



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD PARAOXONASA Y  
AUMENTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA OXIDACIÓN  
DE LAS LDL EN PACIENTES CORONARIOS CON C-LDL  
EN META PERO CON HIPOALFALIPOPROTEINEMIA E  
HIPERTRIGLICERIDEMIA**

**T E S I S**

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

PRESENTA

**KARINA VERA GARCÍA**



MÉXICO, D.F.

2009



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

VOCAL: Profra. María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

SECRETARIO: Profra. Rosalinda Posadas Sánchez

1er. SUPLENTE: Profra. Mireya Rodríguez Penagos

2do. SUPLENTE: Profra. Luz María del Rocío Valdés Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Endocrinología

Instituto Nacional de Cardiología

“Ignacio Chávez”

ASESOR DEL TEMA

---

M. en C. Rosalinda Posadas Sánchez

SUSTENTANTE

---

Karina Vera García

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios

Por darme la vida, por poner en mi camino a personas maravillosas en mi camino, por las bendiciones que recibo día tras día y haberme permitido llegar satisfactoriamente a este momento de triunfo.

A mis Padres

Quienes me han heredado el tesoro más valioso que pudiera dársele a un hijo: Amor y Educación. A ti papi, por tus sacrificios y desvelos para que el día de hoy yo fuera una profesionalista. Sé que desde el cielo me sigues apoyando, guiando y que siempre vas a estar conmigo porque ahora eres mi ángel guardián. A ti mami, porque gracias a tu fortaleza ante los momentos difíciles, supiste sacarnos adelante, por tu apoyo incondicional y sobre todo por ese gran amor de madre que siempre me das.

Gracias papitos por haber hecho de mi una persona de provecho...LOS AMO.

A mis hermanas

Gaby y Vero por todo su apoyo, por ser mis amigas, pero sobre todo por su amor y paciencia; saben? mi ilusión es corresponderles siendo su ejemplo, tal como mi papá lo deseaba. Me siento muy afortunada de tenerlas como hermanas. Las quiero mucho.

A Israel

Al gran amor de mi vida, por permitirme compartir este momento de satisfacción a su lado, por escucharme, aconsejarme, brindarme su apoyo y comprensión.

A Rossy

Por confiar en mí y ser mi tutora, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Endocrinología, de aprender tantas cosas y permitirme concluir este proyecto. Gracias por todos tus consejos, enseñanzas y esos jalones de oreja que me han hecho crecer como persona y como profesionalista.

Equipo del laboratorio de Endocrinología

Al Dr. Posadas por su apoyo e interés en este trabajo, por sus consejos y su experiencia que ayudó a mi aprendizaje durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Cardoso, Gabriel y Esteban por su enseñanzas, consejos y por permitirme compartir momentos divertidos con ustedes.

Joss, Wendy, Caro y Carmen por permitirme conocer a unos grandes seres humanos, amigas y compañeras, por los momentos de alegría, diversión e incluso tristezas. Fue un honor haber trabajado y aprendido con ustedes, gracias por su amistad.

A mis grandes amigos de la Facultad de Química  
Marce, Cris, Vero, Adri, Oscar y Alejo por su apoyo, confianza, por los días en  
que compartimos enseñanzas, ideas, experiencias, tristezas, juegos,  
cumpleaños. El conocerlos fue una de las mejores cosas que me pudo haber  
ocurrido en la Universidad.

A la Universidad Autónoma de México  
Por abrirme las puertas de sus aulas permitiendo y apoyando mi formación  
como universitaria.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>I. RESUMEN</b> .....	9
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	11
1. Lípidos y Lipoproteínas.....	11
1.1 Lípidos.....	11
1.1a Definición y función.....	11
1.1b Clasificación.....	11
1.2 Lipoproteínas.....	16
1.2a Definición, Estructura y Función.....	16
1.2b Clasificación de lipoproteínas.....	17
1.2c Apolipoproteínas.....	17
2. Metabolismo de las Lipoproteínas.....	19
2.1 Enzimas que participan en el metabolismo de las lipoproteínas.....	19
2.2 Vía Exógena.....	19
2.3 Vía Endógena.....	22
2.4 Transporte reverso de colesterol.....	24
3. Lipoproteína de baja densidad.....	27
3.1 Estructura, características y función.....	27
3.2 Receptor de LDL.....	28
3.3 Metabolismo de las LDL.....	29
3.3a Biosíntesis.....	29
3.3b Catabolismo.....	29

3.4	Participación de la LDL en la aterogénesis.....	30
3.4a	Proceso de aterogénesis y factores de riesgo.....	30
3.5	Susceptibilidad a la oxidación de la LDL.....	32
3.5a	LDL oxidada.....	32
3.5b	Efectos proaterogénicos de la LDL oxidada.....	35
3.6	Control del proceso de oxidación.....	36
3.6a	Antioxidantes.....	36
3.6b	Papel ateroprotector de las HDL.....	36
4.	Enzima Paraoxonasa 1.....	37
4.1	Características, genética y efecto antiaterogénico de la PON1.....	37
4.2	Actividad paraoxonasa y aterosclerosis.....	38
<b>III.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>40</b>
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>41</b>
<b>VI.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>

## ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador de membrana A1 dependiente de ATP
ACAT	Acil colesterol aciltransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
Apo A-I	Apolipoproteína A-I
Apo B-48	Apolipoproteína B-48
Apo B-100	Apolipoproteína B-100
Apo C-II	Apolipoproteína C-II
Apo C-III	Apolipoproteína C-III
Apo E	Apolipoproteína E
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL	Colesterol de la lipoproteína de alta densidad
C-LDL	Colesterol de la lipoproteína de baja densidad
C-VLDL	Colesterol de la lipoproteína de muy baja densidad
CL	Colesterol libre
CT	Colesterol total
EAC	Enfermedad arterial coronaria
EC	Ésteres de colesterol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
FL	Fosfolípidos
HA	Hipoalfalipoproteinemia
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HC	Hipercolesterolemia
HTA	Hipertensión arterial
HTG	Hipertrigliceridemia
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
kDa	Kilodaltones
LCAT	Lecitin colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad



LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LDLR	Receptor LDL
LH	Lipasa hepática
LLP	Lipasa lipoproteica
MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
NLP	Normolipidémicos
ON	Óxido nítrico
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON1	Paraoxonasa 1
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
Qm	Quilomicrón
Rem Qm	Remanente de quilomicrón
SR-B1	Receptor pepenador clase B1
TG	Triglicéridos
TGRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
VitE	Vitamina E
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

## RESUMEN

**Antecedentes:** El tratamiento con estatinas reduce significativamente la incidencia de eventos coronarios. Sin embargo, se ha informado que en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) que alcanzaron valores de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) inferiores a 70 mg/dL en respuesta a tratamiento con atorvastatina, el riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes fue 2 veces más alto en aquellos con valores de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) inferiores a 40 mg/dL. Varios estudios prospectivos han mostrado que las LDL pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación y representan un factor de riesgo independiente para eventos cardiovasculares; por otro lado, se ha descrito actividad de paraoxonasa 1 (PON1) disminuida en pacientes con EAC (coronarios) en comparación con sujetos sanos. Más aún se ha reportado que la actividad baja de PON1 es un factor de riesgo independiente para eventos coronarios recurrentes en los pacientes con EAC. Es probable que alteraciones fisicoquímicas de las LDL y funcionales de las HDL puedan contribuir, al menos en parte, al riesgo residual de eventos recurrentes en pacientes con EAC tratados con estatinas.

**Objetivo:** Estudiar en 34 pacientes con EAC tratados con estatina y C-LDL en valores meta (<100mg/dL), pero con C-HDL y TG anormales (grupo HA+HTG), en 35 pacientes con EAC tratados con estatina normolipidémicos (grupo NLP) y en un grupo de 20 hombres sanos sin tratamiento farmacológico (grupo control), la funcionalidad de las HDL a través de la medición de la actividad de PON1, así como el tamaño y la susceptibilidad a la oxidación de las LDL.

**Material y métodos:** El tamaño de las LDL se determinó mediante electroforesis en gel en gradiente. La susceptibilidad a la oxidación de LDL se determinó midiendo la duración de la fase de latencia después de agregar el agente oxidante. La actividad de PON1 en suero se determinó espectrofotométricamente, monitoreando la velocidad de generación de para-nitrofenol.

**Resultados:** En comparación con los grupos control y el NLP, el grupo HA+HTG se caracterizó por la presencia de partículas de LDL pequeñas y densas (26.80, 26.39 y 25.98 nm respectivamente;  $p < 0.05$ ) así como una fase de latencia significativamente menor (62.30, 65.61 y 58.85 min respectivamente;  $p < 0.05$ ) indicando mayor susceptibilidad a la oxidación de las LDL en estos pacientes. La actividad de PON1 estuvo significativamente baja en los dos grupos de pacientes coronarios (grupo NLP y el grupo HA+HTG) y en comparación con los sujetos sanos (204, 213 y 338 nmol p-nitrofenol/min/mL respectivamente;  $p < 0.01$ ).

**Conclusiones:** Los pacientes con enfermedad arterial coronaria tratados con estatinas, con C-LDL en meta e hipoalfalipoproteínemia más hipertrigliceridemia, presentan disminución de la actividad PON1 así como partículas de LDL pequeñas y densas y más fácilmente oxidables. Todas estas alteraciones se asocian a un mayor riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes.

# ANTECEDENTES

## 1. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

### 1.1 Lípidos

#### 1.1a Definición y función

Los lípidos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común es su insolubilidad en agua y solubilidad en solventes orgánicos como acetona, benceno, éter, etc. Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes actuando como formas de almacenamiento energético, como componentes estructurales de las membranas biológicas, cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, mensajeros intracelulares, agentes emulsionantes, precursores de hormonas.<sup>1</sup>

#### 1.1b Clasificación

Los lípidos se clasifican principalmente en 4 categorías: ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.

- Ácidos grasos: Son ácidos carboxílicos con cadenas laterales hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos<sup>1</sup> fuertemente hidrofóbicas; el grupo carboxilo interacciona fácilmente con el agua, lo que da a los ácidos grasos un carácter anfipático (es decir, en la misma molécula coexisten zonas hidrofílicas e hidrofóbicas). Los ácidos grasos se encuentran presentes en su mayoría en forma de derivados del ácido carboxílico tales como ésteres o amidas.<sup>1</sup>

La mayoría de los ácidos grasos contienen un número par de átomos de carbono y sus propiedades están estrechamente relacionadas con la longitud

de sus cadenas y con el grado de insaturación.<sup>2</sup> En la Tabla 1.1a se muestran los ácidos grasos biológicos más comunes.<sup>3</sup>

**Tabla 1.1a Ácidos grasos más comunes**

Símbolo <sup>a</sup>	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
<i>Ácidos grasos saturados</i>			
12:0	Ácido láurico	Ácido dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18:0	Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20:0	Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22:0	Ácido behénico	Ácido docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24:0	Ácido lignocérico	Ácido tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
<i>Ácidos grasos insaturados (todos los dobles enlaces son cis)</i>			
16:1	Ácido palmitoleico	Ácido 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:1	Ácido oleico	Ácido 9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2	Ácido linoleico	Ácido 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18:3	Ácido $\gamma$ -linolénico	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20:4	Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
20:5	EPA	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24:1	Ácido nervónico	Ácido 15-tetracosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

<sup>a</sup> Número de átomos de carbono: número de dobles enlaces.

Fuente: Voet D, Voet JG. Bioquímica, 2a edición, Ed. Omega, España, 1992, pp. 296.

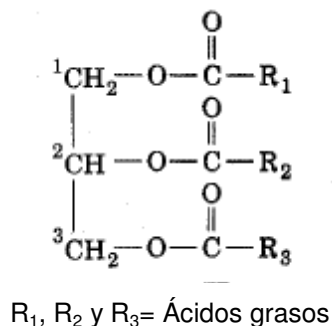
Cuando la cadena hidrocarbonada está constituida solamente por carbonos  $\text{sp}^3$ , es decir, está plenamente saturada, hablamos de ácidos grasos saturados; pero muy a menudo se presentan insaturaciones en forma de dobles enlaces  $\text{C}=\text{C}$ ; hablamos entonces de ácidos grasos insaturados. Estos últimos tienen puntos de fusión más bajos que los saturados. Los ácidos grasos más abundantes en el organismo son el palmítico y el esteárico. Los ácidos grasos poliinsaturados se han agrupado en familias, que se designan por la posición de la insaturación más próxima del extremo metilo terminal (familias  $\omega 9$ ,  $\omega 6$ ,  $\omega 3$ ).<sup>4</sup> Desde el punto de vista nutricional los ácidos grasos poliinsaturados se

consideran como esenciales puesto que no son sintetizados por nuestro organismo; algunos ejemplos de éstos son el ácido linoléico, linolénico y araquidónico.

- Triglicéridos: Están compuestos por tres ácidos grasos esterificados con un solo glicerol<sup>3</sup> (Figura 1.1a). Los triglicéridos constituyen una forma eficiente de almacenamiento de energía en el humano; representan la clase de lípidos más abundante del tejido adiposo (95%)<sup>5</sup> y se dividen en simples y mixtos. Los triglicéridos simples contienen un solo tipo de ácido graso, mientras que los mixtos contienen dos o tres ácidos grasos diferentes<sup>3</sup>. Las propiedades físicas de los triglicéridos dependen de la composición de sus ácidos grasos. No obstante, en general se puede decir que aquellos enriquecidos en ácidos grasos saturados suelen ser sólidos a temperatura ambiente (grasas), mientras que los ricos en insaturados son líquidos (aceites). Los triglicéridos son insolubles en agua, por lo que tienden a asociarse formando micelas.

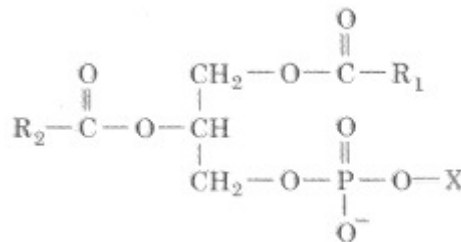
A pH neutro, diversas lipasas catalizan la hidrólisis enzimática de los triglicéridos. Las lipasas del intestino colaboran en la digestión y absorción de las grasas de la dieta. Los adipocitos contienen lipasas que rompen los triglicéridos almacenados, liberando ácidos grasos que son exportados a otros tejidos en los que se necesitan como combustible.

**Figura 1.1a Estructura química de los triglicéridos<sup>3</sup>**



- Fosfolípidos: Son un tipo de lípidos polares compuestos por un glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato<sup>3</sup> (Figura 1.1b). El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster (enlace covalente que se produce entre un grupo hidroxilo y un grupo fosfato) a otras moléculas, que frecuentemente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolamina, en base a las cuales se clasifica (Tabla 1.1b)<sup>3</sup>.

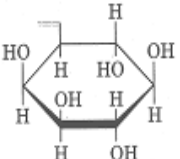
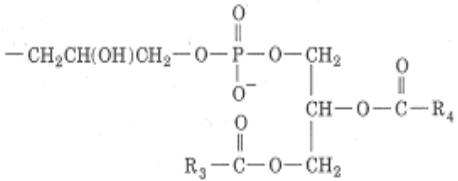
**Figura 1.1b Estructura de los fosfolípidos<sup>3</sup>**



R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>= Ácidos grasos, X= Molécula que los clasifica

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, ya que poseen una región polar que corresponde al grupo fosfato y una región no polar correspondiente a las largas cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. Este carácter anfipático les permite su autoasociación a través de interacciones hidrofóbicas dando lugar a la formación de la bicapa lipídica de las membranas celulares. Esta característica estructural hace posible que los fosfolípidos participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y un sistema lipídico<sup>3</sup>.

**Tabla 1.1b Clasificación de fosfolípidos**

Nombre de X-OH	Fórmula de -X	Nombre del fosfolípido
Agua	-H	Ácido fosfatídico
Etanolamina	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Fosfatidiletanolamina
Colina	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Fosfatidilcolina (lecitina)
Serina	-CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )COO <sup>-</sup>	Fosfatidilserina
<i>mio</i> -Inositol		Fosfatidilinositol
Glicerol	-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	Fosfatidilglicerol
Fosfatidilglicerol		Difosfatidilglicerol (cardiolipina)

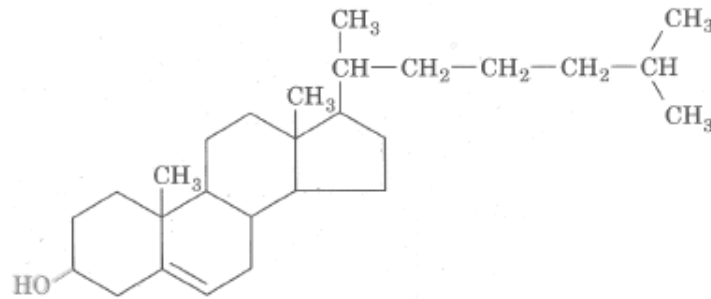
Fuente: Voet D, Voet JG. Bioquímica, 2a edición, Ed. Omega, España, 1992, pp. 330.

- **Colesterol:** Los esteroides son lípidos estructurales presentes en la mayoría de las células eucariontes. Su estructura característica es la del núcleo esteroide de cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco.<sup>1</sup> El colesterol es un componente mayoritario de las membranas celulares. Su grupo hidroxilo le da un carácter débilmente anfipático mientras que su sistema de anillos le confiere mayor rigidez que lo de los otros lípidos de membrana<sup>3</sup> (Figura 1.1c).

El colesterol determina, por tanto, de manera importante las propiedades de la membrana. También es abundante en lipoproteínas plasmáticas en las que alrededor de un 70% del mismo está esterificado con ácidos grasos de cadena larga a través de su grupo hidroxilo formando ésteres de colesterol.<sup>3</sup>



**Figura 1.1c Estructura química del colesterol<sup>3</sup>**



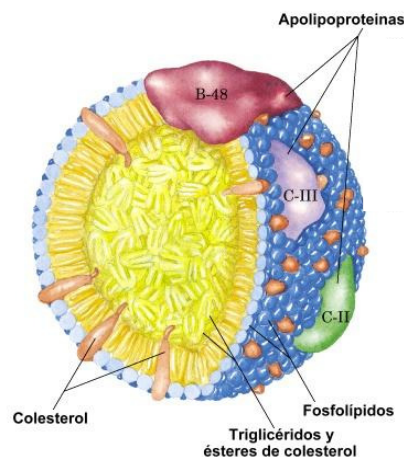
## 1.2 Lipoproteínas

### 1.2a Definición, Estructura y Función

Las lipoproteínas son macromoléculas compuestas por una parte lipídica y una proteica; cada una está formada por un núcleo que contiene cantidades variables de triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado de una monocapa de colesterol libre, fosfolípidos y proteínas<sup>1, 6</sup>(Figura 1.2).

La función principal de las lipoproteínas es el transporte de lípidos en el torrente circulatorio, desde su origen a sitios de uso tales como el hígado, músculo y tejido adiposo.

**Figura 1.2 Estructura general de las lipoproteínas**



Fuente: Nelson D, Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3th Edition, Ed. Worth Publishers, USA 2000, pp. 602.

## 1.2b Clasificación de lipoproteínas

Las lipoproteínas se han clasificado de acuerdo a sus propiedades físicas y composición química<sup>3,7</sup> (Tabla 1.2a).

**Tabla 1.2a Clasificación de las lipoproteínas**

Lipoproteína	Diámetro (nm)	Densidad (g/mL)	Movilidad electroforética	Composición Química (%)			
				TG	CT	FL	Proteínas
Quilomicrón	1000	< 0.95	Origen	86	5	7	2
VLDL	30-90	0.95- 1.006	Pre- $\beta$	55	19	18	8
IDL	20-30	1.006-1.019	$\beta$ -lenta	23	38	19	19
LDL	20	1.019-1.063	$\beta$	5	50	20	25
HDL <sub>2</sub>	10	1.063-1.125	$\alpha$	5	22	33	40
HDL <sub>3</sub>	7	1.125-1.210	$\alpha$	3	17	25	55

VLDL (Lipoproteína de muy baja densidad); IDL (Lipoproteína de densidad intermedia); LDL (Lipoproteína de baja densidad); HDL (Lipoproteína de alta densidad); TG (Triglicéridos); CT (Colesterol total); FL (Fosfolípidos)

Fuente: \* Voet D, Voet JG. Bioquímica, 2a edición, Ed. Omega, España, 1992, pp. 331.

\* Mayes P. A., Transporte y almacenamiento de lípidos, En Murray R. K., Granner, D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., Bioquímica de Harper, 14a Edición, México, Manual Moderno, 1997, pp. 294.

## 1.2c Apolipoproteínas

Las unidades proteicas que aún no se incorporan a las lipoproteínas respectivas se denominan apoproteínas. Cuando forman complejos con las lipoproteínas se denominan apolipoproteínas.<sup>5</sup> En la Tabla 1.2b se encuentran clasificadas las principales apolipoproteínas.<sup>7</sup>

Sus funciones son mantener la estructura de las lipoproteínas y regular el metabolismo y transporte de las mismas, otras actúan como ligandos de receptores celulares o como cofactores de enzimas.<sup>7</sup>

**Tabla 1.2b Principales apolipoproteínas del plasma humano**

<b>APOLIPO- PROTEINA</b>	<b>PESO MOLECULAR (kDa)</b>	<b>LOCALIZACIÓN</b>	<b>PRINCIPAL SITIO DE SÍNTESIS</b>	<b>FUNCIÓN</b>
A-I	28	HDL, Qm	Hígado, intestino delgado	Cofactor de la Lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT)
A-II	17.4	HDL, Qm	Hígado	Proteína estructural; regula a la Lipasa hepática
A-IV	46	HDL, Qm	Intestino delgado	Activador de la LCAT
B-100	550	VLDL, LDL	Hígado	Proteína estructural, ligando para el receptor LDL
B-48	260	Qm	Intestino delgado	Proteína estructural
C-I	6.6	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Cofactor de la LCAT
C-II	8.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Cofactor de la Lipasa lipoproteica (LLP)
C-III	8.8	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibición de la LLP
E	34	VLDL, HDL	Hígado, macrófagos	Ligando para el receptor hepático E

Fuente: Mayes P. A., Transporte y almacenamiento de lípidos, En Murray R. K., Granner, D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., Bioquímica de Harper, 14a Edición, México, Manual Moderno, 1997, pp. 296.

## 2. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

### 2.1 Enzimas que participan en el metabolismo de las lipoproteínas

Existen varias enzimas y proteínas que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas<sup>1,8</sup> (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1 Principales enzimas y proteínas relacionadas con el metabolismo lipoproteico**

ENZIMA	SITIO PRINCIPAL DE SÍNTESIS	FUNCIÓN
Lipasa lipoproteica (LLP)	Endotelio vascular de tejido adiposo, músculo estriado, miocardio y pulmón	Hidrolizar los triglicéridos de las VLDL y los quilomicrones
Lipasa hepática (LH)	Hígado	Hidrolizar los triglicéridos de las IDL, LDL y HDL
Lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT)	Hígado	Esterificación de colesterol, maduración de HDL
Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)	Hígado, intestino delgado, bazo	Favorece la transferencia de ésteres de colesterol de las HDL a las VLDL
Proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP)	Hígado, células endoteliales	Favorece la transferencia de fosfolípidos de las VLDL a las HDL

Fuente: \* Nelson D, Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3th Edition, Ed. Worth Publishers, USA, 2000, pp. 805.

\* Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G, High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21:13-27.

### 2.2 Vía Exógena

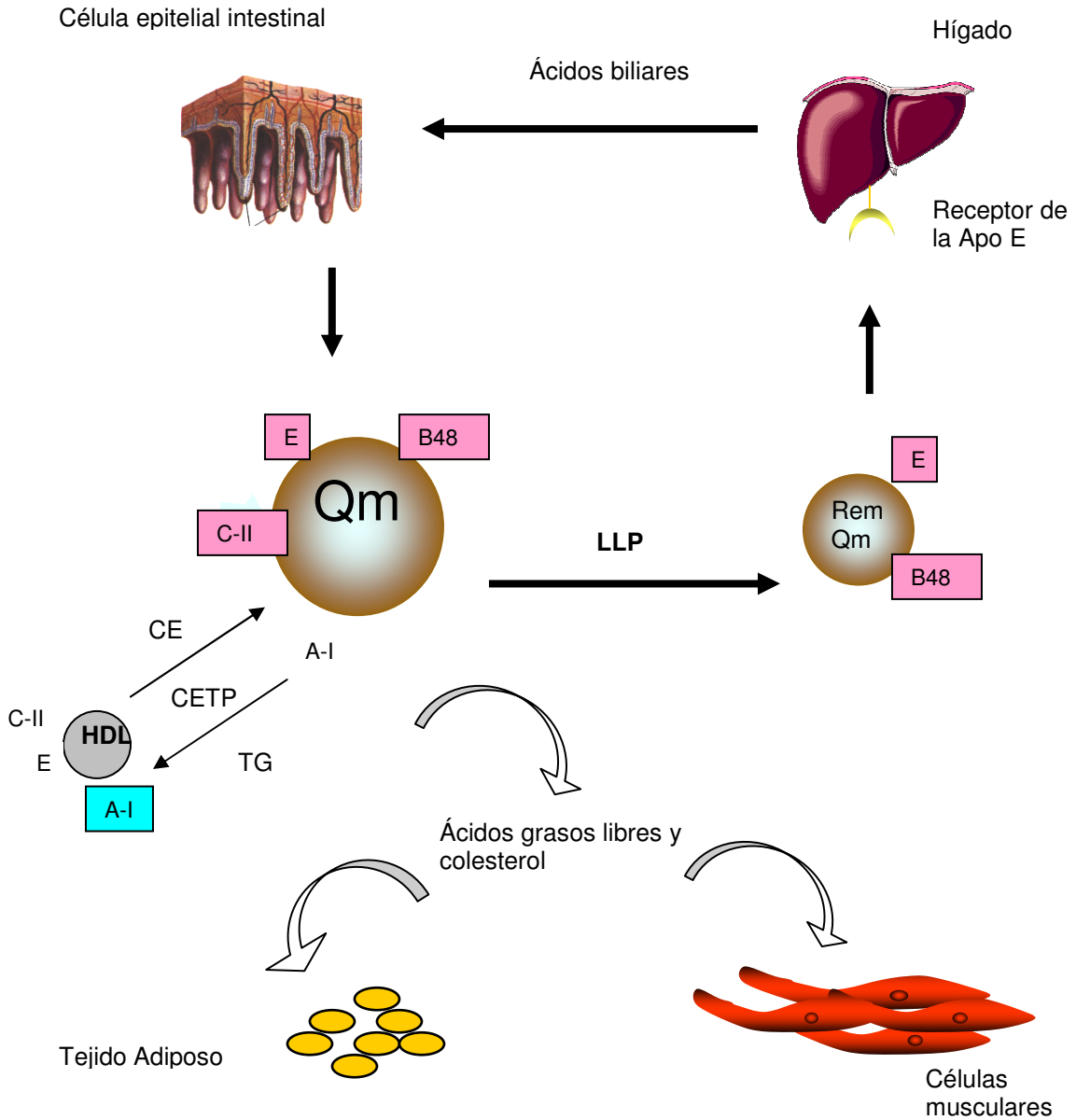
Los lípidos más abundantes provenientes de la dieta son los triglicéridos, sin embargo existen pequeñas cantidades de fosfolípidos y ésteres de colesterol, cuya digestión se lleva a cabo esencialmente en el intestino delgado. En primer

lugar los lípidos son emulsificados por la bilis, secreción hepática que contiene grandes cantidades de sales biliares, dando lugar a la formación de micelas con el fin de que las enzimas digestivas hidrosolubles puedan actuar sobre su superficie.<sup>9</sup> La enzima más importante para la hidrólisis de los triglicéridos es la lipasa pancreática que actúa liberando monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol. Tanto los ésteres de colesterol como los fosfolípidos son hidrolizados por otras dos lipasas existentes en la secreción pancreática, la colesterol éster hidrolasa y la fosfolipasa A<sub>2</sub> respectivamente.<sup>9</sup> Los productos resultantes son transportados hacia la superficie de las microvellosidades del borde en cepillo de la mucosa intestinal, donde se difunden inmediatamente a través de la membrana celular del enterocito hacia su interior.<sup>9</sup> Los ácidos grasos de cadena corta e intermedia se absorben directamente hacia la sangre portal unidos a la albúmina.<sup>5</sup>

Tras penetrar en el enterocito los ácidos grasos de cadena larga (mayor a 12 carbonos) y los monoglicéridos son captados por el retículo endoplásmico liso, donde son recombinados para formar triglicéridos, los cuales se ensamblan con fosfolípidos, pequeñas cantidades de colesterol y apoproteínas (principalmente Apo B-48, A-I y A-II)<sup>9</sup> y luego son transportadas hacia el aparato de Golgi, formando los **quilomicrones**, los cuales son liberados a los canales linfáticos y transportados al torrente circulatorio a través del conducto torácico, donde intercambian Apo A-I y Apo A-II por apolipoproteínas C-II y E de las HDL.

Por medio de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), los quilomicrones también intercambian triglicéridos por ésteres de colesterol de las HDL<sup>10</sup> (Figura 2.2).

**Figura 2.2 Vía exógena**



Qm = Quilomicrón; Rem Qm = Remanente de quilomicrón; HDL = Lipoproteínas de alta densidad; LLP= Lipasa lipoproteica; CETP = Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; TG = Triglicéridos; CE = Ésteres de colesterol

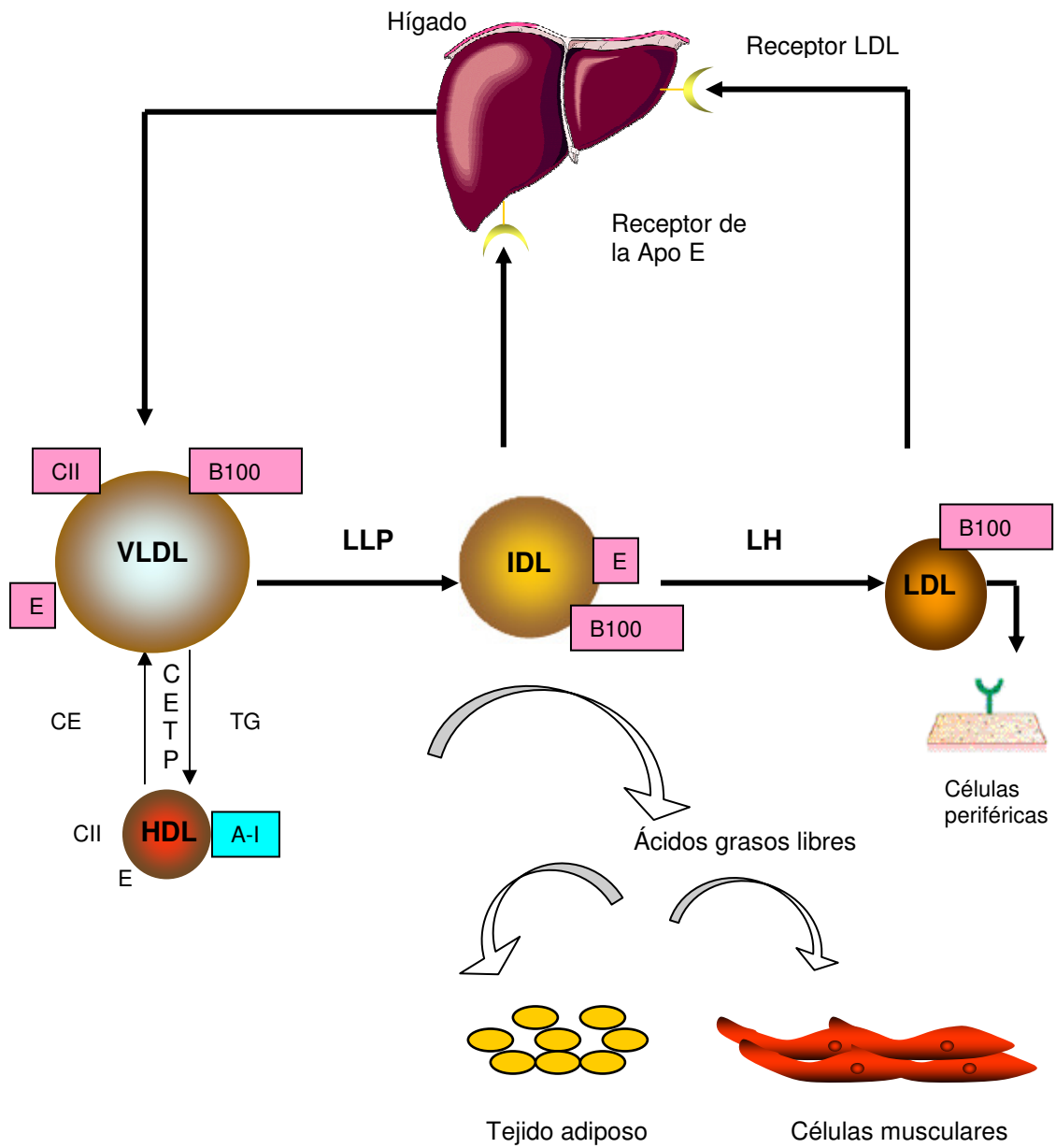
Fuente: Gotto A, DPhil MD. Diagnóstico y tratamiento actual de los trastornos lipídicos, 3ª Edición, Atlas Medical Publishing, Ltd, España 2005, pp 57.

La Apo C-II activa la lipasa lipoproteica (LPL), que se encuentra en el endotelio capilar e hidroliza parte de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones en ácidos grasos libres y colesterol. Los ácidos grasos libres obtenidos de esta forma son oxidados por las células musculares para obtener energía o son almacenados por el tejido adiposo. Los remanentes de quilomicrones resultantes son depurados de la circulación mediante captación por los hepatocitos a través del receptor que reconoce la Apo E.<sup>10</sup> El colesterol liberado de estos remanentes puede ser excretado directamente en la bilis, convertido en ácidos biliares, o bien, puede ser utilizado para la formación de otras lipoproteínas.

### **2.3 Vía Endógena**

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas en el hígado a partir de ácidos grasos libres obtenidos del catabolismo de los quilomicrones o a partir de los triglicéridos producidos endógenamente,<sup>10</sup> los cuales son ensamblados en el retículo endoplásmico liso con Apo B-100, pequeñas cantidades de Apo E, C-II y C-III.<sup>11</sup> Las partículas VLDL son transportadas hacia el aparato de Golgi y liberadas por exocitosis al torrente sanguíneo donde interactúan con las HDL adquiriendo cantidades adicionales de Apo E y C. A través de la acción de CETP, las VLDL intercambian triglicéridos por ésteres de colesterol de las HDL<sup>11</sup> (Figura 2.3).

**Figura 2.3 Vía endógena**



VLDL = Lipoproteínas de muy baja densidad; IDL = Lipoproteínas de densidad intermedia; LDL = Lipoproteínas de baja densidad; HDL = Lipoproteínas de alta densidad; LLP= Lipasa lipoproteica; CETP = Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; TG = Triglicéridos; CE = Ésteres de colesterol

Fuente: Gotto A, DPhil MD. Diagnóstico y tratamiento actual de los trastornos lipídicos, 3ª Edición, Atlas Medical Publishing, Ltd, España 2005, pp. 59.



Al igual que con los quilomicrones, la LLP hidroliza los triglicéridos de las VLDL a ácidos grasos libres que son utilizados como fuente de energía o almacenados en el tejido adiposo. Los remanentes de VLDL, también llamados lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) pueden ser captados por el receptor hepático LDL mediante la Apo E o bien, ser reducidos de tamaño dando lugar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de la acción de la lipasa hepática (LH);<sup>10</sup> durante este proceso, las apolipoproteínas excepto Apo B-100 son transferidas a otras lipoproteínas (Figura 2.3).

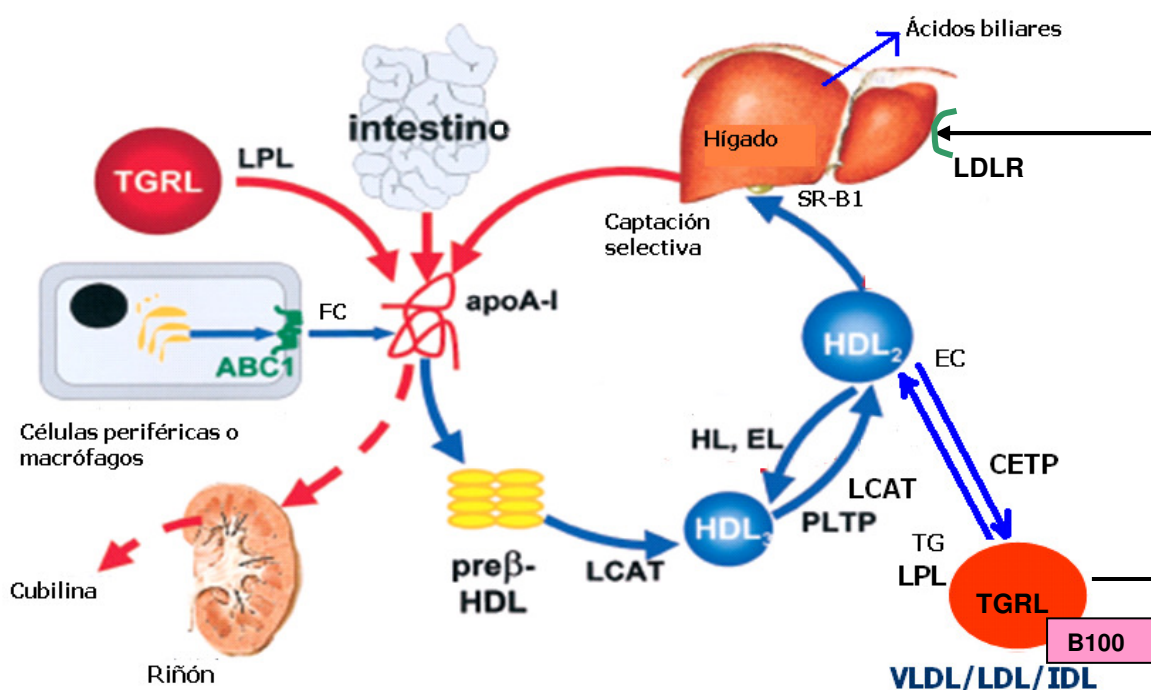
Aproximadamente dos tercios de las LDL son depurados a través del receptor LDL que reconoce a la Apo B-100. En el hepatocito, las LDL son degradadas por las enzimas lisosomales. Las células periféricas también pueden captar LDL para ser empleadas en la biosíntesis de membranas y esteroides. Alrededor del 70% del colesterol plasmático es transportado por partículas LDL.<sup>10</sup>

## **2.4 Transporte reverso de colesterol**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son un grupo heterogéneo de partículas, cuyo origen es tanto intestinal como hepático, siendo sus principales componentes proteicos las apoproteínas A-I (representa aproximadamente el 70%), A-II y A-IV.<sup>11</sup> La adición de lípidos a las apoproteínas comienza después de su secreción, mediante el transportador de membrana A1 dependiente de ATP (ABCA1), pues se ha sugerido que éste forma canales dentro de la membrana por los cuales el colesterol libre y los fosfolípidos son transferidos para así formar las partículas HDL pre- $\beta$  o nacientes de forma discoide.<sup>12</sup>

Las HDL nacientes también contienen la enzima lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT), la cual esterifica el colesterol proveniente de las células periféricas, macrófagos o de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, utilizando como cofactor a la Apo A-I y de esta manera generar partículas HDL<sub>3</sub> maduras que tienen forma esférica que continúan creciendo conforme ocurre la esterificación de colesterol y transferencia de fosfolípidos mediante la acción de la PLTP y así generar partículas HDL<sub>2</sub> grandes<sup>8</sup> (Figura 2.4).

**Figura 2.4 Transporte Reverso del Colesterol**



HDL = Lipoproteínas de alta densidad; TGRL = Lipoproteínas ricas en triglicéridos; ABCA1 = Transportador de membrana A1 dependiente de ATP; SR-B1 = Receptor pepenador clase B1; LDLR = Receptor de LDL; LCAT = Lecitin colesterol acil transferasa; LPL= Lipasa lipoproteica; CETP = Proteína de Transferencia de Ésteres de colesterol; PLTP = Proteína de transferencia de fosfolípidos; LH = Lipasa hepática; TG = Triglicéridos; EC = Ésteres de colesterol; CL= Colesterol libre; FL= Fosfolípidos.

Fuente: Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G, High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21:13-27.

Las partículas HDL<sub>2</sub> ricas en colesterol esterificado interactúan con las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TGRL), principalmente VLDL, a través de la CETP y la LPL. En este proceso un mol de colesterol esterificado de las HDL es intercambiado por uno de triglicéridos de las VLDL, dando lugar a lipoproteínas enriquecidas en triglicéridos y con concentraciones bajas de ésteres de colesterol, las cuales son hidrolizadas por la acción de la lipasa hepática que es regulada por la Apo A-II, dando lugar a la formación de partículas HDL<sub>3</sub><sup>8</sup> (Figura 2.4).

El colesterol libre y esterificado de las HDL puede ser catabolizado mediante la captación selectiva por el hígado vía receptor pepenador clase B1 (SR-B1), o bien, el colesterol esterificado puede ser transferido a las lipoproteínas que contienen Apo B-100 a través de la CETP y entonces ser captado por el hígado vía receptor LDL. En el hepatocito el colesterol esterificado es hidrolizado a colesterol libre, el cual es excretado directamente en la bilis o convertido a ácidos biliares que también son excretados en la bilis.<sup>12</sup>

La conversión de HDL<sub>2</sub> en HDL<sub>3</sub> y viceversa libera Apo A-I pobre en lípidos. Una parte de la Apo A-I libre puede adquirir lípidos y empezar nuevamente el ciclo a través del eflujo de colesterol, otra parte experimenta filtración glomerular y es eliminada por las células tubulares renales mediante el receptor cubilina-megalina.<sup>12</sup>

### **3. LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD**

#### **3.1 Estructura, características y función**

Las lipoproteínas de baja densidad son partículas esféricas con diámetro de 21.8 a 27 nm, densidad entre 1.019 y 1.063 g/mL. Contienen aproximadamente el 50% de colesterol total, 25% de proteínas, 20% de fosfolípidos y 5% de triglicéridos.<sup>13</sup> Es la lipoproteína con mayor contenido de colesterol y contiene cantidades considerables de tocoferoles, carotenoides y otros antioxidantes lipofílicos. Su superficie está compuesta por colesterol libre y fosfolípidos (predominantemente fosfatidilcolina y esfingomielina). Del contenido total de ácidos grasos, aproximadamente el 50 % son poliinsaturados, principalmente ácido linoleico.<sup>14</sup>

En la capa externa de la molécula se encuentra una sola apoproteína (Apolipoproteína B-100). La Apo B-100 es una proteína constituida por 4536 aminoácidos y un peso de 512 kDa, la cual juega un papel importante como ligando para las LDL y su receptor.<sup>15</sup>

Las LDL son partículas heterogéneas con respecto a tamaño, densidad y composición, punto isoeléctrico, carga eléctrica, propiedades hidrodinámicas e inmunorreactividad.<sup>16</sup> Esta heterogeneidad ha sido identificada con el uso de ultracentrifugación analítica, por gradiente de densidad, electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida, entre otros métodos.<sup>13</sup> La Tabla 3.1 muestra las subfracciones principales en las que se dividen las LDL, de acuerdo a la clasificación de Musliner y Krauss.<sup>17</sup>

La función fisiológica de la lipoproteína de baja densidad (LDL) es transportar aproximadamente el 65% al 70% del colesterol hacia los tejidos periféricos<sup>18</sup> y su vida media es de 2.5 a 3.5 días<sup>10</sup>.

**Tabla 3.1 Clasificación de las partículas LDL por Musliner y Krauss<sup>17</sup>**

<b>Subfracción</b>	<b>Densidad (g/mL)</b>	<b>Tamaño de la partícula (nm)</b>
LDL I	1.025 - 1.035	26 – 27
LDL II	1.032 - 1.038	25.5 – 26
LDL III A	1.038 - 1.050	24.7 - 25.6
LDL III B	1.038 - 1.050	24.2 - 24.6
LDL IV A	1.048 - 1.065	23.3 – 24.2
LDL IV B	1.048 - 1.065	21.8 – 23.2

### **3.2 Receptor de LDL**

El receptor de la LDL (LDLR) es una glicoproteína de superficie sintetizada en el retículo endoplásmico y procesada en el aparato de Golgi. El receptor tiene un dominio con residuos cargados negativamente que interactúa con los residuos cargados positivamente de la Apo B-100.<sup>14</sup> El ligando fisiológico más importante para el receptor es la Apo B-100; sin embargo también se une con gran afinidad a la Apo E.<sup>19</sup>

### **3.3 Metabolismo de las LDL**

#### **3.3a Biosíntesis**

Los triglicéridos de las VLDL, sintetizadas en el hígado, son hidrolizados por lipasa lipoproteica, produciendo una reducción del contenido de triglicéridos, Apo C y fosfolípidos. La partícula remanente resultante (IDL) puede ser captada por el hígado mediante la Apo E o ser subsecuentemente hidrolizada por la lipasa hepática, reduciendo su tamaño y dando lugar a la formación de lipoproteínas de baja densidad predominantemente enriquecidas en ésteres de colesterol.<sup>14</sup>

#### **3.3b Catabolismo**

Las LDL son depuradas del plasma por el hígado (75%) y tejidos extrahepáticos (25%). En su forma madura el LDLR es exportado a la membrana plasmática, donde se forman unos sacos cubiertos por clatrina. Las LDL se unen al receptor y las proteínas de clatrina promueven su endocitosis. Dentro de la célula, se disocia la clatrina dando lugar a la formación del endosoma, cuyo contenido ácido provoca la disociación de las LDL y su receptor. El LDLR es reciclado hacia la superficie celular. Los endosomas se fusionan con los lisosomas y la Apo B es hidrolizada a aminoácidos; los ésteres de colesterol son hidrolizados a colesterol libre para la síntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas, vitaminas liposolubles o como componente de las membranas celulares. El exceso de colesterol libre activa la enzima acil colesterol aciltransferasa (ACAT) responsable de su reesterificación, inhibe la actividad de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa, enzima clave en la

biosíntesis de colesterol e inhibe la síntesis de nuevos receptores hepáticos para LDL.<sup>14</sup> Del 35% al 50% de las LDL son depuradas diariamente en personas sanas.<sup>14</sup> Un descenso en el número o actividad de los receptores de estas lipoproteínas conduce a una elevación de colesterol en plasma.

### **3.4 Participación de la LDL en la aterogénesis**

#### 3.4a Proceso de aterogénesis y factores de riesgo

La aterosclerosis se considera una enfermedad crónico-inflamatoria y multifactorial que resulta de interacciones complejas entre ciertos factores genéticos tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemias y factores ambientales como tabaquismo, obesidad y sedentarismo, además de los radicales libres que se originan durante estrés oxidativo. Uno de los principales agentes implicados en su etiología es la acumulación de depósitos de colesterol en macrófagos de la pared arterial, particularmente del colesterol LDL.<sup>20</sup>

Normalmente, las LDL migran a través de la barrera endotelial para llevar a cabo el transporte del colesterol del torrente sanguíneo hacia los tejidos periféricos. El exceso de LDL circulantes, la presencia de LDL pequeñas y densas, el mayor tiempo de residencia de estas partículas en el compartimiento intravascular, así como su mayor penetración al espacio subendotelial, favorece la modificación química (oxidación, glicación y agregación)<sup>21</sup> de sus componentes lipídicos y proteico. La susceptibilidad a la oxidación de las LDL depende de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, de los antioxidantes presentes en la partícula, del grado de glicosilación y de la

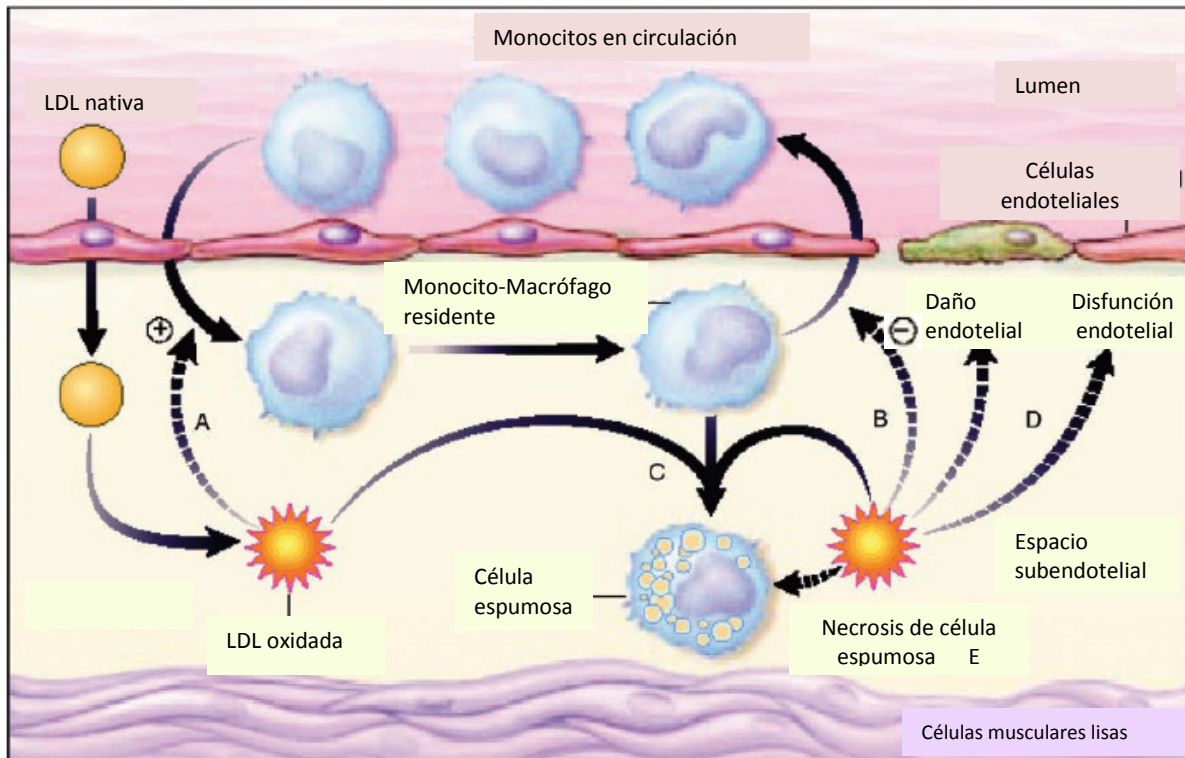
presencia en el medio de radicales libres y metales. In vivo, se generan grandes cantidades de radicales libres, durante diversos procesos del metabolismo celular. Cuando los sistemas oxidante-antioxidante del organismo no se encuentran en equilibrio, se genera estrés oxidativo capaz de producir lipoperoxidación. Inicialmente los antioxidantes lipofílicos evitan la modificación de la lipoproteína; sin embargo, al consumirse los antioxidantes, se oxidan los ácidos grasos poliinsaturados formando hidroperóxidos reactivos. Una vez establecida, la lipoperoxidación se autocataliza y da lugar a una reacción en cadena, modificando covalentemente los residuos de aminoácidos de la Apo B-100 y provocando así una disminución progresiva de la carga positiva de la partícula. Los nuevos epítopes ya no son reconocidos por el LDLR y la LDL oxidada es captada con avidez y en mayor cantidad por el receptor pepenador de los macrófagos.<sup>22,23</sup> A diferencia del LDLR, los receptores pepenadores carecen de capacidad de regularse a la baja, en consecuencia, la captación de grandes cantidades de LDL modificadas transforma a los macrófagos en células espumosas que al acumularse forman la llamada estría grasa, considerada la lesión inicial de la aterosclerosis.<sup>24</sup>

La oxidación confiere citotoxicidad y aterogenicidad a la partícula de LDL. Las LDL oxidadas activan al endotelio vascular originando la expresión de moléculas de adhesión y citocinas. Bajo este estímulo, más monocitos pueden infiltrar la íntima y diferenciarse a macrófagos.<sup>24</sup> Además se produce una serie de cambios funcionales a nivel del vaso, se pierde la regulación del tono vascular mediada por óxido nítrico, produciéndose disfunción endotelial.<sup>25</sup>



Finalmente las células musculares lisas pueden proliferar sobre la lesión aterosclerótica y formar la placa ateromatosa.

**Figura 3.4 Proceso de aterogénesis**



Fuente: Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84:1381-1478.

### 3.5 Susceptibilidad a la oxidación de la LDL

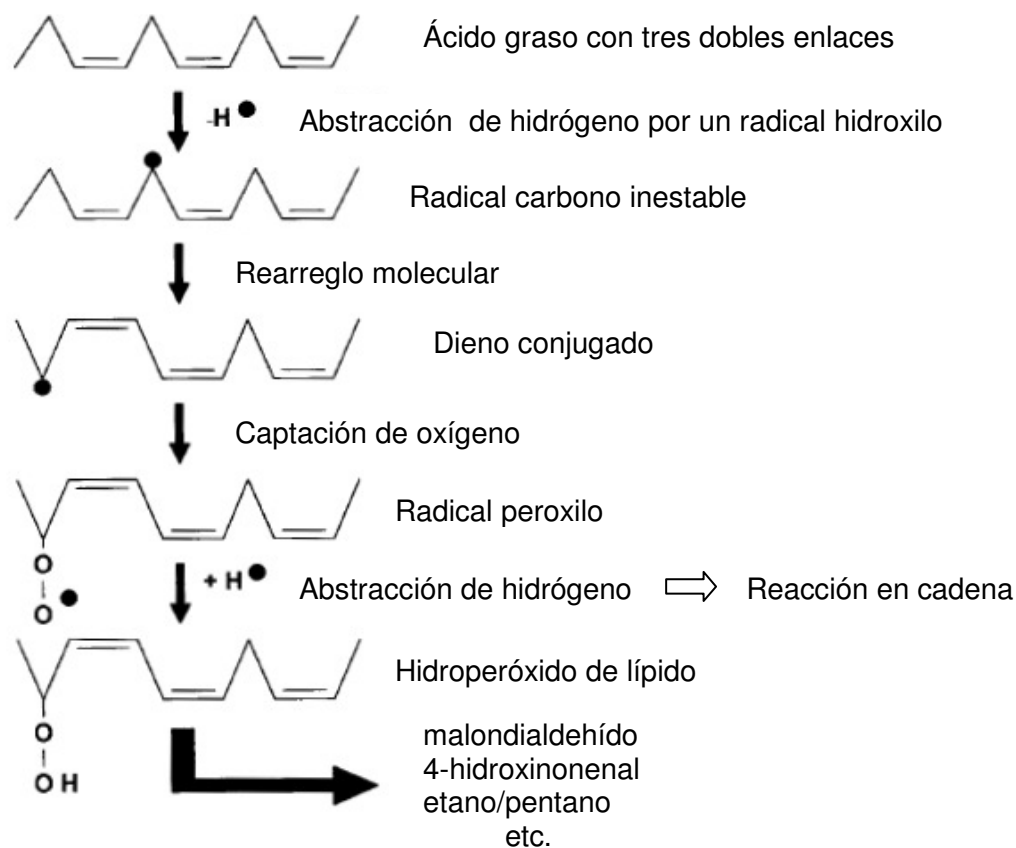
#### 3.5a LDL oxidada

En circulación, las LDL son protegidas de la oxidación por la presencia de antioxidantes como vitamina E y carotenoides. En contraste, en el espacio subendotelial existe un ambiente menos protector, por lo que las lipoproteínas son significativamente más vulnerables a la oxidación.<sup>21</sup> La susceptibilidad a la oxidación de los componentes de la LDL (colesterol, ácidos grasos, antioxidantes y Apo B) varía de uno a otro y depende no sólo de los oxidantes

presentes (radical superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radical hidroxilo y peroxinitrito) sino además de la concentración, duración y condiciones de exposición.<sup>26</sup> Una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) confiere mayor susceptibilidad a la oxidación, mientras que una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) protege contra la oxidación.<sup>27</sup> Cuando la Apo B-100 no ha sido modificada la lipoproteína se denomina LDL mínimamente oxidada y puede contener pequeñas cantidades de antioxidantes. La lipoperoxidación es iniciada por el ataque de los radicales libres a las dobles ligaduras de los PUFAs; al perder un hidrógeno, ocurre un reordenamiento molecular y se originan dienos conjugados, los cuales reaccionan rápidamente con oxígeno molecular para formar lípidos hidroperoxidados.<sup>27</sup>

El proceso de ataque y daño oxidativo que sufren los lípidos insaturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres, iniciadas por la abstracción de un átomo de hidrógeno del lípido insaturado por el radical libre peroxilo y seguido por una secuencia de reacciones propagadoras. Los lípidos hidroperoxidados se fragmentan a aldehídos de cadena corta, como el malondialdehído<sup>27</sup> (Figura 3.5).

**Figura 3.5 Secuencia de reacciones básica de peroxidación de lípidos**

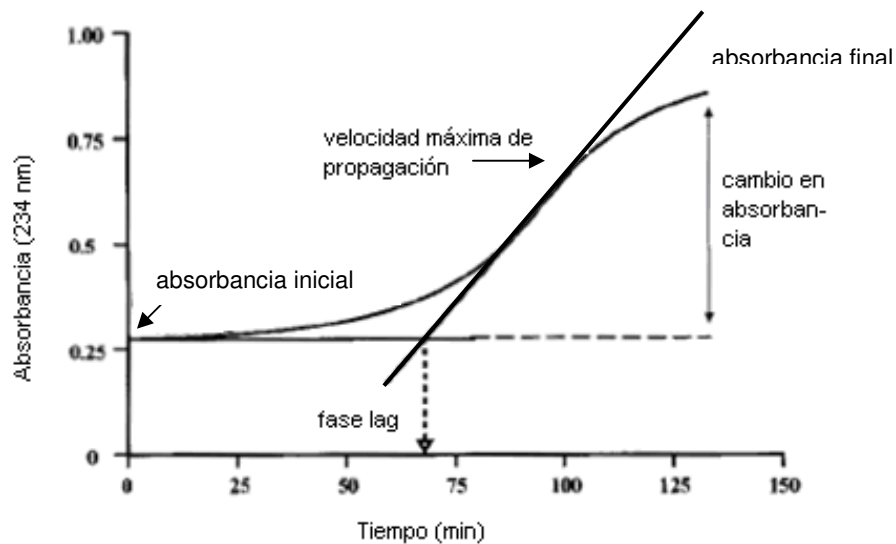


Fuente: Young S, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans. 2001; 29:358-362.

En el laboratorio, la cinética de oxidación se puede medir mediante el monitoreo de la formación de dienos conjugados<sup>28</sup> y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.<sup>29</sup> La Figura 3.5a se muestra una gráfica típica de absorción a 234 nm producida durante la oxidación de LDL aislada incubada con cobre. La fase de latencia es el tiempo transcurrido desde la adición del cobre hasta el inicio de la fase de propagación. Su duración está determinada por la presencia de los antioxidantes endógenos presentes en la LDL. Una vez consumidos los antioxidantes de la LDL, inicia la fase de propagación, mediante la formación de dienos conjugados.

La mayoría de los estudios clínicos han mostrado mayor susceptibilidad a la oxidación de la LDL en condiciones como la hipercolesterolemia,<sup>30</sup> enfermedad arterial coronaria,<sup>30</sup> hipertensión arterial,<sup>31</sup> tabaquismo,<sup>32</sup> uremia<sup>33</sup> y disfunción endotelial.<sup>20</sup>

**Figura 3.5a Perfil de absorción típico a 234 nm producido durante la oxidación de LDL por cobre**



Fuente: Young S, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochemical Society Transactions 2001; 29:358-362.

### 3.5b Efectos proaterogénicos de la LDL oxidada.

Las LDL oxidadas (OxLDL) promueven la aterogénesis: inducen la expresión de moléculas de adhesión, son quimiotácticas para linfocitos T y monocitos, favorecen la expresión del factor de estimulación de formación de colonias de macrófagos, los cuales captan rápidamente a las OxLDL,<sup>27</sup> dando lugar a la acumulación de lípidos en la arteria; inhiben la expresión de la sintasa endotelial de óxido nítrico, disminuyendo su biodisponibilidad y provocando disfunción endotelial, estimulan la activación plaquetaria y la proliferación de células del músculo liso.<sup>34</sup>

### **3.6 Control del proceso de oxidación**

#### **3.6a Antioxidantes**

Como ya se mencionó, la capacidad para resistir la modificación oxidativa depende, entre otros factores, de la cantidad de antioxidantes presentes en la LDL. Los antioxidantes asociados a las lipoproteínas incluyen la vitamina E (VitE), carotenoides y ubiquinol-10.<sup>34</sup> La VitE se encuentra estructuralmente incorporada en la LDL y actúa como un antioxidante intrínseco que impide la transferencia de electrones involucrada en el inicio y propagación de la lipoperoxidación, previniendo así la modificación de las LDL, además tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células musculares lisas.<sup>34</sup>

En circulación se encuentra, entre otros antioxidantes, la albúmina, bilirrubina, vitamina C. La vitamina C es capaz de reaccionar y reducir las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (hidroperóxido, superóxido y radical hidroxilo, peroxinitrito, ozono, dióxido de nitrógeno)<sup>20</sup> y de regenerar a la vitamina E. El selenio es el cofactor necesario para la síntesis y actividad de la glutatión peroxidasa, enzima responsable de la reducción de hidroperóxidos.<sup>35</sup>

#### **3.6b Papel ateroprotector de las HDL**

Desde hace muchos años se conoce la relación inversa entre las concentraciones del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), el riesgo de aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular.<sup>36,37</sup> El transporte del exceso de colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado para su excreción o reciclamiento, se denomina transporte reverso de colesterol y es considerado como la principal función antiaterogénica de las HDL.<sup>38,39</sup> Sin embargo, otras

propiedades de las HDL, como la antioxidante, antiproliferativa, antitrombótica y antiinflamatoria, también pueden contribuir a su acción ateroprotectora.<sup>40,41,42</sup>

Se considera que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad contribuye al inicio y progresión de la aterosclerosis.<sup>43</sup> Las HDL protegen los lípidos y proteínas de las LDL contra la oxidación.<sup>43</sup> Las propiedades antioxidantes de las HDL se atribuyen principalmente a la paraoxonasa 1 (PON1),<sup>44</sup> enzima que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos oxidados activos y destruye lipoperóxidos.<sup>45,46</sup> PON1 también inhibe la oxidación de las HDL, lo cual es relevante porque las HDL oxidadas pierden sus características ateroprotectoras.<sup>47</sup>

#### **4. ENZIMA PARAOXONASA 1**

##### **4.1 Características, genética y efecto antiaterogénico de la PON1**

La PON1 es una proteína de 354 aminoácidos con una masa molecular de 43 kDa,<sup>48</sup> sintetizada primariamente en el hígado de donde una porción es secretada al plasma. En la circulación se encuentra asociada casi exclusivamente a las partículas HDL.<sup>49</sup>

La actividad PON1 está regulada tanto por factores genéticos como ambientales. El gen de PON1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 entre q21.3 y q22.1.<sup>50,51</sup> La influencia genética está dada por varios polimorfismos en las regiones codificadora y promotora del gen de PON1 (C-107T, L55M, Q192R). Los factores ambientales con capacidad para modificar la actividad PON1 incluyen el consumo de tabaco, alcohol y ácidos grasos.<sup>52</sup>

Las concentraciones en plasma de colesterol total y C-HDL también contribuyen en la modulación de PON1.<sup>53</sup> El uso de anticonceptivos orales<sup>53</sup> y la terapia de reemplazo hormonal<sup>54</sup> aumentan la actividad PON1. Los estudios sobre el efecto del tratamiento regulador de lípidos, usando estatinas o fibratos sobre la actividad PON1 han dado resultados inconsistentes. Sin embargo, dos estudios han mostrado que la simvastatina, en dosis de 20 mg diarios, aumenta la actividad<sup>55,56</sup> y la concentración de PON1<sup>56</sup> en pacientes tratados con el fármaco por periodos de dos a cuatro meses.

#### **4.1 Actividad paraoxonasa y aterosclerosis**

La actividad funcional de PON1 se puede medir mediante su capacidad para hidrolizar substratos exógenos como paraoxón (actividad paraoxonasa) o el fenilacetato (actividad arilesterasa).

Se ha sugerido que la PON1 se relaciona con el riesgo de enfermedad coronaria (EAC).<sup>57,58</sup> Algunos estudios han mostrado que el polimorfismo en la posición 192 es factor de riesgo para EAC, pero los resultados no han sido consistentes.<sup>59,60,61,62,63</sup> Por otra parte, en comparación con sujetos sanos, la actividad PON1 se ha encontrado significativamente baja en pacientes que han tenido infarto agudo del miocardio.<sup>64,65</sup> Valores bajos de la actividad de la enzima también se han observado en enfermedades con aterogénesis acelerada, tales como la diabetes mellitus<sup>66</sup> y la hipercolesterolemia familiar.<sup>67</sup> Además, un estudio prospectivo con 15 años de seguimiento demostró que la actividad paraoxonasa baja (pero no la actividad arilesterasa ni la concentración de PON1), fue un factor de riesgo independiente para eventos

coronarios en hombres con EAC previa.<sup>68</sup> En conjunto, estos estudios sugieren que la actividad PON1 es más importante como factor de riesgo para EAC que los polimorfismos genéticos.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los inhibidores de la 3-hidroxi-3metilglutaril coenzima A reductasa, comúnmente denominados estatinas, son potentes reductores de las concentraciones de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL).<sup>69</sup> El tratamiento con estatinas reduce significativamente la incidencia de eventos coronarios,<sup>70,71</sup> particularmente en las poblaciones de pacientes que han logrado valores C-LDL inferiores a la concentración meta de 100mg/dL.<sup>72</sup> Sin embargo, en un estudio reciente en el que los pacientes alcanzaron valores de C-LDL menor a 70 mg/dL, los pacientes con C-HDL bajo tuvieron significativamente más eventos cardiovasculares que aquellos con valores normales de C-HDL.<sup>73</sup> Es posible que estos pacientes además de C-HDL bajo tengan partículas de HDL funcionalmente anormales.

## JUSTIFICACIÓN

Aunque se ha informado que la simvastatina incrementa la actividad PON1 en pacientes con hipercolesterolemia familiar<sup>55</sup> y en pacientes coronarios no diabéticos,<sup>56</sup> no existen estudios que hayan investigado la actividad PON1 en pacientes con EAC tratados con estatina, que han alcanzado el valor meta de C-LDL (<100mg/dL), pero que continúan con C-HDL bajo y TG altos.

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo, fue estudiar la funcionalidad de las HDL a través de la medición de la actividad de PON1 y la susceptibilidad a la oxidación de las LDL en pacientes con EAC tratados con estatina y C-LDL en valores meta (<100mg/dL), pero con C-HDL y TG anormales, así como sus características clínicas y los valores de otras mediciones bioquímicas. Con fines comparativos, también se estudió un grupo de pacientes coronarios con valores de C-LDL en meta y C-HDL y TG normales en respuesta a tratamiento con estatinas, así como un grupo de hombres aparentemente sanos, que no recibían ningún tratamiento farmacológico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Población

Los pacientes fueron seleccionados de la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. Se eligieron pacientes del sexo masculino, con diagnóstico de EAC estable, definida por historia personal de infarto al miocardio, angioplastia o cirugía de revascularización. Todos los pacientes recibían tratamiento con estatina y tenían C-LDL en valores meta ( $<100$  mg/dL). De acuerdo a los valores de TG y de C-HDL, los pacientes se dividieron en dos grupos. El primero, grupo de hipoalfalipoproteinemia combinada con hipertrigliceridemia (HA+HTG), incluyó 34 pacientes con TG entre 151 y 500 mg/dL y C-HDL menor a 40 mg/dL. El grupo de normolipidémicos (NLP) lo conformaron 35 pacientes con C-LDL en meta y valores normales de triglicéridos ( $\leq 150$  mg/dL) y de C-HDL ( $\geq 40$  mg/dL). No se incluyeron pacientes con eventos cardiovasculares agudos en los tres meses previos, insuficiencia cardiaca congestiva, índice de masa corporal (IMC)  $>35$  kg/m<sup>2</sup>, diabetes mellitus descontrolada, disfunción tiroidea, miopatía, ni aquellos con enfermedad renal o hepática. Tampoco se incluyeron pacientes tratados con fibratos, niacina o resinas. El grupo control de sanos se formó con 20 hombres seleccionados de los donadores que acuden al banco de sangre de nuestro Instituto, con un índice de masa corporal (IMC) inferior a 30 Kg/m<sup>2</sup>, sin dislipidemia ni evidencia clínica de enfermedades agudas o crónicas, y que no recibían medicamentos con efectos en el metabolismo lipoproteico. El protocolo fue aprobado por el comité de bioética y

se incluyeron únicamente los pacientes y donadores que, después de conocer las características del estudio, aceptaron firmar la forma de consentimiento informado.

### **Métodos clínicos y de laboratorio**

A todos los participantes se les aplicó un cuestionario para obtener información familiar y personal sobre factores de riesgo cardiovascular, actividad física, consumo de alcohol y tabaco. En los pacientes, se registró el tipo y dosis de estatina así como las terapias concomitantes (antihipertensivos, beta-bloqueadores, inhibidores de la ECA, diuréticos, aspirina y otros antiagregantes plaquetarios) al momento del estudio. Se determinó el peso, la talla, la circunferencia de cintura, la frecuencia cardiaca y la presión arterial. El IMC se calculó con la fórmula: peso (Kg) / talla (m)<sup>2</sup>. El sobrepeso se definió como un IMC de 25-29.9 Kg/m<sup>2</sup>, la obesidad como IMC  $\geq$  30 Kg/m<sup>2</sup> y la adiposidad central cuando circunferencia de cintura fue  $\geq$  90 cm.<sup>74</sup> En ayuno de 12 horas y después de reposo durante 20 minutos en posición sedente, se colectaron 15 mL de sangre venosa en tubos con EDTA y 10 mL en tubos sin anticoagulante. Después de centrifugar, el plasma y el suero fueron separados en alícuotas, a las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU/mL, Benzamidina 1 mM). Todas las alícuotas se almacenaron a -70 °C para su análisis posterior. Los lípidos y la glucosa se midieron en muestras frescas.

## **Análisis de laboratorio**

Las determinaciones de colesterol total, triglicéridos y glucosa en plasma, se realizaron en un autoanalizador Hitachi 902 (Boheringer Mannheim), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, USA). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania), en el cual no es necesario separar previamente las HDL de las otras lipoproteínas.<sup>75</sup> El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se estimó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long [C-LDL= CT-(C-HDL + TG \* 0.16)].<sup>76</sup> Las concentraciones de apoproteína B (Apo B) y la apoproteína A-I (Apo A-I), se determinaron por inmunonefelometría en el nefelómetro BN Pro Spec nephelometer (Dade Behring Marburg GmbH, Ge.). En nuestro laboratorio, la precisión y exactitud de las determinaciones de lípidos y apolipoproteínas son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, GA (CDC, por sus siglas en inglés). Los coeficientes de variación ínter ensayo fueron inferiores al 6% para todos los analitos. La LDL se aisló por ultracentrifugación a 100,000 r.p.m. (355,206xg) en la ultracentrífuga TL100 (Beckman). Brevemente, se ajustó la densidad del suero a 1.063 g/mL con bromuro de potasio sólido y se ultracentrifugó durante 4 horas. Terminada la corrida, se mezclaron 200 µL del sobrenadante con 676 µL de solución salina isotónica (SSI) y se continuó la ultracentrifugación durante 3 horas. Se recuperó el infranadante y se lavó dos veces con SSI por ultracentrifugación durante 2 horas. En la preparación de LDL se cuantificó la concentración de proteína por el método

de Lowry et al.<sup>77</sup> Con objeto de disminuir el tiempo entre el aislamiento y el ensayo para medir la susceptibilidad a la oxidación, la preparación no se dializó.<sup>78</sup> La susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de la LDL se determinó por el método descrito por Esterbauer<sup>79</sup> con pequeñas modificaciones.<sup>80</sup> La LDL aislada se diluyó en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 (PBS), 0.16 M NaCl saturado con oxígeno, a una concentración final de 50 µg de proteína/mL. La oxidación de la lipoproteína se inició mediante la adición de una solución recién preparada de CuSO<sub>4</sub> a una concentración final de 5 µM, a 37°C. La cinética de oxidación se monitoreó mediante lecturas espectrofotométricas a 234 nm, para seguir la formación de dienos conjugados.<sup>79,81</sup> Se registraron lecturas de densidad óptica (DO) cada 2 minutos, durante 200 minutos. Con estos datos se construyó la curva de la cinética de oxidación y a partir de ella se calculó la fase de latencia (FL). La FL, definida como el intervalo entre la adición del sulfato de cobre y el inicio de oxidación rápida, se determinó por la intersección de la recta de la línea basal con la tangente de la fase de oxidación.<sup>79,81,82</sup> En nuestro laboratorio, los coeficientes de variación intra e interensayo para la FL fueron 2.94% y 5.77%, respectivamente. Los resultados se expresaron en minutos. Se eligió la FL porque es una medición reproducible y un marcador aceptable de la oxidabilidad de LDL.<sup>79</sup>

Las subclases de LDL se determinaron por el método de Krauss y Burke modificado. Brevemente, se corrió una electroforesis en gradiente del 2 al 14% de poliacrilamida, en condiciones no desnaturizantes y no reductoras. La electroforesis se realizó durante 20 horas a 150 V. La solución amortiguadora de

corrida fue 0.09 M Tris, 0.08 M de ácido bórico y 0.003 M de EDTA•H<sub>2</sub>O, pH 8.3. Después de la separación, el gel se fijó durante 15 a 20 minutos en metanol/ácido acético/agua (45:10:45% v/v). La tinción se realizó con azul de Coomassie (0.1% p/v) en metanol/ácido acético/agua (45:10:45 % v/v). El gel se decoloró en metanol/ácido acético/agua (45:10:45% v/v) con agitación constante, hasta que los blancos quedaron transparentes. Los geles se hidrataron en agua glicerinada al 1% y una vez secos se analizaron con un densitómetro (modelo 620 de Bio-Rad Laboratories Ltd., U.K.) usando el programa Molecular Analyst, de Bio-Rad v. 1.1. Para la construcción de la gráfica de calibración se utilizaron como estándares una cama de látex (38 nm) y de proteínas de alto peso molecular (Pharmacia): tiroglobulina (17 nm), apoferritina (12.2 nm) y catalasa (6.2 nm). Los resultados se expresaron en nanómetros. En nuestro laboratorio el coeficiente de variación interensayo para este método fue de 0.2 y 1.33% para los controles bajo y alto, respectivamente. La actividad de paraoxonasa en suero se determinó fotométricamente (Beckman DU650, Fullerton, CA) empleando paraoxón (Sigma-Aldrich D9286) como sustrato.<sup>83</sup> La velocidad de generación de para-nitrofenol se determinó a 412 nm en una dilución final de suero de 1:82 en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se compone de paraoxón 0.98 mM, glicina 48.8 mM, cloruro de calcio 0.98 mM, cloruro de sodio 0.98 M, a 25 °C. Se utilizó un coeficiente de extinción (412 nm, pH=10) de 18920 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para calcular las unidades de actividad paraoxonasa, las cuales se expresan como la cantidad de para-nitrofenol formado en nanomoles por minuto por mililitro de suero. Los ensayos de paraoxonasa se realizaron en duplicado y se calculó el promedio de



las determinaciones de la actividad enzimática para cada muestra. En cada determinación se incluyeron mezclas de sueros alto y bajo, independientemente uno del otro, tomados de varios voluntarios de actividad conocida para asegurar la calidad de cada ensayo. En nuestro laboratorio los coeficientes de variación intra e inter ensayo para este método fueron  $< 3\%$  y  $< 7.6\%$ , respectivamente.

### **Análisis estadístico**

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS 13 para Windows (SPSS, Chicago IL). Las características clínicas y bioquímicas de los pacientes se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar (D.E.); la frecuencia de factores de riesgo cardiovascular, de eventos cardiovasculares y de procedimientos previos, así como el empleo de medicamentos como porcentaje. Para comparar valores medios se utilizó la prueba paramétrica ANOVA y para comparar frecuencias se usó la prueba de  $\chi^2$ . Las variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para su análisis. Para conocer la correlación de las variables clínicas y bioquímicas con la fase de latencia, el tamaño de LDL y la actividad paraoxonasa, se utilizó un análisis de correlación de Pearson. La independencia de estas asociaciones se determinó empleando un análisis de regresión lineal múltiple. Todos los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los valores medios de las características antropométricas, tensión arterial y glucosa en los tres grupos estudiados. El peso, el índice de masa corporal (IMC), la circunferencia de cintura y las concentraciones de glucosa, fueron más altas en el grupo de pacientes con HA+HTG. Las diferencias tuvieron significado estadístico al comparar con los pacientes NLP (peso e IMC) o con los controles sanos (circunferencia de cintura y glucosa). Aunque sin diferencia estadísticamente significativa, las tensiones arteriales sistólica y diastólica también fueron más altas en el grupo HA+HTG.

**Tabla 1. Características antropométricas, tensión arterial y glucosa en los tres grupos de estudio**

	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
Edad (años)	55.6 ± 11.8	58.1 ± 11.8	52.5 ± 8.5	0.209
Peso (Kg) <sup>†</sup>	72.9 ± 16.7 <sup>b</sup>	69.5 ± 12.5	69.9 ± 6.8	0.021
Talla (m) <sup>†</sup>	1.66 ± 0.67	1.64 ± 0.06	1.65 ± 0.06	0.286
Índice de masa corporal (Kg/m <sup>2</sup> ) <sup>†</sup>	28.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	25.7 ± 3.6	25.6 ± 2.5	0.028
Circunferencia cintura (cm) <sup>†</sup>	95.1 ± 11.4 <sup>a</sup>	90.4 ± 9.8	88.2 ± 6.6	0.034
Tensión arterial sistólica (mmHg) <sup>†</sup>	125.7 ± 24.1	123.5 ± 27.2	116.1 ± 15.1	0.393
Tensión arterial diastólica (mmHg) <sup>†</sup>	79.1 ± 19.4	75.3 ± 12.3	74.2 ± 10.2	0.590
Glucosa (mg/dL)	96.9 ± 13.5 <sup>a</sup>	93.5 ± 10.3	86.6 ± 5.9	0.005

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidémicos. Valores expresan media ± desviación estándar.

ANOVA (<sup>†</sup>Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP.

La obesidad y la adiposidad central se observaron con más frecuencia en el grupo HA+HTG, pero sólo para la obesidad la diferencia alcanzó significado estadístico (Tabla 2). Puesto que los valores bajos de C-HDL y los altos de triglicéridos son las anomalías lipoproteicas que caracterizan al síndrome metabólico, no sorprende que este síndrome estuviera presente con una frecuencia significativamente más alta en el grupo HA+HTG. No se encontraron diferencias con significado estadístico al analizar las frecuencias de diabetes, hipertensión, hábito de fumar y sedentarismo en los dos grupos de pacientes coronarios.

**Tabla 2. Presencia de factores de riesgo coronario en los 3 grupos estudiados**

	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
Obesidad*	11 (32.4) <sup>a,b</sup>	2 (5.7) <sup>a</sup>	0 (0.0)	0.006
Adiposidad central*	22 (64.7)	15 (42.9)	9 (45.0)	0.153
Diabetes mellitus*	6 (17.6)	10 (28.6)	na	0.158
Hipertensión*	23 (67.6)	25 (71.4)	na	0.602
Tabaquismo actual*	0 (0) <sup>a</sup>	1 (3.0) <sup>a</sup>	3 (15.0)	0.049
Sedentarismo*	11 (32.4)	13 (37.1)	5 (25)	0.375
Síndrome metabólico* †	31 (91) <sup>a,b</sup>	4 (11.4) <sup>a</sup>	0 (0.0)	<0.001

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidémicos; na= no aplica.

Obesidad = IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ; adiposidad central = cintura  $\geq 90 \text{ cm}$ ; hipertensión arterial = TAS  $\geq 140$ , TAD  $\geq 90$ , o uso de fármacos antihipertensivos; tabaquismo = 1 o más cigarrillos por día; sedentarismo = ningún tipo de actividad física en su tiempo libre.

\*Valores expresan número de casos (porcentaje total del grupo estudiado).

<sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP. (Determinada por la prueba de Chi<sup>2</sup>)

† Definido con el criterio de ATP III<sup>37</sup> (alteraciones en la tolerancia a glucosa o DM tipo 2, hipertensión, dislipidemia, obesidad abdominal), excepto para el punto de corte de 90 cm para cintura<sup>74</sup>

En los pacientes estudiados también se analizó la historia de su enfermedad cardiovascular, incluyendo los procedimientos de intervención que habían tenido en

el pasado. En la Tabla 3 se puede observar que más del 90% de los pacientes en los dos grupos había sufrido infarto al miocardio, en aproximadamente 50% se había practicado el procedimiento de angioplastia para reducir la obstrucción de su arteria coronaria lesionada y en alrededor de una cuarta parte había sido necesaria la cirugía para colocar puentes vasculares en los sitios de las obstrucciones coronarias. Las frecuencias de infarto y de los procedimientos de intervención fueron similares en los dos grupos.

**Tabla 3. Eventos cardiovasculares o procedimientos de intervención previos en los dos grupos de pacientes coronarios.**

	Pacientes coronarios		p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)	
Infarto al miocardio*	31 (91.2)	33 (94.3)	0.673
Angioplastia*	18 (52.9)	17 (48.6)	0.811
Cirugía de revascularización*	8 (23.5)	10 (28.6)	0.785

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidémicos.

\*Valores expresan número de casos (porcentaje total del grupo estudiado).

Valor de p determinado por la prueba de Chi<sup>2</sup>

Al momento del estudio, los pacientes estaban en tratamientos con varios fármacos que se muestran en la Tabla 4. Por diseño del estudio, todos los pacientes, pero ningún sujeto control sano, recibían alguna estatina como terapia reguladora de lípidos. El fármaco utilizado con más frecuencia fue la simvastatina (49%); proporciones menores de pacientes recibían atorvastatina (23%), rosuvastatina (21%) y pravastatina (6%). Al comparar los dos grupos, la proporción de pacientes tratados con atorvastatina fue más alta en el grupo NLP (34%) que en el grupo

HA+HTG (17%), con diferencia significativa marginal ( $p=0.05$ ). No se encontraron diferencias con significado estadístico en las dosis utilizadas de las diferentes estatinas. Tampoco se identificaron diferencias en las frecuencias de utilización de otros fármacos anti-isquémicas o antihipertensivas (Tabla 4).

**Tabla 4. Tratamiento farmacológico utilizado por los pacientes coronarios al momento del estudio.**

	Pacientes coronarios		p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)	
Estatinas n (%)	34 (100)	35 (100)	0.489
$\beta$ -Bloqueadores n (%)	25 (73.5)	27 (77)	0.444
Inhibidores ECA n (%)	28 (82.4)	30 (85.7)	0.474
Diuréticos n (%)	6 (17.6)	10 (28.6)	0.215
Bloqueadores de canales de calcio n (%)	11 (32.4)	12 (34.3)	0.534
Aspirina n (%)	32 (94.1)	31 (88.6)	0.351

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidemicos; ECA= Enzima convertidora de angiotensina.

\*Valores expresan número de casos (porcentaje total del grupo estudiado); Valor de p determinado por la prueba de Chi<sup>2</sup>

Debido al efecto del tratamiento con estatinas, los valores de CT y C-LDL en los dos grupos de pacientes fueron significativamente más bajos que en el grupo de sujetos sanos (Tabla 5). Por diseño del estudio, los pacientes HA+HTG mostraron valores significativamente más bajos de C-HDL y más altos de triglicéridos que los pacientes NLP y los controles sanos (Tabla 5). Es importante destacar que en los lineamientos de tratamiento del NCEP, se recomienda que en los pacientes con valores bajos de C-HDL y/o altos de triglicéridos, se debe primero alcanzar la meta de C-LDL (<100mg/dL) y después la meta de C-no HDL (<130mg/dL). En ambos grupos de

pacientes coronarios de este estudio el C-no HDL se encontró en meta, pero fue significativamente más bajo en el grupo NLP de pacientes al comparar con el grupo HA+HTG. Igualmente, los índices CT/C-HDL y C-LDL/C-HDL se encontraron con valores más altos en el grupo HA+HTG en comparación con el grupo de pacientes NLP y el grupo control (Tabla 5).

**Tabla 5. Valores de lípidos y lipoproteínas de los sujetos estratificados por grupo**

	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
Colesterol (mg/dL)				
Total <sup>†</sup>	130.4 ± 22.5 <sup>a</sup>	129.4 ± 20.8 <sup>a</sup>	182.7 ± 33.4	<0.001
LDL <sup>†</sup>	65.1 ± 22.7 <sup>a</sup>	64.8 ± 18.7 <sup>a</sup>	107.5 ± 29.9	<0.001
HDL <sup>†</sup>	30.9 ± 4.3 <sup>a,b</sup>	48.3 ± 7.1 <sup>a</sup>	59.2 ± 17.6	<0.001
No-HDL <sup>†</sup>	99.5 ± 22.2 <sup>a,b</sup>	81.1 ± 19.5 <sup>a</sup>	123.5 ± 30.5	<0.001
Triglicéridos (mg/dL) <sup>†</sup>	214.5 ± 73.5 <sup>a,b</sup>	101.2 ± 23.6	99.6 ± 26.6	<0.001
Relación C-LDL /C-HDL <sup>†</sup>	2.1 ± 0.8 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	2 ± 0.7	<0.001
Relación CT/C-HDL <sup>†</sup>	4.3 ± 0.9 <sup>a,b</sup>	2.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.8	<0.001

HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidémicos.

Valores expresan media ± desviación estándar. ANOVA (<sup>†</sup>Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP.

Algunos estudios han sugerido que la cuantificación de las Apo A-I y Apo B pueden ser de más utilidad para valorar el pronóstico de enfermedad cardiovascular que las mediciones de colesterol de las LDL y las HDL. Las estatinas también disminuyen la Apo B circulante. Como resultado de esta acción de las estatinas, los valores de Apo

B fueron menores en los dos grupos de pacientes que en el grupo de hombres sanos, pero la diferencia fue significativa solo con el grupo NLP (Tabla 6). Las concentraciones de Apo A-I fueron significativamente menores en el grupo HA+HTG en comparación con los otros dos grupos. El valor alto de la relación de Apo B/Apo A-I también tiene utilidad en la predicción de eventos cardiovasculares (>0.7).<sup>84</sup> El grupo HA+HTG mostró el valor más alto de esta relación y la diferencia fue significativa con el grupo NLP que tuvo el valor más bajo.

**Tabla 6. Valores medios de apolipoproteína A-I y apolipoproteína B en plasma y relación Apo B/Apo A-I en los tres grupos de estudio**

	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
Apo B (mg/dL)	76.00 ± 19.00	66.20 ± 16.70 <sup>a</sup>	81.70 ± 16.70	0.006
Apo A-I (mg/dL) <sup>†</sup>	144.10 ± 18.00 <sup>ab</sup>	166.30 ± 23.30	166.50 ± 37.60	0.001
Relación Apo B/Apo A-I <sup>†</sup>	0.53 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.13	<0.001

Apo A-I, apolipoproteína A-I; Apo B, apolipoproteína B; HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidemicos.

Valores expresan media ± desviación estándar. ANOVA (<sup>†</sup>Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP.

Los cambios cualitativos de las LDL pueden ser identificados por la presencia de partículas de LDL pequeñas y densas. La relación C-LDL/Apo B se usa como un marcador subrogado de este tipo de partícula LDL. La Tabla 7 muestra la comparación de esta relación en los tres grupos. Se encontraron diferencias significativas, con los valores más bajos en los pacientes, particularmente en el grupo HA+HTG, sugiriendo la presencia de partículas de LDL pequeñas y densas. Un análisis similar de las HDL reveló que la relación C-HDL/Apo A-I fue

significativamente más baja en los dos grupos de pacientes, pero con mayor reducción en el grupo HA+HTG, indicando la presencia de partículas de HDL de menor tamaño (Tabla 7).

**Tabla 7. Relaciones C-LDL/apo B y C-HDL/apo A-I en pacientes y controles**

	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	p
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
C-LDL/Apo B	2.20 ± 0.48 <sup>ab</sup>	2.56 ± 0.46 <sup>a</sup>	3.45 ± 0.91	<0.001
C-HDL/Apo A-I	0.56 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.76 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.23	<0.001

Valores expresan media ± desviación estándar. ANOVA(debido a su distribución asimétrica las variables se transformaron logarítmicamente). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP.

El análisis de las características fisicoquímicas de las LDL confirmó la existencia de partículas de LDL de menor tamaño en los pacientes, pero la diferencia sólo fue significativa al comparar el grupo HA+HTG con el grupo control (Tabla 8). Se han descrito dos patrones de subclases de LDL,<sup>85</sup> el patrón A se caracteriza por el predominio de partículas de LDL > 25.5 nm, y el patrón B por la predominancia de LDL pequeñas ( $\leq$  25.5 nm). Treinta y tres por ciento de los pacientes HA+HTG tuvieron el patrón B de LDL, mientras que este patrón se observó en sólo 5.9% de los pacientes NLP y estuvo ausente en los sujetos sanos. En la Figura 4 se muestra un gel de poliacrilamida con algunos datos comparativos de muestras de los tres grupos estudiados. Por mencionar algunos ejemplos, el pozo 3, 4 y 6 representan el grupo NLP, control y HA+HTG respectivamente; el pozo 5 un estándar de proteínas de alto peso molecular y el pozo 7 una muestra de diámetro de LDL conocido para identificar la variabilidad de las determinaciones.



**Tabla 8. Tamaño, composición química, susceptibilidad a la oxidación de LDL y patrón B en los tres grupos estudiados**

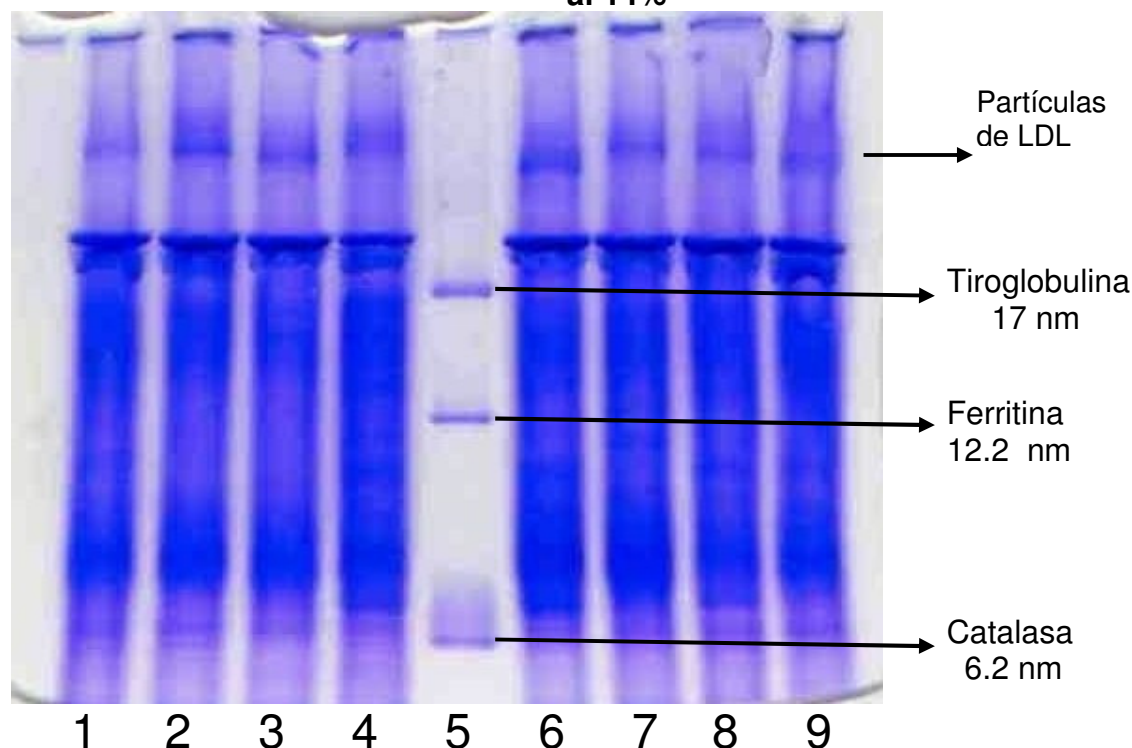
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)	CONTROLES (n = 20)	p
Tamaño de LDL (nm) †	25.98 ± 0.82 <sup>a</sup>	26.39 ± 0.47	26.8 ± 0.9	0.001
Proteínas en LDL (%) †	29.47 ± 5.24	31.86 ± 4.99	30.4 ± 11.0	0.512
Triglicéridos en LDL (%) †	9.23 ± 2.33 <sup>a</sup>	8.49 ± 2.11 <sup>a</sup>	5.62 ± 1.45	<0.001
CL en LDL (%)	11.11 ± 1.29 <sup>a</sup>	11.31 ± 1.40 <sup>a</sup>	9.71 ± 1.43	0.001
CE en LDL (%) †	25.37 ± 2.73 <sup>a</sup>	24.34 ± 2.34 <sup>a</sup>	31.68 ± 8.51	0.005
Fosfolípidos en LDL (%)	24.83 ± 2.13 <sup>a</sup>	24.05 ± 2.62	22.3 ± 2.93	0.035
Fase de latencia (min) †	58.85 ± 11.06 <sup>b</sup>	65.61 ± 11.96	62.3 ± 5.06	0.045
% Patrón B de LDL n (%)	11 (33.3) <sup>a,b</sup>	2 (5.9)	0 (0.0)	0.001 <sup>&amp;</sup>

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidémicos;

Valores expresan media ± desviación estándar. ANOVA († Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05 vs. NLP.

% Patrón B = Proporción de pacientes con LDL ≤ 25.5 nm, Valores expresan número de casos (porcentaje total del grupo estudiado), & Valor de p determinado por la prueba de Chi<sup>2</sup>

**Figura 4. Determinación del tamaño de las LDL en gel de poliacrilamida del 2 al 14%**



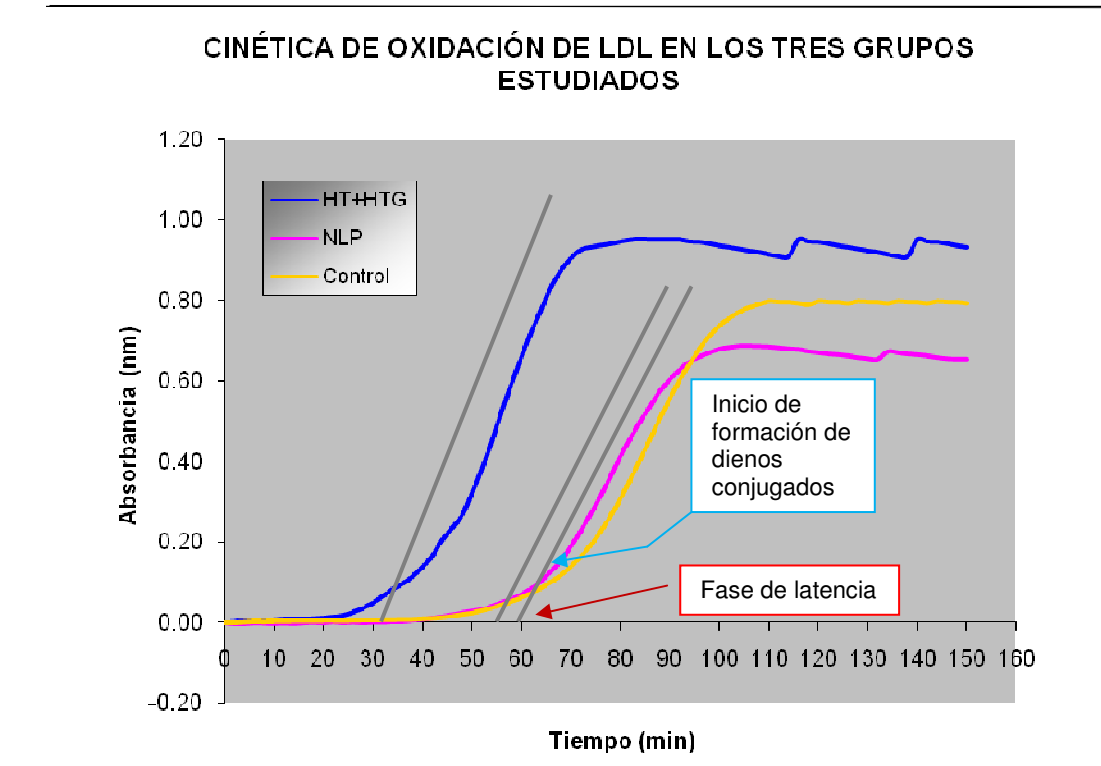
A continuación se muestran algunos resultados de los diámetros de LDL en los tres grupos estudiados obtenidos de la gráfica de calibración:

No. de pozo	Muestra	RF (Factor de migración)	Diámetro
6	HA+HTG	0.26	25.40
3	NLP	0.24	26.24
4	Control	0.23	26.64
7	muestra diámetro conocido	0.23	26.64

En la Figura 4, se puede observar claramente que las bandas de las partículas de LDL de las muestras de los pacientes con HA+HTG y NLP tuvieron un factor de migración (RF) mayor comparado la muestra del control, por lo tanto, las de LDL de los pacientes coronarios fueron más pequeñas que las del grupo control.

Al evaluar la susceptibilidad a la oxidación de las LDL a través de la formación de dienos conjugados inducida por  $\text{Cu}^{2+}$  en los tres grupos se obtuvo que la fase de latencia comparada con el grupo control y el NLP fue significativamente menor en el grupo HA+HTG (62.30, 65.61 y 58.85 min respectivamente), indicando mayor susceptibilidad a la oxidación de la LDL en estos pacientes, tal como lo muestran datos representativos de la Gráfica 1.

Gráfica 1

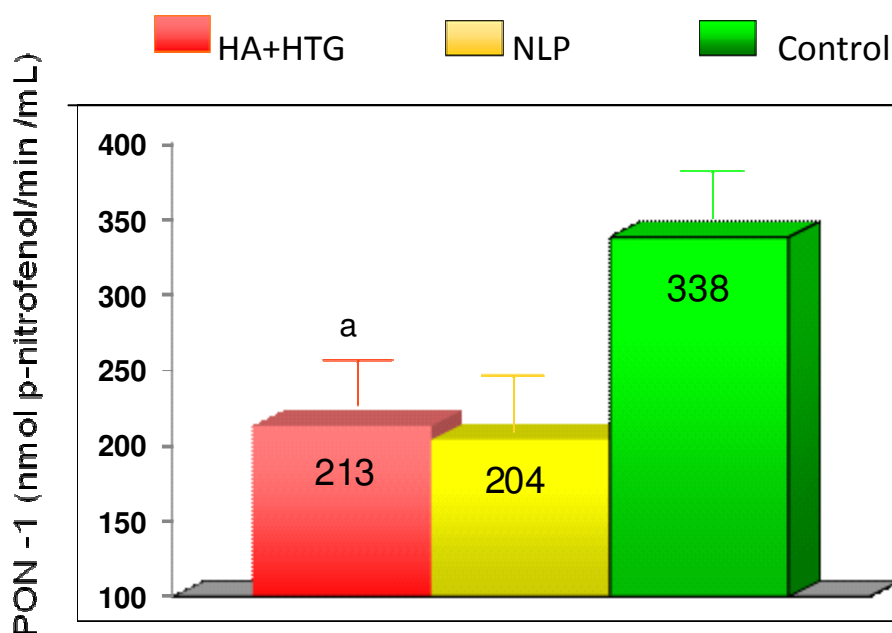


Durante varios años se han acumulado evidencias de que la oxidación de las LDL juega un papel central en la aterogénesis. La PON1, enzima asociada a las HDL, se ha identificado como un factor importante en la capacidad de las HDL para evitar la modificación oxidativa de las LDL. En el presente trabajo se examinó la actividad de PON1, utilizando paraoxón como sustrato exógeno, en los tres grupos estudiados. En la Figura 5 se muestra que la actividad de PON1 estuvo significativamente baja en los dos grupos de pacientes coronarios en comparación con el grupo control.

Debido a que se ha reportado que la simvastatina aumenta la actividad de PON1,<sup>55</sup> los resultados también se analizaron en los pacientes tratados con simvastatina (n=34) y en los que recibían otras estatinas (n=35). Los valores de la actividad de

PON1 aunque más altos en los tratados con simvastatina ( $232.39 \pm 144.95$  nmol p-nitrofenol/min/mL) que en los tratados con otras estatinas ( $193.53 \pm 145.04$  nmol p-nitrofenol/min/mL), estadísticamente no fueron diferentes ( $p=0.20$ ).

**Figura 5. Actividad paraoxonasa en los tres grupos de estudio**



ANOVA. a  $p < 0.005$  vs. Grupo control

Valores expresan media  $\pm$  desviación estándar

En un análisis de regresión lineal múltiple, en el que entraron como variables dependientes la actividad PON1, la fase de latencia y el tamaño de LDL y como variables independientes la edad, las medidas antropométricas, los valores de glucosa y lípidos y la composición de las LDL, se encontró que la varianza en actividad PON1 fue explicada en 12.5% por las concentraciones de LDL, la fase de latencia fue explicada en 12.3% por los fosfolípidos en LDL y la varianza en el tamaño de LDL fue explicada en 18.2% por las concentraciones de TG y un 5.8% por la edad.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que los pacientes coronarios tratados con estatinas que han alcanzado valores meta de C-LDL ( $< 100$  mg/dL), pero que continúan con C-HDL bajo y TG altos (HA+HTG) tienen, en comparación con los pacientes coronarios con lípidos normales (NLP), un perfil de riesgo cardiovascular más desfavorable, caracterizado por frecuencias mayores de obesidad general y adiposidad central, valores más altos de las relaciones CT/C-HDL, Apo B/Apo A-I, concentraciones bajas de Apo A-I y una frecuencia muy alta de síndrome metabólico. La actividad de PON1 se encontró significativamente disminuida en los dos grupos de pacientes, pero el grupo HA+HTG presentó, además, anormalidades cualitativas de lipoproteínas consistentes en partículas pequeñas de LDL y HDL, patrón B de LDL más frecuente, LDL de composición anormal y con mayor susceptibilidad a la oxidación. Este conjunto de alteraciones puede contribuir al aumento de riesgo de sufrir nuevos eventos cardiovasculares.

Los estudios que han investigado la actividad PON1 en pacientes con enfermedad coronaria establecida consistentemente han encontrado valores bajos en comparación con sujetos sanos.<sup>64,65,86</sup> También se ha reportado que la actividad baja de PON1 es un factor de riesgo independiente para eventos coronarios recurrentes en pacientes con enfermedad cardiovascular preexistente.<sup>87,88</sup> Los resultados del presente estudio confirman los valores bajos de la actividad PON1 en la enfermedad coronaria aún en pacientes tratados con estatinas que han logrado valores meta de C-LDL.

En un estudio<sup>56</sup> realizado en 21 pacientes coronarios no diabéticos y sin tratamiento regulador de lípidos, el tratamiento con 20 mg diarios de simvastatina administrados durante un tiempo promedio de 6.7 semanas, produjo un aumento significativo de aproximadamente 23% en la actividad de PON1. En el presente estudio, el análisis de 34 pacientes que estaban tratados con simvastatina mostró que sus valores de actividad PON1 eran más altos que los encontrados en pacientes tratados con otras estatinas. Aunque la diferencia no alcanzó significado estadístico, esta observación sugiere que la simvastatina puede tener efecto antioxidante mediado por aumento en la actividad de PON1, lo cual es apoyado por otro estudio<sup>55</sup> que también mostró mayor actividad de la enzima en pacientes con hipercolesterolemia familiar tratados con simvastatina por 4 meses.

En comparación con los sujetos control, los pacientes NLP y los del grupo HA+HTG tuvieron valores bajos muy similares en la actividad PON1. Sin embargo, las LDL de los pacientes HA+HTG mostraron mayor susceptibilidad a la modificación oxidativa. La posible explicación para este hallazgo es que el síndrome metabólico (SM) fue notable y significativamente más frecuente en el grupo HA+HTG. Además de los valores bajos de C-HDL y altos de triglicéridos, este síndrome se caracteriza por mayor proporción de LDL pequeñas y densas,<sup>89</sup> cambios en la distribución de las subclases de HDL con predominio de las partículas pequeñas y, consecuentemente, menor tamaño promedio de las HDL,<sup>90</sup> estrés oxidativo elevado y HDL disfuncionales con capacidad antioxidante disminuida.<sup>91</sup> En los pacientes coronarios HA+HTG del presente estudio, se encontró una relación C-LDL/ApoB significativamente menor, altamente sugerente de la presencia de LDL pequeñas y

densas. Lo cual fue confirmado por la medición del tamaño de LDL mediante electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida; tuvieron además un aumento significativo en la proporción de patrón B de LDL. Es conocido que las LDL pequeñas y densas son más susceptibles a la oxidación.<sup>92</sup> Se ha sugerido que esto es debido a que su afinidad reducida por el receptor hepático de LDL prolonga el tiempo de residencia de LDL en la circulación, con la subsecuente mayor exposición al ataque por las especies reactivas al oxígeno.<sup>93</sup> Asociadas a los valores bajos de C-HDL, los pacientes HA+HTG mostraron concentraciones significativamente menores de su péptido estructural, la Apo A-I. También tuvieron significativamente más baja la relación C-HDL/Apo A-I, indicando la existencia de partículas de HDL pequeñas y densas. Se han mostrado que este subtipo de partículas HDL tiene composición alterada y capacidad antioxidante disminuida en pacientes con síndrome metabólico.<sup>91</sup> En conjunto, estas alteraciones pueden haber contribuido a la mayor oxidabilidad de LDL observada en los pacientes HA+HTG. Las anormalidades cualitativas de LDL y HDL encontradas en los pacientes HA+HTG pueden contribuir a la mayor incidencia de eventos cardiovasculares observada en los pacientes con C-HDL bajo tratados con estatinas.<sup>73</sup> Se ha demostrado que las LDL promueven la enfermedad aterosclerosa. Un principio básico es relación al papel de las LDL en la aterosclerosis es su modificación química, que las convierte en partículas tóxicas a la vasculatura.<sup>94</sup> Durante las últimas décadas, se han acumulado evidencias que apoyan la oxidación como la principal modificación proaterogénica que ocurre en las LDL. La hipótesis de la oxidación<sup>95</sup> postula que la modificación oxidativa de la proteína y lípidos de las LDL, favorecen la captación no

regulada de esta lipoproteína oxidada por macrófagos y células musculares lisas, transformándolas en células espumosas ricas con colesterol típicas de la lesión aterosclerosa. Como ya se mencionó, las LDL oxidadas tienen otros efectos aterogénicos: estimulan la migración de monocitos al subendotelio, aumentan la expresión de moléculas de adhesión, estimulan la replicación de macrófagos y células musculares lisas, son citotóxicas y pueden provocar necrosis de la placa, estimulan la agregación plaquetaria y alteran la función endotelial.<sup>96</sup> Con base en estos hallazgos reportados en la literatura, es razonable suponer que los pacientes con HA+HTG y mayor oxidabilidad de las LDL, tienen mayor riesgo de presentar eventos coronarios recurrentes.

Al igual que las LDL, las HDL son un grupo heterogéneo de partículas que difieren en tamaño, composición, densidad y carga.<sup>97</sup> Se ha descrito que las HDL pequeñas promueven mayor eflujo de colesterol y tienen mayor actividad antioxidante<sup>98</sup> y antiinflamatoria<sup>99</sup> que las partículas grandes de HDL. Aunque la proporción de HDL pequeñas se encuentra aumentada en las personas con C-HDL bajo<sup>100</sup> y en los pacientes con síndrome metabólico,<sup>91</sup> su composición química y su capacidad funcional están alteradas.<sup>91,100</sup> Por otra parte, se ha encontrado que el aumento de HDL pequeñas, se asocia a la prevalencia de enfermedad arterial coronaria.<sup>101</sup> Todavía más importante son los resultados de Asztalos et al.<sup>102</sup> en el que las subclases de HDL fueron determinadas en pacientes coronarios con c-HDL bajo. En el seguimiento a 5 años de los pacientes de ese estudio, los autores observaron que el patrón de subclases de HDL caracterizado porque el aumento de HDL pequeñas y



disminución de las HDL grandes se asoció a mayor recurrencia de eventos coronarios, aún después de ajustar por factores de riesgo tradicionales.<sup>102</sup>

El riesgo cardiovascular asociado a los trastornos lipoproteicos está relacionado con el balance entre las lipoproteínas aterogénicas (densidad muy baja [VLDL], intermedia [IDL] y baja [LDL]) y las lipoproteínas antiaterogénicas (HDL). Para expresar este balance habitualmente se han utilizado las relaciones CT/C-HDL y C-LDL/C-HDL.<sup>103</sup> Estos índices han sido útiles para predecir eventos cardiovasculares. Sin embargo, se han proporcionado evidencias de que la relación Apo B/Apo A-I tiene un poder de predicción mayor, particularmente en población de alto riesgo.<sup>104</sup> En los pacientes HA+HTG del presente estudio, los tres índices mencionados fueron significativamente más altos que en el grupo NLP, indicando que su riesgo de eventos futuros es mayor.

## CONCLUSIONES

Este estudio muestra que los pacientes con enfermedad arterial coronaria y con HA+HTG a pesar del tratamiento con estatinas, presentan anomalías en las características bioquímicas de las LDL y funcionales de las HDL, además una frecuencia mayor de factores de riesgo tradicionales. La actividad de PON1 estuvo reducida en comparación con los sujetos sanos, pero los valores fueron similares a los encontrados en los pacientes normolipidémicos.

Las alteraciones encontradas en los pacientes HA+HTG se asocian a mayor riesgo de eventos cardiovasculares recurrentes. Esta condición puede contribuir a la morbimortalidad más alta observada en los pacientes coronarios con C-HDL bajo que han alcanzado valores de C-LDL inferiores a 70 mg/dL.<sup>73</sup>

Por lo tanto, aunque la reducción de las concentraciones de C-LDL continúa siendo la meta principal del tratamiento de la EAC, los resultados de este trabajo sugieren que los valores bajos de C-HDL deberían también ser considerados como objetivo de la terapia reguladora de lípidos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson D, Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3th Edition, Ed. Worth Publishers, USA, 2000, pp. 363-378, 599-603, 804-811.
2. Stryer L. Bioquímica, 4a edición, Ed. Reverté, España 1995, pp. 603.
3. Voet D, Voet JG. Bioquímica, 2a edición, Ed. Omega, España, 1992, pp. 294-300, 328- 334.
4. Mayes PA: Lípidos de importancia fisiológica. En Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Bioquímica de Harper, 14a Edición, México, Manual Moderno, 1997, pp. 169-173.
5. Onaka L, Lípidos. En Anderson SC, Cockayne S, Química Clínica, México, Interamericana Mc Graw-Hill, 1995, pp. 171-177.
6. Brunzell JD, Chait A. Lipoprotein Metabolism: Structure and Function. Encyclopedia of life sciences 2002, pp. 1-7.
7. Mayes PA, Transporte y almacenamiento de lípidos. En Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, Bioquímica de Harper, 14a Edición, México, Manual Moderno, 1997, pp. 289-300.
8. Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G, High Density Lipoproteins and Arteriosclerosis: Role of Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001; 21:13-27.
9. Gayton A. Tratado de Fisiología Médica, 9ª Edición, Interamericana Mc Graw Hill, España 1996, pp. 906-908, 913-914.
10. Gotto A, DPhil MD. Diagnóstico y tratamiento actual de los trastornos lipídicos, 3ª Edición, Atlas Medical Publishing, Ltd, España 2005, pp. 54-62.
11. Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D. The Methabolic & Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition, Mc Graw Hill, USA 2001, pp. 2707-2712.
12. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. J. Clin. Invest. 2006; 116:3090–3100.
13. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol. 1999; 48: 125–133.
14. Braunwald E, Baughman KL. Essential Atlas of Heart Diseases, 2th Edition, Mc Graw Hill, USA 2001, pp. 91-109.
15. Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. J. Lipid Res. 2001; 42:1346–1367.

16. Rizzo M, Berneis K, Corrado E, Novo S. The significance of low-density-lipoproteins size in vascular disease. *Int Angiol.* 2006; 25:4-9.
17. Musliner TA, Krauss RM. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem.* 1988; 34: B78–B83.
18. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles. Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000; 1488:189-210.
19. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74:535–562.
20. Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004; 84:1381-1478.
21. Osterud B, Bjorklid E. Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev.* 2003; 83:1069-1112.
22. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320:915-924.
23. Witztum JL, Steinberg D: Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1785-1792.
24. Ito M, Oguri M, Naruse A, Ito H, Suzuki Y, Satake N: Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated thoracic aorta of rats with daunomycin-induced nephrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258:388-395.
25. Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-126.
26. Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:473-481.
27. Young S, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans.* 2001; 29:358-362.
28. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms.* 1989; 6:67-75.
29. Zhang A, Vertommen J, Van Gaal L, De Leeuw I: A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low density lipoprotein and very low density lipoprotein to copper-catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta.* 1994; 227:159-173.
30. Kunitomo M. Oxidative stress and atherosclerosis. *Yakugaku Zasshi.* 2007; 127:1997-2014.
31. Huang H, Mai W, Liu D, Hao Y, Tao J, Dong Y. The oxidation ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Dis Markers.* 2008; 24:341-349.

32. Urahama N, Iguchi G, Shimizu M, Fujihira K, Kobayashi S, Baba H. Smoking and small, dense low-density lipoprotein particles: cross-sectional study. *Nicotine Tob Res.* 2008; 10:1391-1395.
33. Drüeke TB, Nguyen Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Lacour B, Descamps-Latscha B. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001; 78: S114-S119.
34. Aviram M. Review of Human Studies on Oxidative Damage and Antioxidant Protection Related to Cardiovascular Diseases. *Free Rad Res.* 2000; 33:S85-S97.
35. Raji L, Nagy J, Coffee k, DeMastr EG. Hypercholesterolemia promotes endothelial dysfunction in vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 1993; 34:343-358.
36. Gotto AM Jr, Brinton EA. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:717-724.
37. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106:3143-3421.
38. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005; 96:1221-1232.
39. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; 113:2548-2555.
40. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006; 3:144-153.
41. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004; 95:764-772.
42. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006; 98:1352-1364.
43. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004; 45:993-1007.
44. Pérez- Méndez O, Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Mex.* 2004; 74:53-67.
45. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991; 286:152-154.

46. Gao X, Jayaraman S, Gursky O. Mild Oxidation Promotes and Advanced Oxidation Impairs Remodeling of Human High-Density Lipoprotein in vitro. *J Mol Biol.* 2008; 29; 376: 997–1007.
47. Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18:427-434.
48. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996; 33:498-507.
49. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:2214-2225.
50. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med.* 1999; 31:217-224.
51. Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. Structural organization of the human PON1 gene. *Genomics.* 1996; 35:586-589.
52. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. The hunt for nutritional and pharmacological modulators of paraoxonase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1248-1250.
53. Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, Arijia V, Murphy MM, Ceruelo S, Biarnés E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem.* 2003; 49:1491-1497.
54. Sutherland WH, Manning PJ, de Jong SA, Allum AR, Jones SD, Williams SM. Hormone-replacement therapy increases serum paraoxonase arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism.* 2001; 50:319-324.
55. Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:2113-2119.
56. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:2083-2089.
57. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest.* 1995; 96:3005-3008.
58. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:36-44.

59. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashii Y, Yazaki Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis*. 2000; 149:435-442.
60. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1067-1073.
61. Karvonen J, Kauma H, Päivänsalo M, Kesäniemi YA. Paraoxonase-1 gene Leu-Met55 and Gln-Arg192 polymorphisms are not associated with carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2004; 11:511-512.
62. Sanghera DK, Saha N, Kamboh MI. The codon 55 polymorphism in the paraoxonase 1 gene is not associated with the risk of coronary heart disease in Asian Indians and Chinese. *Atherosclerosis*. 1998; 136:217-223.
63. Arca M, Ombres D, Montali A, Campagna F, Mangieri E, Tanzilli G, Campa PP, Ricci G, Verna R, Pannitteri G. PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32:9-15.
64. R Gamboa, JC Regalado, C Huesca-Gómez, C Posadas-Romero, J Verdejo Paris, G Vargas-Alarcón, Oscar Pérez-Méndez. Actividades paraoxonasa y arilesterasa bajas en sujetos mexicanos con enfermedad arterial coronaria. *Arch Cardiol Mex* 2008; 78:360-368.
65. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:330-335.
66. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:1812-1818.
67. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991; 86:193-199.
68. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation*. 2003; 107: 2775-2779.
69. Olsson A: Nuevos estudios clínicos de compuestos reguladores de lípidos. En Packard C "The year in dyslipidemia" versión en español. Barcelona, España, Clinical Publishing, 2008, pp 191-212.

70. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*. 1998; 279:1615-1622.
71. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary Herat disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).*Lancet*. 1994; 344:1383-1389.
72. La Rosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, et al. Treating to New Targets (TNT) Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med* 2005; 352:1425-1435.
73. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, Kastelein JJ, Bittner V, Fruchart JC; Treating to New Targets Investigators. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007; 357:1301-1310.
74. Sánchez-Castillo CP, Velázquez-Monroy O, Berber A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyer R, James WP. Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Health Survey 2000. *Obes Res*. 2003; 11:442–451.
75. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. Direct measurement of High-Density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. *Clin Chem*. 1995;41:717-723.
76. De Long D, De Long E, Wood P, Lippel K, Rifkind BM . A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low- density lipoprotein cholesterol. *JAMA* 1986; 256:2372-2377.
77. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193:265-275.
78. Brussaard HE, Gevers Leuven JA, Klufft C, Krans HMJ, van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, Princen HMG: Effect of 17  $\beta$ -estradiol on plasma lipids and LDL oxidation in postmenopausal women with type II diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:324-330.
79. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms*. 1989; 6:67-75.
80. Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Hernández-Ono A, Baños-Marhaber G, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverrí J: LDL size and susceptibility to oxidation in experimental nephrosis. *Mol Cell Biochem* 2001; 220:61-68.
81. Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G: LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of



- in vitro and in vivo oxidation markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994; 14:1892-1899.
82. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, Gazo A, Nai M, Romanini D, Bellomo G: Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int.* 1994; 45:876-883.
  83. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35:1126-1138.
  84. Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *J Inter Med.* 2006; 259: 493–519.
  85. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willeff WS, Krauss RM: Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *J Am Med Assoc.* 1988; 260:1917-1924.
  86. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:1451-1457.
  87. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003; 107:2775-2779.
  88. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, Shao M, Brennan DM, Ellis SG, Brennan ML, Allayee H, Lusic AJ, Hazen SL. Relationship of paraonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA.* 2008; 299:1265-1276.
  89. <sup>1</sup>Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes.* 2003; 52: 453 - 462.
  90. Garin MC, Kalix B, Morabia A, James RW. Small, dense lipoprotein particles and reduced paraonase-1 in patients with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:2264-2269.
  91. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, Kontush A. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:4963-4971.
  92. Dejager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 1993; 34: 295-308.

93. Pietzsch J, Lattke P, Julius U. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. In vivo insights from stable-isotope studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:E63-E67.
94. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76:333-337.
95. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320:915-924.
96. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991; 88:1785-1792.
97. von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol.* 1994; 5:404-416.
98. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1881-1888.
99. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1450–1455.
100. Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis.* 2005; 182:277–285.
101. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. High-Density Lipoprotein Subpopulation Profile and Coronary Heart Disease Prevalence in Male Participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2181-2187.
102. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2185-2191.
103. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001; 285:2486-2497.
104. Sniderman AD, Jungner I, Holme I, Aastveit A, Walldius G. Errors that result from using the TC/HDL C ratio rather than the apoB/apoA-I ratio to identify the lipoprotein-related risk of vascular disease. *J Intern Med.* 2006; 259(5):455-461.