



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ALTERACIONES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE  
LAS HDL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL  
CORONARIA CON C-LDL EN META PERO CON C-HDL Y  
TRIGLICÉRIDOS ANORMALES**

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

**PRESENTA**  
**WENDY ANGÉLICA OCAMPO ARCOS**



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profra. María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

VOCAL: Profra. Rosalinda Velázquez Salgado

SECRETARIO: Profra. Rosalinda Posadas Sánchez

1er. SUPLENTE: Profra. Luz María del Rocío Valdés Gómez

2do. SUPLENTE: Profra. Claudia Huesca 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

---

Wendy Angélica Ocampo Arcos

## INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	5
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
I. RESUMEN.....	9
II. INTRODUCCION	
Capitulo 1: Lípidos y lipoproteínas	
1.1 Lípidos: Definición, clasificación y función.....	11
1.2 Lipoproteínas: Definición, clasificación y función.....	14
Capitulo 2: Metabolismo de las lipoproteínas	
2.1 Vía exógena (metabolismo de los quilomicrones).....	17
2.2 Vía endógena (metabolismo de VLDL).....	18
2.3 Transporte reverso del colesterol (metabolismo de las HDL).....	21
Capitulo 3: Lipoproteína de alta densidad (HDL)	
3.1 Estructura y composición de las HDL.....	23
3.2 Subpoblaciones de las HDL.....	24
Capitulo 4: Actividades biológicas de las HDL	
4.1 Eflujo de colesterol.....	27
4.2 Actividad antioxidante.....	28
4.3 Actividad antiinflamatoria.....	29
4.4 Actividad antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombotica y antiinfecciosa. ....	30

Capitulo 5: HDL y aterosclerosis	
5.1 Epidemiología de la aterosclerosis	32
5.2 Formación de la placa ateromatosa.....	33
5.3 Alteraciones de las HDL en la aterosclerosis.....	34
III. JUSTIFICACION.....	37
IV. OBJETIVOS.....	38
V. MATERIAL Y METODOS	
• Población.....	39
• Metodología.....	40
• Análisis de laboratorio.....	40
• Análisis estadístico.....	43
VI. RESULTADOS.....	44
VII. DISCUSION.....	55
VIII. CONCLUSIONES.....	61
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	63
XI. ANEXO 1.....	71

## ABREVIATURAS

<b>Apos</b>	Apolipoproteínas
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>IDL</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>apoA-I</b>	Apolipoproteína A-I
<b>apoA-II</b>	Apolipoproteína A-II
<b>apoA-IV</b>	Apolipoproteína A-IV
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B
<b>apoC-I</b>	Apolipoproteína C-I
<b>apoC-II</b>	Apolipoproteína C-II
<b>apoC-III</b>	Apolipoproteína C-III
<b>apoD</b>	Apolipoproteína D
<b>apoE</b>	Apolipoproteína E
<b>apoH</b>	Apolipoproteína H
<b>apoJ</b>	Apolipoproteína J
<b>MTP</b>	Proteína microsomal transportadora de triglicéridos
<b>CETP</b>	Proteína transportadora de esteres de colesterol
<b>ACAT</b>	Acilcolesterol acil transferasa
<b>ABCA-1</b>	Transportador A-1 dependiente de ATP
<b>LCAT</b>	Lecitin colesterol aciltransferasa
<b>PLTP</b>	Proteína transportadora de fosfolípidos

<b>SR-B1</b>	Receptor pepenador B1
<b>LH</b>	Lipasa hepática
<b>LPL</b>	Lipasa lipoproteica
<b>PON</b>	Paraoxonasa
<b>GSPx</b>	Glutati3n seleno peroxidasa
<b>PAF-AH</b>	Acetil-hidrolasa del factor activador plaquetario
<b>VCAM</b>	Mol3cula de adhesi3n vascular tipo I
<b>ICAM</b>	Mol3cula de adhesi3n intracelular tipo I
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>S1P</b>	Esfingosina 1 fosfato
<b>LDL-ox</b>	LDL oxidada
<b>ROS</b>	Especies reactivas de ox3geno
<b>MM-LDL</b>	LDL m3nimamente oxidada
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	Factor nuclear kappa beta
<b>NLP</b>	Normolipid3micos
<b>HA</b>	Hipoalfalipoproteinemia
<b>HTG</b>	Hipertrigliceridemia
<b>IMC</b>	3ndice de masa corporal
<b>LOOH</b>	L3pidos hidroperoxidados
<b>CEOOH</b>	3steres de colesterol hidroperoxidados

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA		PAG
1	Estructura de los triglicéridos.....	13
2	Estructura del colesterol.....	14
3	Estructura de las lipoproteínas.....	15
4	Metabolismo del quilomicrón.....	18
5	Vía endógena (metabolismo de VLDL).....	19
6	Captación de LDL por el receptor.....	20
7	Metabolismo de HDL.....	22
8	Estructura tridimensional de la HDL discoide.....	23
9	Estructura de la HDL esférica.....	24
10	Subpoblaciones de HDL.....	25
11	Electroforesis en dos dimensiones.....	26
12	Formación de la placa ateromatosa y propiedades aterogénicas de HDL.....	34
13	Factores de riesgo coronario en los 3 grupos de estudio.....	45
14	Estatinas utilizadas por los pacientes estudiados.....	16
15	Determinación del tamaño de HDL.....	49
16	Distribución de subclases y tamaño de HDL en los tres grupos estudiados.....	50
17	Determinación del contenido de apolipoproteínas en HDL en los tres grupos estudiados.....	51
18	Eflujo de colesterol de células Fu5AH al plasma en los tres grupos de estudio.....	52
19	Asociación del eflujo de colesterol con las variables clínicas y bioquímicas de todos los sujetos estudiados.....	53



## TABLAS

1	Ácidos grasos comunes.....	12
2	Características de las lipoproteínas.....	16
3	Características antropométricas, tensión arterial y glucosa en los 3 grupos estudiados.....	44
4	Valores de lípidos, lipoproteínas, apoA-I y apoB en plasma y relación apoB/apoA-I en los sujetos estudiados por grupo.....	48
5	Composición química y contenido de apoproteínas de HDL en los tres grupos estudiados.....	51

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** El efecto más importante de las estatinas es la reducción significativa de las concentraciones plasmáticas del colesterol de la lipoproteína de baja densidad (C-LDL). Sin embargo, se ha demostrado que también disminuyen las concentraciones de triglicéridos y producen aumentos modestos en el colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) circulante. Además, estudios recientes han señalado que las estatinas producen cambios favorables en algunas características de las HDL que no son cuantificadas en el laboratorio clínico. A pesar de estos efectos, el riesgo residual en los estudios con estatinas, es de 60% a 70%. Se ha informado que en pacientes coronarios que alcanzaron valores de 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 bajos de C-HDL. Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas. Es posible que el potencial antiaterogénico y la utilidad como marcadores de riesgo sean distintos para las diferentes subpoblaciones de HDL. El transporte reverso de colesterol (TRC) es considerado el mecanismo ateroprotector más importante de las HDL. El eflujo de colesterol de las células de tejidos periféricos hacia las HDL constituye el primer paso en el TRC. Evidencias recientes indican que más que la concentración de C-HDL, son las características fisicoquímicas y la funcionalidad de las HDL las que tiene un papel clave en la patogenia de la aterosclerosis. Es probable que alteraciones fisicoquímicas y funcionales de las HDL puedan contribuir, al menos en parte, al riesgo residual de eventos recurrentes en pacientes coronarios tratados con estatinas.

**Objetivo:** Investigar la composición química, la distribución y la funcionalidad de las HDL, evaluada mediante el eflujo de colesterol, en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) tratados con estatinas y C-LDL en meta (<100mg/dl) pero con triglicéridos (>150mg/dl) y C-HDL (<40mg/dl) anormales (grupo HA+HTG); en pacientes con EAC tratados con estatinas y C-LDL en meta (<100mg/dl) pero con triglicéridos (<150mg/dl) y C-HDL (>40mg/dl) normales (grupo NLP) y en sujetos sanos (grupo control):

**Material y métodos:** Se estudiaron pacientes con enfermedad arterial coronaria con hipoalfalipoproteinemia combinada con hipertrigliceridemia (HA+HTG, n=34), pacientes normolipidemicos (NLP, n=35) y sujetos sin enfermedad arterial coronaria (control n=20). La determinación de lípidos y lipoproteínas en plasma, así como el análisis de la composición química de HDL, se realizó en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio Japan), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania).

El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se estimó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long. Las subpoblaciones de HDL se determinaron en HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial, mediante electroforesis en gradiente (4% al 25%) en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE). El contenido de apos en HDL se determinó semicuantitativamente mediante electroforesis en gradiente (4% al 21%) en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El eflujo de colesterol se determinó empleando células de hepatoma de rata Fu5AH por el método descrito por De la Llera-Moya.

**Resultados:** En comparación con el grupo NLP y el grupo control, los pacientes con HA+HTG se caracterizaron por tener proporciones menores de HDL grandes (HDL<sub>2b</sub> 11.4% vs 14.9% y 16%, p= 0.002; HDL<sub>2a</sub> 16.2% vs 21.6% y 20.7%, respectivamente p< 0.001) y mayores de HDL pequeñas (HDL<sub>3c</sub> 23.4% vs 17.8% y 15.2%, respectivamente p<0.001). Además estos pacientes tuvieron HDL de composición anormal enriquecidas en triglicéridos. También se observaron cambios en la funcionalidad de las HDL evaluada mediante el eflujo de colesterol, los pacientes cardiopatas (HA+HTG y NLP) mostraron menor porcentaje de eflujo comparada con los controles (13.7% y 15% vs 19.1%, respectivamente p<0.001).

**Conclusión:** Los pacientes con EAC establecida, tratados con estatinas, que han alcanzado valores meta de C-LDL pero que cursan con C-HDL bajo y triglicéridos altos, presentan anormalidades tanto en la composición química y en la distribución de subclases de HDL así como en la funcionalidad de las HDL.

Es probable que el riesgo residual observado en los estudios de intervención pueda ser debido, al menos en parte, a las anormalidades fisicoquímicas y a la menor funcionalidad de HDL identificadas en el presente estudio.

## I. INTRODUCCIÓN

### CAPITULO 1: LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

#### 1.1 Lípidos: definición, función y clasificación

Los lípidos son compuestos orgánicos, insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos (e.j cloroformo, benceno, éter dietílico, entre otros). Las funciones biológicas de los lípidos son diversas; en algunos organismos las grasas son usadas como forma de almacenamiento de energía; mientras que los lípidos y los esteroides son componentes de las membranas celulares gracias a su carácter anfipático, otros lípidos funcionan como segundos mensajeros, cofactores enzimáticos, agentes emulsificantes, precursores de hormonas esteroideas como es el caso del colesterol.

La clasificación actual de los lípidos es la siguiente:

- a) Ácidos grasos: son ácidos orgánicos anfipáticos, el grupo carboxilo confiere la polaridad a la cabeza. La cola no polar es una cadena hidrocarbonada de longitud variable: corta (de 2 a 10 átomos de carbono), de cadena media (de 12 a 20 átomos de carbono) o de cadena larga (más de 20 átomos de carbono). Esta cadena puede ser saturada (sin dobles enlaces), monoinsaturada (con un doble enlace) o poliinsaturadas (varios dobles enlaces) (Tabla 1). La nomenclatura de estos compuestos especifica la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces separados por dos puntos (ácido linoleico 18:2( $\omega$ 6); el símbolo ( $\omega$ ) identifica la posición del primer doble enlace en la cadena hidrocarbonada en relación al grupo metilo terminal). El ser humano puede sintetizar ácidos grasos poliinsaturados a partir de los ácidos grasos

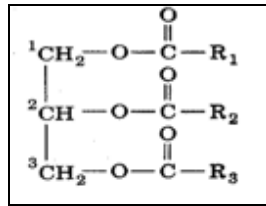
preformados, pero carece de enzimas necesarias para sintetizar ácidos grasos de las familias  $\omega 6$  y  $\omega 3$ , por lo que requiere adquirirlos de la dieta y por ello se denominan ácidos grasos esenciales o nutricionalmente indispensables.

b) Acilglicerol: Se forman al esterificar el glicerol con ácidos grasos libres, dependiendo del número de ácidos grasos que están esterificando al glicerol se denominan: monoacilglicerol (uno), diacilglicerol (dos) y los triacilglicerol o triglicéridos (tres). Los que contienen el mismo tipo de ácido graso en las tres posiciones se les denomina triglicéridos simples, los que contienen dos o mas ácidos grasos se les denomina mixtos.

**Tabla I. Acidos grasos comunes** Error! Marcador no definido.

Nombre	Número de carbonos	Número de dobles enlaces
<i>Saturado</i>		
Laúrico	12	0
Mirístico	14	0
Palmítico	16	0
Esteárico	18	0
Araquídico	20	0
<i>Monoinsaturados</i>		
Palmitoleico	16	1
Oleico	18	1
<i>Poliinsaturados</i>		
Linoleico*	18	2
Linolénico*	18	3
Araquidónico*	20	4

\*Indica un ácido graso esencial



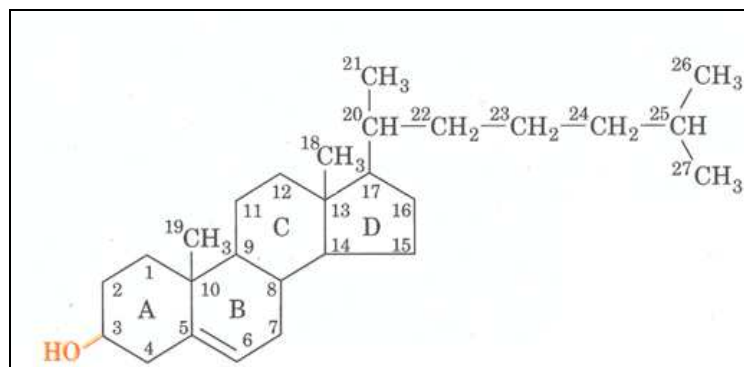
**Figura 1: Estructura de los triglicéridos**

- c) Glicerofosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico y se nombran según su grupo polar de cabeza (ej fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). Todos tienen una carga negativa sobre el grupo fosfato a pH 7; son componentes estructurales de las membranas celulares, también participan como segundos mensajeros.
- d) Esfingolípidos: Los ácidos se encuentran unidos mediante enlace N-acilo (amida), en lugar del enlace éster observado en los acilgliceroles. La base estructural de los esfingolípidos es la esfingosina (esfingenina). Cuando la base esfingoide se une con ácido graso, recibe el nombre de ceramida, que es el metabolito común en la síntesis y en la degradación de los esfingolípidos.

Los lípidos derivados de la base esfingoide son los siguientes:

1. Ceramidas: Son derivados N-acilo de la base esfingoide
2. Fosfoesfingolípidos: Contienen un grupo fosforilo unido a la ceramida .
3. Cerebrósido: Son derivados monoglicosilados de la ceramida, en los que el carbohidrato puede ser la glucosa (glucocerebrósidos) o la galactosa (galactocerebrósidos).
4. Sulfátidos: Contienen unido un grupo sulfato.
5. Lactosilceramidas: Son derivados diglicosilados de la ceramida, en los que el disacárido es lactosa.

6. Gangliósidos: Son glicoesfingolípidos complejos que característicamente contienen ácido siálico además de carbohidratos neutros.
- e) Esteroles: Su estructura característica es la del núcleo esteroide que consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco (Figura 2). Son lípidos estructurales, el colesterol es el principal esteroide en los tejidos animales, es una molécula anfipática con una cabeza polar (el grupo hidroxilo en C-3) y un cuerpo hidrocarbonado no polar (el núcleo esteroide y la cadena lateral hidrocarbonada en C-17). El colesterol es precursor de hormonas esteroides, de algunas vitaminas liposolubles, de los ácidos biliares; los cuales son muy importantes para la digestión de los lípidos.



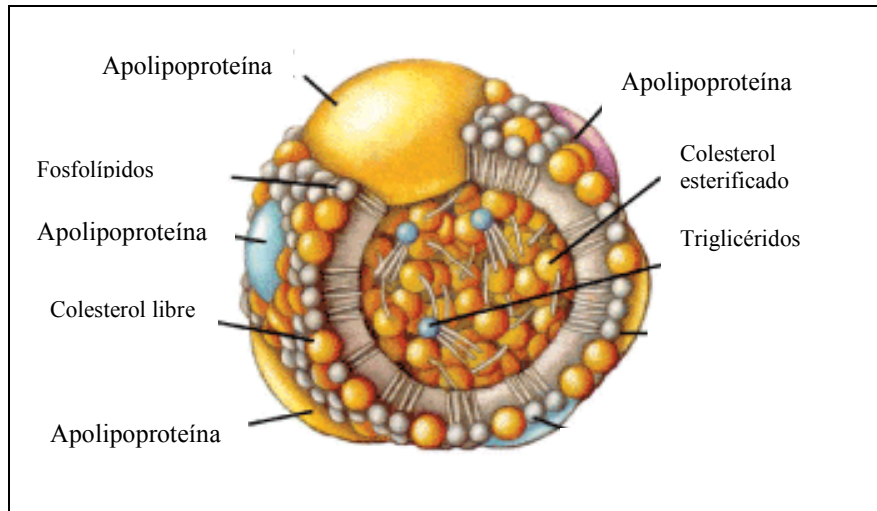
**Figura 2: Estructura del colesterol**

### 1.2 Lipoproteínas: Definición, clasificación y función:

Las lipoproteínas (Figura 3) son complejos macromoleculares esféricos compuestos de lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol), lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre) y proteínas específicas, llamadas apolipoproteínas (apos). Los lípidos no polares; se sitúan en el interior de la partícula, mientras que los fosfolípidos,



colesterol libre y las apolipoproteínas los rodean formando una monocapa que da estabilidad en el medio acuoso.



**Figura 3: Estructura de las lipoproteínas**

Las regiones hidrofóbica e hidrofílica de las apolipoproteínas les permite interactuar tanto con los lípidos de la lipoproteína como con el ambiente acuoso. Su función es determinar y estabilizar el tamaño y estructura de la partícula lipoproteica, actuar como ligandos de receptores celulares y cofactores de enzimas involucradas en el metabolismo lipoproteico.

Las lipoproteínas pueden ser clasificadas de acuerdo a su densidad, tamaño, movilidad electroforética y contenido de apolipoproteínas

a) En base a su densidad:

Quilomicrones; que son las más grandes y de menor densidad ( $d < 0.95$  g/ml)

VLDL (Very Low-Density Lipoproteins); lipoproteínas de muy baja densidad ( $d = 0.95-1.006$  g/ml)

IDL (Intermediate-Density lipoproteins); lipoproteínas de densidad intermedia ( $d = 1.006-1.019$  g/ml)

LDL (Low-Density Lipoproteins); lipoproteínas de baja densidad (d=1.019-1.063g/ml)

HDL (High-Density lipoproteins); lipoproteínas de alta densidad; se pueden separar en dos subclases HDL<sub>2</sub> (1.063-1.125 g/ml) y HDL<sub>3</sub> (1.125-1.21g/ml)

b) En base a su movilidad electroforética se dividen en:  $\alpha$ ,  $\beta$  y pre- $\beta$

c) En base a contenido de apolipoproteínas (Tabla 2) existen 2 tipos :

Lipoproteínas que contienen apolipoproteína AI (apoAI) y apoA-II: LpA-I, LpA-II y LpA-I/AII; estas incluyen a las HDL.

Lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (apoB): Lp-B estas incluyen VLDL, IDL y LDL.

**Tabla 2: Características de las lipoproteínas plasmáticas**

	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL2	HDL3
Densidad (g/ml)	<0.94	0,94-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,21
Diámetro (nm)	100-500	30-80	25-35	20-25	9-12	6-9
Migración electroforética	Origen	pre- $\beta$	$\beta$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha$
Composición (%)						
Proteína	0.5-2	8	19	22	40	56
Triglicéridos	85	55	23	6	5	3
Colesterol Esterificado	2	12	29	42	17	13
Colesterol libre	2	7	9	22	33	3
Fosfolípidos	7	18	19	8	5	25
Apolipoproteínas (%)						
A-I	0-5				70	65
A-II	0-1				10	20
A-IV	10					1
B-100		35-40	45-50	95-100		
B-48	20-25					
C-I	5-10	3	1		1	1
C-II	15	7-8	5		1	1
C-III	35-40	35-40	30-35		10	5
E	5	5-10	10-15		1-10	1

La principal función de las lipoproteínas es el transporte de lípidos en el torrente circulatorio, desde su origen (intestino o hígado) a tejidos periféricos y desde tejidos periféricos al hígado para que se lleve a cabo su catabolismo.

## **CAPITULO 2: METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS**

### 2.1 *Vía exógena (metabolismo de los quilomicrones)*

Esta vía permite que los lípidos de la dieta sean incorporados y utilizados por el organismo, para que esto ocurra estos lípidos deben ser catabolizados por medio del proceso digestivo. Las enzimas responsables de la digestión de lípidos se sintetizan en el páncreas y son secretadas al duodeno en presencia del quimo, la lipasa pancreática hidroliza los triglicéridos y libera ácidos grasos; la colesterol esterasa hidroliza al colesterol esterificado produciendo ácidos grasos y colesterol libre y la fosfolipasa A hidroliza los fosfolípidos.

Los ácidos grasos, el colesterol libre, monoacilgliceroles y diacilgliceroles son absorbidos en el duodeno e íleon. En el retículo endoplásmico del enterocito junto con la apolipoproteína B-48 (Apo B-48) y pequeñas cantidades de apoA-I, por acción de la proteína microsomal transportadora de triglicéridos (MTP), se forman los quilomicrones, estos son transportados al aparato de Golgi y liberados a la linfa mesentérica entrando a la circulación general por medio del ducto torácico (Figura 4). En la sangre, los quilomicrones adquieren apolipoproteínas de la serie C y apolipoproteína E (apoE) de las HDL. La apolipoproteína C-II activa a la lipasa lipoproteica, presente en el endotelio capilar que hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos. La partícula residual, llamada remanente de quilomicron, contiene una menor proporción de triglicéridos y una mayor proporción de colesterol esterificado y apoE que adquirió de las HDL. Los remanentes

de quilomicrón intercambian con las HDL triglicéridos, colesterol libre, y fosfolípidos por ésteres de colesterol, gracias a la acción de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) y a la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP). Una vez hidrolizados los triglicéridos, regresan a las HDL las apoproteínas C-II y C-III que habían recibido de ellas.

El remanente se une a una proteína localizada en la superficie sinusoidal (receptor apo B/E) de los hepatocitos mediado por apoE, después de la endocitosis los componentes del remanente son hidrolizados en los lisosomas del hepatocito y ahí el colesterol puede tener varias vías: síntesis de ácidos biliares, incorporarse las lipoproteínas nacientes o ser esterificado y almacenarse en la célula.

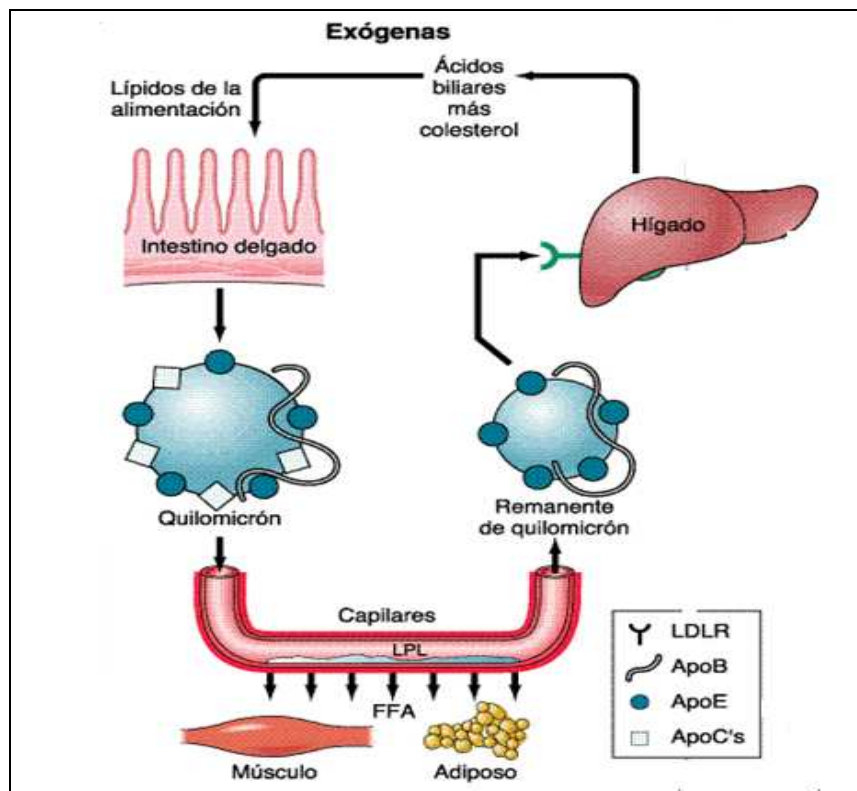
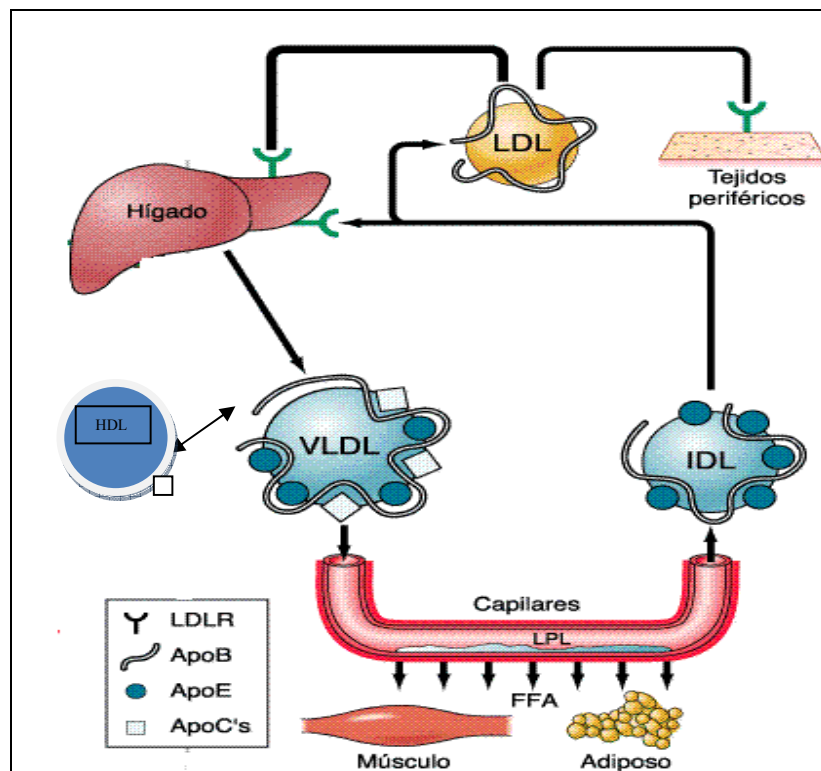


Figura 4: Metabolismo del Quilomicrón

## 2.2 Vía endógena (metabolismo de VLDL)

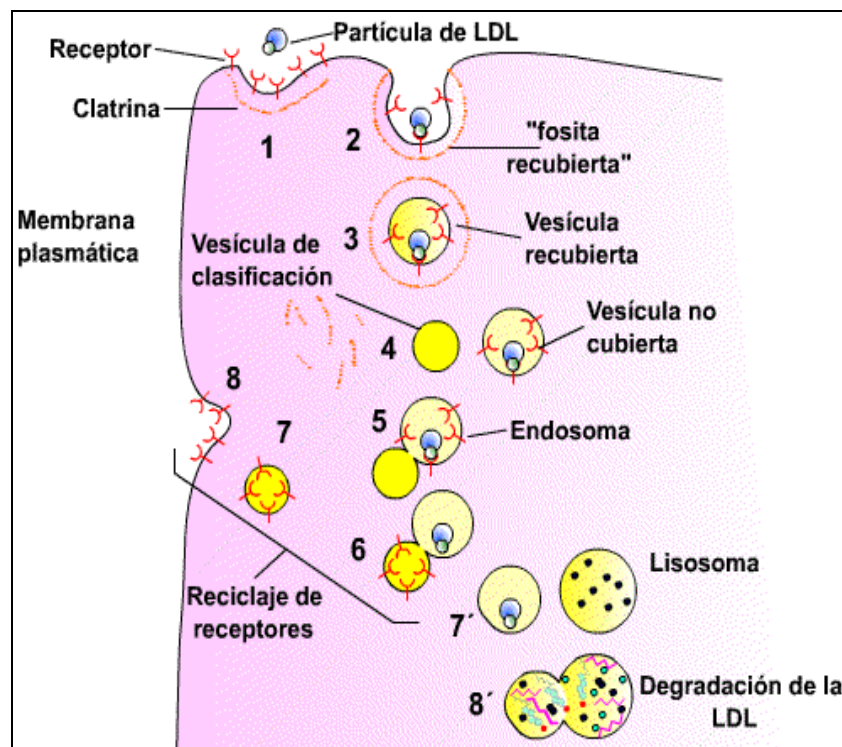
Esta vía representa la secreción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en ingles). La apolipoproteína B-100 (sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso) se asocia a fosfolípidos y triglicéridos sintetizados por el hígado, posteriormente se unen el resto de fosfolípidos y colesterol formando las VLDL. El empaquetamiento se inicia en el retículo endoplásmico liso y culmina en el aparato de Golgi, en esta etapa se requiere la acción de la proteína de transporte microsomal.



**Figura 5: Vía endógena (metabolismo de VLDL)**

En el plasma, las VLDL adquieren múltiples copias de apoE y apolipoproteínas de la serie C, los triglicéridos de VLDL son hidrolizados (Figura 5) por la lipasa lipoproteica (LPL) que está anclada al endotelio capilar en músculo y tejido adiposo; esta hidrólisis da como resultado las lipoproteína de densidad intermedia (IDL por sus siglas en

ingles), que son lipoproteínas de menor tamaño. Las IDL pueden: 1) ser depuradas por el hígado gracias a la interacción de la apoE con el receptor para apoE presente en el hepatocito y 2) ser subsecuentemente hidrolizadas por la lipasa hepática (LH), presente en la superficie del hepatocito, y formar las lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en ingles), partículas mucho más pequeñas que solo tienen apo-B100.



**Figura 6: Captación de LDL por el receptor**

Las LDL pueden ser depuradas por tejidos extrahepáticos vía receptor LDL (rLDL) o por el hepatocito, donde ocurre una endocitosis y en el endosoma se lleva a cabo un reciclaje de receptores (Figura 6). Ya en el lisosoma la apo-B100 es hidrolizada hasta aminoácidos y el colesterol libre se puede utilizar para síntesis de hormonas, ácidos biliares y membrana celular; o puede ser esterificado por medio de la enzima ACAT (acil colesterol aciltransferasa) y almacenarse; este aumento en la concentración

intracelular de colesterol inhibe la actividad de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (HMG- CoA reductasa), enzima encargada de la síntesis de colesterol endógeno. El hígado es el principal sitio de depuración de las LDL.

### 2.3 Transporte reverso del colesterol (metabolismo de HDL)

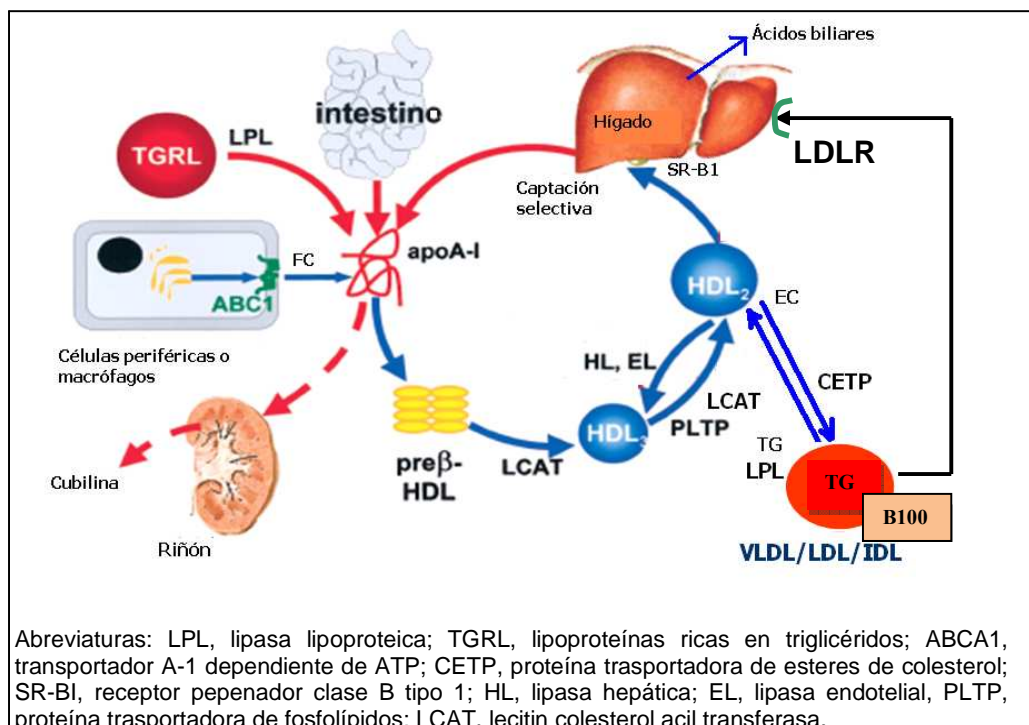
El metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en ingles) es complejo e involucra la síntesis y secreción de los componentes proteicos importantes de las HDL, seguido de una adquisición de lípidos extracelulares (fosfolípidos y colesterol) y el ensamblaje y generación de las partículas HDL.

El hígado y el intestino sintetizan apoA-I, inmediatamente después esta apolipoproteína adquiere lípidos y colesterol a través de un mecanismo regulado por un transportador de membrana dependiente de ATP (receptor ABCA1) vía eflujo de colesterol, este es el primer paso del transporte reverso del colesterol (TRC), y da lugar a HDL nacientes o HDL pre $\beta$  (Figura 7). Se ha sugerido que apoA-I se une al receptor de superficie celular por señales de transducción y que esta unión facilita la translocación de colesterol desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática. El colesterol adquirido es esterificado por acción de la lecitin colesterol acil transferasa (LCAT), en consecuencia las partículas aumentan su tamaño y se vuelven esféricas, generando las HDL<sub>3</sub>, estas pueden seguir enriqueciéndose de colesterol y esterificandolo para formar las HDL<sub>2</sub> las cuales además sufren una remodelación vía fusión de la partícula con otras HDL y transferencia de remanentes de superficie (fosfolípidos) por medio de la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP).

Las HDL<sub>2</sub> pueden ser convertidas a HDL<sub>3</sub> pequeñas por medio de la transferencia de ésteres de colesterol vía CETP desde HDL a lipoproteínas que contienen

apolipoproteína B (apoB). Los lípidos y proteínas de las HDL son removidas de circulación por medio de dos vías directas que involucran: 1) la captación selectiva de lípidos por el receptor pepenador clase B tipo 1 (SR-B1 por sus siglas en ingles) presente en hígado y órganos esteroideogénicos y 2) la captación de apoA1 y apoE por su receptor; y dos vías indirectas que involucran la acción de la CETP, lipasa hepática, y la lipasa endotelial.

La conversión de HDL<sub>2</sub> a HDL<sub>3</sub> mediada por la LH, y la conversión de HDL<sub>3</sub> a HDL<sub>2</sub> mediada por LCAT y PLTP liberan apoA-I pobre en lípidos. Una parte de esta apoA-I puede servir de aceptor de lípidos y generar HDL, mientras otra es depurada por el riñón en el lumen del túbulo proximal mediante el receptor cubilina-megalina.



**Figura 7: Metabolismo de HDL**

Existen otras enzimas involucradas en el metabolismo de las HDL, como la lipasa lipoproteica (LPL) que hidroliza triglicéridos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos

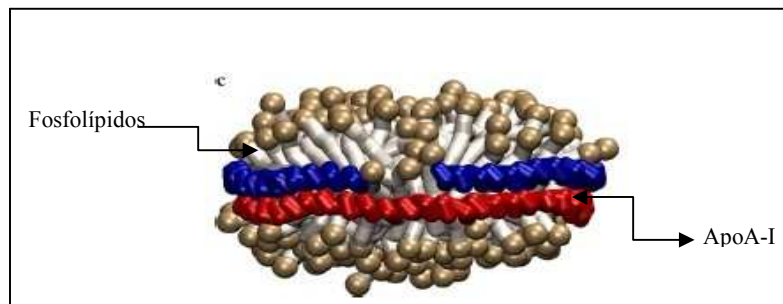


(VLDL y LDL), la *lipasa hepática* (LH) enzima que hidroliza triglicéridos y fosfolípidos en HDL, VLDL y LDL dando como resultado partículas pequeñas y densas, y la *lipasa endotelial* (LE) que hidroliza fosfolípidos en HDL.

### CAPITULO 3: LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDAD

#### 3.1 Estructura y composición de las HDL

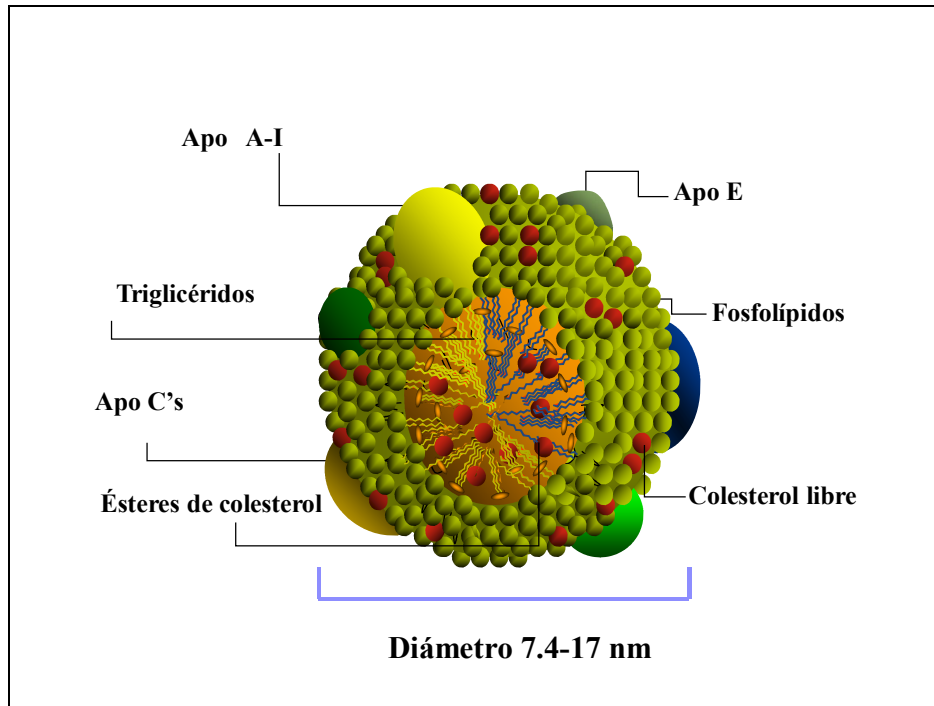
Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son complejos macromoleculares heterogéneos que se caracterizan por su tamaño pequeño (7.4-17nm) y alta densidad ( $1.063 < d < 1.21$  g/ml). Las HDL pueden clasificarse por su forma, composición proteica y tamaño. Las HDL discoides o nacientes (Figura 8); son partículas pequeñas sintetizadas por el hígado o por el intestino; dos moléculas de ApoA-I adoptan una orientación llamada “doble cinturón” alrededor de una monocapa constituida de fosfolípidos y colesterol libre.



**Figura 8: Estructura tridimensional de la HDL discoide**

La forma esférica o madura de las HDL (Figura 9), contienen un centro hidrofóbico de ésteres de colesterol y pequeñas cantidades de triglicéridos (TG), recubierta por una capa anfipática exterior de colesterol libre, fosfolípidos y varias apolipoproteínas (apos).

Sus principales apos son la apoA-I y la apoA-II, pero también contiene apoA-IV, ApoA-V, apoC (I, II, III), apoE, apoD, apoH, apoJ y apoM.



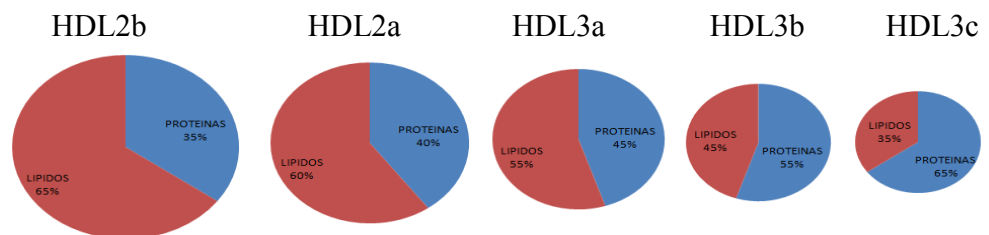
**Figura 9: Estructura de la HDL esférica**

Además de las apo's, las HDL tienen enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos como: lecitina colina aciltransferasa (LCAT), proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP), paraoxonasa 1 (PON), glutatión seleno peroxidasa (GSPx), amiloide A sérico (ASS), acetil-hidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH).

### 3.2 Subpoblaciones de HDL

Como se ha descrito previamente, a lo largo del transporte reverso de colesterol, las partículas HDL son remodeladas constantemente originando varias subpoblaciones, que difieren en cuanto a propiedades fisicoquímicas, metabolismo y actividad biológica.

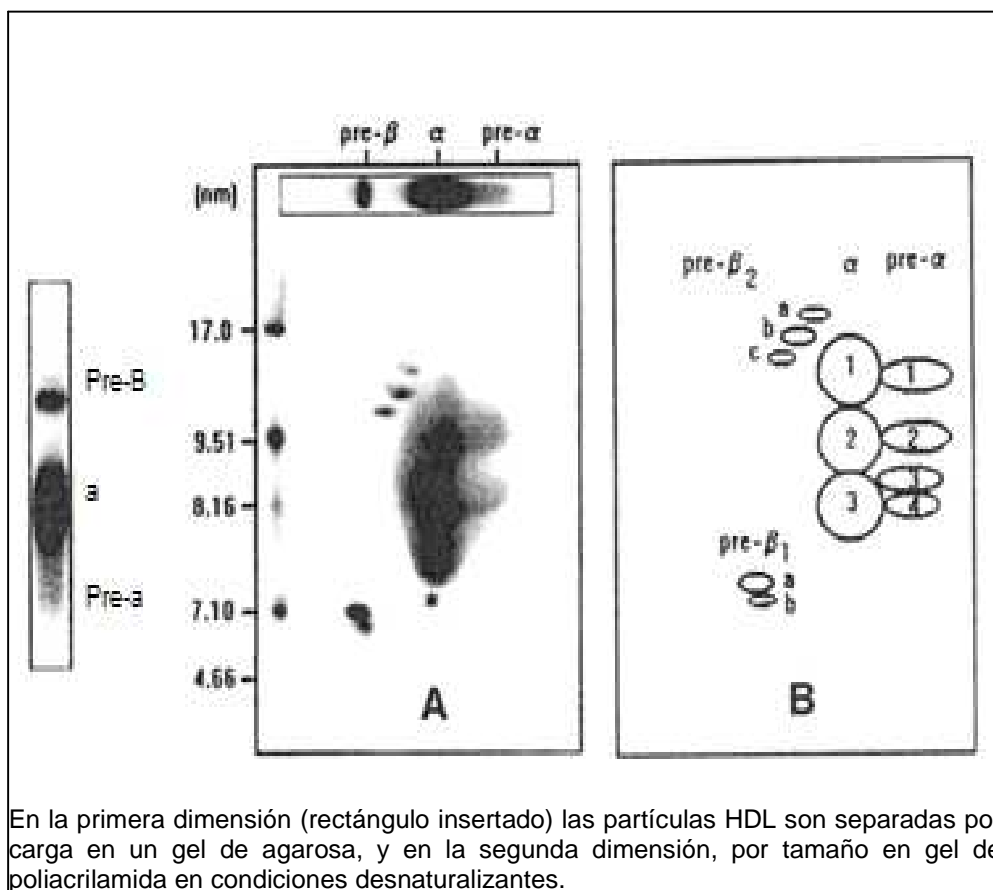
Separadas por ultracentrifugación se obtienen dos subfracciones: HDL<sub>2</sub> (d 1.063-1.125 g/ml) y HDL<sub>3</sub> (d 1.125-1.21 g/ml), cuando se utiliza la electroforesis en gradiente de gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes las HDL se separan en 5 distintas subpoblaciones (Figura 10): HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> las cuales van disminuyendo en tamaño.



<b>Diámetro (nm)</b>	<b>10.4</b>	<b>10.3</b>	<b>9.9</b>	<b>8.0</b>	<b>7.3</b>
<b>Densidad (g/ml)</b>	<b>1.099</b>	<b>1.107</b>	<b>1.123</b>	<b>1,155</b>	<b>1,186</b>
<b>M<sub>r</sub> (kDa)</b>	<b>410</b>	<b>400</b>	<b>360</b>	<b>200</b>	<b>160</b>
<b>Niveles en plasma (uM)</b>	<b>1.7</b>	<b>1.8</b>	<b>1.9</b>	<b>1.3</b>	<b>1.0</b>
<b><u>Apolipoproteínas</u></b> <b><u>mol/molHDL</u></b>					
<b>ApoA-I</b>	<b>4-5</b>	<b>4</b>	<b>3-4</b>	<b>3</b>	<b>2-3</b>
<b>Otras</b>	<b>≤2</b>	<b>≤2</b>	<b>≤2</b>	<b>1</b>	<b>≤1</b>
<b><u>Lípidos de superficie</u></b> <b><u>mol/molHDL</u></b>					
<b>Fosfolípidos</b>	<b>130</b>	<b>140</b>	<b>120</b>	<b>45</b>	<b>25</b>
<b>Colesterol libre</b>	<b>70</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>10</b>
<b><u>Lípidos del centro</u></b> <b><u>mol/molHDL</u></b>					
<b>Esteres de colesterol</b>	<b>180</b>	<b>160</b>	<b>140</b>	<b>70</b>	<b>40</b>
<b>Triglicéridos</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>155</b>	<b>10</b>	<b>5</b>

**Figura 10. Subpoblaciones de HDL**

Cuando se usa la electroforesis en dos dimensiones (Figura 11) se obtienen 8 subpoblaciones: pre- $\beta_3$ HDL, pre- $\beta_2$ HDL, pre- $\beta_1$ HDL,  $\alpha_3$ -HDL y  $\alpha_2$ -HDL, pre- $\alpha_1$ HDL, pre- $\alpha_2$ HDL y pre- $\alpha_3$ HDL. Por métodos inmunológicos, de acuerdo a la composición de apolipoproteína A1, se dividen en las que contienen solo apoA-I ( LpA-I) y las que contienen ambas apoA-I y apoA-II (LpA-I/LpA-II); mientras que por electroforesis en gel de agarosa se observan solo 2 subpoblaciones  $\alpha$ -HDL, Pre- $\beta$ -HDL.



**Figura 11. Electroforesis en dos dimensiones**

## **CAPITULO 4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LA HDL**

El efecto ateroprotector de las HDL contra la aterosclerosis está mediado por varios mecanismos: 1) Eflujo de colesterol 2) Actividad antioxidante 3) Actividad antiinflamatoria y 4) Actividad antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombótica y anti-infecciosa. El transporte reverso del colesterol (TRC), es quizá la actividad ateroprotectora más importante de las HDL; en este proceso el exceso de colesterol presente en los tejidos periféricos es removido y transportado por las HDL hacia el hígado, órgano en el que es reutilizado o excretado en la bilis.

### *4.1 Eflujo de colesterol*

Como se menciona anteriormente, el eflujo de colesterol es el primer paso del TRC y además es la propiedad ateroprotectora de las HDL que más se ha estudiado, involucra la captación de colesterol desde macrófagos o células vasculares formando las pre- $\beta$  HDL; esta vía está mediada principalmente por ABCA1 y su interacción con apo-AI, pero también puede ocurrir, vía receptor SR-B1, o vía difusión pasiva a las partículas HDL. Existen otros transportadores ABC regulados por otros esteroides, entre los que se encuentran ABCG1 y ABCG4 los cuales están involucrados en eflujo de colesterol desde macrófagos a partículas HDL maduras (HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>2b</sub>).

La apoA-I libre de lípidos, apoA-II, apoA-IV, apoC, apoE y péptidos sintéticos anfipáticos sin secuencia homóloga de estas apolipoproteínas pueden realizar un eflujo de fosfolípidos y colesterol que es rápido, saturable, unidireccional, independiente de LCAT y eficiente en reducción de contenido de ésteres de colesterol citosólico.

El eflujo de lípidos mediado por apolipoproteínas involucra interacciones específicas con proteínas de la membrana plasmática, desorción de lípidos de la membrana desde la caveola y lipidación de apolipoproteínas libres de lípidos.

En contraste a las apolipoproteínas libre de lípidos, las partículas HDL que contienen lípidos inducen ambas formas de eflujo de colesterol: específico y no específico. El eflujo de colesterol no específico puede ser también mediado por vesículas de fosfolípidos, ciclodextrinas sintéticas, albumina o partículas HDL parcialmente hidrolizadas; este es lento, no saturable, bidireccional y ocurre por difusión acuosa.

Se ha sugerido que la unión de HDL al SR-B1 facilita el flujo bidireccional entre HDL y la membrana plasmática por reorganización de lípidos dentro de dominios de la caveola ricos en colesterol dentro de la membrana plasmática.

#### 4.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las HDL es típicamente observada como inhibición de la oxidación de las LDL por HDL; se creó que las LDL representan el blanco fisiológico importante de la acción antioxidante de las HDL *in vivo*; inhibiendo la acumulación de varios productos de oxidación en LDL, incluyendo fosfolípidos oxidados y aldehídos de cadena corta.

La actividad antioxidante de HDL está relacionada a la presencia de varias apolipoproteínas y enzimas con propiedades antioxidantes; las apolipoproteínas que poseen actividad antioxidante incluyen apoA-I, apoE, apoJ, y apoA-IV. Parece ser que el componente importante de la actividad antioxidante de las HDL puede ser atribuida a apoA-I ya que esta puede prevenir y/o retrasar la oxidación de las LDL removiendo fosfolípidos oxidados desde las LDL y células de la pared arterial.

Entre las enzimas más importantes con actividad antioxidante se encuentran: paraoxonasa 1 (PON 1), acetil-hidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH), LCAT y glutatión seleno peroxidasa (GSPx). PON1 es una enzima calcio dependiente, su potencial antiaterogénico esta dado por su capacidad de hidrolizar lípidos oxidados, fosfolípidos y ésteres de colesterol hidroperoxidados (CEOOH) lo que limita su acumulación en las LDL y previene la oxidación de las LDL.

PAF-AH y LCAT pueden también hidrolizar fosfolípidos oxidados de cadena corta de las LDL; GSPx puede reducir lípidos hidroxiperoxidados (LOOH) y de este modo destoxificar al organismo. La actividad antioxidante de las subfracciones de HDL aisladas por ultracentrifugación incrementa a medida que incrementa su densidad en el siguiente orden: HDL<sub>2b</sub> < HDL<sub>2a</sub> < HDL<sub>3a</sub> < HDL<sub>3b</sub> < HDL<sub>3c</sub>, de ese modo se establece que son las HDL pequeñas y densas las encargadas de la protección de las LDL contra el estrés oxidativo.

#### 4.3 Actividad antiinflamatoria

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico caracterizado por acumulación de linfocitos T en la intima arterial y un incremento en la concentración plasmática de varios marcadores de inflamación. Las células endoteliales expresan varias proteínas de adhesión incluyendo: molécula de adhesión vascular tipo I (VCAM), molécula de adhesión intracelular tipo I (ICAM), E-selectina y P-selectina inducidas por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1(IL-1). La habilidad de las HDL para inhibir la expresión de las moléculas de adhesión puede estar relacionada a la presencia de apoA-I, apoA-II y apoA-IV y/o distintas especies de fosfolípidos, incluyendo la esfingosina-1-fosfato (S1P) y esfingosilfosforilcolina. La acción

antiinflamatoria de las HDL involucra inhibición de TNF- $\alpha$  que estimula la activación de la esfingosina cinasa y producción de SP1, el cual induce la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales. Varios estudios en animales han mostrado disminución de expresión de ICAM *in vivo*, mediada por HDL. La elevación de la concentración plasmática de HDL por sobreexpresión de apoA-I en ratones deficientes de apoE, un modelo animal de aterosclerosis humana, inhibe significativamente la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y el reclutamiento de monocitos dentro de la pared arterial. La infusión de HDLs inhibe la expresión de E-selectina inducida por IL-1 en un modelo porcino de inflamación aguda, y disminuye la expresión de ICAM y P-selectina en un modelo de rata de shock hemorrágico.

#### 4.4 Actividad antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombótica y anti-infecciosa

Las HDL inhiben la apoptosis, inducida por LDLox o TNF- $\alpha$ , en células endoteliales en forma paralela a la disminución de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminución de los niveles de marcadores apoptóticos,<sup>[Error! Marcador no definido]</sup> sugiriendo que esta actividad puede estar relacionada a la acción antioxidante de las HDL per se o a la de sus componentes. Las HDL contienen SP1, un potente agente antiapoptótico. El SP1 puede modular el efecto antiapoptótico de las HDL mediante el incremento de la producción de óxido nítrico; se ha sugerido que son las HDL pequeñas y densas las que inhiben la apoptosis, inducida por las LDLox, en células endoteliales. La actividad vasodilatadora de las HDL parece estar relacionada a la estimulación de la liberación de óxido nítrico (NO) por las células endoteliales, mediada por movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup> y fosforilación de la óxido nítrico sintetasa (NOS por sus siglas en



ingles) debido a la interacción con apoA-I. Además las HDL pueden estimular la producción de prostaciclina, las cuales poseen potente actividad vasorelajante, inhiben la activación plaquetaria y disminuyen la liberación de factores de crecimiento, los efectos vasoactivos de las HDL pueden además estar mediados por SP1 vía el receptor de lisofosfolípidos (S1P3).

La actividad antitrombótica de las HDL parece radicar en su capacidad para inhibir los factores que promueven la coagulación sanguínea, incluyendo factor tisular, factor X, Va y VIIIa. Este efecto puede estar relacionado a la presencia de cardiolipina y fosfatidil dietanolamina, dos fosfolípidos aniónicos con potentes propiedades anticoagulantes que se encuentran enriquecidos en la fracción de las HDL. Las HDL también incrementan la actividad anticoagulante de la proteína C activada y la proteína S, se ha observado que la infusión de HDLs en voluntarios humanos limita el estado procoagulante asociado con endotoxemia. Lo anterior apoya el concepto de que las HDL pueden ejercer un efecto anticoagulante *in vivo* en humanos.

Finalmente, las HDL pueden jugar un papel importante en la unión y depuración de las endotoxinas circulantes hacia la bilis, de este modo inhiben la activación celular inducida por endotoxinas, dando como resultado una potente actividad anti infecciosa. La inactivación de endotoxinas por HDL, es mediada por interacción directa con apoA-I e involucra como paso clave la reducción en la expresión del receptor para lipopolisacárido CD14 en monocitos.

Como resultado de las acciones ateroprotectoras de las HDL, se mantiene la integridad endotelial, facilita la relajación vascular, inhibe la adhesión de células sanguíneas al endotelio, reduce la agregación plaquetaria y la coagulación, y se favorece la fibrinólisis.

Más aún, las HDL poseen el potencial de prevenir y también de corregir la disfunción endotelial, considerada como el factor clave en la patogenia de la aterosclerosis.

## **CAPITULO 5: HDL Y ATEROSCLEROSIS**

### *5.1 Epidemiología de la aterosclerosis*

La mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) en México tiene una tendencia creciente; el incremento en la tasa fue de 2.1 a 69 por 100 000 habitantes, de 1950 al 2000; se prevé que para el 2020 la ECV provocará 25 millones de muertes anuales. En el distrito federal, la ECV ocupa la tercera causa de muerte en los sujetos mayores de 15 años.

La aterosclerosis es la responsable en la mayoría de los casos de enfermedad cardiovascular, es la principal causa de morbilidad y mortalidad en la mayoría de los países occidentales; inclusive en el nuestro, manifestándose de varias formas como: enfermedad arterial coronaria (EAC) o síndromes isquémicos coronarios, eventos vasculares cerebrales y enfermedad arterial periférica.<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup> La expresión como infarto agudo al miocardio (IAM) de la EAC ocasiona más de 200 000 muertes anuales, de las cuales 50% ocurren en la primera hora de iniciados los síntomas, antes de llegar a un servicio médico, lo que refleja la alta prevalencia de muerte súbita en la población de riesgo. Como se mencionó anteriormente, la aterosclerosis es una enfermedad con componente inflamatorio, en la que participan diferentes elementos que promueven su evolución y progreso. A estos elementos se les conoce como factores de riesgo cardiovascular y entre ellos se encuentran: hipertensión arterial, tabaquismo, obesidad, dislipidemias y diabetes mellitus. El estudio

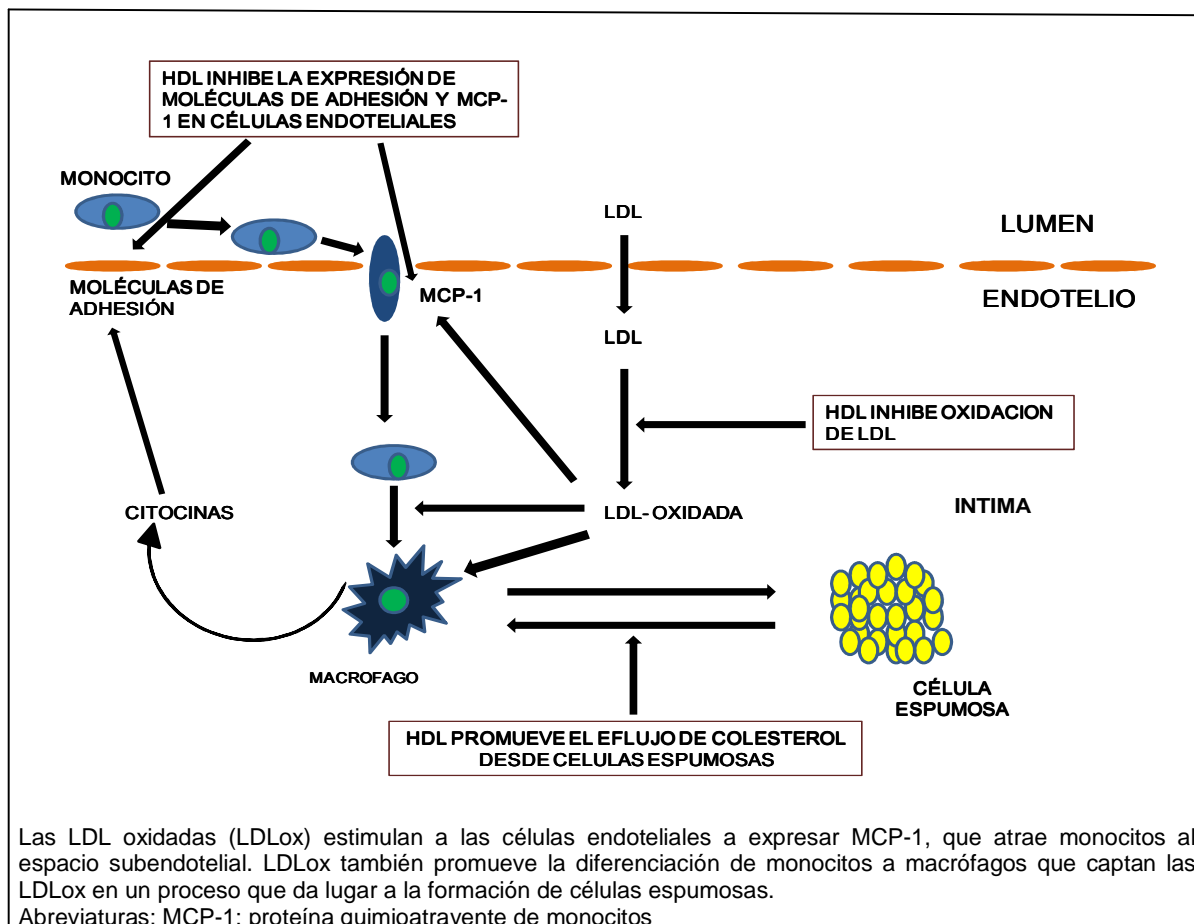
INTERHEART sugiere que factores de riesgo cardiovascular modificables predicen aproximadamente el 90% de los episodios cardiovasculares.

## 5.2 Formación de la placa ateromatosa

Estudios prospectivos epidemiológicos han mostrado que, niveles bajos de colesterol de HDL (C-HDL) representan un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria; el desequilibrio entre concentraciones circulantes de lipoproteínas aterogénicas (VLDL, LDL, IDL) y las HDL, se asocia con disfunción endotelial. Las alteraciones en la fisiología endotelial se han involucrado tanto en la aterosclerosis temprana como en la progresión de la enfermedad.

El estrés oxidativo favorece los factores pro-oxidantes sobre los factores antioxidantes, provoca una mayor formación de radicales libres y la activación de citocinas, dando lugar a la disminución de la vaso-relajación dependiente de endotelio. La disfunción endotelial (Figura 12) aumenta la permeabilidad de la pared de los vasos, favoreciendo una mayor penetración de las LDL en la pared vascular. En el espacio subendotelial existe un ambiente menos protector, por lo que las lipoproteínas son significativamente más vulnerables a la oxidación. La susceptibilidad a la oxidación de los componentes de la LDL varía de uno a otro y depende tanto de los oxidantes presentes como de la concentración, duración y condiciones de exposición. Cuando la Apo B-100 no ha sido modificada, la lipoproteína se denomina LDL mínimamente oxidada (LDL-MM) y puede contener pequeñas cantidades de antioxidantes. Las LDL-MM activan al factor nuclear kappa B (NF-kB) favoreciendo la expresión de moléculas de adhesión y de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-I) que provocan la entrada de más monocitos en la pared de los vasos. En el espacio subendotelial los monocitos se diferencian a

macrófagos y captan LDL oxidadas; debido a que no existe regulación a la baja de sus receptores, seguirán captando LDL oxidadas hasta diferenciarse a células espumosas. Estas células mueren y liberan lípidos que forman el núcleo de la placa ateromatosa. Las células del músculo liso, también secretan factores de crecimiento, y cubren el núcleo ateromatoso produciendo proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos), que formando la cubierta fibrosa.<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup> Se considera que la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad contribuye al inicio y progresión de la aterosclerosis.



**Figura 12. Formación de la placa ateromatosa y propiedades aterogénicas de las HDL.**

### 5.3 Alteraciones de HDL en la aterosclerosis

Como ya se mencionó, las HDL son un grupo de partículas heterogéneas en tamaño y otras características que pueden modificar su función, así como su utilidad como marcadores de riesgo para enfermedad arterial coronaria (EAC). Desde hace varias décadas, los estudios epidemiológicos han mostrado que las concentraciones bajas del C-HDL constituyen un factor de riesgo importante e independiente de EAC. En varios estudios se ha encontrado que los sujetos con hipoalfalipoproteinemia (HA) (C-HDL < 40 mg/dL) combinada con hipertrigliceridemia (HTG) (Triglicéridos (TG) >150mg/dL) tiene una distribución alterada de las subpoblaciones de HDL, que se caracteriza por el aumento de las HDL pequeñas ( $\alpha$ -3 y pre  $\beta$ -1) y disminución de las HDL grandes ( $\alpha$ -1). Lo interesante de este hallazgo, es la observación de que los cambios en la distribución de las subclases de las HDL son de mayor utilidad que las concentraciones de C-HDL, en la predicción de eventos coronarios en pacientes con EAC y C-HDL bajo (<40mg/dl). Más aún, también se ha informado que las HDL de estos sujetos tienen composición lipídica alterada, están enriquecidas en TG y disminuidas en ésteres de colesterol (EC). Esta composición anormal se asocia a reducción de sus efectos antioxidante, antiinflamatorio y a menor capacidad para promover el eflujo de colesterol, lo que puede disminuir la actividad ateroprotectora de las HDL. Además de las alteraciones en la distribución de las subpoblaciones y la composición de las HDL, las enzimas asociadas a esta lipoproteína pueden ser disfuncionales o estar disminuidas. Por otra parte, el enriquecimiento de las HDL en triglicéridos también se asocia con disminución de la actividad de la LPL, LH, LCAT o combinación de estas. Kontush y Chapman han reportado datos que muestran actividad antioxidante de las HDL deficiente,

principalmente de las partículas pequeñas y densas, en dislipidemias aterogénicas, así como síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo II.

Es ampliamente aceptado que la aterosclerosis es una condición inflamatoria crónica. El endotelio lesionado expresa proteínas que favorecen la adhesión de monocitos a la superficie endotelial antes de pasar al espacio subendotelial. Estas proteínas incluyen la molécula-1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1), la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la E-selectina. Las HDL inhiben la expresión de estas moléculas de adhesión inducida por citocinas del tipo del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Los sujetos con C-HDL bajo tienen concentraciones plasmáticas altas de ICAM-1, E-selectina y de VCAM-1.

En algunos estudios pero no en otros, <sup>Error! Marcador no definido.</sup> el eflujo de colesterol es otra de las funciones de las HDL que se ha encontrado alterada en los sujetos que cursan con anomalías del C-HDL. Se ha reportado que los sujetos con hipoalfalipoproteinemia (HA) + hipertrigliceridemia (HTG) y los sujetos con HA aislada tienen disminución significativa del eflujo de colesterol, medido tanto con la utilización de células Fu5AH como en la línea celular J744. En conjunto, los estudios mencionados muestran que los sujetos con HA+HTG se caracterizan no solo por las concentraciones bajas de C-HDL, sino también por partículas de HDL con alteraciones en su tamaño, composición química y disminución de sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y en su capacidad para promover el eflujo de colesterol. Todas estas anomalías de las HDL, pueden ser de importancia en el inicio y progresión de la aterosclerosis, así como en el riesgo residual observado en pacientes coronarios tratados con estatinas y que han logrado alcanzar valores meta de C-LDL.

### III. JUSTIFICACION

El tratamiento implicado en la regulación de lípidos en plasma ha sido controlar el colesterol de LDL (C-LDL) con el uso de estatinas, sin embargo se ha observado que aun con pacientes que alcanzan valores de C-LDL por debajo de la meta (<100mg/dl), siguen presentando un riesgo residual de 60 a 70% de eventos coronarios recurrentes. Esto pudiera estar explicado por las concentraciones bajas de C-HDL y/o altas de triglicéridos; más aún, se ha observado que más que la concentración de C-HDL son las alteraciones en las características fisicoquímicas y funcionales de las HDL las que pueden dar una idea más clara sobre el papel protector de las HDL en la aterosclerosis.

En la literatura, no existen estudios que hayan evaluado las características fisicoquímicas y funcionales de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), en pacientes con cardiopatía coronaria tratados con estatinas y niveles de C-LDL en meta (<100mg/dl) pero que tienen valores bajos de C-HDL y altos de triglicéridos. Por lo que la realización de este trabajo nos dará información de estas alteraciones en pacientes cardiópatas con C-LDL controlado.

#### IV. OBJETIVOS

Investigar en pacientes con enfermedad arterial coronaria tratados con estatinas y C-LDL en meta (<100mg/dl) pero con triglicéridos (>150mg/dl) y C-HDL (<40mg/dl) anormales (grupo HA+HTG); en pacientes con EAC tratados con estatinas y C-LDL en meta (<100mg/dl) pero con triglicéridos (<150mg/dl) y C-HDL (>40mg/dl) normales (grupo NLP) y en sujetos sanos (grupo control):

- ❖ La distribución de las subclases de las HDL.
- ❖ La composición química de las HDL: Triglicéridos (Tg), colesterol esterificado (CE), colesterol libre (CL), proteínas y fosfolípidos.
- ❖ El contenido de apolipoproteínas en las HDL.
- ❖ El eflujo de colesterol evaluado con la línea celular FU5AH.



## V. MATERIAL Y METODOS

### Población

Los pacientes (n=69) fueron seleccionados de la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología. 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 una 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 hipoalfalipoproteinemia combinada con hipertrigliceridemia (HA+HTG), incluyó 34 pacientes con C-HDL menor a 40 mg/dL y TG entre 151 y 500 mg/dL. El grupo normolipidémico (NLP) lo conformaron 35 pacientes con C-LDL en meta y valores normales de C-HDL ( $\geq 40$  mg/dL) y de triglicéridos ( $\leq 150$  mg/dL). No se incluyeron pacientes con eventos cardiovasculares agudos en los tres meses previos, insuficiencia cardíaca 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 de sujetos control sanos se formó con 20 hombres seleccionados de los donadores que acuden al banco de sangre de nuestro instituto. Se incluyeron sujetos con 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 (Anexo 1).

## **Metodología**

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 midieron el peso, la talla, la circunferencia de cintura, la frecuencia cardíaca y la presión arterial. El índice de masa corporal (IMC) se calculó con la fórmula:  $\text{peso(kg)}/\text{talla(m)}^2$ . El sobrepeso se definió como IMC de 25-29.9  $\text{kg/m}^2$ , la obesidad como  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$  y la adiposidad central como circunferencia de cintura  $\geq 90 \text{ cm}$ . En ayuno de 12 horas y transcurridos 20 minutos de reposo en posición sedente, se colectaron 15 ml de sangre venosa en tubos con EDTA y 10 ml en tubos sin aditivo. 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  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  para su análisis posterior. Los lípidos y la glucosa se midieron en muestras frescas.

## **Análisis de laboratorio**

Las determinaciones de lípidos y lipoproteínas en plasma, así como el análisis de la composición química de HDL, se realizaron en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokyo Japan), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, USA). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) se determinó mediante un método enzimático sin precipitación previa (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se estimó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long. El colesterol esterificado, contenido en las HDL, se calculó mediante la siguiente fórmula:  $CE_{HDL} = (CT_{HDL} - C_{libre\ HDL}) * 1.68$ . En nuestro laboratorio, la precisión y exactitud de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, por sus siglas en inglés). La apoproteína B (apoB) y la apoproteína A-I (apoA-I), se determinaron por inmunonefelometría (BN Pro Spec nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Ge.). Los coeficientes de variación ínter ensayo fueron inferiores al 6%.

Las subpoblaciones de HDL fueron determinadas en HDL aisladas por ultracentrifugación secuencial, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente (4% al 25%) en condiciones nativas (PAGE). Como referencia se utilizaron marcadores de alto peso molecular (Pharmacia, Piscataway, NJ) con diámetros conocidos (tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm, y albúmina 7,1 nm). Previa tinción con azul de Coomassie R250, las proporciones relativas a las diferentes subpoblaciones de HDL se cuantificaron por densitometría óptica en un densitómetro (modelo 620;

Bio-Rad, Hertfordshire, UK), que utiliza el programa de análisis molecular Bio-Rad versión 1.1. Los intervalos utilizados para las diferentes subpoblaciones fueron: HDL<sub>3c</sub> 7.21-7.76nm, HDL<sub>3b</sub> 7.76-8.17 nm, HDL<sub>3a</sub> 8.17-8.77 nm, HDL<sub>2a</sub> 8.77-9.71 nm y HDL<sub>2b</sub> 9.71-12.93 nm. Los coeficientes de variación fueron menores al 10% para todas las subpoblaciones. El tamaño promedio de la partícula de HDL está determinado por la proporción relativa de cada una de sus subclases, por lo que se obtuvo sumando el tamaño promedio (nm) de cada subfracción, multiplicado por su proporción relativa, y la suma total se dividió entre 100. El coeficiente de variación para el tamaño promedio de partícula fue menor del 1%. El contenido de apoproteínas (apos) en HDL se determinó semicuantitativamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gradiente (4-21%). Las apos fueron teñidas con azul de Coomassie e identificadas de acuerdo a su peso molecular (apo A IV 46 KD, apo E 34 KD, apo AI 28 KD, apo AII 17 KD, apo CI 8.8 KD, apo CII 6.6 KD), utilizando marcadores de peso molecular conocido (fosforilasa 97 KD, albúmina 66 KD, ovoalbúmina 45 KD, anhidrasa carbónica 30 KD, inhibidor de tripsina 20.1 KD,  $\alpha$ -lactoglobulina 14.4 KD). El porcentaje de área bajo la curva, correspondiente a cada apoproteína, se cuantificó por densitometría óptica.

El eflujo de colesterol, mediado por el receptor SR-B1, se determinó empleando células de hepatoma de rata de la línea Fu5AH de acuerdo al método descrito por de la Llera-Moya. Brevemente, las células se sembraron entre 100 000 y 200 000 células por pozo en medio mínimo esencial (MEM; GIBCO BRL) suplementado con suero fetal bovino al 5% (GIBCO BRL) y crecieron durante 2 días a 37°C en

una atmosfera de CO<sub>2</sub> y una humedad de 5%. Las células crecieron en presencia del colesterol marcado (<sup>3</sup>H-colesterol; England Nuclear) a una concentración de 5μCi/pozo por 2 días; posteriormente el medio se reemplazó por MEM con albumina sérica bovina (ASB) al 0.5% y se incubó durante 18 horas. Se retiró el MEM/ASB 0.5% y se adicionó suero humano diluido al 2.5% a las células marcadas; se incubó a 37°C por 4 horas. Al término de la incubación se retiró el medio y la monocapa de células se removió con NaOH (5N). La radiactividad se cuantificó tanto en células como en el medio, en un contador beta (Parkard).

La fracción del eflujo se calculó al dividir la cantidad de colesterol captado por el plasma del paciente (medio), entre el colesterol remanente en las células de cada pozo, multiplicándolo por 100. Cada muestra fue procesada por duplicado, y en cada ensayo se procesa un control negativo, un control positivo (HDL aisladas por precipitación), y un plasma control. En nuestro laboratorio, los coeficientes de variación intra e inter ensayo para este método fueron 3.25% y 5.30%, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS 13 para Windows (SPSS, Chicago IL). Las variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para su análisis. Los resultados se expresan como valores medios ± desviación estándar (DE) o error estándar (EE) para variables continuas; y como porcentaje para variables categóricas. Diferencias en valores medios entre los tres grupos fueron analizados por ANOVA, las

frecuencias fueron comparadas con la prueba de Chi cuadrada. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para conocer las asociaciones entre las variables. 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.

## VI. RESULTADOS

Las características clínicas de los tres grupos estudiados se muestran en la Tabla 3, los pacientes con HA+HTG se caracterizaron por tener valores más altos de circunferencia de cintura y glucosa comparados con los controles, el IMC también fue mayor en este grupo pero solo fue estadísticamente significativo comparado con el grupo NLP. En los valores medios de tensión arterial no hubo diferencia estadísticamente significativa, aunque fueron más altos en el grupo HA+HTG.

**Tabla 3. Características antropométricas, tensión arterial y glucosa estratificados por grupo 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
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	25.7 ± 3.6	25.6 ± 2.5	0.028
Cintura (cm)	95.1 ± 11.4 <sup>a</sup>	90.4 ± 9.8	88.2 ± 6.6	0.034
TAS (mmHg)	125.7 ± 24.1	123.5 ± 27.2	116.1 ± 15.1	0.393
TAD (mmHg)	79.6 ± 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	88.3 ± 8.3	0.005

Valores expresados como media ± desviación estándar.

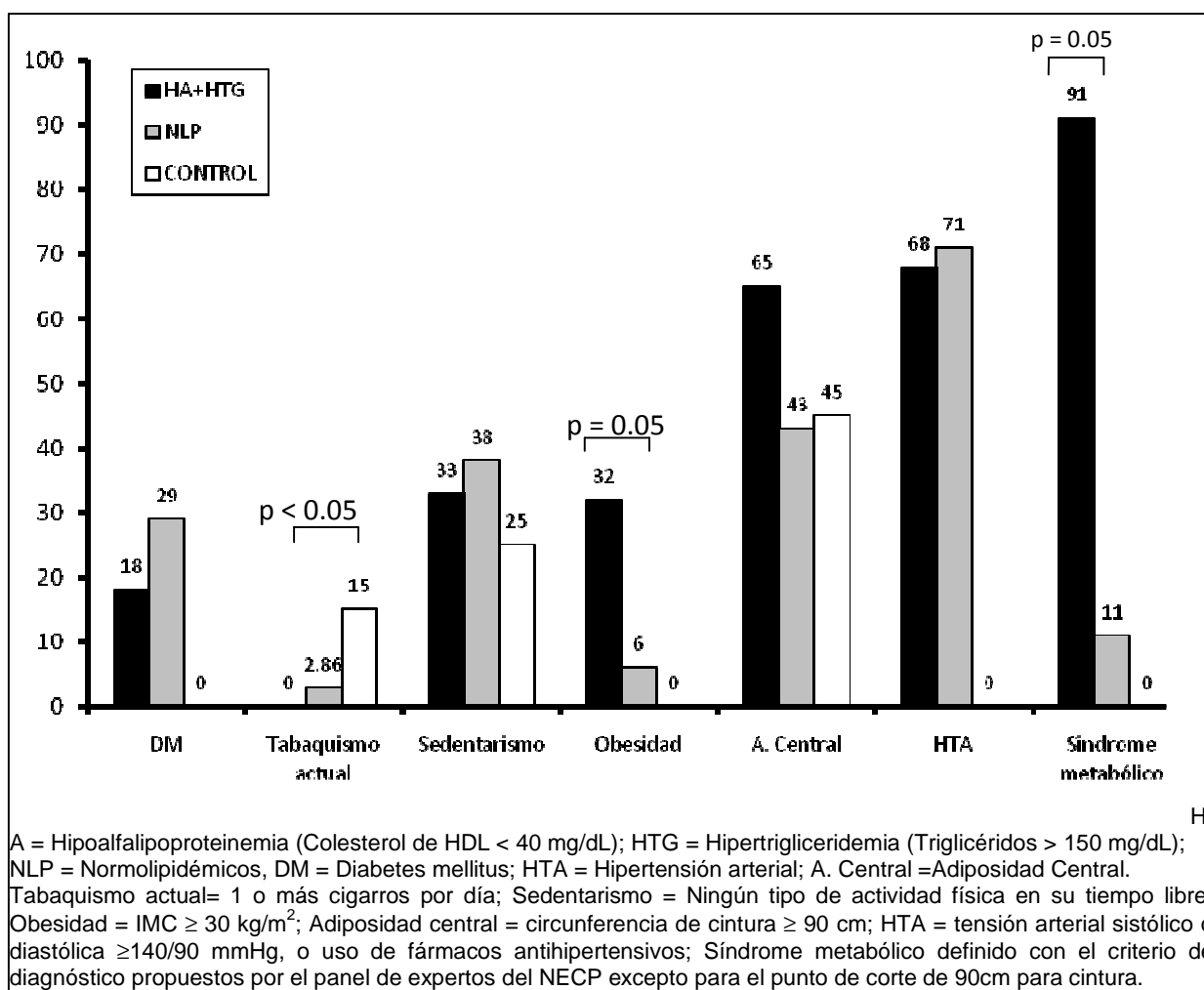
HA = Hipoalfalipoproteinemia (Colesterol de HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidemicos; IMC = Índice de masa corporal; TAS = Tensión arterial sistólica; TAD = Tensión arterial diastólica.

\*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 normolipidemicos.

El síndrome metabólico fue el factor de riesgo coronario más frecuente en el grupo HA+HTG (Figura 13), lo anterior no sorprende considerando que los valores altos de triglicéridos y bajos de C-HDL son las anomalías lipoproteicas características de éste síndrome. La obesidad, tanto general como central, se

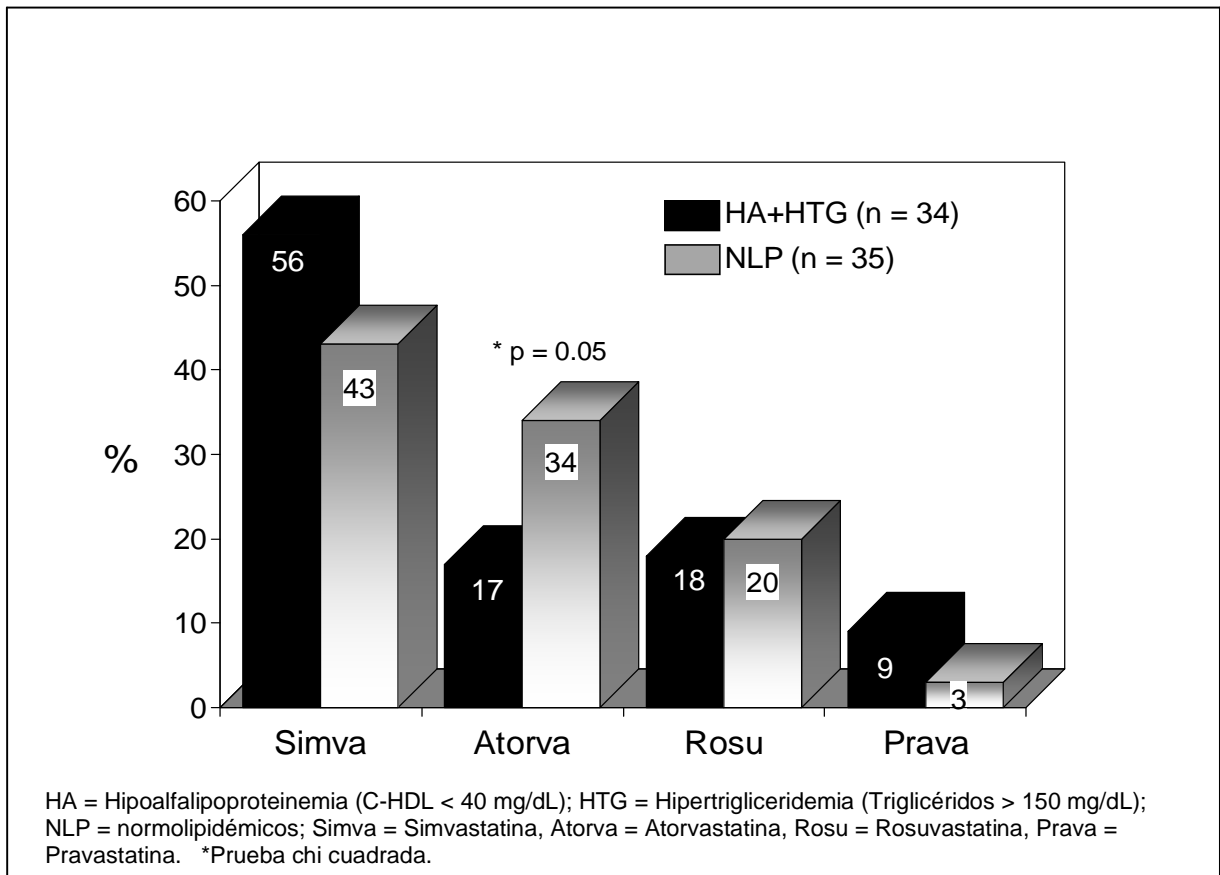
observó con mayor frecuencia en el grupo HA+HTG, sin embargo solo para la obesidad, la diferencia alcanzó significado estadístico. No se observaron diferencias con significado estadístico cuando se analizaron las frecuencias de diabetes, habito de fumar, sedentarismo e hipertensión, en los dos grupos de pacientes con enfermedad arterial coronaria.



**Figura 13. Prevalencia de factores de riesgo coronario en los 3 grupos estudiados**



Todos los pacientes incluidos en el estudio estaban en tratamiento con alguna estatina, la droga más frecuentemente utilizada fue la simvastatina (49%) seguida por la atorvastatina (23%), rosuvastatina (21%) y la pravastatina (6%) (Figura 14). Al comparar los 2 grupos, la proporción de pacientes que recibían tratamiento con atorvastatina fue más alta en el grupo NLP (34%) que en el grupo con HA+HTG (17%) con diferencia significativa ( $p=0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en las dosis utilizadas de las diferentes estatinas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de utilización de otras drogas anti-isquémicas o antihipertensivas.



**Figura 14. Estatinas utilizadas por los pacientes estudiados**

Debido al efecto del tratamiento con estatinas, los pacientes coronarios tuvieron valores significativamente más bajos de CT y C-LDL al compararlos con los controles (Tabla 4). Por diseño del estudio, el grupo HA+HTG presentó valores significativamente más altos de TG y más bajos de C-HDL que los pacientes NLP y los controles sanos (Tabla 4). 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-noHDL (<130mg/dL). En ambos grupos de pacientes coronarios de este estudio el C-noHDL se encontró en meta, pero fue significativamente más bajo en el grupo NLP al compararlo con el grupo HA+HTG. De igual forma, los índices CT/C-HDL y C-LDL/C-HDL tuvieron valores más altos en el grupo HA+HTG en comparación con los grupos NLP y control (Tabla 4).

Algunos estudios han sugerido que la cuantificación de apoA-I y apoB pueden ser de más utilidad para valorar el pronóstico de enfermedad cardiovascular que las mediciones de C-LDL y C-HDL. El tratamiento con estatinas también disminuyen la apoB circulante. Como resultado de esta acción de las estatinas, las concentraciones de apoB fueron menores en los pacientes coronarios que en el grupo de sujetos sanos, pero la diferencia fue significativa solo con el grupo NLP (Tabla 4). Las concentraciones de apoA-I fueron significativamente menores en el grupo HA+HTG en comparación con los otros dos grupos. El valor alto de la relación de apoB/apoA-I también tiene utilidad en la predicción de eventos cardiovasculares (>0.7). Los pacientes con HA+HTG tuvieron el valor más alto de

esta relación y la diferencia fue significativa con el grupo NLP que tuvo el valor más bajo.

**Tabla 4. Valores de lípidos, lipoproteínas, apolipoproteína A-I y apolipoproteína B en plasma y relación Apo B/Apo A-I de los sujetos estratificados por grupo.**

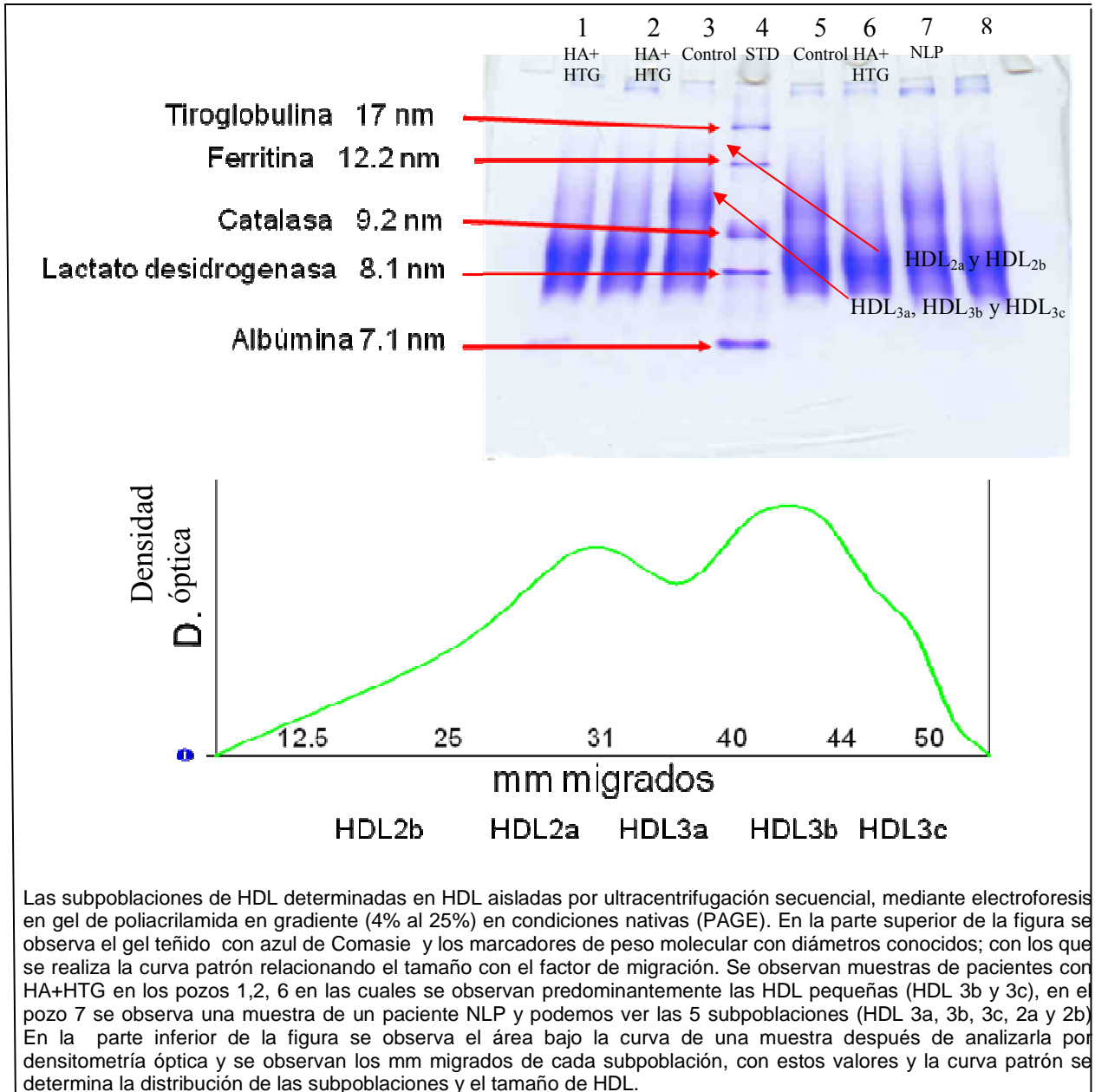
	Pacientes coronarios		Controles (n = 20)	P*
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)		
Colesterol total (mg/dL)	130.4 ± 22.5 <sup>a</sup>	129.4 ± 20.8 <sup>a</sup>	182.6 ± 33.4	<0.001
C-LDL (mg/dL)	65.1 ± 22.7 <sup>a</sup>	64.8 ± 18.7 <sup>a</sup>	107.5 ± 29.9	<0.001
C-HDL (mg/dL)	30.9 ± 4.3 <sup>a,b</sup>	48.3 ± 7.1 <sup>a</sup>	59.2 ± 17.5	<0.001
Colesterol no HDL (mg/dl)	99.5 ± 22.2 <sup>a,b</sup>	81.1 ± 19.5 <sup>a</sup>	123.4 ± 30.5	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	214.5 ± 73.5 <sup>a,b</sup>	101.2 ± 23.6	99.6 ± 26.6	<0.001
CT/C-HDL	4.3 ± 0.90 <sup>a,b</sup>	2.7 ± 0.47 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.76	<0.001
C-LDL/C-HDL	2.14 ± 0.83 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.43 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.70	<0.001
apoB (mg/dL)	76.0 ± 19.0	66.2 ± 16.7 <sup>a</sup>	81.7 ± 16.7	0.006
apoA-1 (mg/dL)	144.1 ± 18.0 <sup>ab</sup>	166.3 ± 23.3	166.5 ± 37.6	0.001
Relación apo B/apo A-I	0.53 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.13	<0.001

Valores expresados como media ± desviación estándar.

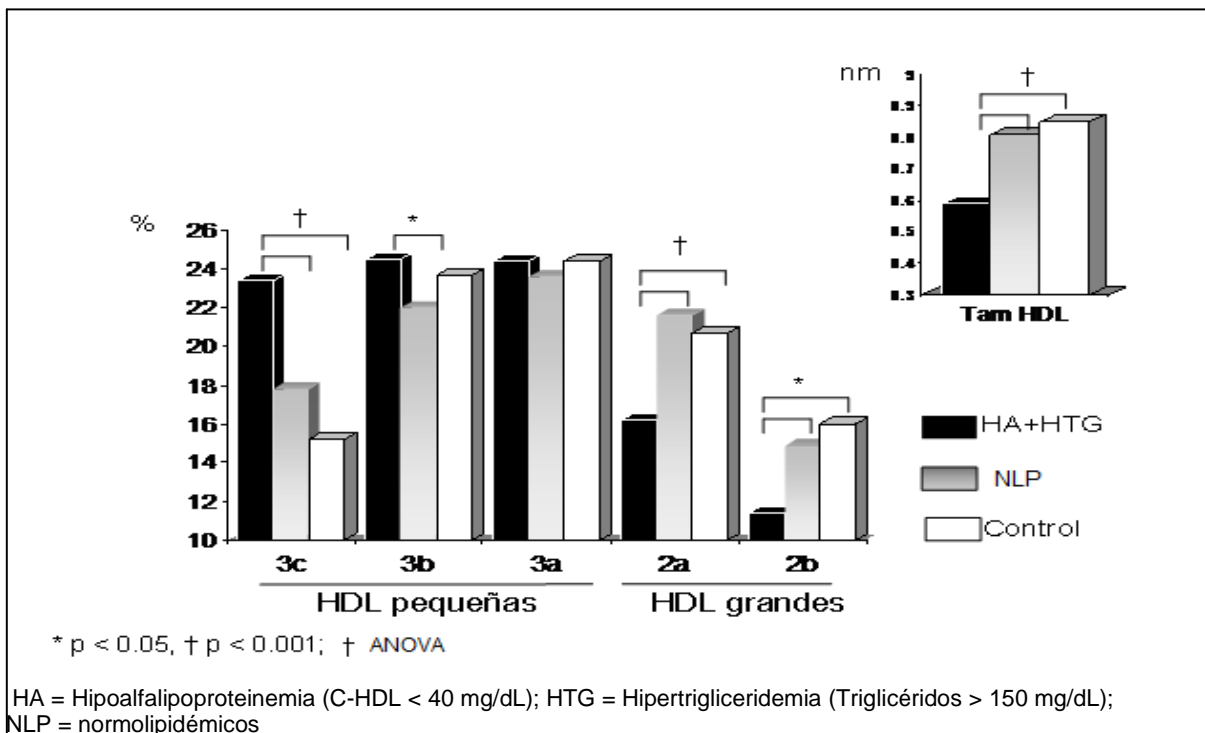
HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = normolipidémicos; C-LDL = Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; C-HDL = Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CT = Colesterol total; Apo A-1, apolipoproteína A-1; Apo B, apolipoproteína B  
\*ANOVA (Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05vs. NLP.

Como se describió en material y métodos, la distribución de las subclases de las HDL se determinó mediante electroforesis en gradiente de 4%-25%, en la Figura 15 se observa un gel representativo de las muestras de los pacientes analizado por densitometría óptica. El pozo 1, 2 y 6 representan al grupo HA+HTG, el pozo 7 al grupo NLP, el pozo 4 a un marcador de peso molecular y el pozo 5 a una muestra conocida usada como control. La Figura 16 muestra la proporción relativa de cada subclase de HDL. En comparación con los pacientes NLP y el grupo control, los pacientes con HA+HTG tuvieron proporciones significativamente más

altas de las HDL pequeñas (HDL<sub>3c</sub> y HDL<sub>3b</sub>) y proporciones más bajas de las HDL grandes (HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub>). Como consecuencia de esta distribución de subclases, el diámetro promedio de las HDL fue significativamente menor en el grupo con HA+HTG.



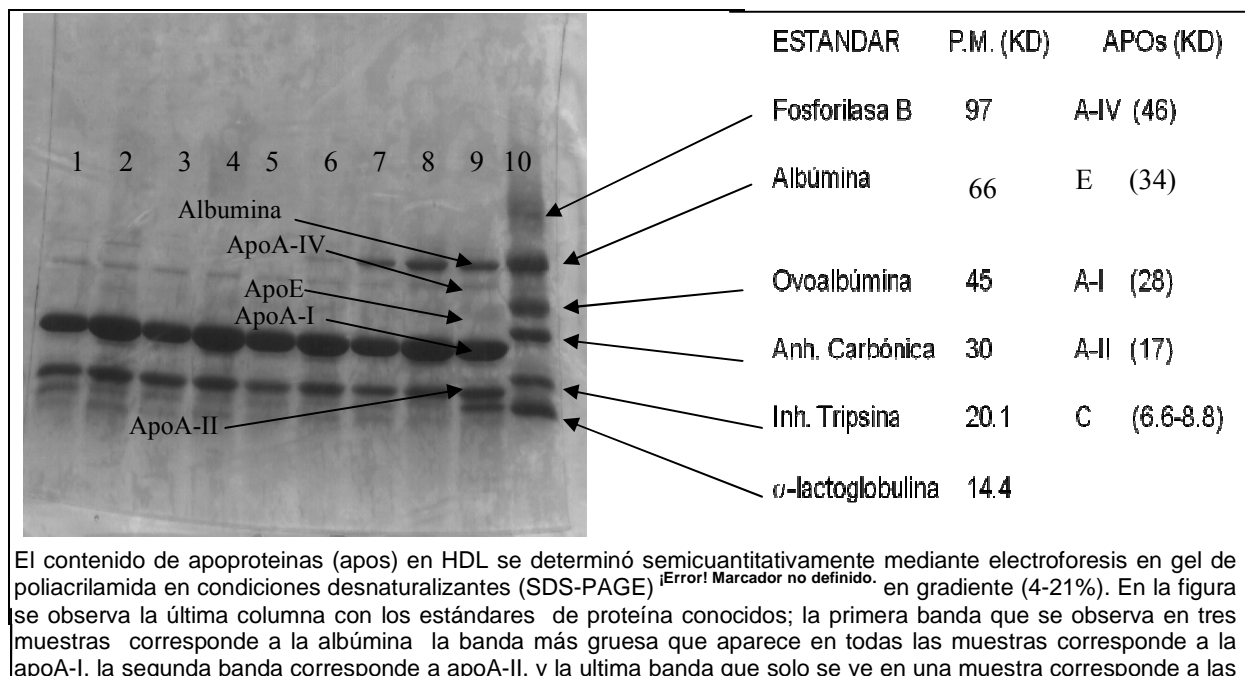
**Figura 15. Determinación de tamaños de HDL**



**Figura 16. Distribución de subclases y tamaño promedio de HDL en los tres grupos estudiados.**

Como se describió en la metodología el contenido de apoproteínas en HDL se determinó semicuantitativamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en gradiente del 4-21 %. La figura 17 muestra el contenido de apoproteínas de diferentes muestras. En el pozo 10 se colocó un estándar de proteínas de peso molecular conocido, la banda más gruesa que se observa en todas las muestras corresponde a apoA-I y la banda por debajo de esta a apoA-II, en los pozos 7,8 y 9 se observa además la albumina que es primera banda, debajo de esta se ve la apoE. La composición química y de apoproteínas de las HDL también mostró diferencias significativas entre los 3 grupos (Tabla 5). Las HDL de los pacientes HA+HTG se caracterizaron por tener

mayor proporción de triglicéridos, menor proporción de ésteres de colesterol y menor contenido de apoA-I y apoA-II.



**Figura 17. Determinación del contenido de apolipoproteínas en HDL**

**Tabla 5. Composición química, contenido de apoproteínas de HDL en los tres grupos de pacientes estudiados.**

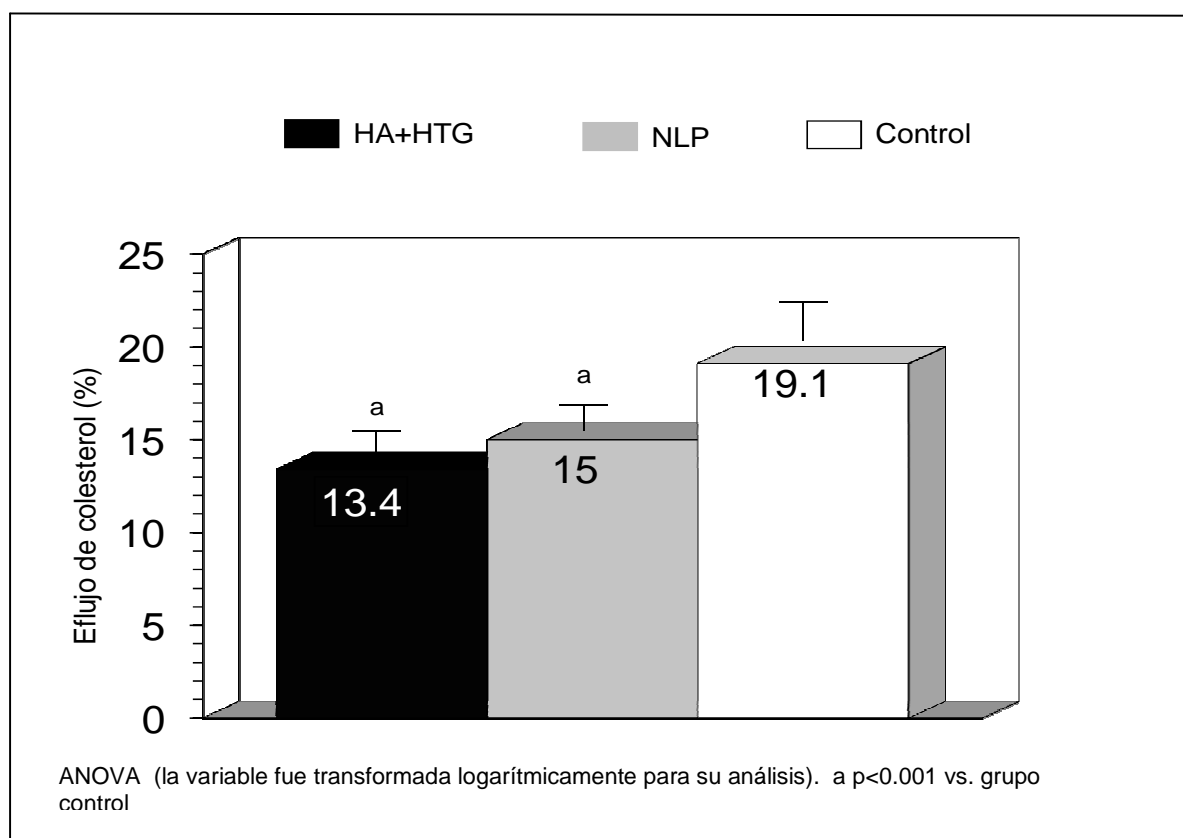
	HA + HTG (n = 34)	NLP (n = 35)	CONTROLES (n = 20)	p*
Proteínas en HDL (%)	46.6 ± 8.1	47.7 ± 6.8	44.9 ± 5.1	0.578
Triglicéridos en HDL (%)	6.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	4.1 ± 1.8	4.6 ± 6.1	0.007
CL en HDL (%)	3.7 ± 0.8	3.9 ± 0.8	3.6 ± 0.5	0.330
CE en HDL (%)	16.9 ± 3.8 <sup>a</sup>	17.8 ± 3.4	19.2 ± 2.2	0.045
Fosfolípidos en HDL (%)	26.6 ± 4.4	26.4 ± 3.3	26.9 ± 2.1	0.814
Apo AIV en HDL (%)	4.5 ± 1.2	4.6 ± 1.1	4.7 ± 1.3	0.765
Apo E en HDL (%)	7.4 ± 1.5	7.4 ± 1.5	7.0 ± 1.3	0.455
Apo AI en HDL (%)	42.4 ± 4.9 <sup>b</sup>	46.0 ± 5.1	44.8 ± 3.6	0.009
Apo AII en HDL (%)	26.4 ± 3.1	25.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	28.3 ± 2.9	0.018

Valores expresados como media ± desviación estándar.

HA = Hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL); HTG = Hipertrigliceridemia (Triglicéridos > 150 mg/dL); NLP = Normolipidemicos; HDL = Lipoproteínas de alta densidad; CL = Colesterol libre; CE = Colesterol esterificado.

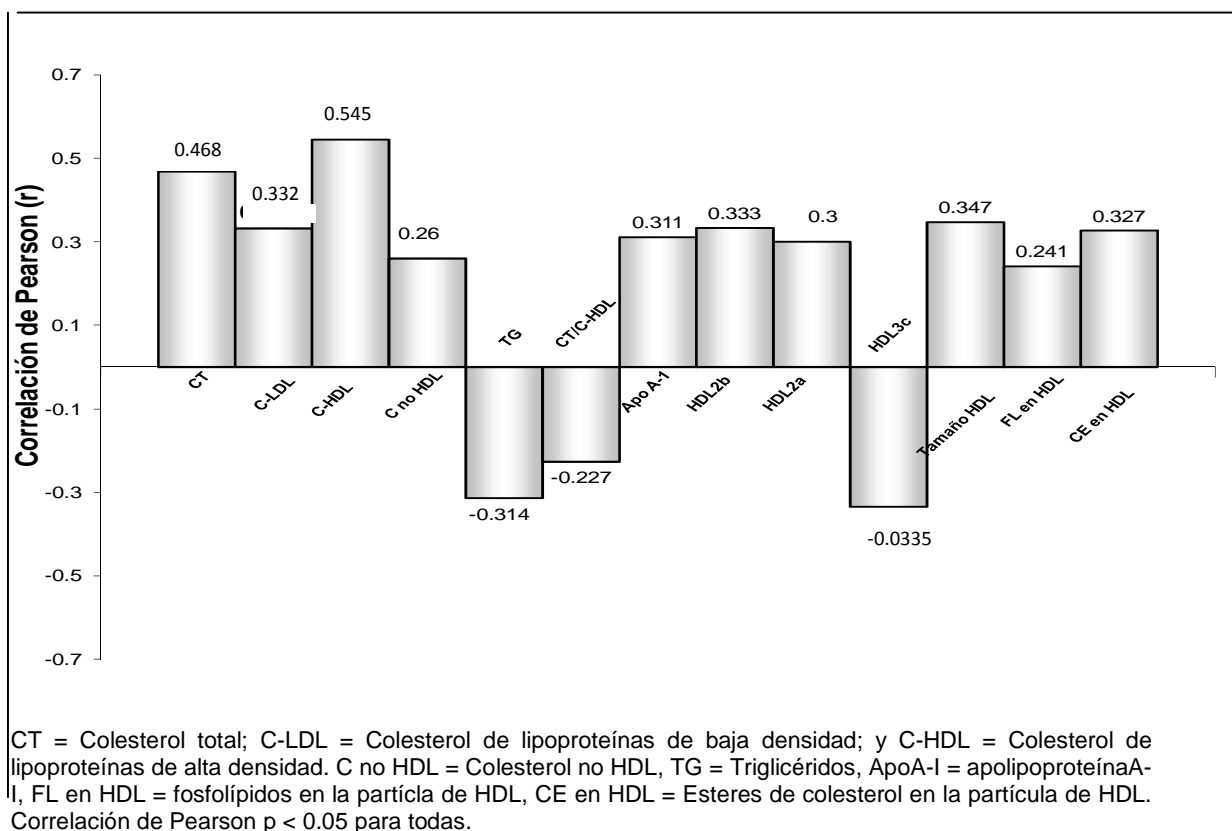
\*ANOVA (Variables con distribución asimétrica fueron transformadas logarítmicamente para el análisis). <sup>a</sup> p<0.05 vs. controles, <sup>b</sup> p<0.05vs. NLP.

La función principal de las HDL es promover el eflujo de colesterol de células extrahepáticas a través de su interacción con proteínas específicas de la membrana celular. El eflujo de colesterol hacia el plasma total de cada participante en los tres grupos estudiados, se evaluó utilizando la línea celular Fu5AH. El eflujo de colesterol más bajo se observó en los pacientes con HA+HTG, el más alto en el grupo control sano, y un valor intermedio en los pacientes del grupo NLP (Figura 18). Las diferencias fueron estadísticamente significativas al comparar los dos grupos de pacientes con el grupo de sanos. Aunque el eflujo de colesterol fue más alto en el grupo NLP que en los pacientes con HA+HTG, la diferencia no alcanzó significado estadístico.



**Figura 18. Eflujo de colesterol de células Fu5AH al plasma en los tres grupos de estudio**

En la Figura 19 se muestran los resultados del análisis de correlación simple del eflujo de colesterol con las variables clínicas y bioquímicas de los tres grupos en conjunto. Las variables con distribución asimétrica fueron transformadas a su logaritmo natural antes del análisis. La asociación del eflujo de colesterol fue positiva con colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol de no HDL, apoA-I, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, tamaño promedio de la partícula de HDL, contenido de fosfolípidos y ésteres de colesterol en la partícula de HDL. Las concentraciones de triglicéridos, el índice CT/C-HDL y las HDL<sub>3c</sub> se asociaron inversamente con el eflujo de colesterol. Todas las correlaciones tuvieron significado estadístico ( $p < 0.05$ ).



**Figura 19. Asociación del eflujo de colesterol con las variables clínicas y bioquímicas de todos los sujetos estudiados (n=89)**



Para determinar la independencia de estas asociaciones del eflujo de colesterol, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple. Como variables independientes se incluyeron en el modelo las concentraciones de los diferentes lípidos y de apoA-I, el índice CT/C-HDL, la proporción de las subpoblaciones HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>3c</sub> así como el tamaño promedio de la partícula de HDL, el contenido de fosfolípidos y ésteres de colesterol de las HDL; y como variable dependiente el eflujo de colesterol. Los resultados mostraron que el C-HDL (31.7%), el colesterol de no HDL (5.7%) y la proporción de HDL<sub>2b</sub> (3.8%), explicaron de manera independiente la varianza en el eflujo de colesterol.

## VII. DISCUSION

En general, los estudios epidemiológicos prospectivos como el de Framingham y el PROCAM han mostrado que el C-HDL bajo se asocia en forma independiente con el aumento de riesgo de EAC. Sin embargo, las excepciones a esta asociación sugieren que la aterogenicidad del C-HDL puede estar influenciada por variables no medidas, en los laboratorios clínicos, e incluyen factores genéticos y adquiridos, o que la concentración de subclases de HDL y la funcionalidad de las HDL, y no la cantidad absoluta de HDL, pueden contribuir al efecto antiaterogénico. Investigaciones recientes indican que el análisis de las subclases de HDL puede mejorar la predicción de la EAC.<sup>iError! Marcador no definido.</sup> En varios estudios se ha observado que el C-HDL bajo suele asociarse a elevación de triglicéridos, y que los pacientes con esta anomalía lipoproteica, conocida como dislipidemia aterogénica también incluye una disminución en tamaño de las HDL, que resulta de las concentraciones menores de HDL grandes y aumento de las HDL pequeñas. También se ha informado que estas partículas de HDL tienen una composición anormal, con aumento en el contenido de triglicéridos y disminución de los esteres de colesterol.<sup>iError! Marcador no definido.</sup> En estos pacientes, el valor bajo de C-HDL se asoció en forma independiente a mayor morbimortalidad cardiovascular a pesar de haber alcanzado valores muy por debajo de C-LDL en respuesta a la administración de estatinas. Con el propósito de investigar las características y la funcionalidad de las HDL, evaluada mediante el eflujo de colesterol, en este tipo de pacientes, en el presente estudio se incluyeron únicamente pacientes tratados con estatinas que habían logrado valores de colesterol de LDL<100mg/dl, pero con persistencia de C-HDL bajo y triglicéridos

altos. En el presente trabajo se informa que los pacientes con 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, ApoB/ApoA-I, concentraciones bajas de apoA-I y una frecuencia muy alta de síndrome metabólico. En estos pacientes se observó disminución en las proporciones de las partículas HDL grandes y aumento de partículas HDL pequeñas. También se observó un aumento significativo en el contenido de triglicéridos en las partículas de HDL y disminución en funcionalidad de las HDL, evaluada mediante eflujo de colesterol. Este conjunto de alteraciones puede contribuir al aumento de riesgo de sufrir nuevos eventos cardiovasculares.

Numerosos estudios han mostrado que la resistencia a la insulina se asocia a un conjunto de anormalidades aterogénicas que incluyen dislipidemia, perfil protrombótico y un estado de inflamación. La obesidad, particularmente el exceso de grasa visceral o intraabdominal, es otra condición frecuentemente asociada a la resistencia a la insulina y alteraciones relacionadas. Aunque la circunferencia de cintura tiene buena correlación con la cantidad total de grasa abdominal, su medición por sí sola no permite distinguir entre la obesidad por exceso de grasa subcutánea y la obesidad visceral. Sin embargo, la presencia simultánea de hipertrigliceridemia y circunferencia de cintura aumentada, puede identificar pacientes con exceso de tejido adiposo visceral y otras anormalidades metabólicas. Nuestros hallazgos confirman lo observado en estos estudios. Los pacientes con la dislipidemia HA+HTG tuvieron los valores más altos de circunferencia de cintura y mayor prevalencia de obesidad abdominal (65% vs.

43%). Los resultados indican que estos pacientes presentan varios componentes del llamado síndrome metabólico. De hecho, utilizando 90cm como punto de corte de circunferencia de cintura<sup>Error! Marcador no definido.</sup> y los otros criterios de diagnóstico propuestos por el panel de expertos del NECP, la prevalencia de este síndrome fue de 91% en HA + HTG, 11.4% en NLP y de 0.0% en los sujetos sanos (Figura 13).

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. Estos índices han sido útiles para predecir eventos cardiovasculares. Sin embargo, se han proporcionado evidencias de que la relación apoB/apoA-I tiene un poder de predicción mayor, particularmente en población de alto riesgo. 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.

Aunque estudios iniciales no mostraron datos convincentes sobre la utilidad de medir las subfracciones de HDL, en los últimos años, varios trabajos de investigación han señalado que la caracterización más detallada de las lipoproteínas de alta densidad mejora la capacidad para evaluar el riesgo de EAC. Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas que difieren en tamaño, composición, densidad y carga. Se ha descrito que las HDL pequeñas promueven mayor eflujo de colesterol y tienen mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria que las partículas grandes de HDL. Aunque la proporción de HDL pequeñas se

encuentra aumentada en las personas con C-HDL bajo y en los pacientes con síndrome metabólico, su composición química y su capacidad funcional están alteradas. <sup>iError! Marcador no definido.</sup> Por otra parte, se ha encontrado que el aumento de HDL pequeñas, se asocia a la prevalencia de enfermedad arterial coronaria, y con mayor recurrencia de eventos coronarios en pacientes con EAC y C-HDL bajo aún después de ajustar por factores de riesgo tradicionales. Algunos estudios no han mostrado efectos de las estatinas sobre el tamaño de las HDL, pero Asztalos y cols, recientemente reportaron que el tratamiento con estatinas da lugar al aumento de las partículas de HDL grandes y disminución de las LDL pequeñas. Estos efectos, más notables con rosuvastatina y atorvastatina en comparación con simvastatina y pravastatina, mejoran pero no logran normalizar la distribución de las subclases de HDL. En este estudio los pacientes coronarios tratados con diferentes estatinas presentaron anormalidades en la distribución de las subclases (aumento de las HDL pequeñas y disminución de las HDL grandes) así como, en la composición de lípidos en las subclases de HDL, estas partículas se encontraron enriquecidas en triglicéridos y disminuidas en ésteres de colesterol, los resultados del presente trabajo son consistentes con los hallazgos de esos estudios.

Debido a la incapacidad de las células periféricas para catabolizar el colesterol, el exceso de este compuesto en los tejidos extrahepáticos debe ser removido y transportado al hígado para su reciclamiento o excreción en la bilis. El transporte reverso de colesterol (TRC), tiene como primer paso crítico el eflujo de colesterol de los tejidos hacia aceptores extracelulares como las HDL y la apoA-I. Los estudios experimentales han sugerido que las moléculas ABCA1, ABCG1 y el

receptor pepenador Clase B tipo 1 (SR-B1), participan de manera importante en el eflujo de colesterol en los macrófagos, y también que el ABCA1 y ABCG1, pero no el SR-B1, promueven el TRC in vivo. Los animales con carencia o deficiencia de ABCA1 y de SR-B1 desarrollan aterosclerosis acelerada. Actualmente se considera que el mecanismo primario ateroprotector de las HDL y la apoA-I está representado por el TRC. La línea celular Fu5AH es un modelo ampliamente utilizado y validado para estudios de eflujo de colesterol. Un estudio que incluyó únicamente 12 individuos no diabéticos, y normotriglicéridémicos, sugirió que el eflujo de colesterol de células Fu5AH hacia el plasma de sujetos con resistencia a la insulina no está alterado a pesar de valores bajos de C-HDL. Otros dos estudios, sin embargo, han mostrado disminución del eflujo de colesterol en pacientes masculinos con HA+HTG y de pacientes con diabetes. Nuestros hallazgos de eflujo de colesterol disminuido en pacientes coronarios tratados con estatinas, confirman lo reportado en esos dos últimos estudios. Más aún la asociación directa, significativa e independiente del eflujo de colesterol con las concentraciones de C-HDL, que encontramos en el análisis de regresión lineal múltiple, es consistente con informes previos. La alteración en el eflujo de colesterol encontrada en el presente estudio, puede favorecer el depósito de colesterol en la pared vascular y contribuir a la progresión de la aterosclerosis.

Como se ha mencionado previamente el transporte reverso de colesterol es considerado como el mecanismo principal involucrado en el papel protector de las HDL contra la aterosclerosis, sin embargo, hay evidencias de que las actividades anti-inflamatoria y antioxidante de las HDL también tienen efectos benéficos en la pared arterial. En comparación con las HDL grandes, las HDL pequeñas son

mejores promotoras del eflujo de colesterol, ejercen más actividad antioxidante y tienen mayor capacidad para inhibir la expresión de moléculas de adhesión. Esta actividad biológica de las subclases de HDL se encuentra alterada en individuos con C-HDL bajo. Se ha informado que la capacidad antioxidante de todas las HDL pequeñas (3a, 3b, 3c) está significativamente disminuida en pacientes con síndrome metabólico. Con base en estos estudios, es posible que, en nuestros pacientes con colesterol de HDL bajo y triglicéridos altos, otras actividades ateroprotectoras de las HDL se encuentren disminuidas. Sin embargo, se requieren futuros estudios adicionales que confirmen esta posibilidad.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Primera, se incluyeron en el estudio únicamente pacientes del sexo masculino, por lo que los resultados reportados pudieran no ser aplicables en las mujeres. Segunda, los pacientes no estaban tratados con un solo tipo de estatina, sino con varios de estos medicamentos que pueden diferir en sus efectos sobre algunas características de las HDL. Esta modalidad del estudio obedeció a nuestro deseo de reproducir en la muestra estudiada lo que ocurre en la práctica clínica cotidiana. Dado que las proporciones de pacientes que recibían las diferentes estatinas y las dosis utilizadas fueron generalmente similares en ambos grupos, es poco probable que esta característica del estudio haya tenido influencia en los resultados. Tercera, los métodos utilizados para evaluar las características de las HDL en los pacientes estudiados, no están disponibles para la práctica clínica. Sin embargo, la información obtenida por este tipo de estudios contribuye a mejorar el conocimiento sobre las anomalías lipoproteicas que pueden participar en la progresión del proceso aterogénico.





## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo, obtenidos con pacientes coronarios tratados con estatinas que han alcanzado valores meta de C-LDL, muestran que la presencia de valores bajos de C-HDL y elevados de triglicéridos identifica a un grupo de pacientes con mayor frecuencia de obesidad general y adiposidad abdominal, valores más altos del índice CT/C-HDL, disminución significativa de las concentraciones de apoA-I, alteraciones fisicoquímicas y en la distribución de las subclases de HDL. Además, en estos pacientes se demostró reducción del eflujo de colesterol, proceso considerado como la función ateroprotectora más importante de las HDL. Los estudios en la literatura señalan que cada una de estas anormalidades, contribuye a la progresión de la aterosclerosis y se asocia a mayor riesgo cardiovascular. Es plausible que el riesgo residual, observado en todos los estudios de prevención primaria y secundaria con estatinas, así como la mayor morbimortalidad en los pacientes coronarios con C-HDL bajo y C-LDL con valores inferiores a 70 mg/dl, observado en el estudio de tratamiento para lograr nuevas metas <sup>¡Error! Marcador no definido.</sup> pueda ser debido, al menos en parte, a las anormalidades fisicoquímicas y funcionales de HDL identificadas en el presente estudio. Aunque la reducción de las concentraciones del C-LDL continúa siendo la meta principal del tratamiento, este y otros estudios sugieren que los valores bajos del C-HDL deberían también ser considerados como objetivo de la terapia reguladora de lípidos. Esta posición es apoyada por el reporte de que el aumento en las concentraciones de las HDL grandes en respuesta al tratamiento con simvastatina más niacina, se asoció significativamente a menor progresión de estenosis coronaria.

Estos resultados son evidencia clara de que el tratamiento con estatinas no es suficiente en la prevención secundaria para este grupo de pacientes que representa entre 30% y 50% de la población con EAC.

Numerosas evidencias disponibles en la actualidad, señalan que los cambios en el estilo de vida que incluyen dieta saludable y aumento en la actividad física, pueden ser de gran utilidad en el manejo de los pacientes con este conjunto de anormalidades.

## IX: BIBLIOGRAFIA

1. Onaka L: Lípidos. En Anderson S.C et al. "Química Clínica", México, Editorial Mc Graw Hill, 1995: 168-169.
2. Juarez Oropeza M.A: Los lípidos estructura y clasificación. En Diaz Zagoya J.C, Ble Castillo J.L. "Metabolismo de lípidos y esteroides hormonales"; México 1998:15-24.
3. Nelson D. Cox. "Leningher principles of biochemistry" 3th edición , Editorial Worth publishers, USA; 2000:241-255.
4. Medina U.A. Dislipidemias en individuos adultos de la ciudad de México. Tesis para obtener el título para química farmacéutica bióloga UNAM 1996:12-16.
5. Perez C.H.J. Influencia sobre el polimorfismo de la apolipoproteína E sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en adolescentes. Tesis que para obtener el título de químico farmacéutico biólogo 2004: 5-6.
6. [www.medinet.com.mx/el\\_médico](http://www.medinet.com.mx/el_médico), El médico interactivo diario electrónico de la sanidad; 2003 vol 10 No. 892.
7. Havel J Richard, Kane. P John. Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins. En Scriver C.R, Beudet A.L, Sly W.S, Valle D. "The metabolic and molecular bases of inherited disease", 8a edición , Editorial Mc Graw-Hill, USA 2001:2709-2712.
8. Mahley R.W, Hussain MM. Chylomicron and chylomicron remnant catabolism. Curr Opin Lipidol 1991; 2:170-176.
9. Rader DJ, Hobbs HH: Disorder of lipoprotein metabolism. En Kasper DL, et al. "Harrison's principles of internal medicine"; 16th edición, Editorial McGraw-Hill, USA 2005: 2286-2289.
10. Rader JD. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. J Clin Invest 2006; 116: 3090-3100.
11. Lewis F Gary, Rader Daniel. New insight into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport; Circ Res. 2005; 96: 1221-1232.
12. Von Eckardstein, Roch Jerry, Assman Gerd. High density lipoprotein and atherosclerosis Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thomb Vasc Biol. 2001; 21: 13-27.

13. Kontush Anatol and Chapman John. Functional defective High-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroad of dyslipidemia, inflamación, and aterosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58:342-374.
14. Kerry-Ann R, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factor *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238.
15. Shih AY, Freddolino PL, Arkhipov A, Schulten K. Assembly of lipoprotein particles revealed by coarse-grained molecular dynamics simulations. *J Struct Biol* 2006; 8: 2-14.
16. Ansell JB, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High density lipoprotein function. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(10): 1792-1798.
17. Aztatlos BF, Lefevre M, Foster TA, Tulley R, Windhouser M, Wong L, Roheim PS. Normolipidemic subjects with low HDL-cholesterol levels have altered HDL subpopulations. *Arterioscler thromb vasc biol* 1997; 17: 1885-1893.
18. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming part II. *Circulation* 2001; 104: 2498-2502.
19. Ansell B, Fonarow G, Fogelman A. High-density lipoprotein: Is it always atheroprotective. *Curr Atheros Rep* 2006; 8:405-41.
20. Navab M, Ananthramaiah, GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004 45:993–1007.
21. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, and Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000 41:1495–1508.
22. Rodriguez-Esparragón F, Hernández-Trujillo Y, Macías-Reyes A, Hernández-Ortega E, Medina A, Rodríguez-Pérez JC. Sobre los genes paraoxonasa-1y SR-B1 y su importancia en la aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59(2):154-64.
23. Kontush A, Chantepie S, and Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1881–1888.

24. Barter P.J, Nicholls S, Rye Kerry-Anne, Nanantharamaiah G.M, Navab M, Fogelman A.M. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95:674-772.
25. Calabresi L, Gomaraschi M, Francheschini . Endothelial protection by High-Density-lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1724-1731.
26. Mineo Ch, Deguchi H, Griffin J.H, Shaul P.W. Endothelial and antithrombotic action of HDL. *Circ Res* 2006; 98:1352-1364.
27. Martínez Sanchez CR, Ceceña LE, González Pacheco H; Atherosclerosis. En Vargas Barrón J, Attie F, Fernández Santander SM, Leiva Garza JL, Lorenzo Negrete JA, Peña Duque MA, Kadlubik DS, Romero Cárdenas A, Vazquez Antona CA. " Tratado de cardiología sociedad mexicana de cardiología", 1ra edición, Editorial Intersistemas S.A de C.V, México 2006:135-157.
28. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informatica (INEGI), Secretaría de Salud y del consejo Nacional de Población (CONAPO). Mortalidad del Distrito Federal DE 1990-2006 [en línea]. Disponible en URL : [www.salud.df.gob.mx](http://www.salud.df.gob.mx)
29. Yusuf S, Hawken S, Ounpou S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Lisheng L. Effects of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case control study. *Lancet* 2004; 364:912-914
30. Kontush A, Chapman J.M. Antiatherogenic small dense HDL- guardian angel of the arterial wall. *Nature Clinic Pract* 2006; 3(3): 144-151.
31. Celermajer DS. Endotelial dysfunction : does it matter? It is reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 325-333.
32. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 105:32s-39s.
33. Osterud B, Bjorklid E. Role of Monocytes in Atherogenesis. *Physiol Rev* 2003; 83:1069-1112.
34. Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:473-481.
35. Tuñon J, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Blanco-Colio LM, Martín – Ventura JL, Egido J; Aterogénesis y complicación de la placa. *Cardiovasc Risk Fact* 2000; 9(2): 75-84.

36. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707 - 714.
37. Aztalos BF, Roheim PS, Milani LL, Lefever M, McNamara JR, Horvath Kv. Distribution of apoA-I containing HDL subpopulation in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20 (12):2670 - 2676.
38. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, et al; 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.
39. 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.
40. 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.
41. Calabresi L, Gomaraschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated Soluble Cellular Adhesion Molecules in Subjects With Low HDL-Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 656-661.
42. Brites FD, Bonavita CD, De Geitere C, Cloës M, Delfly B, Yael MJ, Fruchart J, Wikinski RW, Castro GR. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2000;152:181-192.
43. Blankenberg S, Barboux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;170:191-203.
44. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;(11):1987-1994.
45. Medina UXA, Pérez MOA, Huesca GC, Zamora GJ, Posadas RC. Functional and metabolic characteristics of HDL in healthy subjects and cardiovascular disease (CVD) patients. XIV International Symposium on Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2006 Supl. 7:534. Resumen No. 186.
46. 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.

47. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N. Direct measurement of HighDensity lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated  $\alpha$ -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41:717-723.
48. 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.
49. Tailleux A, Torpier G, Caron B, Fruchart JC, Fievet C. Immunological properties of apo B- containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries. *J Lipid Res* 1993; 34: 719-728.
50. Blanche P, Gong E, Forte T, Nichols AV . Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408 - 419.
51. Perusse M, Pascot A, Despres JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res* 2001; 42:1331 - 1334.
52. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680 - 685.
53. de la Llera-Moya M, Atger V, Paul JL, Fournier N, Moatti N, Giral P, Friday KE, Rothblat G. A cell system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:056-1065.
54. 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.
55. 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.
56. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835-2838.

57. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol* 1992;70:733-737.
58. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-1316.
59. Gotto AM Jr. Low high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report. *Circulation* 2001; 103:2213-2218.
60. Asztalos BF, Horvath KV, McNamara JR, Roheim PS, Rubinstein JJ, Schaefer E. Effects of atorvastatin on the HDL subpopulation profile of coronary heart disease patients. *J Lipid Res* 2002;43:1701-1707.
61. Gotto AM Jr, MD, DPHIL, Eliot A. Brinton. Assessing Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Risk Factor in Coronary Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:717-24.
62. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, Liao Y. 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.
63. 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.
64. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-194.
65. Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, de Courten M. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. *Ann N Y Acad Sci* 1999;892:25-44.
66. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1999;83:25F-29F.
67. Ross R, Aru J, Freeman J; Hudson R, Janssen I. Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E657-E663.
68. Brunzell JD, Hokanson J;. Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. *Diabetes Care* 1999;22 Suppl 3:C10-C13.



69. Nieves DJ, Cnop M, Retzlaff B, Walden CE, Brunzell JD, Knopp RH, Kahn SE; The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes* 2003; 52:172-179.
70. Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P; Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1039-1049. Erratum in: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:e151.
71. Lemieux I, Pascot A, Couillard C, Lamarche B, Tchernof A, Alméras N, Bergeron J, Gaudet D, Tremblay G, Prud'homme D, Nadeau A, Després JP. Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapoprotein B; small, dense LDL) in men? *Circulation* 2000;102:179-184.
72. 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.
73. 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.
74. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, Fourrier JL, Bertrand M, Koren E. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987; 68: 35 – 40.
75. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325:373 – 381.
76. von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:404-416.
77. 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.
78. Asztalos BF, Cupples LA, Demissies, Hovarth KV, Cox CE, Batista MC, Shaefer EJ. High Density Lipoprotein Subpopulation Profile and Coronary

Hearth disease Prevalence in male Participants of the Framingham Offspring study . *Arterioscler Trhomb Vasc Biol* 2004;24: 2181-2187.

79. Franceschini G, Sirtori M, Vaccarino V, Gianfranceschi G, Chiesa G, Sirtori CR. Plasma lipoprotein changes after treatment with pravastatin and gemfibrozil in patients with familial hipercolesterolemia. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 250 - 259.
80. Homma Y, Ozawa H, Kobayashi T, Yamaguchi H, Sakane H, Nakamura H. Effects of simvastatin on plasma lipoprotein subfractions, cholesterol esterification rate, and cholesteryl ester transfer protein in type II hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1995; 114: 223 - 234.
81. Asztalos BF, MCTaggarr F, Horvath KV, Lemaulf F, Dallal GE, Schaefer EJ. Effect of maximal statin therapy on the high density lipoprotein (HDL) subpopulation profiles of hypercholesterolemic subjects (Abstract). *Atherosclerosis supplements* 2006; 7: 580.
82. Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation* 2001;104:2498-2502.
83. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:193-205.
84. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:2216-2224.
85. van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, Orsó E, Rothe G, Twisk J, Böttcher A, Van Amersfoort ES, Christiansen-Weber TA, Fung-Leung WP, Van Berkel TJ, Schmitz G. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6298-6303.
86. Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003; 108:2258-2263.
87. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006; 113:2548-2555.

88. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res* 1999; 40:781-796.
89. Dullaart RP, van Tol A. Role of phospholipid transfer protein and prebeta-high density lipoproteins in maintaining cholesterol efflux from Fu5AH cells to plasma from insulin-resistant subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61:69-74.
90. Brites FD, Cavallero E, de Geitere C, Nicolaiew N, Jacotot B, Rosseneu M, Fruchart JC, Wikinski RL, Castro GR. Abnormal capacity to induce cholesterol efflux and a new LpA-I pre-beta particle in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1999;279:1-14.
91. Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003; 54: 321 - 341.
92. Xia P, Vadas MA, Rye KA, Barter PJ, Gamble JR. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J Biol Chem* 1999; 274:33143 - 33147.
93. Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:285 – 288.
94. Asztalos BF, Batista M, Horvath KV, Cox CE, Dallal GE, Morse JS, Brown GB, Schaefer EJ. Change in alpha1 HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:847-852.

## XI. ANEXO 1

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE SANO

Institución: **Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

Estimado Señor:

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación debido a que usted se encuentra clínicamente sano y no está bajo ningún tratamiento. Antes de que decida participar, es importante que sepa por qué se está haciendo esta investigación y lo que implica. Por favor tómese todo el tiempo necesario para leer la siguiente información, coméntela, si así lo desea, con su médico, familiares o con sus amigos. Pregunte cualquier cosa que no le haya quedado del todo clara o si desea más información.

#### PROPÓSITO

En las personas que tienen diabetes, presión arterial alta, colesterol alto o que fuman, las grasas y otras sustancias se acumulan en las arterias del corazón y forman placas que con el tiempo las obstruyen. Esta enfermedad se llama aterosclerosis y cuando las placas se rompen pueden producir infartos cardiacos. Además del colesterol, tener triglicéridos altos y valores bajos del colesterol bueno (C-HDL) también favorece los infartos. Los pacientes que han tenido infartos cardiacos deben mantener sus cifras de colesterol lo más bajo posible para disminuir la posibilidad de un nuevo infarto. Es por eso que deben reducir el consumo de grasas y colesterol en su dieta, y tomar el medicamento conocido como “**estatina**”, que reduce el colesterol. La estatina, reduce principalmente el colesterol malo (C-LDL), sin embargo, es conveniente que los triglicéridos y el colesterol bueno (C-HDL) también estén controlados, ya que su alteración puede contribuir al riesgo de presentar problemas del corazón.

El propósito de este estudio es investigar si existen alteraciones en la distribución y funcionamiento de las partículas de HDL (colesterol bueno) y de otras variables bioquímicas, en pacientes con enfermedad arterial coronaria, que tienen controlado su colesterol malo pero que continúan con cifras altas de triglicéridos y bajas del colesterol bueno, y compararlos con personas sanas como usted.

#### PROCEDIMIENTOS.

En el hospital le atenderá un médico endocrinólogo. Si usted reúne las condiciones para el estudio y acepta participar, se le harán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le pedirá que conteste un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales.
2. El médico le hará un examen físico y medirá su estatura, peso, circunferencia de cintura, presión arterial y frecuencia cardiaca.
3. Se tomará muestras de sangre, equivalente a 6 cucharaditas.
4. Será necesario que se presente en ayuno de 12 horas a la cita en que se tomará sangre, sin haber ingerido bebidas alcohólicas, café ni bebidas de cola o chocolate.
5. Su muestra de sangre servirá para realizar estudios de colesterol y triglicéridos. También se realizarán estudios especiales del funcionamiento de las partículas de HDL (colesterol bueno).

## RIESGOS E INCONVENIENTES

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días.

## BENEFICIOS

La visita al médico, los exámenes de laboratorio y los estudios del funcionamiento de las partículas de HDL, son sin costo para usted. Es importante que usted sepa que no percibirá pago alguno por participar de manera voluntaria en el estudio.

## PARTICIPACION VOLUNTARIA Y DERECHO DE LOS SUJETOS A TERMINAR SU PARTICIPACIÓN.

Su participación en este estudio es voluntaria. Si decide participar, se le pedirá que firme esta forma de consentimiento. Puede rehusarse a participar en el estudio.

## CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información personal, la obtenida por el cuestionario y los resultados de laboratorio se codificarán (su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe que se genere del estudio).

Toda la información que se obtenga, se almacenará en un lugar seguro y nos ajustaremos a los procedimientos internos y regulaciones gubernamentales para proteger la información personal y de laboratorio. Sin embargo, la información que se obtenga por el cuestionario y la generada por el laboratorio se consultará para comprobar que es correcta y corresponde a los exámenes que le fueron practicados. Esto lo hará el personal que participa en la realización del estudio y que mantendrá la confidencialidad de su información.

Confirmando haber leído las declaraciones de la forma de consentimiento informado para la realización de este estudio. Confirmando también que el Dr. \_\_\_\_\_ me ha explicado toda la información y los procedimientos del estudio, el día \_\_\_\_\_ durante el proceso de consentimiento para este estudio. Asimismo, se me ha dado la oportunidad de hacer las preguntas sobre el estudio y haber quedado satisfecho con las respuestas y explicaciones que se me proporcionaron. En caso de tener alguna pregunta o duda acerca del protocolo puedo contactar al Dr. Nacú Caracas o Enrique Mendoza al teléfono 5573-2911 ext 1272 para una respuesta o aclaración. Se me ha dado el tiempo suficiente para leer con cuidado la información, comentarla con otras personas y decidir si participo, o no, en este estudio.

Estoy de acuerdo con participar en este estudio.

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

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo del participante.

Firma del testigo 1 \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo del testigo.

Firma del testigo 2 \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo del testigo.

Firma de la persona que aplicó la forma de consentimiento. \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE

Institución: **Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

Estimado paciente:

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación debido a que usted tiene Enfermedad Arterial Coronaria (obstrucción de las arterias del corazón) y se encuentra recibiendo tratamiento para mantener en valores adecuados sus cifras de colesterol, pero otras grasas de la sangre llamadas triglicéridos y colesterol-HDL (colesterol bueno) no están bien controlados. Antes de que decida participar, es importante que sepa por qué se está haciendo esta investigación y lo que implica. Por favor tómese todo el tiempo necesario para leer la siguiente información, coméntela, si así lo desea, con su médico, familiares o con sus amigos. Pregunte cualquier cosa que no le haya quedado del todo clara o si desea más información.

### PROPÓSITO

En las personas que tienen diabetes, presión arterial alta, colesterol alto o que fuman, las grasas y otras sustancias se acumulan en las arterias del corazón y forman placas que con el tiempo las obstruyen. Esta enfermedad se llama aterosclerosis y cuando las placas se rompen pueden producir infartos cardiacos. Además del colesterol, tener triglicéridos altos y valores bajos del colesterol bueno (C-HDL) también favorece los infartos. Los pacientes que, como usted, han tenido infartos cardiacos deben mantener sus cifras de colesterol lo más bajo posible para disminuir la posibilidad de un nuevo infarto. Es por eso que usted debe reducir el consumo de grasas y colesterol en su dieta, y tomar el medicamento conocido como “**estatina**”, que reduce el colesterol. La estatina, reduce principalmente el colesterol malo (C-LDL), sin embargo, es conveniente que los triglicéridos y el colesterol bueno (C-HDL) también estén controlados, ya que su alteración puede contribuir al riesgo de presentar problemas del corazón.

El propósito de este estudio es investigar si existen alteraciones en la distribución y funcionamiento de las partículas de HDL (colesterol bueno) y de otras variables bioquímicas, en pacientes que tienen controlado su colesterol malo pero que continúan con cifras altas de triglicéridos y bajas del colesterol bueno.

### PROCEDIMIENTOS.

En el hospital le atenderá un médico endocrinólogo. Si usted reúne las condiciones para el estudio y acepta participar, se le harán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le pedirá que conteste un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales.
2. El médico le hará un examen físico y medirá su estatura, peso, circunferencia de cintura, presión arterial y frecuencia cardiaca.
3. Se tomará muestras de sangre, equivalente a 6 cucharaditas.
4. Será necesario que se presente en ayuno de 12 horas a las citas en que se tomará sangre, sin haber ingerido bebidas alcohólicas, café ni bebidas de cola o chocolate.
5. Su muestra de sangre servirá para realizar estudios de colesterol y triglicéridos. También se realizarán estudios especiales del funcionamiento de las partículas de HDL (colesterol bueno).

## RIESGOS E INCONVENIENTES

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días.

## BENEFICIOS

La visita al médico y los exámenes de laboratorio y los estudios del funcionamiento de las partículas de HDL, son sin costo para usted. Es importante que usted sepa que no percibirá pago alguno por participar de manera voluntaria en el estudio.

## PARTICIPACION VOLUNTARIA Y DERECHO DE LOS SUJETOS A TERMINAR SU PARTICIPACIÓN.

Su participación en este estudio es voluntaria. Si decide participar, se le pedirá que firme esta forma de consentimiento. Puede rehusarse a participar en el estudio. Su decisión no afectará la atención médica que usted recibe en el hospital.

## CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LA INFORMACIÓN

La información personal, la obtenida por el cuestionario y los resultados de laboratorio se codificarán (su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe que se genere del estudio).

Toda la información que se obtenga, se almacenará en un lugar seguro y nos ajustaremos a los procedimientos internos y regulaciones gubernamentales para proteger la información personal y de laboratorio. Sin embargo, la información que se obtenga por el cuestionario y la generada por el laboratorio se consultará para comprobar que es correcta y corresponde a los exámenes que le fueron practicados. Esto lo hará el personal que participa en la realización del estudio y que mantendrá la confidencialidad de su información.

Confirmando haber leído las declaraciones de la forma de consentimiento informado para la realización de este estudio. Confirmando también que el Dr. \_\_\_\_\_ me ha explicado toda la información y los procedimientos del estudio, el día \_\_\_\_\_ durante el proceso de consentimiento para este estudio. Asimismo, se me ha dado la oportunidad de hacer las preguntas sobre el estudio y haber quedado satisfecho con las respuestas y explicaciones que se me proporcionaron. En caso de tener alguna pregunta o duda acerca del protocolo puedo contactar al Dr. Nacu Caracas o Enrique Mendoza al teléfono 5573-2911 ext 1272 para una respuesta o aclaración. Se me ha dado el tiempo suficiente para leer con cuidado la información, comentarla con otras personas y decidir si participo, o no, en este estudio.



Estoy de acuerdo con participar en este estudio.

Firma del paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

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

Firma del testigo 1 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo del testigo.

Firma del testigo 2 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre completo del testigo.

Firma de la persona que aplicó la forma de consentimiento. \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nombre completo.

## AGRADECIMIENTOS:

A Dios por permitirme llegar hasta donde he llegado, por siempre estar conmigo y ayudarme cuando lo necesito.

A mis padres por todo el apoyo tanto emocional como económico a lo largo de este gran sueño, gracias por ayudarme a salir adelante y lograr superarme día a día, por no permitir que abandonara este sueño que hoy se hace realidad. Por su paciencia a pesar de lo tardado que fue culminar este sueño.

A mi hermano Daniel, por apoyarme económicamente en algún momento de mi vida profesional, por todo tu cariño y amistad.

A mi sobrina Mildred por los momentos de alegría que me regalaba cuando llegaba cansada de la escuela.

A mis primos Jonhy, Edgar y Yessi por ser como unos hermanos para mí, por todo el cariño y amistad que cada uno a su manera me ha demostrado, por permitirme darles consejos y hacerme sentir como un ejemplo para ustedes.

A mis amigas:

Brenda, por ser una gran amiga, sincera y honesta por todos tus consejos, conocimientos y ayuda que me brindaste durante la carrera y por tu apoyo en los momentos malos de la carrera y mi vida,

Esmeralda, gracias por aguantarme durante tantos años, por ser mi amiga y siempre estar conmigo en los momentos tanto de alegría como de tristeza, por todos tus consejos y ayuda.

Mónica, por todos esos buenos momentos que pasamos durante la carrera, por soportarme cuando estaba neurótica.

Maya, gracias por ser mi amiga, por pasar conmigo tantos momentos de ocio y alegría, por todos tus consejos y por aguantarme cuando andaba de mal humor.

A mi mejor amigo Luis gracias por ayudarme en materias que eran un poco complicadas para mí, porque sin tu ayuda esto no sería posible.

A mis amigos de las donas, David, Blanca, Raúl, Paty, Pablito, Cecilia, Carla, Lucía, Paola, Fidel, Arturo, gracias por todos esos buenos momentos cuando no teníamos clases y contábamos infinidad de tonterías, a pesar de que toda la escuela se enterara de nuestra vida "jajajaja". Ese etapa de mi vida nunca la voy a olvidar, fue muy bueno conocerlos y ser su amiga.

A mis amigos los mebas, Ortiz, Saúl, Laura, Gerardo, Eliseo, Pagre, Juan Carlos y Shariani gracias por todos esos momentos en la oficina en los que se me olvidaba el estrés de la escuela, porque gracias a su compañía el trabajo era menos pesado y sobretodo divertido. Por permitirme ser su amiga y darme consejos ó solo por escucharme.

A Joss y Karina, por brindarme su amistad y consejos tanto en la vida profesional como emocional, gracias por estar siempre cuando las necesitaba.

Al departamento de endocrinología

Rosy, gracias por ser mi tutora, por aceptarme y tenerme paciencia, por todo el apoyo. Por creer en mí y resolverme de manera clara las dudas que tuve a lo largo de este trabajo. Por permitirme estar en este laboratorio y enseñarme tantas cosas.

Dr. Posadas; gracias por todo su apoyo, por su enseñanza, y por darme la oportunidad de conocer la investigación.

Dr. Guillermo, gracias por ser más que un profesor, por siempre mostrarme su apoyo y por resolverme de manera clara todas las dudas que se me presentaron.

Esteban, gracias por brindarme tu amistad, por siempre estar en la actitud de ayudarme. Por resolverme muchas dudas y por toda la paciencia mostrada.

Gabriel, por tu amistad y consejos, por tus regaños que hicieron de mí una mejor persona, Gracias por tu sinceridad y decirme lo que te molestaba.

Aida, gracias por las veces en que me resolviste las dudas y le diste el visto bueno a mis presentaciones.

A mis queridas nutriólogas, Carmen y carolina (maría!!!), gracias por escucharme y darme consejos, por resolverme las dudas que tenía, por ayudarme a armar presentaciones que tanto estrés me ocasionaban. Por todos esos momentos en los que la tristeza se convirtió en alegría.

A mis sinodales, por todos sus consejos y observaciones que permitieron que este sueño se cumpliera.

Y por último a la UPAE por permitirme ser parte de esta maravillosa institución llena de sabiduría.