFL-HDL y c-HDL/FFL-HDL, como marcadores de la composición lipídica de las HDL (115) (**Tabla 6**). Después de la suplementación, encontramos una disminución significativa del 6% y 21% en el promedio de c-HDL/FFL-HDL a las 4 y 8 h, respectivamente, comparado con los valores en ayuno. En contraste, el promedio del cociente Tg-HDL/FFL-HDL permaneció sin cambios estadísticamente significativos en cualquier tiempo de estudio antes y después de la suplementación (**Tabla 6**).

### 6.2.4 Efecto del MEGR en la distribución de los tamaños de las HDL en mujeres con SICA

Se determinó la estructura de las HDL durante la suplementación con el MEGR (**Tabla 7**); comparando la condición de ayuno (0 h), las subclases HDL2b aumentaron ligeramente pero significativamente después del consumo del MEGR en comparación con la pre-suplementación. Por otra parte, después del consumo

del MEGR hubo un incremento significativo de casi el 79% en las subclases HDL3c a las 8 h del postprandio comparado con la pre-suplementación. Igualmente, en la pre-suplementación la proporción relativa de las HDL2b incrementó 25% con una disminución concomitante de las subclases HDL3a y HDL3b a las 8 h después del consumo del alimento hiperlipídico ( $p \leq 0.05$  para todas las comparaciones) (**Tabla 7**).

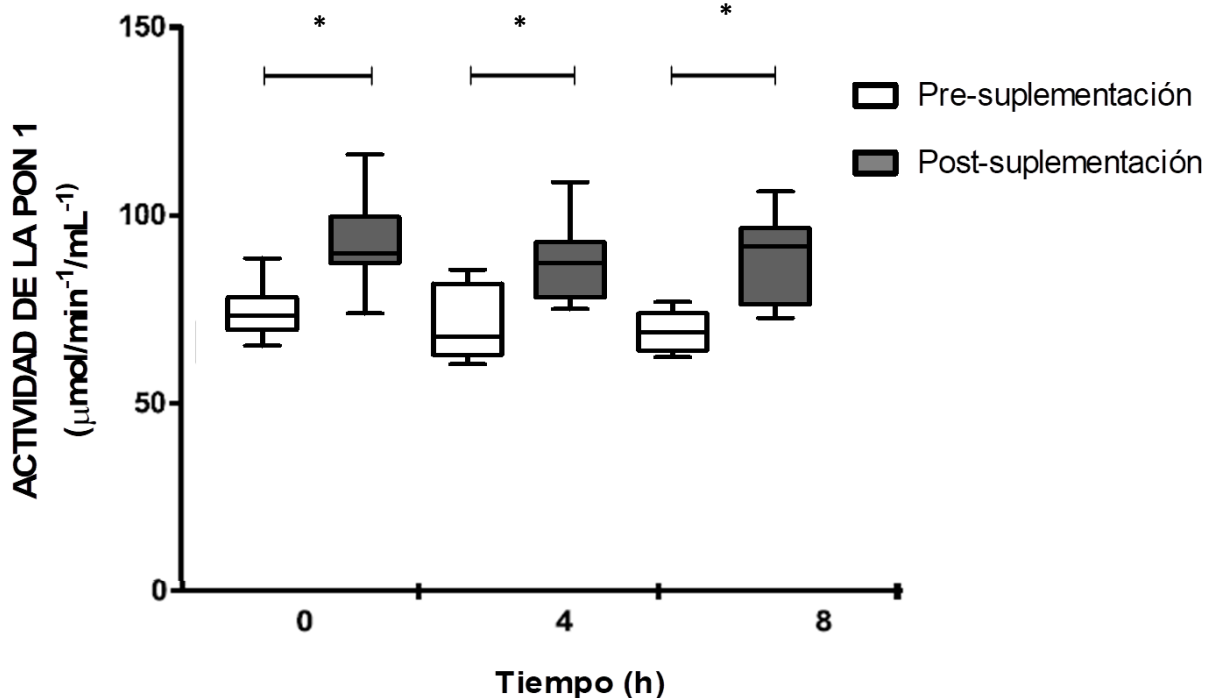
Tabla 7. Efecto de la suplementación de MEGR sobre el porcentaje total de proteína en HDL

| Subclases de HDL (%) |      | Tiempo (n=11)                 |                               |                               |
|----------------------|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                      |      | 0h                            | 4h                            | 8h                            |
| HDL2b                | Pre  | 30.8 (15.9-35.0)              | 31.5 (16.9-40.3) <sup>a</sup> | 38.6 (18.8-42.3) <sup>a</sup> |
|                      | Post | 31.5 (17.3-40.3) <sup>a</sup> | 32.8 (19.3-40.7) <sup>b</sup> | 31.7 (18.2-42.1)              |
| HDL2a                | Pre  | 14.3 (10.9-16.4)              | 15.0 (10.9-16.6)              | 16.0 (12.5-18.7)              |
|                      | Post | 15.0 (12.3-17.9)              | 14.6 (12.4-16.6)              | 14.7 (10.6-16.9)              |
| HDL3a                | Pre  | 31.0 (27.8-35.9)              | 29.2 (27.3-33.5)              | 28.3 (25.9-32.8) <sup>a</sup> |
|                      | Post | 27.7 (26.5-34.1) <sup>a</sup> | 29.5 (24.7-34.1)              | 29.2 (26.0-33.3)              |
| HDL3b                | Pre  | 16.9 (12.5-21.8)              | 14.1 (10.2-21.5)              | 10.4 (7.8-21.2) <sup>a</sup>  |
|                      | Post | 14.7 (10.0-21.8)              | 15.7 (8.2-25.6)               | 15.3 (8.8-23.2)               |
| HDL3c                | Pre  | 6.2 (4.6-12.3)                | 6.4 (3.4-19.3)                | 4.4 (1.3-15.1)                |
|                      | Post | 5.1 (2.6-10.8)                | 5.5 (2.3-16.8)                | 7.9 (1.2-21.3) <sup>c</sup>   |

Los datos son expresados como mediana (rango intercuartilar). Prueba de Wilcoxon <sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  vs. 0h pre-suplementación, <sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  vs. 4h pre-suplementación, <sup>c</sup>  $p \leq 0.05$  vs. 8h pre-suplementación.

### 6.2.5 Efecto del MEGR en la actividad de la PON1 en plasma de mujeres con SICA

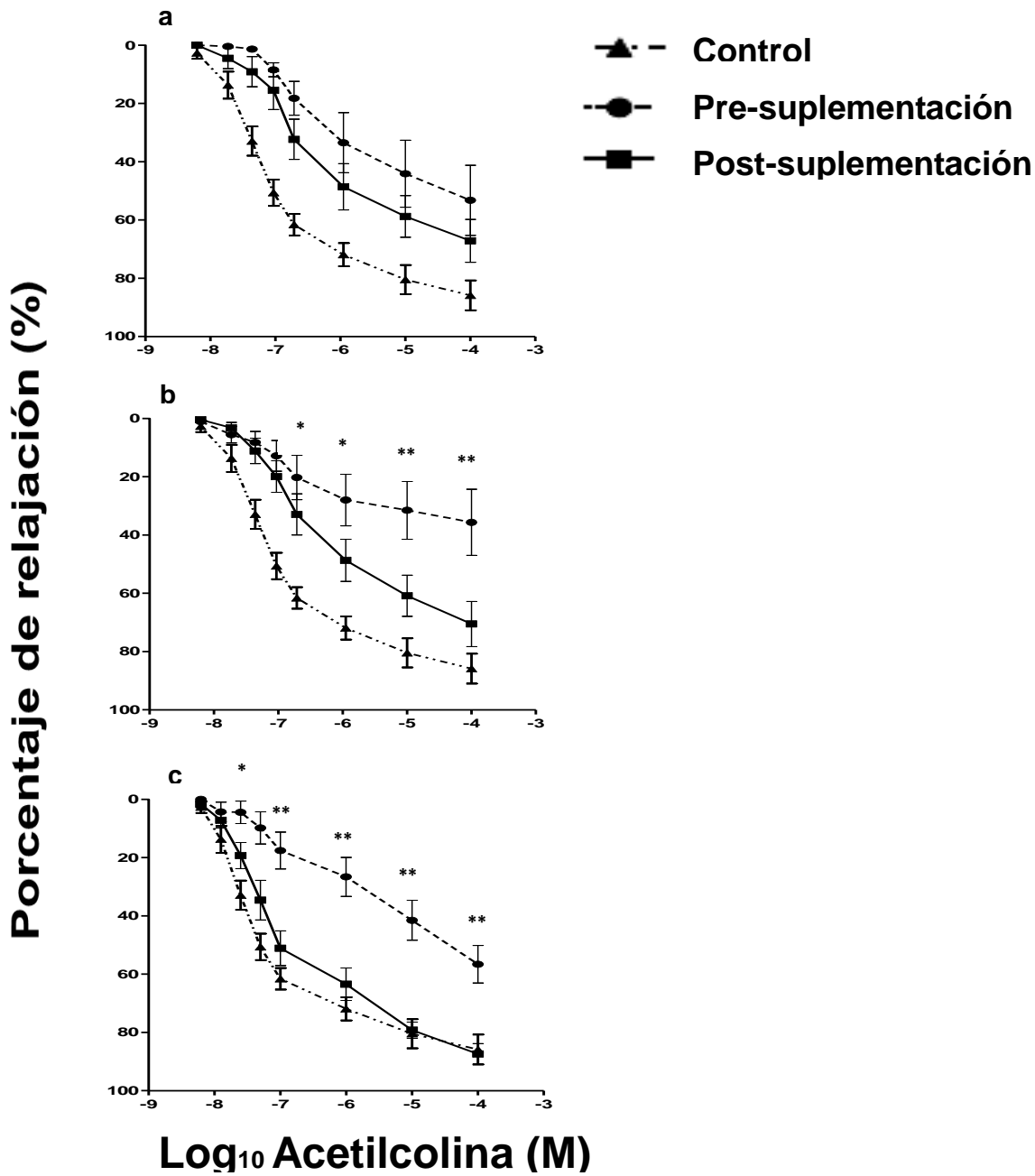
La actividad de la PON1 fue determinada utilizando fenilacetato como sustrato, como se describió en la metodología; la suplementación con MEGR indujo un incremento del 20% al 29% la actividad de la PON1 al tiempo basal, 4 y 8 h, comparado con los tres tiempos antes de la suplementación ( $p \leq 0.01$  para todos) (Figura 5).



**Figura 5. Efecto del microencapsulado de granada roja (MEGR) sobre la actividad de la paraoxonasa-1 (PON1) en suero de mujeres con SICA.** La actividad de la PON1 fue determinada en condiciones basales (cajas blancas) y 30 días después de la suplementación con el MEGR (cajas grises). Las mediciones fueron tomadas a las 0, 4 y 8 h después del consumo del alimento hiperlipídico. La mediana es representada con una línea horizontal y las cajas representan el rango intercuartil. \*Prueba de Wilcoxon con una  $p \leq 0.01$ , entre pre y post-suplementación.

### *6.2.6 Efecto del MEGR en la función endotelial en anillos de aorta de rata incubados con HDL de mujeres con SICA*

Para explorar si los cambios estructurales leves pero significativos de las HDL tuvieron impacto en la funcionalidad de estas lipoproteínas, determinamos la vasorrelajación dependiente de endotelio en anillos de aorta de rata en presencia de HDL. Como se muestra en la **Figura 6**, la vasorrelajación de los anillos incubados con las HDL aisladas después de la suplementación con MEGR fue más significativa en comparación con los anillos incubados con las HDL antes de la suplementación. La vasodilatación tuvo una tendencia a ser menor antes de la suplementación que después de la suplementación (0 h), pero las diferencias no alcanzaron a ser significativas en alguna concentración de acetilcolina (**Figura 6**). En contraste, la vasorrelajación a las 4 h en presencia de las HDL aisladas después de la suplementación fue significativamente alta en comparación con las HDL aisladas antes de la suplementación, particularmente en el rango de concentraciones de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  de acetilcolina ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 6**). A las 8 h del periodo postprandial, los efectos de las HDL después de la suplementación con el MEGR fueron más marcados que los observados a las 4 h, el porcentaje de la vasorrelajación fue mucho mayor comparando antes de la suplementación, en cualquier concentración de acetilcolina (**Figura 6**).



**Figura 6. Efecto del MEGR sobre la relajación mediada por endotelio en anillos de aorta de rata incubados con HDL de pacientes con SICA.** Las curvas representan el porcentaje de relajación de los anillos de aorta, pre-contraídos con fenilefrina e incubados con HDL aisladas antes de la suplementación (círculos negros) y 30 días después de la suplementación con MEGR (cuadrados negros) en función del logaritmo de concentración de acetilcolina. En **6a** se muestra la condición basal o 0 h, en **6b** y **6c**, las condiciones 4 y 8 h después del alimento hiperlipídico, respectivamente. Cada punto representa la media y el error estándar (EE). Una curva de 11 experimentos independientes usando anillos de aorta incubados en ausencia de HDL ha sido incluida en cada gráfica (triángulos negros) como referencia. Prueba t de Student utilizada para comparar pre y post-suplementación, \*p≤ 0.05 y \*\*p≤ 0.01.



## 7. Discusión

En el presente estudio se probó la funcionalidad de un nuevo microencapsulado de jugo de granada roja (MEGR) en un modelo de conejo no dislipidémico. Un vez que comprobamos que el MEGR conserva las características cardioprotectoras del jugo fresco de granada, determinamos el efecto del microencapsulado, en mujeres con Síndrome Isquémico Coronario Agudo (SICA). En particular, determinamos la funcionalidad de la HDL generadas durante la trigliceridemia postprandial.

Con respecto a la primera parte de esta tesis, después de un mes de suplementación con el MEGR se observó una disminución significativa de los niveles de colesterol total y triglicéridos cambios en el perfil lipídico de las HDL, junto con un incremento de la actividad de la PON1 y de la vasorrelajación en endotelio en los conejos sanos. A pesar de ser aun controversial (116, 117), algunos estudios han mostrado que el consumo de granada roja induce un incremento en los niveles de c-HDL y una disminución en los triglicéridos y c-LDL, así como lo que se observó en este estudio. Un posible mecanismo que lleva a estos efectos benéficos, se ha propuesto que algunos componentes de la granada pueden activar PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$  (118-120) y enzimas hepáticas que participan en la oxidación de los ácidos grasos. Interesantemente, después de la suplementación con MEGR en los conejos, observamos una disminución significativa de esfingomielina, un fosfolípido estructural de las lipoproteínas que disminuye la (121, 122). Esta disminución significativa de esfingomielina se dio en la fracción no-HDL conformada por partículas que contienen Apo B (VLDL, IDL, LDL); diversos estudios han demostrado una relación entre la concentración de esfingomielina y la progresión de la enfermedad aterosclerosa (123). En las LDL se ha descrito que el elevado contenido de esfingomielina está relacionado con el desarrollo de la placa aterosclerosa (124, 125). El mismo sentido, la inhibición de la biosíntesis de esfingomielina en ratones knockout Apo E (Apo E<sup>-/-</sup>) se asoció con una disminución de la lesión aterosclerosa (123).

En conjunto, los resultados obtenidos con conejos indican claramente que el MEGR conserva las propiedades cardioprotectoras del jugo fresco (88, 120).

Además, el microencapsulado presenta diversas ventajas sobre el jugo fresco; a diferencia del jugo fresco, el microencapsulado concentra las moléculas funcionales y permite un uso más amplio de la granada como un alimento funcional, ya que es fruto de temporada y por lo tanto no puede ser consumida durante todo el año. Además, según estudios preliminares el MEGR tiene una vigencia de más de un año (datos no publicados), lo que permite su distribución incluso en regiones donde no se cultiva el fruto.

Se ha reportado que una suplementación con antioxidantes llevan a un remodelamiento lipídico y modificaciones proteicas de las HDL, además de incrementar la actividad de PON1 mejorando la funcionalidad de estas lipoproteínas *in vivo* (126). En este contexto, para determinar si las ligeras variaciones en estructura de las HDL en los conejos tenían un efecto sobre la funcionalidad de estas lipoproteínas, evaluamos la actividad de la PON1 antes y después del consumo del MEGR. Observamos un incremento significativo de la actividad PON1 en los conejos después del mes de suplementación. La PON1 es una enzima transportada por las HDL en el plasma y que le confiere a estas lipoproteínas la mayoría de su actividad antioxidante (127, 128). La actividad de PON1 también en las mujeres con SICA fue incrementada después del consumo de MEGR y se mantuvo durante el postprandio. El incremento de la actividad de PON1 después de la suplementación con el MEGR fue debido probablemente a un incremento de la síntesis de esta proteína, como previamente propusimos (88, 119).

Posteriormente evaluamos la función endotelial en presencia de HDL aisladas de plasma antes y después de la suplementación con MEGR, usando aortas de conejos sanos en cámara de órgano aislado. Este modelo para el estudio de la función endotelial se basa en el hecho de que el endotelio genera y libera óxido nítrico en respuesta a la estimulación del vaso con acetilcolina. Usando este modelo, observamos que las HDL aisladas de plasma inhiben significativamente la vasorrelajación mediada con endotelio con respecto a los experimentos control realizados en ausencia de HDL. Este efecto negativo de las HDL se revirtió después de la suplementación con MEGR; las HDL aisladas después la

suplementación reestablecieron la vasorrelajación a los niveles de anillos de aorta de control. Es comúnmente aceptado que las HDL favorecen la función endotelial (3, 129, 130); por lo anterior, esperábamos en nuestro modelo de anillos de aorta un aumento de la vasorrelajación en presencia de las HDL aisladas. Paradójicamente observamos lo contrario, las HDL de los conejos antes de la suplementación inhibieron parcialmente la vasorrelajación. Estudios previos habían reportado dicha inhibición y que se atribuía a los fosfolípidos de las lipoproteínas, incluyendo a la esfingomielina (131, 132).

Por tal motivo decidimos determinar también el contenido de esfingomielina de las HDL, pero no observamos cambios de la misma después de la suplementación en las HDL. Independientemente de la esfingomielina, la suplementación con MEGR revirtió el efecto inhibitorio de la vasorrelajación de las HDL. Este efecto no se puede explicar por los fosfolípidos totales de la HDL ya que no disminuyeron, sino al contrario, incrementaron después de la suplementación. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la concentración de fosfolípidos pueden incrementar por dos factores, el aumento del contenido por cada partícula HDL, o porque aumentó el número de partículas. La segunda explicación es congruente con el hecho de que algunos componentes de la granada pueden activar PPAR- $\alpha$  (118-120); en efecto, el gen de la Apo A1 contiene un elemento de respuesta para PPAR- $\alpha$ , y su estimulación resulta en una sobreexpresión de la proteína (133).

Por otra parte, observamos una disminución significativa en el promedio de Tg-HDL/FFL-HDL, sugiriendo que hubo una disminución del contenido de triglicéridos en las partículas HDL después del consumo del MEGR. No se puede descartar que la disminución de triglicéridos después de la suplementación se relacione con la reversión de la disfunción endotelial mediada por las HDL. Adicionalmente, existe la posibilidad de que las HDL incluyan en su estructura algunas moléculas hidrofóbicas de la granada y las vectoricen hacia el endotelio como se discute más adelante.

Una vez que comprobamos que el microencapsulado conservaba las propiedades cardioprotectoras de la granada, procedimos a determinar el efecto del mismo sobre la funcionalidad de las HDL en mujeres con SICA. Elegimos realizar este

estudio en mujeres porque durante la transición de la menopausia hay un incremento del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, debido al incremento de daño oxidativo por especies reactivas o radicales libres que causan disfunción endotelial y desestabilización de la placa aterosclerótica.

En las mujeres con SICA después consumo del MEGR mostraron en una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos, IMC, circunferencia de cintura y presión sistólica, así como un incremento de la actividad de la PON1; estos efectos son congruentes con estudios previos realizados con jugo fresco de granada (88, 90, 128, 134)

Se ha propuesto que la enfermedad coronaria es un fenómeno postprandial (135). De acuerdo a esta idea, la trigliceridemia postprandial es un factor de riesgo independiente de los eventos cardiovasculares (136). Al observar que en los conejos sanos disminuyeron los niveles plasmáticos de triglicéridos y presentarse el mismo fenómeno en las mujeres después del consumo del MEGR, exploramos si el MEGR proporciona efectos benéficos durante el periodo de postprandio. Para tal efecto, determinamos el área incremental bajo la curva de triglicéridos (ABCi) en las mujeres con SICA; este parámetro es un mejor marcador para las modificaciones postprandiales del metabolismo de lípidos que el área total bajo la curva (ATBC) (48, 137). Nuestros datos muestran claramente una disminución en el ABCi de las pacientes con SICA después de la suplementación con MEGR. Considerando que los componentes del MEGR activan PPAR- $\alpha$  (118) y PPAR- $\gamma$  (119), la mejora observada en el ABCi después de la suplementación con MEGR puede estar relacionada con a sobreexpresión de la actividad de LPL y de su cofactor, la Apo CII. Se requieren estudios específicos para dilucidar los mecanismos implicados en la mejora de la trigliceridemia postprandial inducidos por la granada roja.

Para evaluar la función endotelial en las mujeres con SICA, particularmente nos enfocamos en las HDL durante el periodo de postprandio (121). A pesar del número limitado de pacientes, la disfunción endotelial fue evidente cuando los anillos de aorta fueron incubadas con las HDL generadas durante el periodo del postprandio. Estudios previos sugieren que la funcionalidad de las HDL es

dependiente del tamaño y composición de las partículas (48, 80, 115, 138). En este contexto, las HDL también se remodelan durante el periodo del postprandio y dicho remodelamiento es diferente en sujetos con alto riesgo de enfermedad cardiovascular que en sujetos sanos (48). Por lo tanto, exploramos si el MEGR podría inducir cambios en la remodelación de HDL postprandiales y si este cambio podría ser asociado con partículas más funcionales. Nuestros resultados claramente muestran que en condiciones basales, hubo algunos cambios leves pero significativos en la proporción relativa de las subclases de las HDL después del alimento con alto contenido de lípidos. Dichas modificaciones ya no se observaron después de la suplementación con el MEGR. En el mismo sentido, cuando los anillos de aorta fueron co-incubados con HDL aisladas antes de la intervención, demostramos que había una disfunción endotelial similar a la observada con el grupo de conejos. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte que muestra que la disfuncionalidad de las HDL postprandiales en el endotelio de pacientes con SICA. Además, la suplementación con MEGR revirtió paulatinamente a lo largo del postprandio los efectos nocivos de las HDL de las pacientes con SICA.

La disfunción endotelial mediada por las HDL antes de la suplementación sugiere fuertemente que la estructura de estas lipoproteínas se modificó durante el periodo del postprandio; la distribución del tamaño de las HDL de hecho cambio de las subclases grandes (HDL2b) hacia las medianas y pequeñas subclases (HDL3a y HDL3b) después de las 8 h del consumo del alimento con alto contenido de lípidos. En contraste con lo observado en los conejos, la composición lipídica de las subclases de HDL, estimada por los cocientes HDL-Tg/Pho y HDL-C/Pho, permaneció sin cambios.

Estudios previos en sujetos normales, han demostrado que la proporción relativa de las subclases HDL3 disminuye con un enriquecimiento concomitante de triglicéridos y colesterol en su composición. Por lo tanto, es probable una re-estructuración de las HDL durante el postprandio en las mujeres con SICA no es homogéneo y contribuye a sus efectos nocivos en la función endotelial. Esta posibilidad es congruente con la estructura de las HDL en el periodo postprandial

después del tratamiento con el MEGR; no se encontraron cambios en la distribución de tamaños de las HDL, pero las HDL3 mostraron una tendencia a incrementar, como previamente se había observado en sujetos sanos (48). Por lo tanto, el MEGR favorece modificaciones postprandiales de las HDL en las mujeres con SICA, que posiblemente se relacionen con la inhibición de los efectos nocivos de estas lipoproteínas sobre la función endotelial.

En congruencia con las observaciones en el modelo de conejo, en las pacientes con SICA se observó una tendencia a incrementar la concentración de FFL-HDL después del consumo del MEGR. Dicho incremento fue estadísticamente significativo a las 8 horas del postprandio después de la suplementación con el MEGR. Considerando que las HDL son sintetizadas tanto en el hígado como en el intestino delgado (139), nosotros proponemos que el MEGR incrementa la síntesis intestinal de las HDL, probablemente por la activación de la vía de los PPAR (118-120) o por la activación de ABCA-1 (140). Además, se ha demostrado que algunos antioxidantes provenientes de la dieta y componentes hidrofóbicos como la zeaxantina y luteína, requieren a las HDL para su absorción intestinal (141). Por lo tanto, algunos componentes bioactivos hidrofóbicos de la granada, como el ácido punícico, pudieran ser absorbidos vía intestinal e integrados a la estructura de las HDL. Además, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las HDL pueden internalizarse en las células endoteliales y liberar tanto en la membrana celular como en el citoplasma de las mismas (142). De esta manera, existe la posibilidad de que si las HDL intestinales contienen los componentes activos de la granada podrían, vectorizarlos a los compartimentos intracelulares durante la internalización y disgregación de la partícula dentro de las células. Los componentes particulares de la granada que pudieran ser internalizadas en las células periféricas por las HDL intestinales es un tema que debería ser explorado en futuros estudios.

Como limitaciones de este estudio, reconocemos que no se analizó el balance de los ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados y otros lípidos como esfingomielina (80, 143), los cuales pudieran determinar la funcionalidad de las HDL. Asimismo, la inclusión de un grupo de mujeres sanas como referencia podría

haber aportado información adicional a la funcionalidad postprandial de las HDL, y de los efectos del MEGR en ausencia de un padecimiento subyacente. Por lo tanto futuros estudios, deberían de explorar los efectos benéficos de la granada pueden ser extrapolados a hombres y si otros lípidos contenidos en las HDL son modificados por el consumo de esta fruta.

## **8. Conclusión**

Después de un mes de tratamiento con MEGR, hubo una mejora en los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol total en el modelo animal y en las mujeres con SICA. Asimismo, el MEGR se asoció con una disminución de los triglicéridos durante el postprandio de manera significativa mientras que el c- HDL tuvo una tendencia a incrementarse en la condición en ambos estudios. Se presentaron cambios discretos después del consumo del MERG en la composición de las HDL en ambos estudios, acentuándose más durante la trigliceridemia postprandial en mujeres con SICA, lo que posiblemente se reflejó en un incremento de la actividad de la PON1 y en la mejora de la función endotelial mediado por las HDL.

Por último, describimos por primera vez que las HDL de pacientes con SICA inducen disfunción endotelial en el modelo de anillo de aorta en cámara de órgano aislado; esta condición nociva de las HDL se revierte por el consumo de MEGR.



## 9. Bibliografía

1. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*. 1999;353(9147):89-92. Epub 1999/02/19.
2. Mack M, Gopal A. Epidemiology, Traditional and Novel Risk Factors in Coronary Artery Disease. *Heart failure clinics*. 2016;12(1):1-10. Epub 2015/11/17.
3. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*. 2006;98(11):1352-64. Epub 2006/06/10.
4. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(10):1881-8. Epub 2003/08/16.
5. Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *International journal of cardiology*. 2000;73(3):231-6. Epub 2000/06/08.
6. Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, 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*. 2003;108(22):2751-6. Epub 2003/11/26.
7. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;238(1):61-5. Epub 1997/09/23.
8. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid research*. 1984;25(12):1277-94. Epub 1984/12/01.
9. Mahley RW, Ji ZS. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *Journal of lipid research*. 1999;40(1):1-16. Epub 1998/12/31.
10. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of lipid research*. 2001;42(9):1346-67. Epub 2001/08/24.
11. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, et al. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *Jama*. 1996;276(11):882-8. Epub 1996/09/18.
12. Estrada-Luna D, Ortiz-Rodriguez MA, Medina-Briseno L, Carreon-Torres E, Izquierdo-Vega JA, Sharma A, et al. Current Therapies Focused on High-Density Lipoproteins Associated with Cardiovascular Disease. *Molecules*. 2018;23(11). Epub 2018/10/27.
13. Green PH, Glickman RM, Riley JW, Quinet E. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. *The Journal of clinical investigation*. 1980;65(4):911-9. Epub 1980/04/01.
14. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79(1):8-15. Epub 1989/01/01.
15. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *The New England journal of medicine*. 2004;350(15):1495-504. Epub 2004/03/10.
16. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *Journal of cardiovascular risk*. 1996;3(2):213-9. Epub 1996/04/01.
17. Schaefer EJ, Anthonot P, Diffenderfer MR, Polisecki E, Asztalos BF. Diagnosis and treatment of high density lipoprotein deficiency. *Progress in cardiovascular diseases*. 2016;59(2):97-106. Epub 2016/08/28.
18. Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. [Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins]. *Clinica e investigacion en arteriosclerosis : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Arteriosclerosis*. 2013;25(2):98-103. Epub 2013/06/19. Mecanismos basicos: estructura, funcion y metabolismo de las lipoproteinas plasm.

19. Rizzo M, Otvos J, Nikolic D, Montalto G, Toth PP, Banach M. Subfractions and subpopulations of HDL: an update. *Current medicinal chemistry*. 2014;21(25):2881-91. Epub 2014/04/17.
20. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *The American journal of cardiology*. 2003;91(7A):12E-7E. Epub 2003/04/08.
21. Calabresi L, Gomaraschi M, Simonelli S, Bernini F, Franceschini G. HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1851(1):13-8. Epub 2014/07/30.
22. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet*. 2014;384(9943):618-25. Epub 2014/08/19.
23. Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Annals of epidemiology*. 1992;2(1-2):23-8. Epub 1992/01/01.
24. Asztalos BF. High-density lipoprotein particles, coronary heart disease, and niacin. *Journal of clinical lipidology*. 2010;4(5):405-10. Epub 2010/12/03.
25. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *The New England journal of medicine*. 1989;321(19):1311-6. Epub 1989/11/09.
26. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47. Epub 1998/05/29.
27. Toth PP, Barter PJ, Rosenson RS, Boden WE, Chapman MJ, Cuchel M, et al. High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. *Journal of clinical lipidology*. 2013;7(5):484-525. Epub 2013/10/02.
28. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(25 Pt B):2935-59. Epub 2013/11/19.
29. Ramirez A, Hu PP. Low High-Density Lipoprotein and Risk of Myocardial Infarction. *Clinical Medicine Insights Cardiology*. 2015;9:113-7. Epub 2015/12/23.
30. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, Gao P, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *The New England journal of medicine*. 2012;367(14):1310-20. Epub 2012/10/05.
31. Superko HR, Pendyala L, Williams PT, Momary KM, King SB, 3rd, Garrett BC. High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. *Journal of clinical lipidology*. 2012;6(6):496-523. Epub 2013/01/15.
32. Okura H, Yamashita S, Ohama T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Hamada Y, et al. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2010;17(6):568-77. Epub 2010/03/11.
33. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115(4):450-8. Epub 2006/12/28.
34. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1703(2):93-109. Epub 2005/02/01.
35. Pajovic SB, Saicic ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiological research*. 2008;57(6):801-11. Epub 2007/12/07.
36. Sammalkorpi K, Valtonen V, Kerttula Y, Nikkila E, Taskinen MR. Changes in serum lipoprotein pattern induced by acute infections. *Metabolism: clinical and experimental*. 1988;37(9):859-65. Epub 1988/09/01.
37. Reiner Z. Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease. *Nature reviews Cardiology*. 2017;14(7):401-11. Epub 2017/03/17.
38. Torzewski J, Oldroyd R, Lachmann P, Fitzsimmons C, Proudfoot D, Bowyer D. Complement-induced release of monocyte chemoattractant protein-1 from human smooth muscle cells. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16(5):673-7. Epub 1996/05/01.

39. Masuda D, Yamashita S. Postprandial Hyperlipidemia and Remnant Lipoproteins. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2017;24(2):95-109. Epub 2016/11/11.
40. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *Jama*. 2007;298(3):309-16. Epub 2007/07/20.
41. Boren J, Matikainen N, Adiels M, Taskinen MR. Postprandial hypertriglyceridemia as a coronary risk factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;431:131-42. Epub 2014/02/11.
42. Nakamura K, Miyoshi T, Yunoki K, Ito H. Postprandial hyperlipidemia as a potential residual risk factor. *Journal of cardiology*. 2016;67(4):335-9. Epub 2016/01/09.
43. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *Journal of lipid research*. 2009;50(1):90-7. Epub 2008/09/26.
44. Nakano T, Nakajima K, Niimi M, Fujita MQ, Nakajima Y, Takeichi S, et al. Detection of apolipoproteins B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;390(1-2):38-43. Epub 2008/01/22.
45. Pal S, Semorine K, Watts GF, Mamo J. Identification of lipoproteins of intestinal origin in human atherosclerotic plaque. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2003;41(6):792-5. Epub 2003/07/26.
46. Teeman CS, Kurti SP, Cull BJ, Emerson SR, Haub MD, Rosenkranz SK. Postprandial lipemic and inflammatory responses to high-fat meals: a review of the roles of acute and chronic exercise. *Nutrition & metabolism*. 2016;13:80. Epub 2016/11/29.
47. Sarwar N, Sattar N. Triglycerides and coronary heart disease: have recent insights yielded conclusive answers? *Current opinion in lipidology*. 2009;20(4):275-81. Epub 2009/06/11.
48. Quintanilla-Cantu A, Pena-de-la-Sancha P, Flores-Castillo C, Mejia-Dominguez AM, Posadas-Sanchez R, Perez-Hernandez N, et al. Small HDL subclasses become cholesterol-poor during postprandial period after a fat diet intake in subjects with high triglyceridemia increases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2017;464:98-105. Epub 2016/11/17.
49. Ibitoye OB, Ajiboye TO. Dietary phenolic acids reverse insulin resistance, hyperglycaemia, dyslipidaemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome rats. *Archives of physiology and biochemistry*. 2018;124(5):410-7. Epub 2017/12/21.
50. Tawakol A, Jaffer F. Imaging the Intersection of Oxidative Stress, Lipids, and Inflammation: Progress Toward Personalized Care of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71(3):336-8. Epub 2018/01/20.
51. Huyut Z, Beydemir S, Gulcin I. Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochemistry research international*. 2017;2017:7616791. Epub 2017/11/22.
52. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Czechowska G, Korolczuk A, Marciniak S, Beltowski J. The paraoxonase 1 (PON1), platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) and dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity in the metformin treated normal and diabetic rats. *European journal of pharmacology*. 2016;789:187-94. Epub 2016/07/28.
53. Cohen E, Aviram M, Khatib S, Volkova N, Vaya J. Human carotid atherosclerotic plaque protein(s) change HDL protein(s) composition and impair HDL anti-oxidant activity. *Biofactors*. 2016;42(1):115-28. Epub 2015/12/15.
54. Merzouk H, Lamri MY, Meghelli-Bouchenak M, Korso N, Prost J, Belleville J. Serum lecithin: cholesterol acyltransferase activity and HDL2 and HDL3 composition in small for gestational age newborns. *Acta Paediatr*. 1997;86(5):528-32. Epub 1997/05/01.
55. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87(10):840-4. Epub 2000/11/14.
56. Hussein H, Saheb S, Couturier M, Atassi M, Orsoni A, Carrie A, et al. Small, dense high-density lipoprotein 3 particles exhibit defective antioxidative and anti-inflammatory function in familial hypercholesterolemia: Partial correction by low-density lipoprotein apheresis. *Journal of clinical lipidology*. 2016;10(1):124-33. Epub 2016/02/20.
57. Zerrad-Saadi A, Therond P, Chantepie S, Couturier M, Rye KA, Chapman MJ, et al. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox

status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(12):2169-75. Epub 2009/09/19.

58. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*. 2017;132:19-27. Epub 2016/10/25.

59. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(9):1304-16. Epub 2004/09/30.

60. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(48):44444-9. Epub 2001/10/02.

61. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(3):921-7. Epub 2002/01/19.

62. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):55-61. Epub 2005/04/13.

63. Sumegova K, Nagyova Z, Waczulikova I, Zitnanova I, Durackova Z. Activity of paraoxonase 1 and lipid profile in healthy children. *Physiological research*. 2007;56(3):351-7. Epub 2006/06/24.

64. Sakai T, Matsuura B, Onji M. Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus. *Intern Med*. 1998;37(7):581-4. Epub 1998/08/26.

65. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clinical chemistry*. 2004;50(12):2309-15. Epub 2004/10/02.

66. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS letters*. 1991;286(1-2):152-4. Epub 1991/07/29.

67. Gong M, Garige M, Varatharajalu R, Marmillot P, Gottipatti C, Leckey LC, et al. Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;379(4):1001-4. Epub 2009/01/15.

68. Perla-Kajan J, Borowczyk K, Glowacki R, Nygard O, Jakubowski H. Paraoxonase 1 Q192R genotype and activity affect homocysteine thiolactone levels in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018:fj201800346R. Epub 2018/05/22.

69. Gouedard C, Barouki R, Morel Y. Induction of the paraoxonase-1 gene expression by resveratrol. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(12):2378-83. Epub 2004/10/02.

70. Arii K, Suehiro T, Ota K, Ikeda Y, Kumon Y, Osaki F, et al. Pitavastatin induces PON1 expression through p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in Huh7 cells. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):439-45. Epub 2008/06/24.

71. Dart AM, Chin-Dusting JP. Lipids and the endothelium. *Cardiovascular research*. 1999;43(2):308-22. Epub 1999/10/28.

72. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*. 2013;9(10):1057-69. Epub 2013/11/20.

73. Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ, Braun AP. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2017;54(7-8):458-70. Epub 2017/11/01.

74. Kjaergaard AG, Dige A, Krog J, Tonnesen E, Wogensen L. Soluble adhesion molecules correlate with surface expression in an in vitro model of endothelial activation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2013;113(4):273-9. Epub 2013/06/04.

75. Stalenhoef AF, de Graaf J. Association of fasting and nonfasting serum triglycerides with cardiovascular disease and the role of remnant-like lipoproteins and small dense LDL. *Current opinion in lipidology*. 2008;19(4):355-61. Epub 2008/07/09.

76. Jagla A, Schrezenmeir J. Postprandial triglycerides and endothelial function. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2001;109(4):S533-47. Epub 2001/07/17.

77. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;956:511-40. Epub 2016/12/31.
78. Qi J, Zheng JB, Ai WT, Yao XW, Liang L, Cheng G, et al. Felodipine inhibits ox-LDL-induced reactive oxygen species production and inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular medicine reports*. 2017;16(4):4871-8. Epub 2017/08/10.
79. Tretjakovs P, Kalnins U, Dabina I, Dinne I, Erglis A, Kumsars I, et al. Plasma HDL-cholesterol has an effect on nitric oxide production and arachidonic acid metabolism in the platelet membranes of coronary heart disease patients without LDL-hypercholesterolemia. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2000;6(3):507-11. Epub 2001/02/24.
80. Persegol L, Darabi M, Dauteuille C, Lhomme M, Chantepie S, Rye KA, et al. Small dense HDLs display potent vasorelaxing activity, reflecting their elevated content of sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research*. 2018;59(1):25-34. Epub 2017/11/19.
81. Agewall S, Beltrame JF, Reynolds HR, Niessner A, Rosano G, Caforio AL, et al. ESC working group position paper on myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries. *European heart journal*. 2017;38(3):143-53. Epub 2017/02/06.
82. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Pepine CJ, Reis SE, Bittner V, Kelsey SF, et al. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47(3 Suppl):S4-S20. Epub 2006/02/07.
83. Shen CY, Jiang JG, Huang CL, Zhu W, Zheng CY. Polyphenols from Blossoms of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. Show Significant Anti-Complement and Anti-Inflammatory Effects. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017;65(41):9061-8. Epub 2017/09/26.
84. Chung RWS, Leanderson P, Lundberg AK, Jonasson L. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2017;262:87-93. Epub 2017/05/21.
85. Taguchi K, Hida M, Hasegawa M, Matsumoto T, Kobayashi T. Dietary polyphenol morin rescues endothelial dysfunction in a diabetic mouse model by activating the Akt/eNOS pathway. *Molecular nutrition & food research*. 2016;60(3):580-8. Epub 2015/12/03.
86. Vilahur G, Padro T, Casani L, Mendieta G, Lopez JA, Streitenberger S, et al. Polyphenol-enriched diet prevents coronary endothelial dysfunction by activating the Akt/eNOS pathway. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015;68(3):216-25. Epub 2014/12/03.
87. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Sarrafzadegan N. Pomegranate Consumption and Blood Pressure: A Review. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(7):1042-50. Epub 2016/10/18.
88. Estrada-Luna D, Martinez-Hinojosa E, Cancino-Diaz JC, Belefant-Miller H, Lopez-Rodriguez G, Betanzos-Cabrera G. Daily supplementation with fresh pomegranate juice increases paraoxonase 1 expression and activity in mice fed a high-fat diet. *European journal of nutrition*. 2018;57(1):383-9. Epub 2017/03/01.
89. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*. 2006;187(2):363-71. Epub 2005/10/18.
90. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1062-76. Epub 2000/05/09.
91. Meerts IA, Verspeek-Rip CM, Buskens CA, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, et al. Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2009;47(6):1085-92. Epub 2009/05/09.
92. Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS(n). *Food chemistry*. 2011;127(2):807-21. Epub 2011/07/15.
93. Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 2003;89(2-3):295-300. Epub 2003/11/13.

94. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000;48(10):4581-9. Epub 2000/10/29.
95. Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate fruit as a rich source of biologically active compounds. *BioMed research international*. 2014;2014:686921. Epub 2014/05/13.
96. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on *Punica granatum L.* *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*. 2016;21(3):221-7. Epub 2015/08/02.
97. Kozik V, Jarzembek K, Jedrzejowska A, Bak A, Polak J, Bartoszek M, et al. Investigation of Antioxidant Activity of Pomegranate Juices by Means of Electron Paramagnetic Resonance and UV-Vis Spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 2015;98(4):866-70. Epub 2015/08/14.
98. Guo C, Wei J, Yang J, Xu J, Pang W, Jiang Y. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr Res*. 2008;28(2):72-7. Epub 2008/12/17.
99. Sezer ED, Akcay YD, Ilanbey B, Yildirim HK, Sozmen EY. Pomegranate wine has greater protection capacity than red wine on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of medicinal food*. 2007;10(2):371-4. Epub 2007/07/27.
100. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(4):1415-22. Epub 2008/01/29.
101. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2008;13(2):128-44. Epub 2008/07/02.
102. Gupta N, Kandimalla R, Priyanka K, Singh G, Gill KD, Singh S. Effect of Resveratrol and Nicotine on PON1 Gene Expression: In Vitro Study. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2014;29(1):69-73. Epub 2014/01/31.
103. Razani Z, Dastani M, Kazerani HR. Cardioprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) Juice in Patients with Ischemic Heart Disease. *Phytotherapy research : PTR*. 2017;31(11):1731-8. Epub 2017/09/16.
104. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*. 2004;23(3):423-33. Epub 2004/05/26.
105. Delgado NT, Rouver WD, Freitas-Lima LC, de Paula TD, Duarte A, Silva JF, et al. Pomegranate Extract Enhances Endothelium-Dependent Coronary Relaxation in Isolated Perfused Hearts from Spontaneously Hypertensive Ovariectomized Rats. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:522. Epub 2017/01/20.
106. Bellone JA, Murray JR, Jorge P, Fogel TG, Kim M, Wallace DR, et al. Pomegranate supplementation improves cognitive and functional recovery following ischemic stroke: A randomized trial. *Nutritional neuroscience*. 2019;22(10):738-43. Epub 2018/02/13.
107. Davidson MH, Maki KC, Dicklin MR, Feinstein SB, Witchger M, Bell M, et al. Effects of consumption of pomegranate juice on carotid intima-media thickness in men and women at moderate risk for coronary heart disease. *The American journal of cardiology*. 2009;104(7):936-42. Epub 2009/09/22.
108. Shi M, Shi YL, Li XM, Yang R, Cai ZY, Li QS, et al. Food-grade Encapsulation Systems for (-)-Epigallocatechin Gallate. *Molecules*. 2018;23(2). Epub 2018/02/22.
109. Zhu F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. *Food chemistry*. 2017;229:542-52. Epub 2017/04/05.
110. Huesca-Gomez C, Carreon-Torres E, Nepomuceno-Mejia T, Sanchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejia AM, et al. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrine research*. 2004;30(3):403-15. Epub 2004/11/24.
111. Garcia-Sanchez C, Torres-Tamayo M, Juarez-Meavepena M, Lopez-Osorio C, Toledo-belles P, Monter-Garrido M, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome.

- Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2011;412(3-4):292-8. Epub 2010/11/03.
112. Huesca-Gomez C, Franco M, Luc G, Montano LF, Masso F, Posadas-Romero C, et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism: clinical and experimental*. 2002;51(4):443-50. Epub 2002/03/26.
113. Toledo-Ibelles P, Garcia-Sanchez C, Avila-Vazzini N, Carreon-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcon G, et al. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *Journal of lipid research*. 2010;51(6):1610-7. Epub 2010/01/26.
114. Bautista R, Carreon-Torres E, Luna-Luna M, Komera-Arenas Y, Franco M, Fragoso JM, et al. Early endothelial nitrosylation and increased abdominal adiposity in Wistar rats after long-term consumption of food fried in canola oil. *Nutrition*. 2014;30(9):1055-60. Epub 2014/06/25.
115. Garcia-Sanchez C, Posadas-Romero C, Posadas-Sanchez R, Carreon-Torres E, Rodriguez-Perez JM, Juarez-Rojas JG, et al. Low concentrations of phospholipids and plasma HDL cholesterol subclasses in asymptomatic subjects with high coronary calcium scores. *Atherosclerosis*. 2015;238(2):250-5. Epub 2014/12/22.
116. Manthou E, Georgakouli K, Deli CK, Sotiropoulos A, Fatouros IG, Kouretas D, et al. Effect of pomegranate juice consumption on biochemical parameters and complete blood count. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(2):1756-62. Epub 2017/08/07.
117. Asgary S, Sahebkar A, Afshani MR, Keshvari M, Haghjooyjavanmard S, Rafieian-Kopaei M. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. *Phytotherapy research : PTR*. 2014;28(2):193-9. Epub 2013/03/23.
118. Dana N, Javanmard SH, Rafiee L. Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma in antiangiogenic effect of pomegranate peel extract. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2016;19(1):106-10. Epub 2016/04/21.
119. Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, Aviram M, Fuhrman B. Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis*. 2010;208(1):119-25. Epub 2009/09/29.
120. Hontecillas R, Diguardo M, Duran E, Orpi M, Bassaganya-Riera J. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR alpha expression in adipose tissue. *Clin Nutr*. 2008;27(5):764-72. Epub 2008/09/10.
121. Tabas I. Sphingolipids and atherosclerosis: a mechanistic connection? A therapeutic opportunity? *Circulation*. 2004;110(22):3400-1. Epub 2004/12/01.
122. Alewijnse AE, Peters SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both? *European journal of pharmacology*. 2008;585(2-3):292-302. Epub 2008/04/19.
123. Hojjati MR, Li Z, Zhou H, Tang S, Huan C, Ooi E, et al. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):10284-9. Epub 2004/12/14.
124. Kinnunen PK, Holopainen JM. Sphingomyelinase activity of LDL: a link between atherosclerosis, ceramide, and apoptosis? *Trends in cardiovascular medicine*. 2002;12(1):37-42. Epub 2002/02/14.
125. Holopainen JM, Medina OP, Metso AJ, Kinnunen PK. Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(22):16484-9. Epub 2000/05/29.
126. Contreras-Duarte S, Chen P, Andia M, Uribe S, Irrazaval P, Kopp S, et al. Attenuation of atherogenic apo B-48-dependent hyperlipidemia and high density lipoprotein remodeling induced by vitamin C and E combination and their beneficial effect on lethal ischemic heart disease in mice. *Biological research*. 2018;51(1):34. Epub 2018/09/17.
127. Rom O, Volkova N, Jeries H, Grajeda-Iglesias C, Aviram M. Exogenous (Pomegranate Juice) or Endogenous (Paraoxonase1) Antioxidants Decrease Triacylglycerol Accumulation in Mouse Cardiovascular Disease-Related Tissues. *Lipids*. 2018;53(11-12):1031-41. Epub 2018/12/19.

128. Rosenblat M, Aviram M. Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. *Biofactors*. 2009;35(1):98-104. Epub 2009/03/26.
129. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endothelial protection. *British journal of pharmacology*. 2013;169(3):493-511. Epub 2013/03/16.
130. Westerterp M, Wang N, Tall AR. High-Density Lipoproteins, Endothelial Function, and Mendelian Randomization. *Circulation research*. 2016;119(1):13-5. Epub 2016/06/25.
131. Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP. Non-specific inhibition by human lipoproteins of endothelium dependent relaxation in rat aorta may be attributed to lipoprotein phospholipids. *Cardiovascular research*. 1997;34(3):590-6. Epub 1997/06/01.
132. Takahashi M, Yui Y, Yasumoto H, Aoyama T, Morishita H, Hattori R, et al. Lipoproteins are inhibitors of endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *The American journal of physiology*. 1990;258(1 Pt 2):H1-8. Epub 1990/01/01.
133. Staels B, Auwerx J. Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis*. 1998;137 Suppl:S19-23. Epub 1998/08/07.
134. Zarfeshany A, Asgary S, Javanmard SH. Potent health effects of pomegranate. *Advanced biomedical research*. 2014;3:100. Epub 2014/05/07.
135. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979;60(3):473-85. Epub 1979/09/01.
136. O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *The American journal of cardiology*. 2007;100(5):899-904. Epub 2007/08/28.
137. 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: clinical and experimental*. 2003;52(8):1034-7. Epub 2003/08/05.
138. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Negre-Salvayre A, Salvayre R, 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(12):2715-23. Epub 2013/10/05.
139. Perez-Mendez O, Pacheco HG, Martinez-Sanchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2014;429:111-22. Epub 2013/12/18.
140. Lv O, Wang L, Li J, Ma Q, Zhao W. Effects of pomegranate peel polyphenols on lipid accumulation and cholesterol metabolic transformation in L-02 human hepatic cells via the PPARgamma-ABCA1/CYP7A1 pathway. *Food & function*. 2016;7(12):4976-83. Epub 2016/11/16.
141. Niesor EJ, Chaput E, Mary JL, Staempfli A, Topp A, Stauffer A, et al. Effect of compounds affecting ABCA1 expression and CETP activity on the HDL pathway involved in intestinal absorption of lutein and zeaxanthin. *Lipids*. 2014;49(12):1233-43. Epub 2014/10/11.
142. Munoz-Vega M, Masso F, Paez A, Vargas-Alarcon G, Coral-Vazquez R, Mas-Oliva J, et al. HDL-Mediated Lipid Influx to Endothelial Cells Contributes to Regulating Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Expression and eNOS Phosphorylation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11). Epub 2018/11/02.
143. Martinez-Ramirez M, Madero M, Vargas-Alarcon G, Vargas-Barron J, Fragoso JM, Rodriguez-Perez JM, et al. 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. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;454:77-81. Epub 2016/01/12.



## 10. Anexos



### Carta de Consentimiento Informado

Tlalpan, Distrito Federal a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_

Por medio de la presente yo, \_\_\_\_\_ autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado “Estudio de la magnitud de la trigliceridemia postprandial en mujeres postmenopáusicas con Síndrome isquémico coronario agudo (SICA): efecto de la suplementación con granada roja (*Punica granatum L*)”. El objetivo de este estudio es analizar el efecto que tienen los valores sanguíneos de triglicéridos, colesterol y otros componentes de las lipoproteínas antes y después de la ingesta de alimento, y determinar si la granada roja aporta beneficios en la salud cardiovascular. Se me ha explicado y he comprendido que mi participación consistirá en asistir en ayuno al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología en donde se me colocará un cateter para tomar muestras de sangre. Se me tomarán 10 mL de sangre y posteriormente recibiré un desayuno que consta de un sándwich y de agua de limón, y permitiré que me extraigan 10 mL de sangre cada 2 horas durante un lapso de 8 h. He sido informado que debo permanecer durante el tiempo del estudio en las instalaciones del Instituto Nacional de Cardiología. Me han informado y entiendo que la realización del estudio que me permitirá conocer mis niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, y mis medidas antropométricas (peso-talla, índice de masa corporal). Asimismo, se me hará una valoración clínico-nutricional, con lo cual se determinará el riesgo cardiovascular que presento y se me harán las recomendaciones dietéticas y nutricionales pertinentes. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: por la toma de sangre, dolor durante la punción y posible formación de hematoma en el sitio de la misma. Además, los posibles efectos secundarios y riesgos por el volumen de sangre que se me tomará son considerados como mínimos. Con lo anterior se generará información para determinar el efecto de la trigliceridemia postprandial sobre la estructura y la actividad endotelial de las HDL. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente. El investigador principal Dr. Oscar A. Pérez Méndez, cédula profesional: 1509827, teléfono: 55732911 ext 1460, ha confirmado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Dr. Óscar Pérez Méndez

\_\_\_\_\_  
Testigo 1. Nombre y firma

Domicilio:

\_\_\_\_\_  
Testigo 2. Nombre y firma

Domicilio: