

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD
MEDIANTE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN PACIENTES CON LUPUS
ERITEMATOSO GENERALIZADO**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LA ESPECIALIDAD EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DR. CARLOS ALBERTO GARZA GARCÍA

TUTOR DE TESIS

DR. CARLOS AGUILAR SALINAS

México, Distrito Federal

2013



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.

Dr. Sergio Ponce de León Rosales
Director de Enseñanza del INCMNSZ

Dr. Carlos Aguilar Salinas
Profesor adscrito al Servicio de Endocrinología del INCMNSZ
Tutor principal de Tesis

Alfonso Gulías Herrero
Profesor Adscrito al servicio de Medicina Interna del INCMNSZ
Profesor titular del curso de Medicina Interna

DEDICATORIA

A mi familia, mi motor en el camino de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A todo aquel que ha enriquecido e incrementado mi acervo acerca de lo que quiero y no quiero en esta vida.

INDICE

1. Resumen

2. Marco Teórico

-El colesterol de alta densidad

-Colesterol de alta densidad en procesos inflamatorios

-Alteraciones del colesterol de alta densidad en pacientes con enfermedades autoinmunes

3. Justificación

4. Hipótesis

-Hipótesis nula

-Hipótesis alterna

5. Objetivos

-Objetivos específicos

-Objetivos generales

6. Material y Métodos

7. Resultados

8. Conclusiones

9. Discusión

10. Bibliografía

Resumen

Título: Análisis de la composición de las lipoproteínas de alta densidad mediante la espectrometría de masas en pacientes con lupus eritematoso generalizado.

Introducción: el colesterol de alta densidad (C-HDL) desarrolla un papel protector para enfermedades cardiovasculares. Las características específicas que permiten al C-HDL llevar a cabo su función se consideran en gran medida asociadas a su composición estructural única. Se ha planteado disfunción del C-HDL, y con ello pérdida de su papel protector para riesgo cardiovascular en pacientes con enfermedades inflamatorias agudas y crónicas; esto se atribuye a cambios de la molécula así como la sobresaturación de la misma con partículas inflamatorias circulantes. Sin embargo, no se cuenta con estudios descriptivos detallados de la composición del C-HDL en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas que permitan corroborar esta hipótesis. Por lo anterior, se decidió estudiar la composición y contenido del C-HDL en personas sanas y pacientes diagnosticados con lupus eritematoso generalizado (LEG), el prototipo de enfermedad autoinmune y por ende un modelo de inflamación crónica, en fase activa e inactiva.

Objetivos: describir de forma detallada la composición estructural del C-HDL mediante espectrometría de masas en personas sanas y pacientes con lupus eritematoso generalizado activo e inactivo, así como describir las diferencias entre estos grupos.

Material y métodos: se realizó un estudio observacional, descriptivo y comparativo entre casos y controles, se estudiaron diversas variables antropométricas, bioquímicas y cuestionarios clínicos de forma transversal. Se incluyó un total de 10 controles sanos y 28 casos de pacientes con LEG, de este último grupo 14 pacientes con enfermedad activa y 14 pacientes inactivas. Se llevó a cabo análisis estructural de C-HDL mediante espectrometría de masas de alta resolución en la totalidad de los pacientes de cada grupo para describir y reportar diferencias.

Resultados: el C-HDL presenta notables diferencias entre casos y controles, incluso entre casos con enfermedad activa e inactiva. Estas diferencias son predominantemente consecuencia de la presencia de múltiples y distintas proporciones de los constituyentes conocidos del C-HDL.

Conclusiones: el C-HDL es diferente entre personas sanas y con enfermedades inflamatorias. Estas diferencias concuerdan con la literatura médica que sustenta la disfunción del C-HDL en enfermedades inflamatorias.

Marco teórico

El colesterol de alta densidad

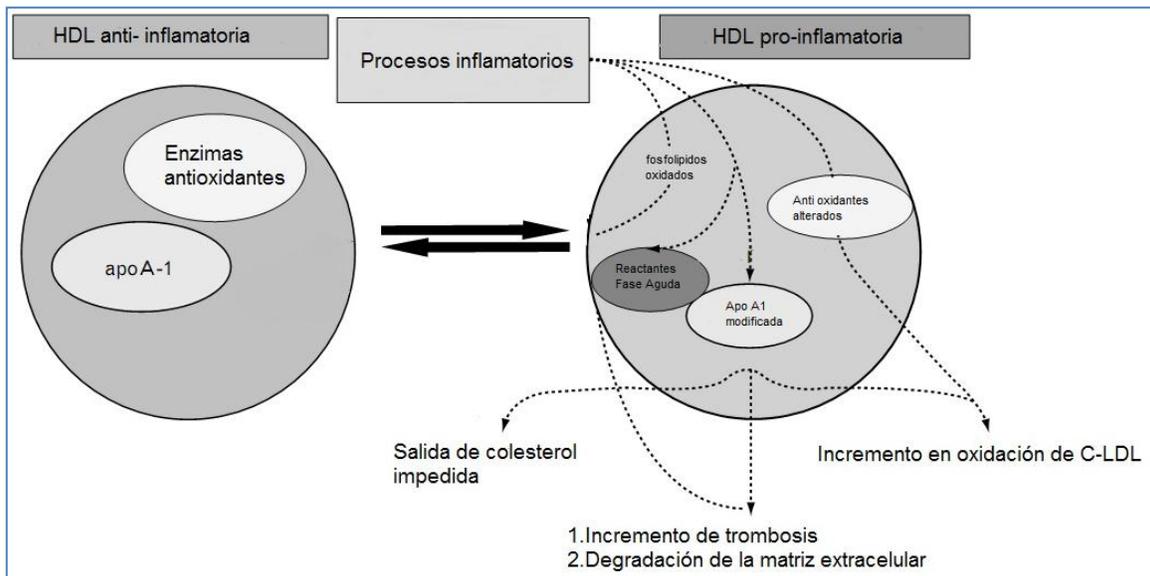
Tradicionalmente el colesterol de alta densidad (C-HDL) se ha conocido como un factor protector para riesgo cardiovascular, esto a través de propiedades estructurales y funcionales propias al C-HDL, las cuales le permiten participar en procesos como el transporte inverso de colesterol, inhibición de la oxidación de fosfolípidos en el colesterol de baja densidad (C-LDL), regulación a la baja de citocinas inflamatorias así como de moléculas de adhesión a células vasculares; estas propiedades balancean y mitigan el papel aterogénico del colesterol de baja densidad (C-LDL).

Sin embargo, el C-HDL es diverso en su composición y funcionalidad acorde a las comorbilidades de las personas, ya que el medio en el que la molécula se encuentra, define ciertas propiedades de la misma, es así como se ha determinado que en contextos específicos podemos encontrar C-HDL de “función paradójica” o inflamatoria la cual incrementa incluso el riesgo cardiovascular.

Colesterol de alta densidad en procesos inflamatorios

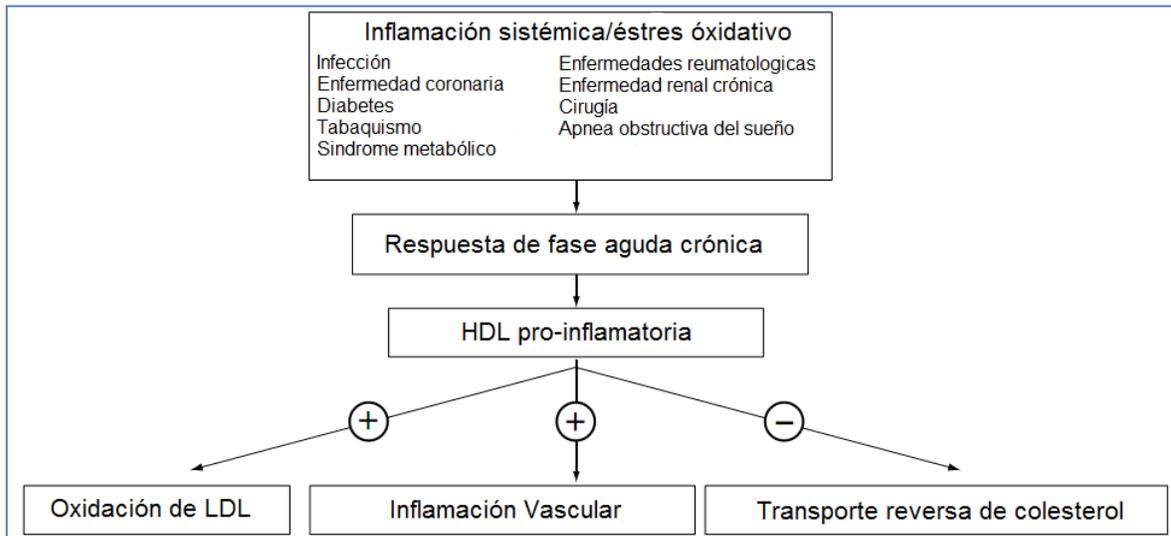
Entidades clínicas como la cardiopatía isquémica, equivalentes de riesgo coronario, síndrome metabólico, enfermedad renal crónica, síndrome de apnea obstructiva del sueño, infecciones, procesos quirúrgicos y enfermedades reumatológicas, algunas en mayor proporción a otras, se han asociado a la pérdida de la capacidad protectora del C-HDL, incluso hasta convertirla en una molécula pro-inflamatoria y aterogénica. (Figura 1).

Figura 1. Cambios moleculares en C-HDL durante procesos inflamatorios



Se conoce que los principales inductores de cambios estructurales en C-HDL son la interleucina 6 y el interferón alfa, ambas incrementadas en procesos inflamatorios como las entidades clínicas antes referidas, las cuales generan expresión de amiloide sérico A y fosfolipasa secretora A2 del grupo IIA. Así, como parte de los procesos inflamatorios el C-HDL se modifica uniéndose a reactantes de fase aguda como amiloide sérico A y ceruloplasmina, los cuales saturan al C-HDL y con lo que desplazan y disminuyen al principal componente protector y anti-inflamatorio del colesterol de alta densidad que es la proteína Apo A1. (Figura 2).

Figura 2. Procesos inflamatorios y cambios funcionales en C-HDL



Alteraciones del colesterol de alta densidad en pacientes

con enfermedades autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, espondilitis anquilosante, colitis ulcerativa crónica y enfermedad de Chron, entre otras, en su papel de ser un proceso inflamatorio crónico, inducen que los cambios en la composición del C-HDL sean persistentes. Distintos modelos de enfermedades inflamatorias crónicas han reportado colesterol de alta densidad estructuralmente anormal, en hasta 42% de los pacientes con lupus eritematoso generalizado y en hasta un 20% de los pacientes con artritis reumatoide, acorde a algunas series.

Conocer, definir y sobre todo, comprender la función del C-HDL en modelos de inflamación persistente, así como a través de los distintos espectros de esta, manifestada por grados de actividad de las enfermedades, podrá favorecer la búsqueda intencionada de intervenciones que favorezcan llevar al C-HDL hacia un perfil anti-aterogénico y anti-inflamatorio que amortigüe adecuadamente los cambios inducidos por la inflamación crónica propia a estas enfermedades.

Justificación

Comparar y describir diferencias en la composición del C-HDL en personas con una enfermedad inflamatoria crónica, como lo es el LEG, respecto a personas sanas podrá contribuir al entendimiento del papel que desarrolla el C-HDL en el riesgo cardiovascular de estos diferentes grupos, una explicación teórica tentativa acerca de los elementos propios al cambio de la molécula que estimulan el incremento y aceleración en la aterosclerosis.

Hipótesis

Hipótesis nula: la composición proteica del C-HDL será igual en personas sanas y pacientes con LEG activo e inactivo.

Hipótesis alterna: la composición proteica del C-HDL será distinta en personas sanas al compararlas con pacientes con LEG, así como entre pacientes con LEG activo e inactivo.

Objetivos

Objetivo general:

Conocer la composición proteica del C-HDL en personas sanas y pacientes con LEG activo e inactivo, así como llevar a cabo una comparación entre grupos.

Objetivos específicos:

1. Medir la concentración de lípidos sanguíneos (triglicéridos, colesterol total, colesterol de alta densidad y colesterol de baja densidad) en personas sanas así como pacientes con LEG activo e inactivo.
2. Identificar los péptidos contenidos en el C-HDL de forma total así como en sus respectivas subclases.

3. Comparar la concentración de lípidos sanguíneos y C-HDL total, así como los péptidos contenidos en éstos, entre personas sanas y pacientes con LEG activo e inactivo.
4. Proponer un marcador bioquímico subrogado que identifique C-HDL disfuncional.

Material y métodos

Se realizó un estudio trasversal, observacional, descriptivo y comparativo. Se invitaron a participar a pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG) atendidos en el departamento de Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. El diagnóstico de LEG (casos) fue definido acorde a los criterios de la ACR (American College of Rheumatology) para esta enfermedad establecidos en 1982; el grado de actividad fue estratificado con base en el cuestionario “Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000” (SLEDAI2K) con un punto de corte para enfermedad activa mayor a 6 puntos así como criterio clínico de los reumatólogos del Instituto (29, 30). Los pacientes con enfermedad inactiva se catalogaron como tales con base a un índice de SLEDAI2K menor a 6 puntos, un periodo mínimo de inactividad de 6 semanas así como criterio clínico por parte de un reumatólogo. Las personas sanas (controles) fueron reclutadas de población general mexicana invitada a participar en el estudio. Se realizó pareo de casos y controles acorde a sexo y edad (+/- 5 años de edad).

Resultados

Para el grupo de controles se reclutaron un total de 10 pacientes, 9 mujeres y 1 hombre. En todos ellos se realizó cromatografía líquida de alta resolución para C-HDL.

En lo respectivo a los casos, se reclutaron 28 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG). De este grupo, 14 pacientes considerados con actividad al momento de estudio (12 mujeres, 2 hombres) así como 14 pacientes sin presencia de

actividad al momento del estudio (14 mujeres); lo anterior representado por una puntuación en SLEDAI2K de 13.23 ± 5.50 y de 2.0 ± 1.15 para cada grupo respectivamente ($p = < 0.001$).

Dentro de las variables demográficas (Tabla 1) se encontró significancia estadística (valor de $p < 0.05$) en el índice de cintura cadera, presión arterial diastólica así como horas de caminata en 7 días entre controles y casos. Dentro del grupo de los casos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre casos activos e inactivos para el índice de actividad SLEDAI2K y el uso de corticoesteroides.

Tabla 1. Características clínicas entre controles, casos inactivos y casos activos

Variable	Control (n=10)	Caso inactivo (n=14)	Caso activo (n=14)	p
Mujer/Hombre	9(90%) / 1(10%)	14(100%)/0(0%)	12(85.71%)/2(14.28%)	0.28
Edad	29.50 ± 5.89	39.00 ± 15.24	31.16 ± 8.68	0.10
Peso (K)	58.51 ± 16.00	66.24 ± 13.75	65.97 ± 12.49	0.53
Talla (m)	1.60 ± 0.13	1.55 ± 0.07	1.57 ± 0.07	0.63
Índice de masa corporal	22.75 ± 3.07	27.41 ± 5.47	26.67 ± 5.37	0.22
Índice cintura-cadera	0.78 ± 0.09	0.89 ± 0.07	0.87 ± 0.10	0.02
Presión arterial sistólica	105.50 ± 13.84	112.50 ± 11.38	117.16 ± 11.83	0.14
Presión arterial diastólica	66.50 ± 10.55	78.16 ± 9.16	78.33 ± 12.44	0.02
Tabaquismo positivo	3 (30%)	1 (7.14%)	0 (0%)	0.10
Hrs caminata en 7 días	25.67 ± 39.07	1.42 ± 0.53	1.49 ± 0.76	0.01
SLEDAI 2K	-----	2.00 ± 1.15	13.23 ± 5.50	<0.001
Uso de corticoides	-----	1 (7.14%)	12 (85.71%)	0.01
Uso de inmunosupresores	-----	7 (50%)	7 (50%)	0.57
Uso de calcio antagonistas	-----	1 (7.14%)	0 (0%)	1.0
Uso de levotiroxina	-----	2 (14.28)	1 (7.14%)	0.50
Uso de antimalaricos ^Ж	-----	5 (34.71%)	3 (21.42%)	0.30

Ж Uso de Hidroxicloroquina o cloroquina

Por parte de las variables bioquímicas convencionales (Tabla 2) de química sanguínea, perfil de lípidos así como apolipoproteínas A y B, se reportaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos para triglicéridos y apolipoproteína B. Dentro de los grupos de lupus eritematoso generalizado estas mismas variables mantuvieron significancia estadística con una mayor proporción de ambos parámetros en pacientes activos.

Tabla 2. Características bioquímicas entre controles, casos inactivos y casos activos

Variable	Control (n=10)	Caso inactivo (n=14)	Caso activo (n=14)	p
Glucosa (mg/dL)	89.90 ± 7.99	85.15 ± 6.73	104 ± 71.14	0.52
Creatinina sérica (mg/dL)	0.68 ± 0.09	0.62 ± 0.18	0.73 ± 0.55	0.79
Colesterol Total (mg/dL)	178.40 ± 17.67	167.15 ± 22.77	204.30 ± 70.83	0.12
Triglicéridos (mg/dL)	101.80 ± 37.74	124.69 ± 59.66	186.46 ± 60.71	0.002
Colesterol HDL (mg/dL)	56.00 ± 11.09	42.00 ± 8.12	47.69 ± 29.87	0.24
Colesterol LDL (mg/dL)	102.00 ± 16.04	100.30 ± 17.25	119.38 ± 47.15	0.25
Apolipoproteína A (mg/dL)	145.60 ± 18.79	135.91 ± 13.31	140.47 ± 68.43	0.87
Apolipoproteína B (mg/dL)	79.60 ± 16.00	81.15 ± 14.42	105.31 ± 29.53	0.01

En lo referente a la composición y diferencias estructurales encontradas por espectrometría de masas en cromatografía líquida de alta resolución en el C-HDL de las poblaciones estudiadas, se comparten 21 proteínas entre casos y controles (Tabla 3); dentro de este grupo de proteínas compartidas se encuentra una diferente proporción de alfa 1 antitripsina, paraoxonasa 1, FETUINA, proteína amiloide A-4, apolipoproteína M y apolipoproteína F. Estas mismas proteínas dentro del subgrupo de lupus eritematoso generalizado presentó diferencia significativa únicamente para paraoxonasa 1 ($p < 0.05$).

Tabla 3. Proteínas compartidas entre casos y controles

HDL TOTALES		Control (n=10)	Caso inactivo (n=14)	Caso activo (n=14)	Valor p
1	Apolipoproteína A-I	10 (100%)	14 (100%)	14 (100%)	0.28
2	Apolipoproteína A-II	10 (100%)	11 (78.57%)	12 (85.71%)	0.30
3	Alfa-1-Antitripsina	10 (100%)	3 (64.28%)	6 (42.81%)	<0.001
4	Apolipoproteína E	10 (100%)	14 (100%)	13 (92.85%)	0.41
5	Apolipoproteína B-100	10 (100%)	11 (78.57%)	12 (85.71%)	0.30
6	Paraoxonasa 1	10 (100%)	7 (50%)	12 (85.71%)	0.01
7	FETUINA	7 (70%)	1 (7.14%)	3 (64.28%)	0.003
8	Apolipoproteína A-IV	10 (100%)	14 (100%)	13 (92.85%)	0.41
9	Apolipoproteína C-III	10 (100%)	13 (92.85%)	14 (100%)	0.41
10	Proteína Amiloide A-4 (SSA4)	10 (100%)	3 (64.28%)	6 (42.81%)	0.001
11	Apolipoproteína L1	6 (60%)	5 (35.71%)	7 (50%)	0.48
12	Apolipoproteína D	10 (100%)	13 (92.85%)	13 (92.85%)	0.68
13	Apolipoproteína C-I	10 (100%)	11 (78.57%)	12 (85.71%)	0.30
14	Apolipoproteína M	9 (90%)	1 (7.14%)	3 (64.28%)	<0.001
15	Apolipoproteína F	8 (80%)	1 (7.14%)	5 (35.71%)	0.001
16	Citoesqueleto de queratina tipo 2 (k2c1)	3 (30%)	0 (0%)	4 (28.57%)	0.08
17	Proteína básica de plaqueta (CXCL7)	9 (90%)	9 (64.28%)	7 (50%)	0.12
18	Proteína Amiloide A (SSA)	3 (30%)	6 (42.81%)	10 (71.42%)	0.10
19	Proteína de canal catiónico asociada a esperma subunidad gamma (CTSRG)	1 (10%)	0 (0%)	1 (7.14%)	0.51
20	Inhibidor de la cadena pesada H4 Inter-alfa-tripsina (ITI4)	1 (10%)	0 (0%)	1 (7.14%)	0.51
21	Clusterina	2 (20%)	0 (0%)	1 (7.14%)	0.19

Exclusivamente en el grupo de los casos, tanto activos como inactivos, se encontraron 21 moléculas proteicas conocidas como propias al C-HDL de pacientes con LEG: proteína SAA2, trastiretina, región variable de la cadena de los anticuerpos células B, HSPC319, HCG27283, cromosoma 9 de marco de lectura abierto 19 en isoforma CRA a, azapropazone, HSPC336, tripsinógeno catiónico, estructura cristalina de la activación de neutrófilos humanos recombinantes péptido 2, Ig cadena pesada de la región variable, proteína poliposis locus-codificada, helicasa en dedo de zinc, SUN dominio que contiene la

proteína 5, cromosoma 6 con marco de lectura abierto 150, proteína KIAA1545, EGF, HCG2038395 isoforma cra b, supresor de tumor stfcdna4, HCG 2029285 isoforma cra b y KIAA1543.

Así también, en ambos grupos de pacientes con LEG se encontró un interesante hallazgo de proteínas que no estaban previamente reportadas para el C-HDL en pacientes con LEG. No hubo diferencia estadística entre grupos activos e inactivos para todas estas proteínas (Tabla 4) y ninguna de ellas se reportó presente en el grupo de los controles.

Tabla 4. Proteínas encontradas y no descritas para C-HDL de pacientes con LEG⁺

1	Transducina como la proteína beta 3
2	Til16
3	UPF0760 proteina c2 o 29
4	Transforming acidiccoiledcoil
5	CAT
6	Colágeno alfa 6 vi
7	Proteína 1 inducida por la 5 azacytidine
8	Inhibidor ribonucleasa
9	Glicoproteína de membrana de poro nuclear 210
10	Proteína MICAL-2
11	Tripsina-1
12	Zinc finger protein 828
13	Aminotransferasa de glicina mit
14	GIRDIN
15	Cyclin depend entkinases regula
16	TSF1
17	Proteínas G acoplados receptor F27E5
18	Biogénesis de los lisosomas en relación con
19	Down syndrome cell adhesion mole
20	AMBP
21	Factor latente de crecimiento transformante
22	ADP ribosylation factor binding

Adicionalmente, cabe señalar que 13 proteínas conocidas en el C-HDL de pacientes con LEG estuvieron ausentes en nuestra población de estudio: proteína fosfatasa 1J (PPM1J), complemento C4-A (COA4), proteína relacionada con haptoglobina (HPTR), Proteína dedicante de la citocinesis 9 (DOCK9), proteína CASP, factor plaquetaria 4 variante (PF4V), proteína C9 o F140 (CI140), ubiquitina carboxiterminal hidrolasa 1 (UBP1), 5-oxoprolinase (OPLA), fosfatidilinositol 4-quinasa alfa (PI4KA), dominio tudor que contiene proteína 6 (TDRD6), canal de potasio dependiente de voltaje de la subfamilia H – miembro 5 (KCNH5), CAF1B.

Discusión

Comenzando por parámetros bioquímicos generales, se encontró diferencia en la cantidad de triglicéridos y apolipoproteína B entre casos y controles. A lo anterior debemos tomar en consideración como parámetros medidos para los grupos la diferencia en índice de cintura y cadera así como caminata semanal, además de parámetros propios y únicos a los pacientes con lupus eritematoso generalizado como la presencia de la enfermedad misma, el uso de corticoesteroides e inmunosupresores.

Como parte de la espectrometría de masas por cromatografía líquida de alta resolución y con orientación al punto central del estudio, encontramos que al comparar la composición del C-HDL de los casos y los controles se encuentran algunas proteínas compartidas como APO A1 y paraoxonasa, lo cual resulta interesante pues ambas tienen un papel conocido en transporte reversa de colesterol. Sin embargo, la desigualdad para la proteína de paraoxonasa entre todos los grupos y dentro de los sub-grupos mismos de LEG, muestra que un ambiente proinflamatorio pudiera afectar a esta proteína en forma cuantitativa, mientras que a APO A1 en forma cualitativa. En referencia a lo anterior, es llamativo también que entre algunas otras proteínas presentes en todos los grupos se encuentra una diferente proporción, como es el caso de la apolipoproteína M; la cual se presentó en menor proporción en los pacientes con LEG y tiene un papel conocido en la reducción de placas de ateroma a nivel vascular.

De manera general, los pacientes con lupus eritematoso generalizado poseen muchas más proteínas en la conformación estructural total del C-HDL, principalmente a expensas de fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas asociadas a procesos de inflamación como las proteínas amiloides. Una importante aportación del estudio fue el hallazgo de 22 proteínas no conocidas para el C-HDL de pacientes con LEG, así como la ausencia de proteínas específicas esperadas para este grupo de pacientes. Es relevante señalar que todos estos últimos hallazgos se encontraron por igual en ambos grupos de enfermedad, activos como inactivos, sin importar el grado de actividad por SLEDAI 2K.

Conclusión

La conformación estructural del C-HDL es diferente entre personas sanas y quienes padecen lupus eritematoso generalizado. Las principales diferencias entre estos grupos son dos: una distinta proporción de algunas proteínas compartidas por casos y controles, así como una mayor cantidad de fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas asociadas a procesos inflamatorios en pacientes con LEG.

Bibliografía

1. Yamashita S, Maruyama T, Hirano KI. Molecular mechanisms, abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 2000, 152:271-285.
2. Huesca-Gómez C, Franco M, Lúe G. Hypothyroidism induces abnormal structure of high density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in rats. *Metabolism* 2002, 51:443-50.
3. Executive Summary of the Third Report on The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 2486-2497.
4. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adult (Adult Panel Treatment III) final report. *Circulation* 2002, 106; 3140-0.
5. Moss AJ, Gotstein RE, Marder VJ. Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999, 99; 2517-2522.
6. Elkhailil L, Majd Z, Bakir R. Structural and in vivo metabolic abnormalities of high density lipoproteins. *Metabolism* 1997, 46: 474-483.
7. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, Apo AI Milano and Apo AII. *Atherosclerosis* 1999, 148: 317-325.
8. Pérez-Méndez O, Lúe G, Posadas-Romero C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad, HD plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Inst Cardiol Méx* 2000, 70:312-321.
9. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM. Mutations in ABC1 in Tangier disease and fa high density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999, 22: 336-345.
10. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its function. A possible role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 1581-1590.
11. Ruiz J, Blanche H, James RW. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995, 346:869-87.

12. Serrato M, Manan AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary disease J Clin Invest 1995, 96: 3005-3008.
13. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K: Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary disease in Japanese non insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 1997, 82: 2257-2260.
14. Anurag P, Anuradha CV: Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose fed rats. Diabetes Obes Metab 2002, 4: 36-42.
15. James RW, Blatter GM, Calabresi L. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. Atherosclerosis 1998, 139: 77-82.
16. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX. Glycation impairs high density lipoprotein function. Diabetologia 2000, 43: 312-320.
17. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM. Mutations human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages and association with coronary artery disease. Pharmacogenetics 1999, 9: 755-761.
18. Zhang X, Zhao SP, Li XP. Endothelium dependent and independent functions are impaired in patients with coronary heart disease. Atherosclerosis 2000, 149: 19-24.
19. Li XP, Zhao SP, Zhang XY. Protective effect of high density lipoprotein in endothelial dependent vasodilatation. Int J Cardiol 2000, 73: 231-236.
20. Kaufmann PA, Gneccchi-Ruscione T, Schafers KP. Low density lipoprotein and coronary microvascular dysfunction in hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 2000, 36: 103-109.
21. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR. High density lipoproteins inhibit cytokine expression of endothelial cell adhesion molecules. Arterioscler Thromb Vaso Biol 1995, 15: 1987-1994.
22. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR. Inhibition of VC expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. Biochem Biophys Res Commun 1997 231-65.
23. Kaneko T, Wada H, Wakita Y. Enhanced T factor activity and plasminogen activator inhibitor-1 antigen in human umbilical vein endothelial cells incubated lipoproteins. Blood Coagul Fibrinolysis 1994, 5: 385-392.

24. Bloonfield RH, Davenport J, Babikian V. Reduction in stroke with gemfibrozil in men with coronary heart disease and low HDL cholesterol. Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Circulation* 2001, 103: 2828-2833.
25. Pérez-Méndez O, Castro G, Fruchart J-C. Kinetic and metabolic studies of Apo AI and Apo AII in hypoalphalipoproteinemic patient. *Eur J Neurology* 1995 Suppl 2, 2: 77.
26. Dattito AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Clin Nutr* 1992, 56:320-328.
27. Moffat RJ, Biggerstaff KD, Stamford BS. Effects of the transdermal nicotine patch on normalization of HDL and its subfractions. *Prev Med* 2000, 31:148-152.
28. Saks FM. The role of high density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary disease: expert group recommendations. *Am J Cardiol* 2002, 90:139-142.
29. Dafna G, Ibañez D, Urowitz M. Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000. *J Rheumatol* 2002; 29: 288-91).
30. Abramowicz M, Fortin PR, Du BR. The relationship between disease activity and expert physician's decision to start major treatment in active systemic lupus erythematosus: a decision aid for development of entry criteria for clinical trials. *J Rheumatol* 1998; 25: 277-84.