



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN
PLASMÁTICA DE LÍPIDOS DE LAS SUBCLASES DE
HDL EN SUJETOS CON ENFERMEDAD
ATEROSCLEROSA SUBCLÍNICA**

T E S I S

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

PRESENTA

ALIN DENIS QUIROZ AGUILAR



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profa. Martha Leticia Jiménez Pardo

VOCAL: Prof. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Prof. Óscar Armando Pérez Méndez

1er. Suplente Profa. Martha Patricia Neri Paez

2° Suplente Profa. Vanesa Rebeca Maya Ampudia

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”,
Departamento de Biología Molecular.

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
Asesor del tema

Alin Denis Quiroz Aguilar
Sustentante

*A las personas más importantes en mi vida: mis
padres quienes has sido el mejor ejemplo en mi
vida y a mis hermanos por su apoyo.*

INDICE.

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	
1) Lipoproteínas	3
1.1) Clasificación de las lipoproteínas	5
2) Enfermedad Aterosclerosa Coronaria	7
2.1) Formación y progresión del ateroma	7
2.2) Cuantificación de Calcio Coronario	9
3) Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y EAC	11
3.1) Subpoblaciones de HDL	12
3.2) Evidencias epidemiológicas	14
3.3) Metabolismo intravascular de las HDL:	14
transporte reverso del colesterol	
3.4) Hipoalfalipoproteinemia	18
3.5) Composición lipídica de las HDL	19
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Muestras	23
Obtención de muestras	24
Análisis de laboratorio	24
Aislamiento y análisis de la subpoblaciones de HDL	24
Caracterización de las HDL	25
Separación de las subclases de HDL	25
A) Colesterol total de las subclases de HDL.	25
B) Colesterol libre y colesterol esterificado	26
de las subclases de HDL.	

C) Triglicéridos de las subclases de HDL.	26
D) Fosfatidilcolina de las subclases de HDL.	27
Determinación de la concentración plasmática de los lípidos HDL	28
Análisis estadístico.	29
RESULTADOS	30
Características clínicas y perfil bioquímico de los sujetos de estudio.	30
Distribución de las subpoblaciones de HDL en sujetos de estudio.	32
Cuantificación de las subpoblaciones de HDL.	34
Análisis de correlación entre características clínicas, perfil bioquímico y composición química de las subclases de HDL.	35
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXO 1 Determinación de Colesterol libre en microplaca	56
ANEXO 2 Determinación de proteínas por el método de Lowry	57
ANEXO 3 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas	59
ANEXO 4 Tinción para la determinación de la distribución de lípidos en gel de poliacrilamida	60
ANEXO 5 Análisis de correlación	61

ABREVIATURAS.

ABCA-1:	Transportador de membrana dependiente de ATP
Apo:	Apolipoproteínas
CAC:	Calcio en Arterias Coronarias
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL:	Colesterol de HDL
C-LDL:	Colesterol de LDL
CT:	Colesterol total
CL:	Colesterol Libre
DM:	Diabetes mellitus
EAC:	Enfermedad aterosclerosa coronaria
FMS:	Fenazin metasulfato
GEA:	Genética de la Enfermedad Aterosclerosa
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia
LCAT:	Lecitina colesterol acilo transferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LH:	Lipasa hepática
LPL:	Lipoproteína lipasa
MTT:	Azul de Tetrazolium
OPN:	Osteopontina
PAGE:	Electroforesis en gradiente de poliacrilamida
PON1:	Paraoxonasa
Ph:	Fosfatidilcolina
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
TAD:	Tensión arterial diastólica
TAS:	Tensión arterial sistólica
TC:	Tomografía computalizada
TRC:	Transporte reverso del colesterol
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN.

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es primera causa de mortalidad en los países desarrollados y segunda causa de muerte en la población adulta de nuestro país, después de la Diabetes mellitus (DM). La estrategia principal para combatir esta enfermedad se focaliza en la prevención. En este contexto los métodos de laboratorio, para evaluar el riesgo cardiovascular de manera precoz, son de gran relevancia porque permitirán adoptar las medidas higiénicas y farmacológicas para retrasar o prevenir las manifestaciones clínicas de la EAC.

La EAC es un proceso oxidativo, inflamatorio, progresivo, generalizado y multifactorial en el cual existe una participación activa de las lipoproteínas. Los síntomas clínicos alcanzan su expresión última cuando se desencadena un proceso trombótico dando lugar al infarto, sin embargo, el proceso de formación y crecimiento del ateroma se inician muchos años antes de las manifestaciones clínicas. Es en este periodo subclínico que se puede determinar la presencia y magnitud del ateroma a través de métodos, como la tomografía computarizada (TC). La mayor parte de los ateromas contienen calcio, el cual puede representar hasta un 20% del volumen de la lesión. La utilidad clínica del método de Agaston para la cuantificación de calcio, es aún motivo de debate, lo que queda fuera de toda discusión es la presencia de calcio indica la presencia de un ateroma.

Las HDL evitan la formación del ateroma por su papel central que desempeñan en el transporte reverso del colesterol (TCR), este se define como el regreso del colesterol de las células periféricas al hígado para su excreción o reciclaje. Se ha postulado que las proporciones plasmáticas de las subpoblaciones de HDL pueden ser indicativas del metabolismo de esta familia de lipoproteínas, proporcionando con ello la probabilidad de

que las subpoblaciones tengan diferentes potenciales antiaterogénicos. Por ello se ha sugerido que algunas subclases de HDL pueden ser más antiaterogénicas, sin embargo, los resultados al respecto son contradictorios. Mientras que la mayoría de los estudios epidemiológicos sostienen que las HDL grandes están presentes en sujetos con bajo riesgo de EAC y DM2. Los estudios un vitro demuestran que las HDL pequeñas poseen mejores propiedades antiaterosclerosas.

En este trabajo se propuso que cuando las HDL son separadas por su tamaño, es posible que aún puedan existir diferencias en base al contenido de lípidos entre subpoblaciones de un mismo diámetro hidrodinámico. Por ello se cuantifico mediante un método enzimático-colorimétrico en fase semisólida las concentraciones de lípidos de las subpoblaciones de HDL en sujetos con aterosclerosis subclínica, documentada por puntaje (score) de calcio coronario, con el objetivo de establecer la utilidad de esta cuantificación en la evaluación del riesgo coronario. Los resultados del presente estudio mostraron los valores correspondientes a la determinación plasmática de la concentración de lípido-proteína de las subpoblaciones de las HDL en sujetos con aterosclerosis subclínica diagnosticada por score de calcio; este método de diagnóstico resulta ser un excelente predictor de eventos coronarios futuros, y se ha considerado al score de calcio un predictor de riesgo independiente de desarrollo de la EAC.

ANTECEDENTES.

Lipoproteínas.

Los lípidos conforman un grupo grande y heterogéneo de biomoléculas caracterizadas por su baja solubilidad en medios acuosos y su alta solubilidad en solventes orgánicos no polares; por esta razón, para ser transportados en el plasma se asocian de manera no covalente a proteínas y otros lípidos, formando complejos macromoleculares y pseudomicelares, que facilitan su transporte y metabolismo. A estos complejos se les denomina lipoproteína

Las lipoproteínas (Figura 1) son estructuras compuestas por una monocapa de lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos), cuyos grupos polares son orientados hacia el medio acuoso. En el interior de las lipoproteínas se localizan los lípidos hidrófobos (ésteres de colesterol y triacilgliceroles); su ubicación evita que interactúen con el medio acuoso. Las lipoproteínas también contienen componentes denominados apolipoproteínas (apo) cuyo papel es favorecer la estabilidad fisicoquímica de las partículas, integrando los componentes internos y de la superficie ^{1,2}.

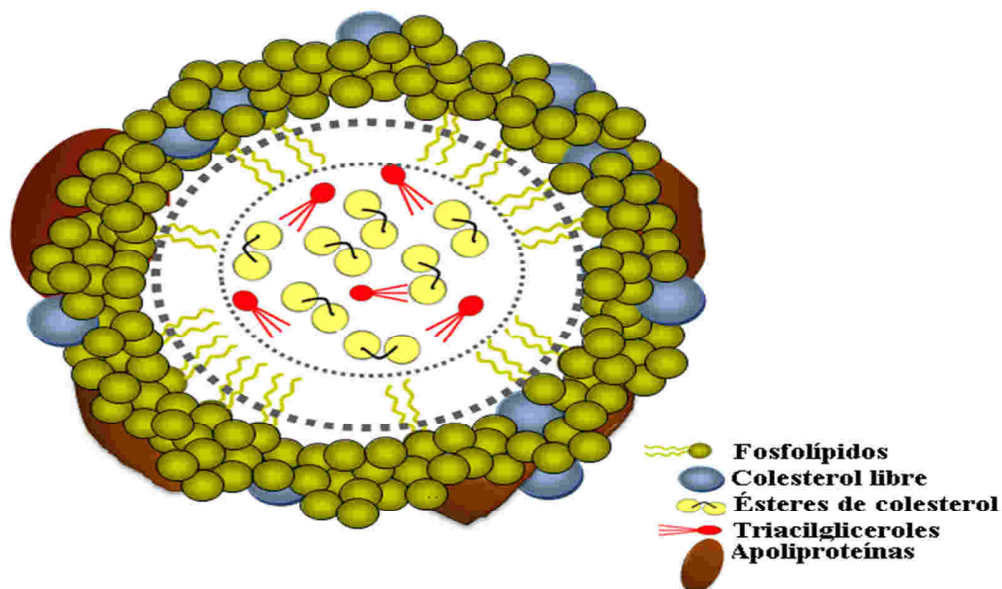


Figura 1. Esquema del arreglo general de los componentes de las lipoproteínas. La estructura es esférica y pseudomicelar, los lípidos anfipáticos en la superficie, los lípidos hidrófobos en el interior, así como las apolipoproteínas que forman parte de la partícula confiriéndole estabilidad.

En el Cuadro 1 se esquematizan las características más importantes de ciertas apolipoproteínas

Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas.³

Apo	P.M.	pI	Localización	Sitio de síntesis	Conc. plasmática (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
B-100	512,723	-	VLDL, LDL	Hígado	80-100	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	--	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III_{0,1,2}	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E_{2,3,4}	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Apo: Apolipoproteína, P.M: Peso molecular, pI: Punto isoeléctrico, Lp: Lipoproteína, Tg: Triacilgliceroles, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

Clasificación de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas, de acuerdo a su densidad de flotación, se clasifican en 5 subclases presentes a continuación:^{1,2}

- **Quilomicrones:** Son las lipoproteínas de mayor tamaño, con densidad menor a 0.94 g/mL. Tienen un alto contenido en triacilgliceroles y sus apolipoproteínas son B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

- **Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very Low Density Lipoproteins*):**
0.94 < densidad < 1.006 g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

- **Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, *Intermedie Density Lipoproteins*):**
1.006 < densidad < 1.019 g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

- **Lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoproteins*):**
1.019 < densidad < 1.063 g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.

- **Lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoproteins*):**
1.063 < densidad < 1.210 g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos, además de colesterol. Su principal apolipoproteína es la A-I, además contienen A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

En el Cuadro 2 se presentan algunas de las características de las diferentes lipoproteínas.

Cuadro 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.⁴

Lp	Movilidad Electroforética	Tamaño (nm)	Proteína (%)	Plp (%)	Tg (%)	CL (%)	CE (%)
Qm	Origen	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta beta	20-30	20	30	35	35	
LDL	Beta	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Plp: fosfolípidos, Tg: Triacilglicérols, CL: colesterol libre; CE: colesterol esterificado.

Estas lipoproteínas difieren entre sí en su composición de proteínas y de lípidos, en su tamaño y actividad fisiológica. La homeostasis del colesterol depende de la biosíntesis celular del mismo y su esterificación, así como de su transporte intercelular. Las lipoproteínas interactúan con receptores celulares específicos para aportar o remover colesterol. Los vehículos de transporte importantes para el colesterol son lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) que tienen un papel de oposición en el desarrollo de la Enfermedad aterosclerosa coronaria.

Enfermedad aterosclerosa coronaria

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es primera causa de mortalidad en los países desarrollados y segunda causa de muerte en la población adulta de nuestro país, después de la Diabetes mellitus (DM).⁵ La estrategia principal para combatir la EAC se focaliza en la prevención. Por ello, el estudio de su diagnóstico y tratamiento es prioritario para combatir este padecimiento.

Formación y progresión del ateroma

La enfermedad aterosclerosa comprende un espectro de desórdenes clínicos que abarca desde la aterosclerosis asintomática y la angina estable hasta los llamados síndromes coronarios agudos (SCA): angina inestable, infarto y muerte súbita. La EAC es un proceso oxidante, inflamatorio crónico⁶ caracterizado por la alteración morfológica y funcional de la pared vascular que en estadios finales tiene como consecuencia la disminución del calibre de la luz arterial. A las alteraciones de la pared arterial se asocian con mayor frecuencia fenómenos de agregación plaquetaria y trombosis que se pueden llegar a producir la obstrucción completa de la luz del vaso.

La EAC puede comenzar con la disfunción del endotelio vascular producida como respuesta a una agresión ejercida en la pared vascular.⁷ Como consecuencia de este daño al endotelio, se produce una infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, los cuales son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores denominados “scavenger”. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma (Figura 2).

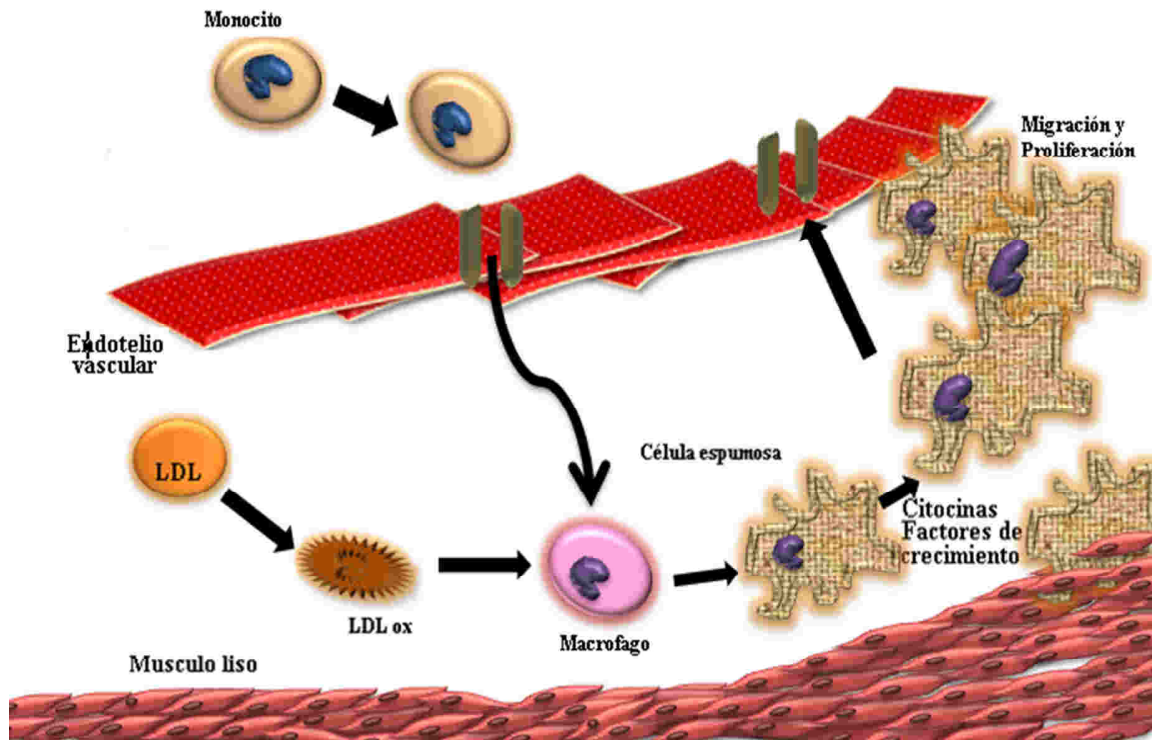


Figura 2. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa aterosclerótica. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDLox). Los monocitos se adhieren al endotelio activado, el cual sobreexpone moléculas de adhesión. Los monocitos circulantes, atraídos, penetran en la pared y son diferenciados a macrófagos, proceso en el que también intervienen las LDLox. Los macrófagos captan LDLox y se transforman en células espumosas. Las células musculares lisas (CMLV) de la media, activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, migran a la íntima y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

Una vez establecido, el ateroma está comúnmente compuesto de cantidades variables de células musculares lisas, macrófagos, linfocitos T, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Además del 5% al 20% de su estructura está conformada por calcio. La placa continúa su crecimiento paulatino hasta incluso, llegar a obliterar el lumen del vaso, reduciendo el flujo sanguíneo y causando diferentes tipos de manifestaciones clínicas.

Cuantificación de Calcio Coronario

Diversos autores han establecido que la presencia de calcio en las arterias coronarias (CAC) está directamente relacionada con la formación de la placa aterosclerosa. Algunos estudios publicados demuestran una alta sensibilidad de CAC para detectar la presencia de la EAC en pacientes asintomáticos; asimismo, se ha observado que los pacientes con un incremento en la carga de la placa (aumento de CAC) tienen aproximadamente 10 veces más probabilidades de sufrir eventos cardíacos en los siguientes 5 años.⁸ La calcificación de la placa aterosclerosa suele comenzar tan temprano como en la segunda década de la vida, justo después de la formación de la estría grasa.⁹

El proceso de formación y crecimiento del ateroma se inician muchos años antes de las manifestaciones clínicas. La etapa asintomática que se conoce como Aterosclerosis Subclínica, puede progresar hasta la aparición de manifestaciones clínicas frecuentemente graves; se estima que el 30-40% de los eventos coronarios ocurren en individuos sin síntomas previos o sin que tengan conocimiento de enfermedad aterosclerótica.¹⁰

Se ha demostrado que el enfoque tradicional basado en la identificación y tratamiento de los factores de riesgo es insuficiente para la aterosclerosis, ya que ignora su detección aun en pacientes en etapas subclínicas de alto riesgo, por lo que no es válida para definir estrategias de riesgo cardiovascular en estos pacientes.

Los depósitos de calcio se encuentran con más frecuencia, en individuos mayores y en lesiones ateroscleróticas más avanzadas¹¹, siendo edad y el sexo los factores de riesgo más importantes para la presencia de calcificación coronaria¹²⁻¹³. La mayor parte de los ateromas contienen calcio, el cual puede representar hasta un 20% del volumen de la lesión y por esta razón entre más calcio, mayor el riesgo cardiovascular.

En el período subclínico se puede determinar la presencia y magnitud de ateroma a través diferentes técnicas de tomografía computarizada (TC). El desarrollo del EBCT (Electron beam computed tomography)^{14,15} representa un cambio fundamental en el enfoque y diagnóstico de la enfermedad aterosclerótica cardíaca. Éste, utiliza un barrido de electrones de anillos de tungsteno estacionarios, dirigidos a 210 grados con el fin de

generar un haz de Rayos X finamente enfocado, cuyas imágenes permiten la detección de cantidades mínimas de calcio. El advenimiento de los multidetectores, y tomando en cuenta su mayor versatilidad, ha facilitado su implementación como técnica de elección para la cuantificación del puntaje de calcio coronario.

En el año 1990, con base en las imágenes generadas por TC, Agaston et al.¹⁶ propusieron un método para establecer una medida cuantitativa del calcio depositado en las arterias, conocido como puntaje (score) de calcio. Se trata de un estudio que permite detectar la aterosclerosis, ya que posibilita la cuantificación de placas ateromatosas por su contenido de calcio, permitiendo predecir el riesgo de eventos cardiovasculares y la presencia de enfermedad coronaria obstructiva.

Los resultados del puntaje de calcio pueden ser clasificados en 5 grupos que se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3 Directrices para la interpretación de los pacientes asintomáticos en función de la Puntuación obtenida por el método de Agatston y col.¹⁶

Puntaje de Calcio	Categoría
0	Sin calcificación coronaria
< 100	Calcificación coronaria leve
100 - 399	Calcificación coronaria moderada
400 - 999	Calcificación coronaria severa
1000	Calcificación coronaria extensa

Un nivel del calcio coronario de cero, significa que no hay calcificaciones detectables; sin embargo, placas no calcificadas pueden aún estar presentes. Para la correcta interpretación de estas categorías de calcificación coronaria, debe considerarse que existe una estrecha relación y dependencia con la edad y el género.

En el momento actual el empleo del score de calcio se centra en la evaluación del riesgo en pacientes asintomáticos, con el propósito de modificar y potencialmente mejorar su estilo de vida, así como medio para seleccionar diagnóstico adicional o procedimientos invasivos.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y EAC

Por medio de estudios epidemiológicos y evidencia clínica documentada se ha establecido que existe una correlación negativa entre las concentraciones de colesterol asociado a las HDL y la incidencia de EAC.¹⁷ Debido a esto se ha postulado que las HDL tienen una función protectora en el desarrollo de esta enfermedad y se han descrito distintos mecanismos para explicar este efecto.

Las HDL son las lipoproteínas de menor tamaño, con diámetros que oscilan entre los 7.5 nm y los 12 nm, contienen una mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca), derivado de ello, las HDL poseen una mayor densidad comparada con el resto de las lipoproteínas. Respecto a su composición en apolipoproteínas, cabe destacar que la apo A-I es la más abundante.

La apo A-I además de su función estructural en las HDL,³ es indispensable en el eflujo de colesterol de las células periféricas, primera etapa del transporte reverso del colesterol (TRC). La apo A-I también desempeña la función de coenzima de la lecitina: colesterol acilo transferasa (LCAT), dentro del metabolismo de las HDL, como se describe más adelante.

Las HDL sufren un procesamiento metabólico continuo, esto propicia que adquieran propiedades y composiciones químicas variables, permitiendo que estas lipoproteínas se presenten como una gama muy heterogénea de partículas, que pueden diferenciarse por su diámetro, composición, densidad y carga. Se han planteado diversos métodos de aislamiento y separación de las lipoproteínas y, a causa de esta heterogeneidad en sus características, se han generado diferentes subclasificaciones.

Subpoblaciones de HDL.

El método clásico para la separación de las subfracciones de lipoproteínas es la densidad. Se utiliza la ultracentrifugación para su separación de otros componentes del plasma. En esta separación se distinguen dos subpoblaciones mayoritarias, las HDL₂ (densidad entre 1,063 y 1,125 g/mL) y las HDL₃ (densidad entre 1,125 y 1,210 g/mL) y las pre HDL de más de 1,210 g/mL.¹⁸ Las HDL₂ son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL₃ están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas. Una clasificación más fina de las HDL en función de su tamaño, las dividen en 5 subclases, HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} y HDL_{3c}. (cuadro 5)

Las subfracciones de HDL pueden separarse también con base en su diámetro hidrodinámico por medio de electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones no-desnaturalizantes. Las HDL separadas por este método pueden subdividirse en HDL_{2b} con diámetros de 9.7-12 nm, HDL_{2a}, de 8.8-9.7 nm, HDL_{3a} 8.2-8.8 nm, HDL_{3b} 7.8-8.2 nm y HDL_{3c} de 7.2-7.8 nm.³ Cabe destacar que este método es semicuantitativo.

Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, por lo que algunos autores las identifican como α -lipoproteínas. Por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño, otras subfracciones de HDL, entre estas destacan las partículas pre- β 1 compuestas básicamente de fosfolípidos y apo A-I, presentan una masa molecular de alrededor de 60 kDa. Estas HDL son sintetizadas en el hígado y desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas como se describe más adelante.

Cuadro 5 Características y clasificación de las HDL de plasma humano¹⁹

Propiedad	Pre-beta HDL	HDL2	HDL3
<i>Movilidad electroforética</i>	Pre- β	α	α
<i>Densidad (g/mL)</i>	> 1.210	1.063 -1.125	1.125-1.210
<i>Subpoblaciones</i>	Pre- β_1 , Pre- β_2 , Pre- β_3	HDL _{2b} , HDL _{2a}	HDL _{3a} , HDL _{3b} , HDL _{3c}
<i>Diámetro (nm)</i>	Pre- β_1 : 5,4-7 Pre- β_2 : 12-14	HDL _{2b} : 9.7-12 HDL _{2a} : 8,8-9,7	HDL _{3a} : 8,2-8,8 HDL _{3b} : 7.8-8,2 HDL _{3c} : 7,2-7,8

Subpoblaciones de HDL y su relación con EAC

Los padecimientos cardiovasculares se acompañan de distribuciones de tamaños anormales de las lipoproteínas de alta densidad (HDL); en consecuencia, la determinación de los tamaños de HDL puede ser una herramienta diagnóstica incluso mejor que la determinación del colesterol-HDL plasmático. Además, se ha sugerido que algunas subclases de HDL pueden ser más antiaterogénicas. Sugiriendo que la fracción protectora corresponde a las HDL grandes, pero los estudios in vitro han demostrado lo contrario: las HDL pequeñas promueven más el eflujo de colesterol, tienen mayor poder antioxidante y su proporción aumenta en ciertas circunstancias de bajo riesgo cardiovascular.²⁰⁻²²

La divergencia en los resultados de varios estudios puede ser atribuida a los diferentes métodos utilizados, la variación étnica, o la heterogeneidad probable de las subfracciones con funciones fisiológicamente diferentes. Esencialmente los métodos utilizados se basan en la determinación de alguno de los componentes estructurales de las lipoproteínas, como lo son el colesterol y la proteína.

Por esta razón, en nuestro laboratorio se han desarrollado métodos que permiten cuantificar la concentración de los lípidos de las subpoblaciones HDL por medio de métodos enzimáticos en fase gel.^{23,24} Estos métodos han puesto en evidencia algunas diferencias en los lípidos de las subpoblaciones de HDL entre pacientes con síndrome metabólico y sus correspondientes controles. Sin embargo, no se ha demostrado si tales diferencias se asocian al desarrollo de la EAC o a la condición de resistencia a la insulina que caracteriza al síndrome metabólico.

Evidencias epidemiológicas

En los estudios epidemiológicos se ha demostrado que las concentraciones bajas del C-HDL constituyen un factor de riesgo importante e independiente de EAC. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los cambios en la distribución de las subpoblaciones de las HDL son de mayor utilidad que las concentraciones de C-HDL en la predicción de eventos coronarios.^{17,25} También se ha informado que en los individuos con valores bajos de C-HDL, las HDL están enriquecidas en Tg y presentan una disminución de ésteres de colesterol.²⁶ Esta composición anormal se asocia a reducción de sus efectos antioxidantes y a una menor capacidad para promover el eflujo de colesterol, lo que puede disminuir la actividad ateroprotectora de las HDL.²⁷

Metabolismo intravascular de las HDL: transporte reverso del colesterol.

La composición, estructura y distribución de las HDL son parámetros que derivan del intercambio dinámico de lípidos y apolipoproteínas entre lipoproteínas de diferentes clases y entre lipoproteínas y los tejidos. Esta interacción es posible gracias a la presencia y participación de una gran variedad de enzimas, proteínas plasmáticas y de membrana, implicadas en el transporte, hidrólisis y transferencia de los componentes de las lipoproteínas. Algunas características de estas proteínas se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas.^{4, 28}

Nombre	Función	Origen
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilglicerolos y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triacilglicerolos de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilglicerolos entre las HDL ₂ y las lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado
Receptores y Proteínas de membranas		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, tejido esteroideogénico
ABCA-1	Modulación del eflujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino
apo-B/E r	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el eflujo de colesterol vía los hepatocitos.	Hígado

LCAT: Lecitina colesterol acilo-transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoprotéica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso del exceso de colesterol, de las células periféricas hacia el hígado para su eliminación o reciclaje. Lo anterior evita la formación de acumulaciones patológicas como la placa ateromatosa.^{29,30} Este proceso (Figura 3) en la primera etapa consiste en la captación de colesterol libre de células periféricas a través de HDL pequeñas, ricas en apolipoproteínas y con una menor proporción de lípidos como son las tipo pre β y HDL₃. Una vez que el colesterol se localiza en las HDL es esterificado por la enzima lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT); esta esterificación ocasiona que el colesterol pierda su carácter anfipático y se internalice, dando origen al aumento en el tamaño de las HDL y su consecuente decremento en su densidad generando HDL₂. A partir de aquí el colesterol esterificado tiene dos posibilidades de interacción:

a) Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el que interviene el receptor hepático SR-BI, el cual remueve de manera selectiva los ésteres de colesterol de las HDL₂. Esta interacción no elimina a la partícula lipoproteica. Es decir la HDL sólo cambia su estructura y regenera partículas de tipo HDL₃, capaces de continuar con el eflujo del colesterol.

b) Por otro lado, a través de diversas reacciones de transferencia, los ésteres de colesterol asociados a las HDL son intercambiadas por triacilgliceroles con los diferentes lipoproteínas que contienen apo B como VLDL e IDL, intercambio facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), por una parte; las apo C y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL. Los triacilgliceroles captados por las HDL₂ son hidrolizados por la lipasa hepática (LH), y en asociación con la actividad de la PLTP los remanentes de HDL son remodelados en partículas pre- β y HDL₃, ambas con la capacidad de iniciar el ciclo. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares.²⁹

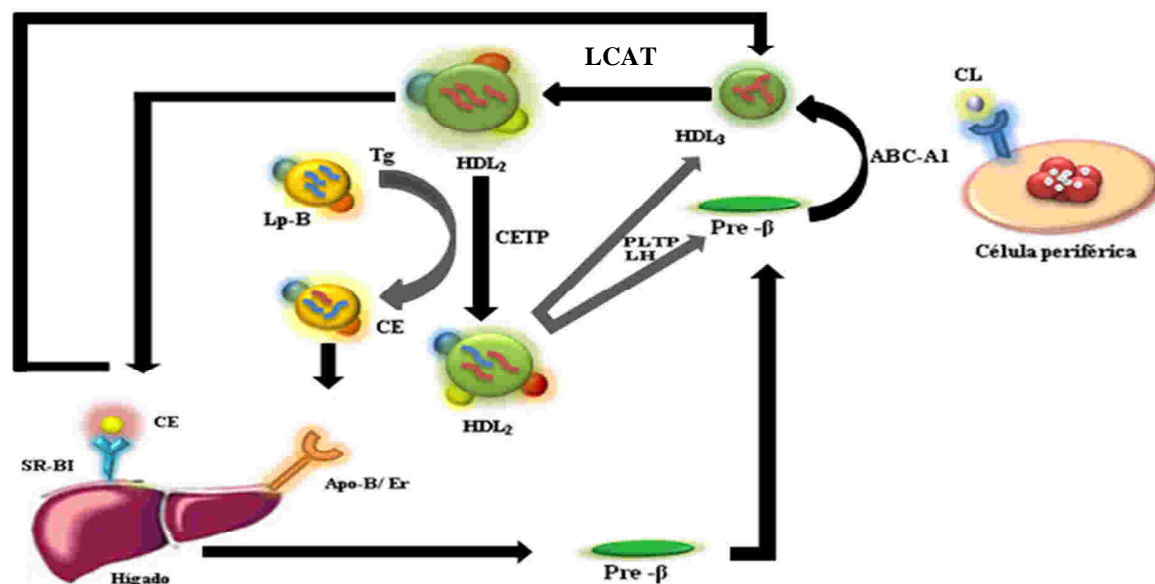


Figura 3. Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL, lipoproteínas de baja densidad y Qm, Quilomicrones). Tg: triacilglicerolos; LCAT: Lecitina colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger BI; ABC-A1: Transportador de membrana dependiente de ATP.

En años recientes se ha postulado que las HDL tienen propiedades antiaterosclerosas más allá de la promoción del flujo de colesterol. Las HDL poseen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, profibrinolíticas, de estimación del funcionamiento endotelial y en particular, varios estudios han identificado los efectos antioxidantes de HDL como una función potencialmente importante.

Hipoalfalipoproteinemia

Por definición, el término hipoalfalipoproteinemia corresponde a concentraciones plasmáticas de C-HDL por debajo de 40 mg/dL nivel considerado como un factor de riesgo para aterosclerosis.^{31,32}

En diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo independiente de enfermedad aterosclerosa coronaria. En estudios prospectivos, el C-HDL es comúnmente el factor de riesgo lipídico que mejor correlaciona con el riesgo de aterosclerosis coronaria.^{17,33} Como se ha mencionado anteriormente las HDL desempeñan, sin duda, un papel directo en la protección contra el proceso ateroscleroso. Sin embargo, su actividad protectora probablemente no explica la totalidad del gran poder predictivo que tienen las HDL en los estudios epidemiológicos. En efecto, los niveles bajos de C-HDL suelen correlacionar con hipertrigliceridemia y se asocian comúnmente con la presencia de partículas LDL pequeñas y densas que son altamente aterogénicas.³⁵ Además, la hipoalfalipoproteinemia puede ser consecuencia de resistencia a la insulina y por lo tanto se considera marcador del síndrome metabólico que por sí sólo es considerado proaterogénico.^{31,35} Otros factores de riesgo de aterosclerosis como el sobrepeso, ingesta elevada de carbohidratos, el tabaquismo y el sedentarismo, también generan hipoalfalipoproteinemia, de tal manera que los bajos niveles de C-HDL son el resultado de varias situaciones proaterogénicas, que no siempre se han incluido en los estudios epidemiológicos. Por lo tanto, el C-HDL no es un factor de riesgo tan independiente como los suelen demostrar los análisis estadísticos multivariados.

Debido a que bajos niveles de C-HDL pueden ser simultáneamente causa de aterosclerosis y marcador de otros factores de riesgo, existe la posibilidad de que la intervención terapéutica sobre el C-HDL no contribuya a reducir tanto el riesgo de aterosclerosis coronaria, como podría esperarse con base en los resultados de los estudios epidemiológicos. A pesar de que los niveles bajos de C-HDL son un factor independiente de riesgo cardiovascular, algunos casos aislados de hipoalfalipoproteinemia severa no se asocian a riesgos elevados de enfermedad arterial coronaria (EAC).^{36,37} En ese tipo de

pacientes, se ha determinado que el catabolismo de las HDL es muy elevado, lo que sugiere una función acelerada. En otras palabras, la cantidad de HDL es importante, pero la velocidad con la que realizan sus funciones lo es aún más.

A pesar del concepto de que las partículas de HDL tienen propiedades que protegen contra la aterosclerosis, y que estas funciones no necesariamente pueden ser inferidas a partir de la medición de las concentraciones plasmáticas de HDL, se ha sugerido que las propiedades antiaterosclerosas de las HDL dependen también de su estructura, y por esta razón, las HDL se han agrupado en diferentes subclases. Sin embargo aún no se sabe con certeza cuál es la fracción más protectora de las HDL

Composición lipídica de las HDL

El contenido de fosfolípidos es un factor importante en el metabolismo de las HDL y sus efectos dependen en gran medida de la naturaleza de la cabeza polar.³⁸⁻⁴⁰ Las HDL ricas en fosfatidilcolina son más eficientes en promover el eflujo de colesterol en comparación con las HDL nativas.⁴¹ La fosfatidilcolina se deposita en la placa aterosclerosa por medio de las HDL y esto contribuye a solubilizar el colesterol contribuyendo así al eflujo de colesterol desde la placa.⁴¹

La carga eléctrica de la superficie de las partículas de HDL determina el metabolismo de estas lipoproteínas⁴² y depende en gran parte de los grupos químicos ionizables de los fosfolípidos de superficie, en particular de la fosfatidilserina. Este fosfolípido, tiene un papel central en la formación de las HDL en los compartimentos intracelulares sugiriendo que la carga eléctrica negativa de superficie adicional aportada por la fosfatidilserina en las HDL es crucial para interacción de la apo AI con la interface lipídica de las lipoproteínas.

Actualmente se desconoce con precisión cuál o cuáles subclases de HDL contribuyen con una mayor cantidad de fosfolípidos y cómo se altera el contenido de fosfolípidos de las diferentes subclases de HDL en la EAC y otras circunstancias fisiopatológicas de riesgo cardiovascular.

JUSTIFICACIÓN.

Se ha postulado que las proporciones plasmáticas de las subpoblaciones de HDL pueden ser indicativas del metabolismo de esta familia de lipoproteínas, proporcionando con ello la probabilidad de que las subpoblaciones tengan diferentes potenciales antiaterogénicos. Sin embargo, no se ha demostrado si tales diferencias se asocian al desarrollo de la EAC o a la condición de resistencia a la insulina que caracteriza al síndrome metabólico. Hasta el momento no es posible elegir con certeza las fracciones de HDL que son más ateroprotectoras, puesto que las evidencias experimentales al respecto son contradictorias.

Con este argumento en el proyecto se propone que cuando las HDL son separadas por su tamaño, es posible que aún puedan existir diferencias en base al contenido de lípidos entre subpoblaciones de un mismo diámetro hidrodinámico, estas diferencias son resultado de circunstancias fisiopatológicas. Si esto es así, entonces la determinación de la concentración plasmática de los lípidos de las subpoblaciones de HDL será una herramienta adicional para establecer el riesgo coronario.

En el presente trabajo se plantea la determinación de los lípidos de las subpoblaciones de HDL en sujetos con aterosclerosis subclínica, documentada por puntaje (score) de calcio coronario, con el objetivo de establecer la utilidad de esta cuantificación en la evaluación del riesgo coronario. Se determinará la concentración plasmática de triglicéridos, fosfatidilcolina, colesterol total, colesterol libre y colesterol esterificado de las subpoblaciones de HDL en sujetos con enfermedad aterosclerosa subclínica, determinada por una tomografía computarizada basado en un puntaje (score) de calcio coronario.

HIPÓTESIS.

Los sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria subclínica diagnosticada por puntaje de calcio coronario presentarán alteraciones de los niveles de lípidos plasmáticos de las subclases de HDL en comparación con los sujetos con puntaje de calcio igual a cero.

OBJETIVOS.

Objetivo general

- Cuantificar la concentración plasmática de fosfatidilcolina, colesterol total, colesterol libre, y triacilglicerolos de las subclases de HDL (HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c) en sujetos con enfermedad aterosclerosa coronaria subclínica diagnosticada por determinación de score de calcio y sus respectivos controles

Objetivos particulares.

- Establecer la distribución de tamaños las 5 subclases de HDL por electroforesis en gradiente de poliacrilamida.
- Realizar la tinción enzimática específica para cuantificar las concentraciones de colesterol total, colesterol libre (no esterificado), triglicéridos, fosfatidilcolina, en el gel de poliacrilamida y realizar el análisis de densitometría óptica correspondiente.
- Cuantificar las concentraciones plasmáticas de colesterol-HDL (C-HDL), colesterol Libre-HDL (CL-HDL), fosfatidilcolina-HDL (Ph-HDL), triglicéridos-HDL (Tg-HDL).
- Establecer si los lípidos de las subclases de HDL se correlacionan estadísticamente con el score de calcio coronario.
- Establecer si los lípidos de las subclases de HDL se correlacionan estadísticamente con factores de riesgo cardiovascular no lipídicos

MATERIALES Y MÉTODOS.

Pacientes:

Este estudio es parte del proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa) registrado en el Instituto Nacional de Cardiología y conducido por los Dres. Gilberto Vargas y Carlos Posadas. Todos los pacientes fueron valorados clínicamente con estudios de laboratorio. Posteriormente los sujetos se sometieron a una tomografía computarizada para establecer su score de calcio arterial coronario (CAC).

En nuestro trabajo se seleccionaron un total de 120 sujetos (edad entre 40 y 75 años), clínicamente sanos. A partir de los valores de CAC se dividieron en tres grupos, el primero incluyó 40 personas a las que se les diagnosticó enfermedad aterosclerosa asintomática y ($CAC \geq 75$) percentiles de la población según edad y sexo⁴³, y se consideró como el grupo de pacientes o casos. El grupo de comparación lo conformaron 40 pacientes clínicamente sanos que además presentaron un score de calcio coronario igual a cero ($CAC=0$). En este proyecto estos pacientes se describen como grupo control.

Para un análisis posterior cuya finalidad es establecer que parámetros determinan el Calcio Arterial Coronario, se integró un grupo de 40 pacientes con un ($CAC \leq 25$) percentiles de la población para edad y sexo. La metodología para estimar los percentiles para edad y sexo está descrita con detalle por McClelland et al.⁴⁴

Criterios de inclusión: Hombres o mujeres de 40 a 75 años de edad. Encontrarse clínicamente sanos al momento del estudio.

Criterios de exclusión: Hombres o mujeres de menores de 40 años; Infarto agudo al miocardio, angina o consumo de nitroglicerina; enfermedad cerebral vascular; ataque isquémico transitorio o enfermedad vascular periférica; injerto de derivación de arteria coronaria o angioplastia; enfermedad aterosclerosa prematura en algún familiar de primer grado; enfermedad hepática, renal, tiroidea, cáncer o enfermedad reumatológica; infección aguda en las dos semanas previas al estudio; consumo bebidas alcohólicas; consumo de fármacos antidislipidémicos y/o beta-bloqueantes.

Obtención de muestras

Después de un ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosas que fueron colectadas en tubos que contenían EDTA (1 mg/mL). Inmediatamente las muestras fueron centrifugadas a 3500 r.p.m (rotor ángulo oscilante, radio de 14.9cm) durante 15 minutos a 4 °C. al concluir este tiempo el plasma fue separado, se conservó en alícuotas que fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de su análisis.

Análisis de Laboratorio

El perfil de lípidos: triacilgliceroles, fosfatidilcolina y colesterol total se determinó por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales Randox® (Reino Unido). Para la determinación colesterol libre se utilizó un método desarrollado en el laboratorio, el cual se describe en el Anexo1. En muestras de plasma se precipitó de manera selectiva las lipoproteínas que contienen apo B con una solución de ácido fosfotúngstico/cloruro de magnesio Randox® (Reino Unido) y posteriormente con métodos enzimáticos colorimétricos comerciales, se determinó en el sobrenadante colesterol de HDL (C-HDL), triacilgliceroles (Tg-HDL), Fosfatidilcolina (Ph-HDL)

Las determinaciones de proteínas totales se realizaron por el método de Lowry et al.⁴⁵ (Anexo2).

Para la determinación de los lípidos de las subclases de HDL se utilizó la metodología que se describe a continuación.

Aislamiento y análisis de la subpoblaciones de HDL

Caracterización de las HDL

Separación de las subclases de HDL. Las muestras de HDL se obtuvieron por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma, ajustando la densidad del mismo a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultra centrifugando por 2 horas 30 minutos a 100000 r.p.m. (rotor de ángulo fijo, radio de 37.2 mm) con el fin de separar las lipoproteínas que contienen apo B. Posteriormente se ajustó nuevamente la densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido y se ultracentrifugó por 3 horas a 100000 r.p.m. (rotor de ángulo fijo, radio de 37.2 mm) para aislar a las HDL.. A continuación se ajustó el sobrenadante con solución de KBr sólido a una densidad 1.25g/mL y se ultracentrifugó por 3 horas a 100000 r.p.m. (rotor de ángulo

fijo, radio de 37.2 mm) para disminuir la cantidad de albúmina residual que está presente con las HDL. Bajo estas condiciones se recupera de 80% a 85%⁴⁶ de la apo A-I del plasma total. Las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH 8.4 (amortiguador TBE).

Las subpoblaciones de HDL se separaron posteriormente por su tamaño en electroforesis en gradiente de 3 a 30 % de poliacrilamida en condiciones nativas, detallado en el Anexo 3. Los radios hidrodinámicos de las subclases de HDL (HDL2b 10.58-12.36 nm, HDL2a 9.94-10.58 nm, HDL3a 8.98-9.94, HDL3b 8.45-8.98 nm, HDL3c 7.90-8.45 nm)⁴⁷ separadas en el gel, se analizaron utilizando como referencia marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina de 17 nm, ferritina de 12.2 nm, catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK)⁴⁶. De esta manera se determinó la porción de cada subpoblación de HDL. Posteriormente se obtuvo el densitograma (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad) de las bandas correspondientes a los lípidos (colesterol, triacilgliceroles, fosfatidilcolina) y proteína para su análisis. Los geles se tiñeron inicialmente con el reactivo revelador de cada uno de los lípidos según se detalla más adelante para cada uno de ellos. Tras la decoloración de la tinción de lípidos con una mezcla de ácido acético/metanol, los geles de poliacrilamida fueron teñidos para proteína con una solución de colorante azul de Coomassie R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua, este colorante se asocia a proteínas.

- A. *Colesterol total de las subclases de HDL.*** La tinción en gel del colesterol total se llevó a cabo según el método desarrollado previamente en nuestro laboratorio²³ se utilizó una mezcla enzimática compuesta de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4. Además, se agregó colato de sodio 3 mM y Tritón 100X 0.1% para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas. Para evitar la difusión de los reactivos y productos de reacción, así como para garantizar un contacto homogéneo del reactivo con la superficie del gel de poliacrilamida, se empleó carboximetilcelulosa como agente viscosante (Anexo 4). El H₂O₂, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas, es estequiométricamente proporcional al colesterol total en la muestra y se puso en evidencia con la peroxidasa y azul de tetrazolium (MTT) y fenazin metasulfato (FMS) como donador de electrones.⁴⁸

El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica. Las reacciones acopladas se esquematizan en la figura 4.

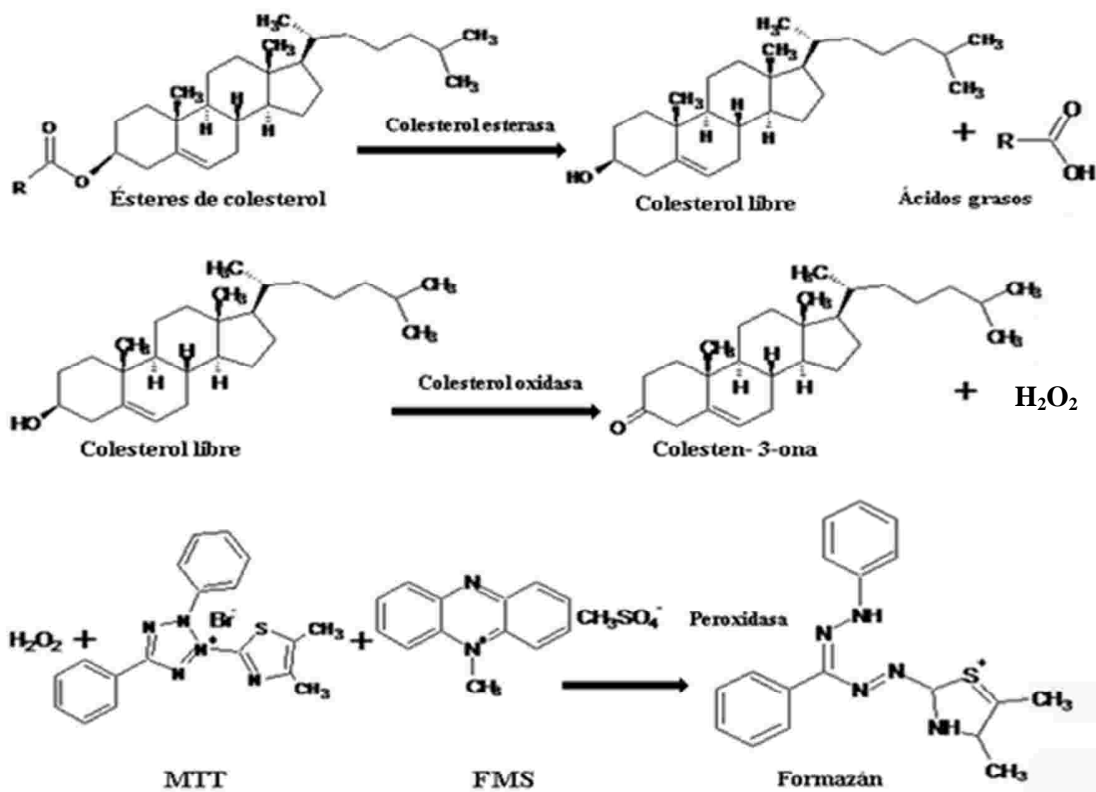


Figura 4. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol. El formazán será analizado por densitometría óptica en un intervalo de longitud de onda de 520 a 570 nm.

- B. Colesterol libre y colesterol esterificado de las subclases de HDL.** Se utilizó el mismo procedimiento que para el colesterol total pero omitiendo la enzima colesterol esterasa. Esto garantiza la cuantificación específica del colesterol libre (Anexo 4). El colesterol esterificado se calculó por la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.
- C. Triglicéridos de las subclases de HDL.** Se empleó una mezcla enzimática compuesta de lipasa, glicerol cinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, ATP 1 mM, colato de sodio 3 mM y Tritón® 100X 0.1%. Se agregó además el agente viscosante (Anexo 4).²⁵ El H_2O_2 se pone en evidencia con MTT

y FMS⁴⁶ (figura 5). El producto de reacción precipita en el gel y se analiza por densitometría óptica.

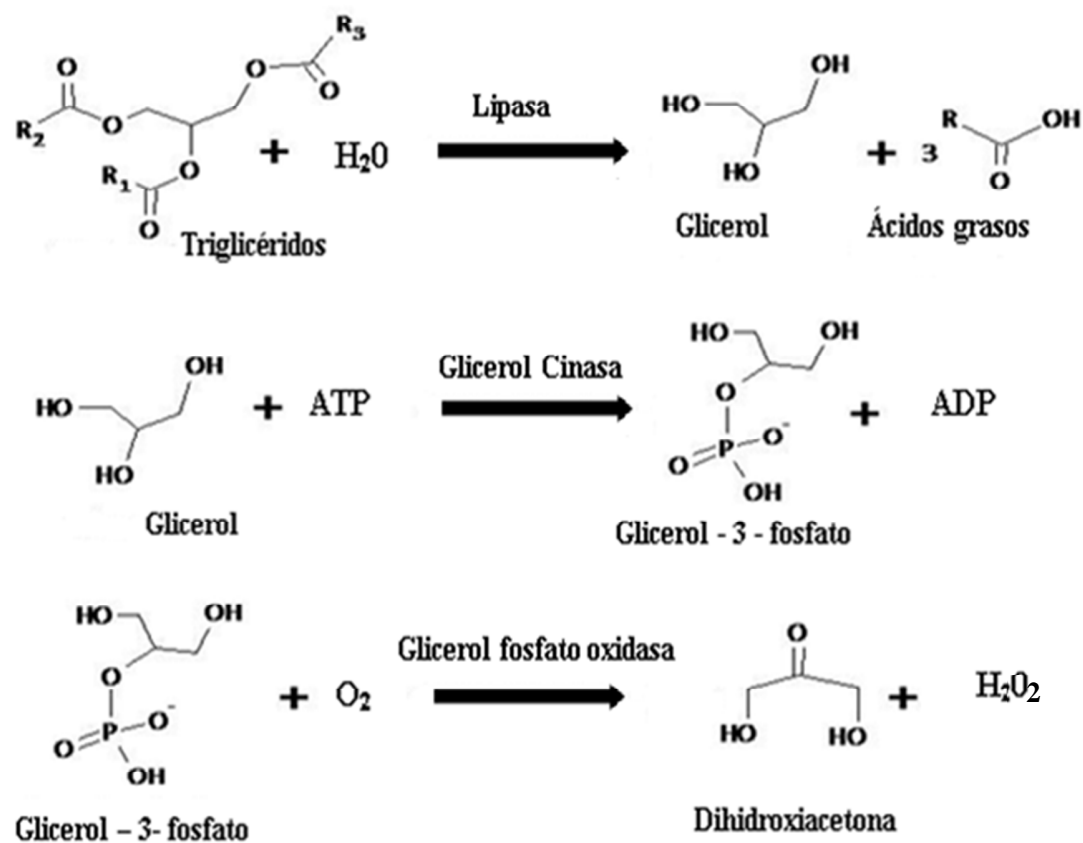


Figura 5. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de triglicéridos.

D. Fosfolípidos de las subclases de HDL. Para realizar la detección selectiva de fosfatidilcolina sobre el gel de poliacrilamida se empleó una mezcla enzimática compuesta de fosfolipasa D y colina oxidasa en solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 7.4, colato de sodio 3 mM y Tritón® 100X 0.1%. Se agregó además el agente viscosante (Anexo 4). El H₂O₂, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas se pondrá en evidencia con peroxidasa, MTT y FMS⁴⁸ (fig. 6). El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica.

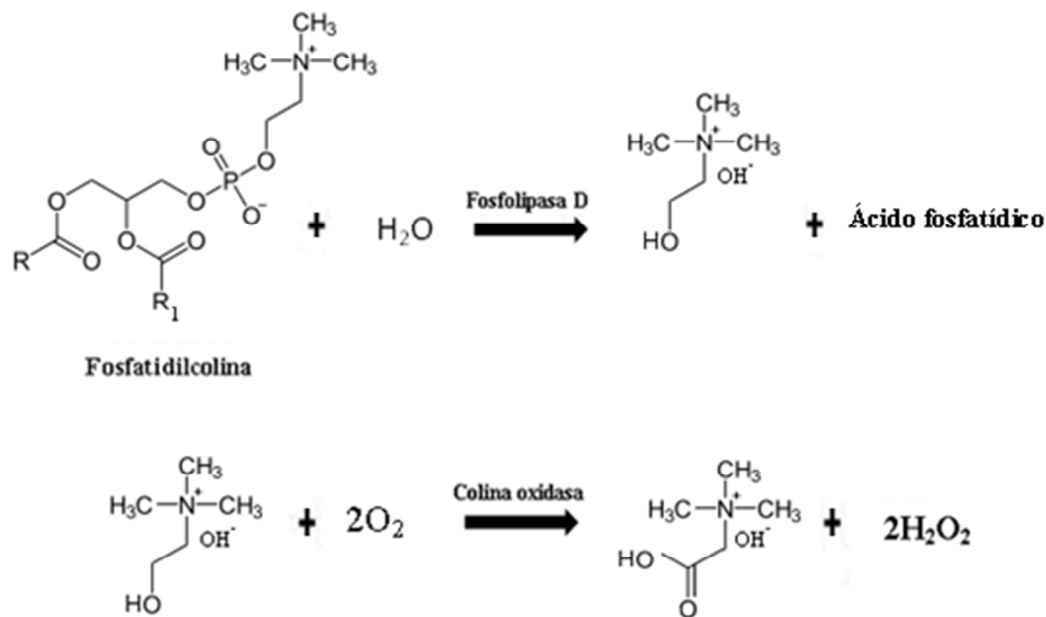


Figura 6. Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de fosfatidilcolina.

Determinación de la concentración plasmática de los lípidos HDL

La concentración plasmática de cada uno de los lípidos de HDL totales (triglicéridos, fosfatidilcolina, colesterol libre y esterificado) sirvió de referencia para calcular la concentración plasmática de cada subclase de HDL. Para realizar estas determinaciones, las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL) se precipitan selectivamente con un reactivo comercial que contiene ácido fosfotúngstico/cloruro de magnesio Randox® utilizado habitualmente para la determinación colesterol-HDL en química clínica de rutina. En el sobrenadante contiene a las HDL totales. En ese sobrenadante se cuantifican cada uno de los lípidos HDL arriba mencionados utilizando la misma mezcla enzimática de los incisos A) al D). La cuantificación se hizo espectrofotométricamente. El colesterol esterificado, contenido en las HDL, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CE -HDL} = (\text{CT-HDL}) - (\text{CL-HDL}) * 1.68.^{49}$$

Análisis estadístico.

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, versión 18.0 para Windows. Chicago, Illinois). Los valores de las variables clínicas y bioquímicas se expresan como la media \pm desviación estándar. Las variables bioquímicas con distribución no normal se representan como mediana con rango intercuartilar (percentilas 25 a la 75).

Para determinar si los datos se ajustan a una distribución normal se realizó una prueba de Kolmogorov–Smirnov. La comparación entre variables cuantitativas continuas con una distribución normal se realizó mediante la prueba de t de Student si se comparan dos muestras y una ANOVA con análisis post hoc tipo LDS si se comparan más de dos grupos con distribución normal. Las variables con una distribución no normal se les realizó una transformación logarítmica para poder aplicarles las pruebas paramétricas correspondientes.

Se utilizó un análisis de Correlación de Pearson para evaluar la interdependencia entre la concentración de lípidos o proteína de las subclases de HDL y algunas variables bioquímicas de los pacientes.

En todos los casos los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos

RESULTADOS.

Características clínicas y perfil bioquímico de los sujetos de estudio

En los cuadros 6 y 7 se presentan las características clínicas y bioquímicas correspondientes a los sujetos que conforman los grupos de estudio, aquellos con CAC ≥ 75 percentil para edad y sexo, los que presentan CAC ≤ 25 percentil y el grupo con CAC=0

Cuadro 6. Características clínicas para los sujetos de estudio.

	CAC=0 (n=40)	CAC ≤ 25 (n=40)	CAC ≥ 75 (n=40)	p*
Mujeres/ hombres	19 / 21	22 / 18	21 / 19	0.686
Edad (años)	56.9 \pm 8.7	58.6 \pm 6.7	56.7 \pm 8.8	0.489
IMC (kg/m²)	28.7 \pm 3.9	28.6 \pm 3.9	28.4 \pm 4.5	0.938
Cintura (cm)	94.3 \pm 10.6	94.2 \pm 11.2	95.8 \pm 11.1	0.784
TAS (mm Hg)	122.2 \pm 19.2	122 \pm 20.4	126.8 \pm 20.6	0.491
TAD (mm Hg)	74.0 \pm 8.3	74.5 \pm 10.4	78.1 \pm 11.9	0.147

Media \pm D.E IMC = Índice de masa corporal; TAS = presión arterial sistólica; TAD = presión arterial diastólica. * = ANOVA

	CAC=0 (n=40)	CAC ≤ 25 (n=40)	CAC ≥ 75 (n=40)	p*
Glucosa (mg/dL)	93.5 (84.8-103)	94.5 (87.8-108.3)	99 (87.0-105.8)	0.563
CT (mg/dL)	197.4 \pm 34.3	200.2 \pm 34.2	200.1 \pm 31.7	0.909
Tg (mg/dL)	158 (112.3-239.3)	171 (113.5-212.0)	177 (139.3-223.0)	0.513
A. Úrico (mg/dL)	5.3 \pm 1.3	5.8 \pm 1.7	5.8 \pm 1.5	0.262
Cr (mg/dL)	0.9 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	0.606
C-LDL (mg/dL)	121.4 \pm 32.2	124.9 \pm 29.7	127.9 \pm 25.7	0.607

Media \pm D.E o mediana (rango intercuartil); CT=Colesterol Total; Tg=Triglicéridos; Á.úrico=Ácido Úrico; Cr = Creatinina; C-LDL=Colesterol de lipoproteínas de baja densidad * = ANOVA

Se puede observar en el cuadro 6 que los tres grupos de estudio no presentaron diferencias significativas para ninguno de las características clínicas, consideradas como factores de riesgo tradicionales.

La concentración de triglicéridos (cuadro 8) tiende a ser más elevada en el grupo CAC ≥ 75 con respecto a los grupos CAC=0 y CAC ≤ 25 sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas.

Con la finalidad de conocer la composición lipídica de las HDL, se realizó la determinación plasmática de los lípidos de HDL en los sujetos con CAC ≥ 75 , CAC ≤ 25 y CAC=0, los resultados se presentan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Composición en lípidos de las HDL de los grupos de estudio.

	CAC=0 (n=40)	CAC ≤ 25 (n=40)	CAC ≥ 75 (n=40)	P*
C-HDL (mg/dL)	45.5 (35.8-60.0)	44 (38.8-50.0)	38 (33.3-46.8)	0.026 ^a
CL-HDL (mg/dL)	19.0 \pm 8	20.8 \pm 9.2	17.4 \pm 7.9	0.191
CE-HDL (mg/dL)	45.8 \pm 17.0	39.5 \pm 16.9	36.9 \pm 15.6	0.046 ^a
Tg-HDL (mg/dL)	36.8 \pm 18.9	38.2 \pm 16.7	34.9 \pm 17.2	0.704
Ph-HDL (mg/dL)	131.9 \pm 31.7	123.5 \pm 30.9	111.2 \pm 32.5	0.015 ^a

Media \pm D.E o mediana (rango intercuartil); C-HDL = Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CL-HDL= Colesterol Libre de lipoproteínas de alta densidad; CE-HDL= Colesterol Esterificado de lipoproteínas de alta densidad; Tg-HDL= Triglicéridos de lipoproteínas de alta densidad; Ph-HDL= Fosfatidilcolina de lipoproteínas de alta densidad *** = ANOVA**

^a p<0.05 entre CAC=0 y CAC ≥ 75 .

Los lípidos como el C-HDL, el CE-HDL y Ph-HDL del grupo CAC=0 presentan una concentración aproximadamente 17% mayor, con respecto al grupo CAC ≥ 75 . Mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas para los lípidos de HDL de los grupos CAC=0 y CAC ≤ 25 .

Distribución de las subpoblaciones de HDL en sujetos de estudio

Algunos resultados experimentales sugieren que las concentraciones plasmáticas de las subpoblaciones de HDL pueden ser indicativas del metabolismo de esta familia de lipoproteínas, y es muy probable que las subpoblaciones tengan diferentes potenciales antiaterogénicos. Por esta causa se determinó la distribución de tamaños de las HDL mediante electroforesis en gradiente de 3% a 30% condiciones nativas, según se describe en la sección de métodos.

En la figuras 7, 8 y 9 se pueden observar los resultados de los grupos $CAC=0$, $CAC\leq 25$ y $CAC\geq 75$ donde se muestran las proporciones relativas determinadas por la fracción proteica de las diferentes subpoblaciones de HDL.

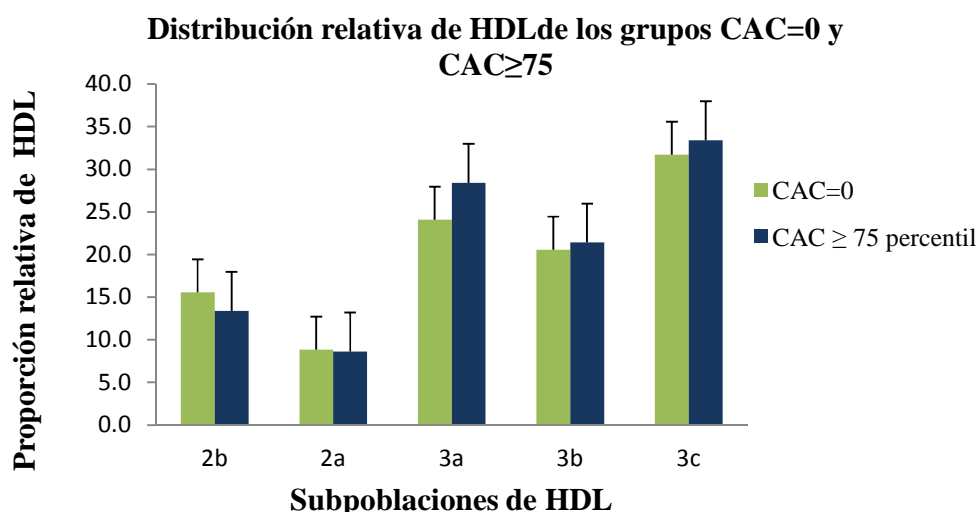


Fig. 7 Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL de los grupos en estudio $CAC=0$ y $CAC\geq 75$; Los valores se expresan como la media \pm DE

En la Figura 7 se muestra la comparación de las distribuciones relativas de HDL de los grupos en estudio $CAC=0$ y $CAC\geq 75$ al ser cuantificadas por su contenido en proteína. Se puede observar que únicamente las HDL3a del grupo $CAC\geq 75$ presenta una mayor proporción aprox. 14% con respecto al grupo $CAC=0$, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Las demás subpoblaciones tampoco presentan diferencias significativas.

Se observa (Figura 8) que las diferentes subpoblaciones de HDL de los grupos de estudio $CAC=0$ y $CAC\leq 25$ no presentan diferencia significativas al comparar las proporciones relativas determinadas por proteína.

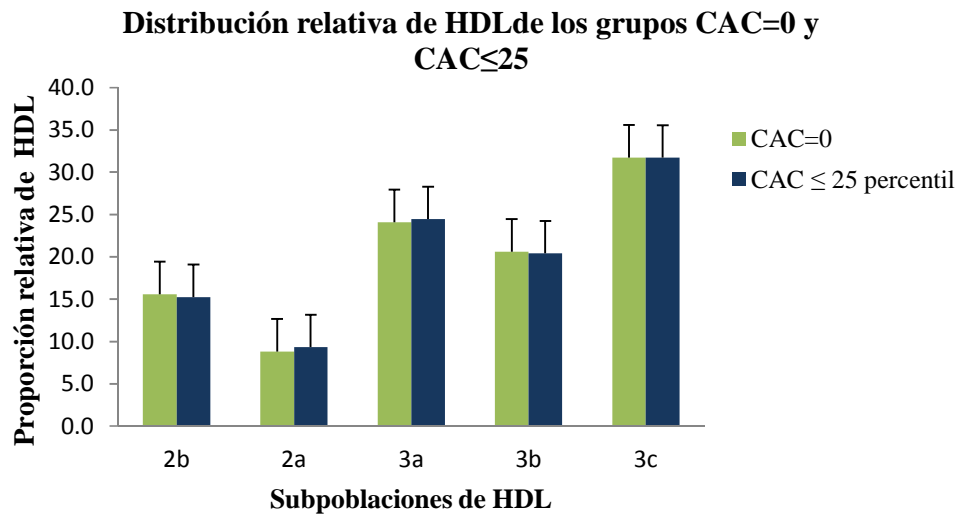


Fig. 8 Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL de los grupos en estudio para CAC =0 y CAC≤25; Los valores se expresan como la media ±DE

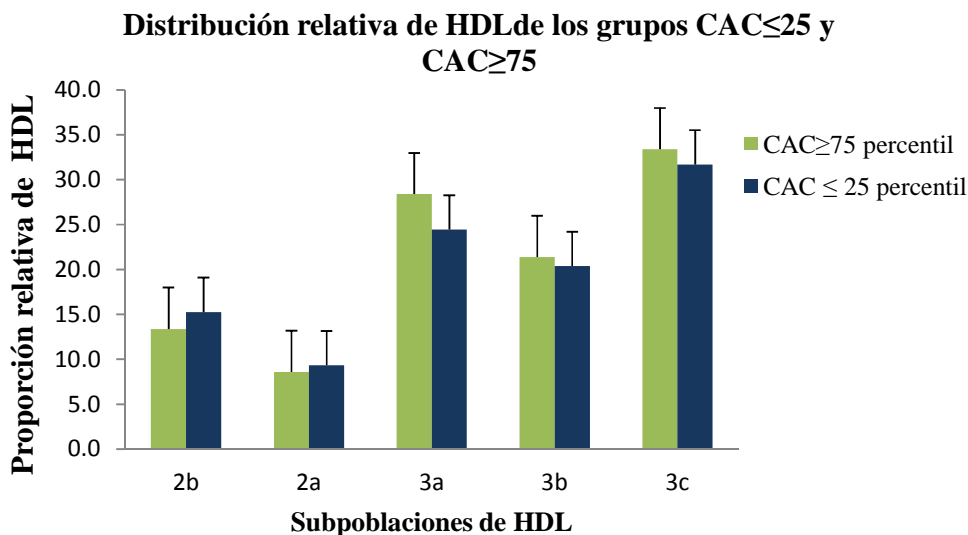


Fig. 9 Distribución relativa de las diferentes subpoblaciones de HDL de los grupos en estudio para CAC ≤25 y CAC ≥ 75; Los valores se expresan como la media ±DE

En la Figura 9 se puede observar la comparación de las distribuciones relativas de las subpoblaciones de HDL de los grupos en estudio CAC ≥ 75 y CAC ≤ 25 al ser cuantificadas por su contenido en proteína. Las diferentes subclases no presentan diferencias significativas a excepción de HDL3a del grupo CAC ≥ 75 las cuales tienen una mayor proporción proteína con respecto al grupo CAC ≤ 25 pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

Cuantificación de los lípidos de las subpoblaciones de HDL

Cuando las HDL se separan por su tamaño, pueden existir todavía diferencias de contenido de lípidos entre subpoblaciones de un mismo diámetro hidrodinámico. Por lo anterior se determinó la concentración de lípidos en las HDL, como se describe en material y métodos. En el Cuadro 9 se presenta la proporción de lípidos de cada subpoblaciones de HDL.

En el cuadro 9 se puede observar que en comparación con los pacientes $CAC=0$, los pacientes con $CAC \geq 75$ tuvieron proporciones significativamente más bajas de colesterol total y fosfatidilcolina, presentaron diferencias entre las subclases de HDL grandes (HDL2b y HDL2a) y HDL pequeñas (HDL3a y HDL3b) excepto para las HDL3c.

Se puede observar que la composición química de las HDL en proporción a los triglicéridos no presentó diferencias entre los grupos $CAC=0$ y $CAC \geq 75$. Las HDL de los sujetos con $CAC \leq 25$ presenta mayor proporción de Tg y tendencia a un mayor contenido en colesterol libre en comparación con el grupo $CAC=0$, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Cuadro 9. Concentración de lípidos asociados a las subpoblaciones de HDL en los sujetos de los grupos de estudio.

Lípido	Subclase	CAC=0 (n=40)	CAC ≤25 (n=40)	CAC ≥75 (n=40)
Colesterol Total (mg/dL)	HDL _{2b}	11.7 ± 5.5	11.3 ± 4.6	9.1 ± 4.5 ^a
	HDL _{2a}	5.6 ± 2.3	5.4 ± 1.9	4.4 ± 1.8 ^a
	HDL _{3a}	11.5 ± 4.2	11.6 ± 2.9 ^b	9.8 ± 3.2 ^a
	HDL _{3b}	7.7 ± 2.3	7.9 ± 2.2	6.8 ± 2.5
	HDL _{3c}	10.8 ± 3.0	10.2 ± 3.6	9.5 ± 3.5
Colesterol Libre (mg/dL)	HDL _{2b}	4.8 ± 2.3	5.4 ± 2.8	4.3 ± 2.6
	HDL _{2a}	2.1 ± 0.8	2.6 ± 1.2 ^b	2.1 ± 1.1
	HDL _{3a}	4.7 ± 1.9	5.5 ± 2.4	4.6 ± 2.3
	HDL _{3b}	2.9 ± 1.1	3.5 ± 1.4	2.9 ± 1.3
	HDL _{3c}	4.0 ± 2.0	4.6 ± 2.5	4.0 ± 2.0
Colesterol Esterificado (mg/dL)	HDL _{2b}	11.3 ± 6.6	9.5 ± 6.5	8.9 ± 5.7
	HDL _{2a}	5.6 ± 2.6	4.5 ± 2.8	4.2 ± 2.5 ^a
	HDL _{3a}	11.3 ± 4.9	10.0 ± 4.7	9.3 ± 4.9
	HDL _{3b}	8.1 ± 2.6	7.5 ± 3.8	7.2 ± 3.1
	HDL _{3c}	10.8 ± 5.0	9.0 ± 6.1	9.1 ± 6.2
Triglicéridos (mg/dL)	HDL _{2b}	8.4 ± 5.6	9.3 ± 4.4	7.6 ± 5.5
	HDL _{2a}	3.9 ± 2.0	4.6 ± 2.3	3.7 ± 2.0
	HDL _{3a}	9.0 ± 4.5	10.4 ± 5.0	8.3 ± 4.2
	HDL _{3b}	6.0 ± 2.8	6.8 ± 3.4	5.6 ± 2.9
	HDL _{3c}	7.5 ± 3.8	8.8 ± 4.8	7.9 ± 5.9
Fosfatidilcolina (mg/dL)	HDL _{2b}	33.9 ± 10.3	32.1 ± 12.6	27.0 ± 13.2 ^a
	HDL _{2a}	15.6 ± 4.0	15.3 ± 5.1 ^b	13.0 ± 5.2 ^a
	HDL _{3a}	35.9 ± 10.8	32.8 ± 9.6	28.7 ± 9.7 ^a
	HDL _{3b}	22.9 ± 6.9	20.4 ± 5.2	18.3 ± 5.3 ^a
	HDL _{3c}	27.9 ± 9.5	25.0 ± 9.1	24.1 ± 9.9

Los resultados se expresan como Media ± D.E. ANOVA y LDS

a) p<0.05 vs CAC=0

b) p<0.05 vs CAC ≥75.

Análisis de correlación entre características clínicas, perfil bioquímico y composición química de las subpoblaciones de HDL

Se realizaron análisis de correlación entre la fracción lipídica de las subpoblaciones de HDL y su posible relación con algunas variables clínicas como el calcio arterial coronario (CAC), índice de masa corporal (IMC), diámetro de la cintura, presión arterial sistólica (TAS), presión arterial diastólica (TAD) y bioquímicas como C-HDL, C-LDL, Creatina, ácido úrico, glucosa, esto con la finalidad de poder discernir qué parámetros intervienen en el desarrollo de la EAC. En este apartado de resultados se presentan únicamente los cuadros cuyos parámetros tienen valores de correlación con significado estadístico.

Los resultados de análisis de correlación muestran (cuadro 10) que las concentraciones de C-HDL se correlacionaron positivamente con las subpoblaciones HDL2 y HDL3 en cuanto a su composición lipídica, excepto para las HDL3c en su proporción de fosfatidilcolina y triglicéridos.

Sin embargo no existe una correlación entre la composición lipídica de las subpoblaciones de HDL y el C-LDL plasmático (cuadro 11).

Cuadro 10. Correlación Lípidos-HDL y C-HDL

		<i>Subclases de HDL</i>				
		<i>HDL_{2b}</i>	<i>HDL_{2a}</i>	<i>HDL_{3a}</i>	<i>HDL_{3b}</i>	<i>HDL_{3c}</i>
<i>Colesterol Total</i>	Coefficiente r	0.809**	0.81**	0.853**	0.647**	0.457**
	Significancia p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>Colesterol Libre</i>	Coefficiente r	0.529**	0.499**	0.456**	0.456**	0.336**
	Significancia p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001
<i>Colesterol Esterificado</i>	Coefficiente r	0.638**	0.624**	0.599**	0.420**	0.271**
	Significancia p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
<i>Fosfatidilcolina</i>	Coefficiente r	0.672**	0.687**	0.589**	0.48**	0.182
	Significancia p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.066
<i>Triglicéridos</i>	Coefficiente r	0.379**	0.325**	0.286**	0.244*	0.143
	Significancia p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167

* p< 0.05, ** p< 0.01 Nivel de significado estadístico de la correlación.

Cuadro 11. Correlación Lípidos-HDL y C-LDL

		<i>Subclases de HDL</i>				
		<i>Valor estadístico</i>	HDL_{2b}	HDL_{2a}	HDL_{3a}	HDL_{3b}
<i>Colesterol Total</i>	Coeficiente r	-0.002	0.019	0.134	0.049	0.067
	Significancia p	0.987	0.848	0.170	0.614	0.497
<i>Colesterol Libre</i>	Coeficiente r	0.018	0.064	0.063	0.021	-0.022
	Significancia p	0.855	0.523	0.529	0.833	0.829
<i>Colesterol Esterificado</i>	Coeficiente r	-0.122	-0.097	0.050	0.066	0.126
	Significancia p	0.24	0.352	0.633	0.527	0.226
<i>Fosfatidilcolina</i>	Coeficiente r	-0.187	-0.145	-0.157	-0.089	0.145
	Significancia p	0.058	0.143	0.114	0.369	0.143
<i>Triglicéridos</i>	Coeficiente r	-0.148	-0.094	-0.087	-0.09	-0.085
	Significancia p	0.153	0.364	0.400	0.388	0.413

Análisis de Correlación de Pearson

Se puede apreciar (cuadro 12) que las concentraciones de creatinina correlacionaron de manera negativa con la fracción del colesterol total de las subpoblaciones HDL 2a, 3b, y con las subpoblaciones HDL2b en su proporción colesterol libre y triglicéridos.

El ácido úrico únicamente correlacionó negativamente para la fracción de colesterol total para las subpoblaciones HDL 2a, 3a, 3b, 3c. Mientras que la glucosa correlaciona negativamente con colesterol total de las subpoblaciones HDL 2b, 2a y 3c.

Cuadro 12. Correlaciones entre lípidos-HDL y creatinina, ácido úrico, glucosa

<i>Subclases</i>	<i>Creatinina</i>		<i>Ácido Úrico</i>		<i>Glucosa</i>	
	Coefficiente r	Significancia p	Coefficiente r	Significancia p	Coefficiente r	Significancia p
CT-HDL_{2b}	-0.197	0.054	-0.191	0.061	-0.205*	0.034
CT-HDL_{2a}	-0.242*	0.017	-0.234*	0.021	-0.202*	0.037
CT-HDL_{3a}	-0.25*	0.013	-0.242*	0.017	-0.19	0.051
CT-HDL_{3b}	-0.164	0.106	-0.265**	0.008	-0.144	0.138
CT-HDL_{3c}	0.156	0.132	0.002*	0.01	-0.23*	0.018
CL-HDL_{2b}	-0.206*	0.049	-0.133	0.207	-0.055	0.58
CL-HDL_{2a}	-0.182	0.083	-0.179	0.088	-0.082	0.41
CL-HDL_{3a}	-0.182	0.083	-0.145	0.169	-0.049	0.628
CL-HDL_{3b}	-0.124	0.239	-0.058	0.583	-0.073	0.464
CL-HDL_{3c}	-0.058	0.578	-0.012	0.91	-0.028	0.777
CE-HDL_{2b}	-0.066	0.546	-0.058	0.596	-0.224*	0.030
CE-HDL_{2a}	-0.136	0.216	-0.097	0.379	-0.182	0.079
CE-HDL_{3a}	-0.125	0.253	-0.107	0.33	-0.193	0.062
CE-HDL_{3b}	-0.202	0.064	-0.202	0.064	-0.189	0.069
CE-HDL_{3c}	0.195	0.073	0.048	0.663	-0.191	0.066
Ph-HDL_{2b}	-0.142	0.174	-0.097	0.355	-0.16	0.106
Ph-HDL_{2a}	-0.092	0.380	-0.095	0.367	-0.114	0.251
Ph-HDL_{3a}	-0.11	0.294	-0.115	0.272	-0.053	0.595
Ph-HDL_{3b}	-0.18	0.085	-0.128	0.222	-0.108	0.275
Ph-HDL_{3c}	0.056	0.596	0.157	0.132	-0.102	0.305
Tg-HDL_{2b}	-0.206*	0.049	-0.133	0.207	0.059	0.570
Tg-HDL_{2a}	-0.195	0.062	-0.179	0.088	0.093	0.368
Tg-HDL_{3a}	-0.182	0.083	-0.145	0.169	0.125	0.227
Tg-HDL_{3b}	-0.124	0.239	-0.058	0.583	0.141	0.172
Tg-HDL_{3c}	-0.058	0.578	-0.012	0.91	0.158	0.126

CT-HDL= Colesterol total de lipoproteínas de alta densidad; CL-HDL= Colesterol Libre de lipoproteínas de alta densidad; CE-HDL= Colesterol Esterificado de lipoproteínas de alta densidad; Tg-HDL= Triglicéridos de lipoproteínas de alta densidad; Ph-HDL= Fosfatidilcolina de lipoproteínas de alta densidad.

* p< 0.05, ** p< 0.01. Nivel de correlación con signífico estadístico.

Por otro lado se observa que el CAC (cuadro13) correlaciona de forma negativa con las subpoblaciones de HDL 2a, 3a y 3b de la fracción determinada por fosfatidilcolina; con las subclases 2b para colesterol esterificado y 2a, 3b y 3c para el colesterol total.

Cuadro 13. Correlación Lípidos-HDL y CAC

		<i>Subclases de HDL</i>				
		<i>Valor estadístico</i>	HDL_{2b}	HDL_{2a}	HDL_{3a}	HDL_{3b}
<i>Colesterol Total</i>	Coeficiente r	-0.127	-0.195*	-0.179	-0.204*	-0.213*
	Significancia p	0.193	0.044	0.065	0.035	0.029
<i>Colesterol Libre</i>	Coeficiente r	-0.097	-0.084	-0.056	-0.023	-0.030
	Significancia p	0.334	0.41	0.579	0.815	0.766
<i>Colesterol Esterificado</i>	Coeficiente r	-0.074*	-0.160	-0.165	-0.200	-0.173
	Significancia p	0.480	0.124	0.112	0.053	0.094
<i>Fosfatidilcolina</i>	Coeficiente r	-0.190	-0.208*	-0.264**	-0.278**	-0.059
	Significancia p	0.054	0.035	0.007	0.004	0.555
<i>Triglicéridos</i>	Coeficiente r	-0.044	-0.048	-0.044	0.011	0.128
	Significancia p	0.675	0.644	0.670	0.916	0.218

* p< 0.05, ** p< 0.01 Nivel de significado estadístico de la correlación.

En el anexo 5 se presentan los análisis de correlación correspondientes a la fracción proteica - lipídica de las HDL y variables clínicas como el CAC, IMC, diámetro de la cintura, TAS, TAD y bioquímicas como C-HDL, C-LDL, creatinina, ácido úrico y glucosa. Se puede observar (cuadro 18, anexo 5) que el IMC, TAD no correlacionan con la composición de lípidos de las subpoblaciones de HDL. Por otro lado el diámetro de la cintura correlaciona negativamente con proporción relativa de colesterol total para las subpoblaciones de HDL grandes (2b, 2b); mientras que la presión arterial sistólica correlaciona de forma positiva con las HDL (2b, 2a, 3a) para el mismo lípido.

En el cuadro 16 se observa que la creatinina correlaciona negativamente con la fracción proteica de las HDL grandes (2b, 2a) y de forma positiva con las HDL 3c (cuadro 16, anexo 5), así mismo la concentración de glucosa correlaciona negativamente para las HDL grandes (2b, 2a)

Existe una correlación positiva (cuadro 17, anexo 5) entre el C-HDL y la composición proteica de las HDL grande (2b, 2a) y negativa para las HDL pequeñas (3b, 3c), en contraste con los triglicéridos que correlacionan negativamente con las HDL grandes y positivamente con las HDL 3c, no existe correlación con el CAC.

A continuación se presenta los gráficos con los resultados de análisis de correlación entre la proporción de lípidos de las subpoblaciones lipoproteínas de alta densidad y los triglicéridos plasmáticos. Cabe señalar que los valores de triglicéridos plasmáticos fueron transformados a una escala logarítmica puesto que no se ajusta a una distribución normal.

Correlación CT-HDL y triglicéridos plasmáticos

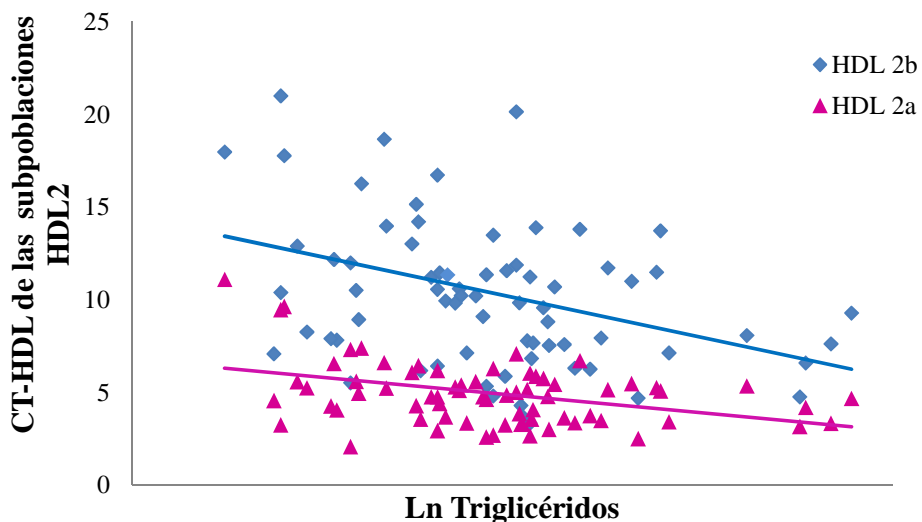


Fig. 10 Se presenta el análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmático y la fracción del colesterol total (mg/dL) de las subclases HDL 2.

Correlación CT-HDL y triglicéridos plasmáticos

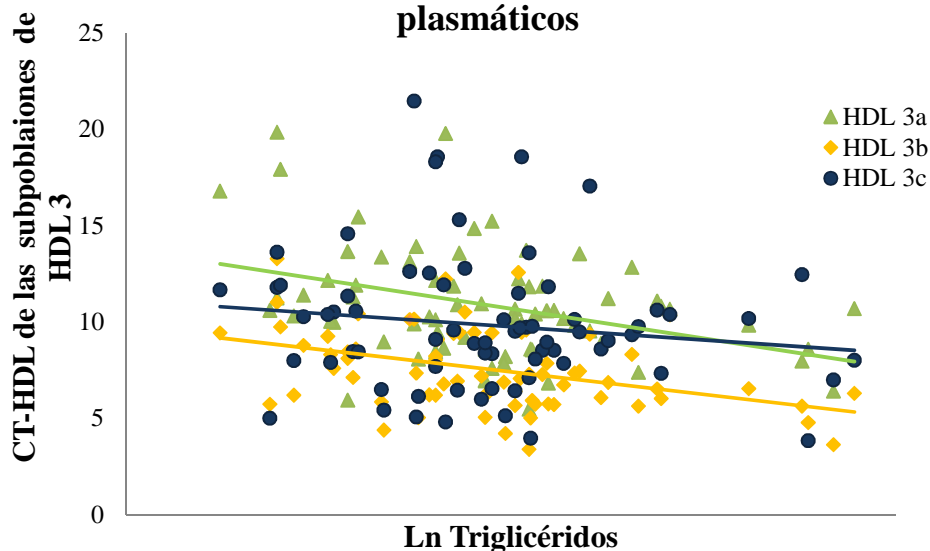


Fig. 11 Análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmáticos y la proporción del colesterol total (mg/dL) de las HDL 3.

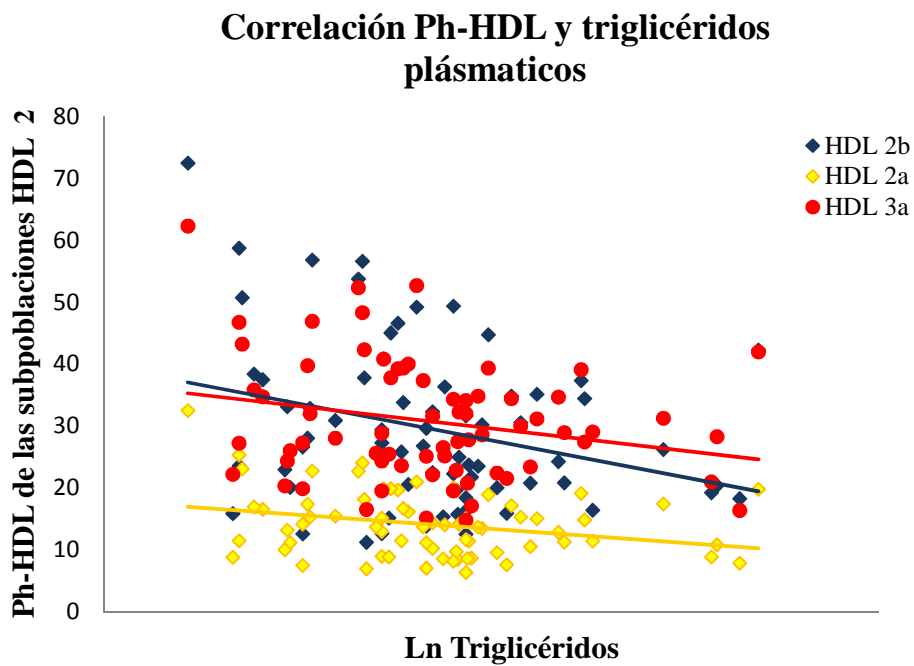


Fig. 12 Análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmáticos y la proporción de fosfatidilcolina (mg/dL) de las HDL 2.

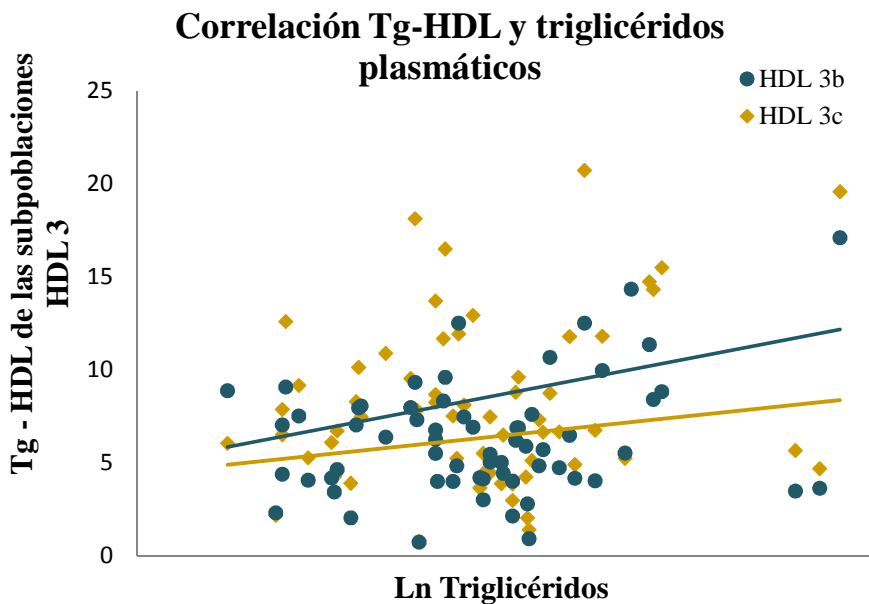


Fig. 13 Análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmáticos y la proporción de triglicéridos (mg/dL) de las HDL 3.

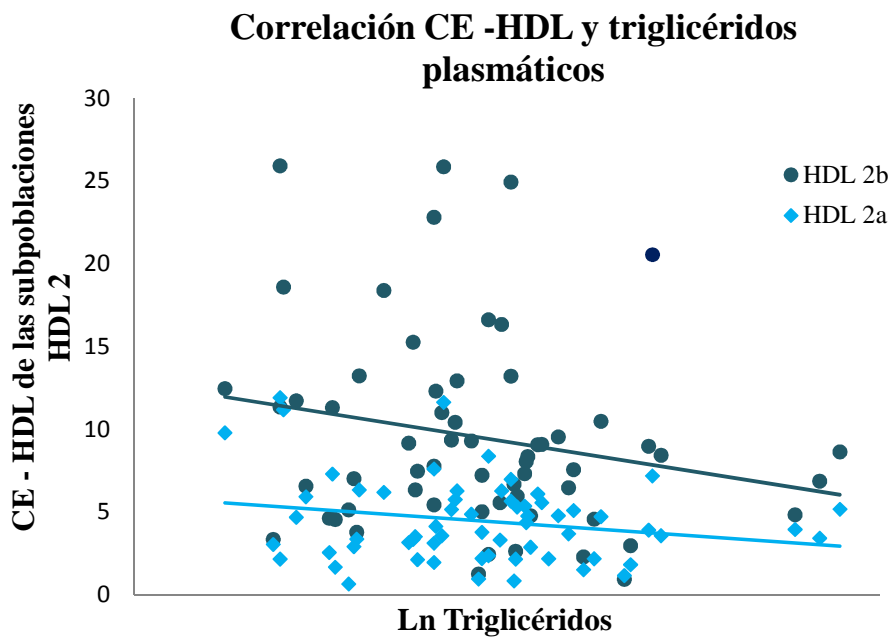


Fig. 14 Análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmáticos y la proporción de colesterol esterificado (mg/dL) de las HDL 2.

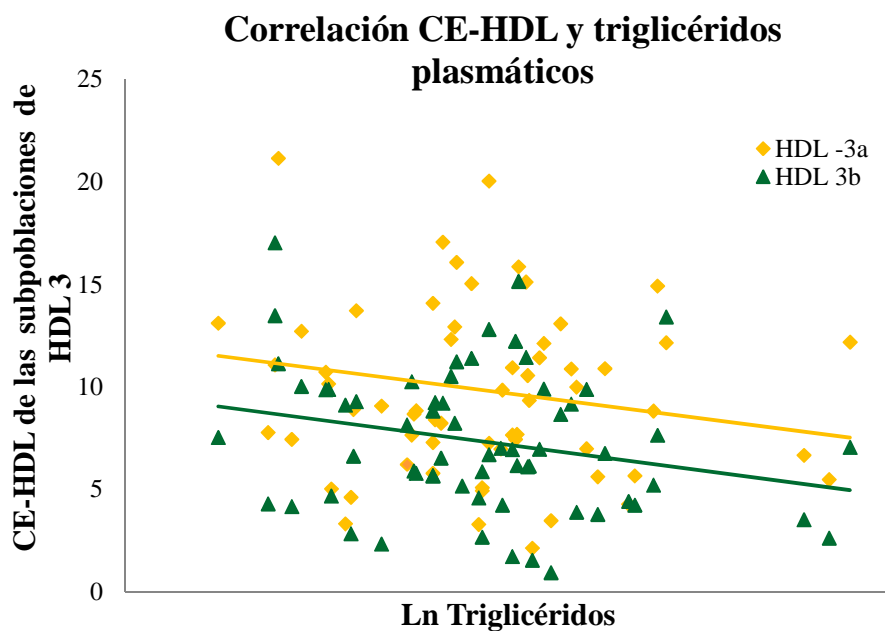


Fig. 15 Análisis de correlación existente entre la determinación de triglicéridos plasmáticos y la proporción de colesterol esterificado (mg/dL) de las HDL 3.

DISCUSIÓN.

Diversos estudios epidemiológicos han determinado claramente que los valores bajos de C-HDL se asocian de forma independiente con un mayor riesgo para el desarrollo de EAC.⁵⁰ En este contexto, en estudios recientes se ha sugerido que el análisis de las subclases de HDL puede mejorar la predicción de la enfermedad.⁵¹ Aunque los estudios iniciales no revelaron datos claros sobre la utilidad de medir las subpoblaciones de HDL,^{52,53} en años recientes en varios estudios se ha señalado que la caracterización más detallada de las HDL mejora la capacidad para evaluar el riesgo de EAC. En un estudio de casos y controles se demostró que los pacientes coronarios tienen concentraciones significativamente más bajas de HDL grandes y valores más altos de HDL pequeñas que los controles.⁵⁴ Después de ajustar por factores de riesgo tradicionales, se encontró asociación entre este patrón anormal y la prevalencia de EAC,⁵⁵ el estudio también mostró relación independiente con la mayor recurrencia de eventos coronarios en pacientes con EAC y C-HDL bajo.⁵¹

Las anormalidades en la distribución de tamaño de las HDL observadas en los padecimientos cardiovasculares podrían tener más que un biomarcador, sino que podrían tener una relación directa con el desarrollo de la enfermedad.^{35, 56-59} Sin embargo, no existe consenso acerca de cuál es la subclase de HDL con mayor potencial antiaterogénico; la mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que las HDL grandes están presentes en sujetos con bajo riesgo de EAC. En contraste, los estudios *in vitro* demuestran que las HDL pequeñas promueven más el eflujo de colesterol, tienen mayor poder antioxidante y su proporción aumenta en ciertas circunstancias de bajo riesgo cardiovascular^{20-22,57-59}. Una posible explicación a esta aparente paradoja es que el tamaño de la partícula HDL no es un parámetro suficiente para subclasificarlas. Es por ello que en estudios previos en nuestro laboratorio se han desarrollado metodologías que permiten la cuantificación de la concentración de los componentes químicos de las subpoblaciones de HDL.²⁴ Con estas herramientas dentro del marco del presente estudio, nos dimos a la tarea de comenzar a definir el papel los lípidos de las subclases de las HDL en el desarrollo de la EAC.

En este trabajo se propone que cuando las HDL son separadas por su tamaño, es posible que aún puedan existir diferencias en base al contenido de lípidos entre subpoblaciones de un mismo diámetro hidrodinámico. En este trabajo se presentan los valores correspondientes a la determinación plasmática de la concentración de lípido-proteína de las subpoblaciones de las HDL en sujetos con aterosclerosis subclínica diagnosticada por score de calcio; este método de diagnóstico resulta ser un excelente predictor de eventos coronarios futuros, y se ha considerado al score de calcio un predictor de riesgo independiente de desarrollo de la EAC.⁶⁰ En este trabajo se incluyeron únicamente a sujetos con EAC subclínica que no reciben tratamientos antidislipidémicos; esta característica representa una fortaleza de nuestro diseño, porque la acción de estos fármacos es un factor confusor que comúnmente ocurre en los estudios relacionados con la EAC. Otra fortaleza de nuestro estudio radica en que la población de estudio está pareada por edad y sexo.

En cuanto al perfil de lípidos, observamos pequeñas diferencias en los triglicéridos, que presentaron una tendencia hacia una concentración más elevada en el grupo $CAC \geq 75$ con respecto a los grupos $CAC=0$ y $CAC \leq 25$; sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significado estadístico. Sorprendentemente, el colesterol-LDL fue comparable entre los grupos; en todos los estudios epidemiológicos, en modelos animales e in vitro, se ha demostrado consistentemente la participación del C-LDL en el desarrollo de la placa ateromatosa. Esta observación puede tener, al menos, dos posibles interpretaciones; el score de calcio no refleja la presencia real de una placa ateromatosa. En este sentido, en algunos estudios se afirma que no existe una clara correlación entre la carga de calcio coronario y el desarrollo de síntomas de la EAC.⁶¹ Beckman et al.⁶² consideran que la calcificación refleja un estado avanzado en el desarrollo de la placa, pero se debe reconocer la asociación entre la extensión de la placa de aterosclerosis y una mayor presencia de placas calcificadas y no calcificadas; aquellos pacientes con placas calcificadas (“más estables”) presentan también placas no calcificadas o “blandas”, siendo estas últimas más propensas a la ruptura y a evolucionar hacia una trombosis coronaria aguda. Esto sugeriría que el CAC no es un reflejo de la placa aterosclerosa tradicional. Sin embargo, las evidencias experimentales acerca de la validez del score de calcio como un marcador de placa ateromatosa y predictor independiente de EAC son muy consistentes.⁸

La segunda interpretación a que el C-LDL es comparable entre los grupos, es que el depósito de calcio en las coronarias es un proceso que contribuye a la formación de la placa ateromatosa pero es independiente del papel que juegan las LDL en el proceso. La validez de esta hipótesis tiene que demostrarse con estudios posteriores.

La única diferencia estadísticamente significativa en el perfil de lípidos tradicional la observamos en el colesterol-HDL entre los sujetos $CAC > 75$ y $CAC = 0$; tanto la concentración plasmática del colesterol libre como del esterificado de las HDL son menores en los sujetos $CAC > 75$ que en los controles, sugiriendo una contribución de la deficiencia de HDL a la formación de la placa. Las menores concentraciones de fosfolípidos-HDL observadas en el grupo $CAC > 75$ apoyan esta idea, ya que se ha considerado a estos lípidos como un mejor indicador del número de partículas en comparación con el colesterol-HDL.²⁴

Los sujetos $CAC \geq 75$ presentaron proporciones significativamente más bajas de colesterol total y fosfatidilcolina entre las subclases de HDL grandes y HDL pequeñas que los sujetos control. Aunque las HDL de los sujetos con $CAC \leq 25$ presentaron mayor proporción de Tg y tendencia a un mayor contenido en colesterol libre en comparación con el grupo $CAC = 0$, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Además la distribución relativa de las HDL determinada por su contenido en proteína no presenta diferencias significativas para ninguno de los grupos de estudio. El CAC correlacionó inversamente con los lípidos de las subpoblaciones de HDL 2a, 3a y 3b de la fracción determinada por fosfatidilcolina; con las subpoblaciones 2b para colesterol esterificado y 2a, 3b y 3c para el colesterol total. Estos resultados sugieren que existe una relación directa entre el CAC y los niveles plasmáticos de lípidos asociados a HDL. En apoyo a este concepto, la resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes frecuentemente se presentan con valores subnormales de C-HDL asociados a una disminución en tamaño de las HDL.²⁷ También se ha informado que estas partículas de HDL tienen una composición anormal, con aumento en el contenido de triglicéridos y disminución de los ésteres de colesterol.²⁶ Estos resultados en su conjunto sugieren que la determinación de los lípidos de las HDL puede ser una alternativa para identificar a los sujetos con aterosclerosis subclínica, particularmente en las circunstancias que no permiten realizar la tomografía computarizada como herramienta de diagnóstico. No obstante, la

participación directa de las anomalías de las HDL al desarrollo de la placa no se puede establecer a partir de nuestros resultados y debe ser abordada específicamente en estudios futuros.

No observamos ninguna correlación estadísticamente significativa entre la distribución relativa de tamaños de las HDL o la composición lipídica de las subpoblaciones de HDL y los factores tradicionales de riesgo cardiovascular; ni el índice de masa corporal (IMC), circunferencia de la cintura,^{63,64} presión arterial,⁶⁵ ni el C-LDL correlacionaron con las subclases de HDL. Las diferencias encontradas entre los sujetos CAC 75 y los CAC=0 en cuanto a las características de las subclases HDL y la ausencia de correlaciones entre ellas y los factores de riesgo tradicionales, soportan la hipótesis arriba planteada acerca de que el depósito de calcio en la lesión ateromatosa es un proceso independiente de otros factores proaterogénicos.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran una asociación entre la distribución relativa de tamaños de las HDL o la composición lipídica de las subpoblaciones de HDL y variables bioquímicas como creatinina, ácido úrico y glucosa. Tanto creatinina como el ácido úrico pueden considerarse como marcadores de función renal; en este sentido, se ha sugerido que uno de los sitios catabólicos principales de las HDL es el túbulo renal^{66,67}. De esta manera, la interacción del riñón y las HDL podría contribuir a definir la distribución de tamaños y composición lipídica de estas lipoproteínas y de ahí la correlación entre los marcadores de función renal y las subclases de HDL. En lo que concierne a la glucosa plasmática, este parámetro está determinado por el nivel de sensibilidad a la insulina. Dado que la resistencia a la insulina es un factor que determina la distribución de tamaños de HDL la correlación observada entre la glucosa y las subclases de HDL se explicaría con este fundamento.⁵⁸

Una de las posibles funciones de las partículas HDL es evitar la formación de depósitos de calcio; la osteopontina (OPN) es una glicoproteína fosforilada con una estructura homóloga a las proteínas de la matriz extracelular, que se encuentra distribuida con mayor abundancia en el tejido óseo en condiciones normales. La OPN participa en la

biomeneralización⁶⁸ y puede unirse a un gran número de receptores, está asociada con la reparación de tejidos, fibrosis y calcificaciones distróficas tras lesiones inmunológicas.⁶⁹

Los macrófagos, en las lesiones aterosclerótica, expresan de manera OPN.⁷⁰ También se ha demostrado que los niveles de OPN es mayor en pacientes con calcificación vascular⁷¹ y en pacientes con EAC.^{16,72} Dado que las HDL pueden regular la expresión de diferentes proteínas como la ON sintasa, VCAM-1, entre otras, es válido postular que estas lipoproteínas también podrían regular la expresión de OPN. Esto explicaría la asociación entre el score de calcio y las subclases de HDL.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se han mostrado los valores correspondientes a la determinación plasmática de la concentración de lípido-proteína de las subpoblaciones de las HDL en sujetos con aterosclerosis subclínica diagnosticada por score de calcio.

Nuestros resultados sugieren la existencia de una relación directa entre el CAC y los niveles plasmáticos de lípidos asociados a HDL. Sin embargo nuestros datos sugieren que el depósito de calcio en la lesión ateromatosa es un proceso independiente de otros factores proaterogénicos.

Por otro lado, nuestros resultados apuntan que la correlación entre los marcadores de función renal y la subpoblaciones de HDL se debe a la interacción de las HDL con el riñón, posiblemente, contribuyendo así a definir los tamaños y composición lipídica de estas lipoproteínas.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Voet D, Voet J. Bioquímica 3a. edición. Edit. Panamericana 2006. pp. 454-464
2. Nelson DL, Cox MM Principles of Biochemistry. 4a edición USA 2004 pp. 820-827.
3. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-416.
4. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán* 1989; 2: 22-28.
5. Secretaría de Salud Información epidemiológica de morbilidad 2008. Dirección General de Epidemiología.
6. 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
7. Stability and Instability: Two Faces of Coronary Atherosclerosis. 1996; 94:2013-2020.
8. Budoff M., Gul K.M. 2008 Expert review on coronary calcium. *Vascular Health and Risk Management* 2008;4(2) 315-324
9. Davies M: Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 94: 2013-2020, 1996
10. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesion of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J* 1990;11:3-19
11. Doherty TM, Detrano RC. Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 224-30
12. Agaston AS, Janowitz WR, Aizawa N, Gasso J, Hildner F, Viamonte M, et al. Quantification of coronary calcium reflects the angiographic extent of coronary artery disease. *Circulation* 1991;84:11-59
13. Goel M, Wong ND, Eisenberg H, Hagar J, Kelly, Tobis JM. Risk factor correlates of coronary calcium as evaluated by ultrafast computed tomography. *Am J Cardiol* 1992;70:977-80
14. Budoff M, Achenbach S, Blumenthal R, Carr J, Goldin J, Greenland P, Guerci A, Lima J, Rader D, Rubin G, Shaw L, Wiegers S. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography : A scientific statement from American Heart Association committee on cardiovascular imaging an intervention, Council on cardiovascular radiology and

- intervention, and committee on cardiac imaging, council on clinical cardiology. *Circulation* 2006;114:1761-91
15. O'Rourke Ra, Brundage BH, Froelicher VF, Greenland P, Grundy SM. American College of Cardiology/American Heart Association expert consensus document on electron-beam computed tomography for the diagnosis and prognosis of coronary artery disease. *Circulation* 2000;102: 126-140
 16. Agaston AS, Janowitz WR, Hildner FG, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Qualification of coronary of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827-32.
 17. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et. al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124:S11-S20.
 18. Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:241-7
 19. Vicent Rivas Sierra. Marzo 2005 Estudio de las propiedades antiaterogénicas de las HDL en ratones transgénicos de Apo- AII de humano, (Doctorado)- Universidad Autónoma de Barcelona.
 20. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis* 2005; 181: 233-240
 21. Huesca C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5: 64
 22. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345.
 23. Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res.* 51(6):1610-7, 2010.
 24. García-Sánchez C. Torres –Tamayo M, Juárez–Meavepeña M, López-Osorio C., Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, Cruz-Robles D et.al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 292-298.

25. Wilson Pw, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, Mcnamara PM, Kannel WB: Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterols. *Am J Cardiol* 1980; 46: 649-654.
26. Godsland IF, Crook D, Walton C, Wynn V, Oliver MF: Influence of insulin resistance, secretion, and clearance on serum cholesterol, triglycerides, lipoprotein cholesterol, and blood pressure in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1030-1035.
27. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, et al: Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes* 2003; 52: 453-462.
28. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27.
29. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996, 7: 82 -87.
30. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
31. 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.
32. 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.
33. Moss AJ, Goidstein re, Marder VJ, Sparks Ce, Oakes D, Greenberg H, et al: Thrombogenic factors and recurrent coronary events . *Circulation* 1999; 99: 2517-2522.
34. Schaefer EJ, Lamou-Favas, Ordovas Jm, Cohn Sd, Schaefer Mm, Castelli Wp, Wilson Pwf: Factors associated with low and elevated plasma high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham Offspring Study. *J Lipid Res* 1994;35:871-882.
35. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW: Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277: 4301-4308
36. Elkhilil L, Majd Z, Bakirr, Pérez-Méndez O, Castro G, Puolain P, et al: Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483.

37. Pérez-Méndez O, Bruckerte, Franceschini G, Duhal N, LacoOixb, Bontejp, et al: Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 1999; 148: 317-325.
38. Pérez-Méndez O, Álvarez-Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, de la Peña A, et al. Palmitic acid reduces the fractional catabolic rates of HDL apo A-I in vivo: contribution of the surface negative charge. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 53-58
39. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montañó LF, Massó F, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51: 443-450.
40. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter Garrido M, Toledo-Ibelle P, Gamboa R, Menjivar M, López Marure R, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolism. *Clin Chim Acta* 2008 in press (doi:10.1016/j.cca.2008.11.003)
41. Chung BH, Franklin F, Liang P, Doran S, Cho BH, Curcio CA. Phosphatidylcholine-rich acceptors, but not native HDL or its apolipoproteins, mobilize cholesterol from cholesterol-rich insoluble components of human atherosclerotic plaques. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1733: 76-89
42. Fukuda M, Nakano M, Miyazaki M, Tanaka M, Saito H, Kobayashi S et al. Conformational change of apolipoprotein A-I and HDL formation from model membranes under intercellular acidic conditions. *J Lipid Res* 2008; 49: 2419-2426
43. Matthew J, Khurram N, Robyn L. et al. Coronary calcium predicts events better with absolute calcium scores than age-gender-race percentiles – The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53(4): 345–352
44. McClelland RL, Chung H, Detrano R, et al. Distribution of Coronary Artery Calcium by Race, Gender, and Age: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* 2006;113:30
45. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
46. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, et al. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyl transferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004; 30: 403-415.
47. Williams PT, Kraus RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.

48. Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, González L, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG, et al. Renal Interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F84-F9.
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. Gordon T, Castelli W, Hjortland M, Kannel W, Dawber T: High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62: 707-714
51. Asztalos B, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath K, Bloomfield H, et al: Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2005; 25: 2185-2191
52. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, Fourrier JL, Bertrand M, Koren E, et al: Apo lipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1987; 68: 35-40.
53. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH: A prospective study of cholesterol, apo lipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325: 373-381.
54. Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, Mcnamara JR, Horvath KV, et al: Distribution of Apo A-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2000; 20: 2670-2676.
55. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, ET AL: High-Density Lipoprotein Subpopulation Profile and Coronary Heart Disease Prevalence in Male Participants of the Framingham Offspring Study. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2004; 24: 2181-2187.
56. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2003; 23: 1881-1888.
57. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high density lipoprotein pathway. *Biochemistry* 1988; 27: 25-29.
58. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17-22.

59. Pérez-Méndez O, Espinola-Zavaleta N, Soto-López ME, Carreón Torres E, Gamboa R, Huesca- Gomez C, Reyes PA. Altered flow mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activities, and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J*. 2008 in press.
60. Schmermund A, Denktas A, Rumberger J, Christian T, Sheedy P, Bailey K et al. Independent and incremental value of coronary artery calcium for predicting the extent of angiographic coronary artery disease. *J Am CollCardiol* 1999;34:777-86.
61. Pletcher M, Tice J, Pignone M, McCulloch C, Browner W. What does my patient coronary artery calcium score mean? Combining information from the coronary artery calcium score with information from conventional risk factors to estimate coronary heart disease risk. *BMC medicine*. 2004;2:31.
62. Beckman JA, Ganz J, Creager MA, Ganz P, Kinlay S. Relations of clinical presentation and calcification of culprit coronary artery stenosis. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2001; 21: 16182.
63. Henry P., Thomas F., Benetos A., Guize L: Impaired Fasting glucose, blood pressure and cardiovascular disease mortality. *Hypertension* 2002;40:458-464.
64. Ridker PM., BuringJE., Cook NR., Rifai N: Creactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: An 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* 2003;107:391-397.
65. Wang H.D, Johns D.G., Xu S., et al. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H1697-H1702.
66. Glass C, Pittman RC, Weinstein DB, Steinberg D: Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 5435-5439.
67. Moestrup SK, Kozyraki R: Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:133-140.
68. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 2000;19 : 615-622.
69. Miyazaki Y, Tashiro T, Higuchi Y, Setoguchi M, Yamamoto S, Nagai H, et al. Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene. *Ann New York AcadSci* 1995; 760: 334-341.

70. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM et al. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *ArteriosclerThromb* 1994; 14:1648-56.
71. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2003;170:333-7.
72. Fuster V, Arthur and Hilda A. *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. De la edición española y traducción: Springer- Verlang Ibérica. S.A. Barcelona 1997 pp. 482.

ANEXO 1

Determinación de Colesterol Libre en microplaca

Solución A (reactivo de color)

Reactivo	Cantidad
4-Amino-Fenol	0.088 g
Fenol	0.040 g
Colato	0.126 g
Tritón	100 μ L

Llevar a 10 mL con Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4

- Tomar un mililitro de la solución A y mezclarlo con 9 mL de Solución Salina Isotónica 0.9%

Posteriormente adicionar las siguientes enzimas:

Enzima	Cantidad
Colesterol Peroxidasa(0.25 μ U/mL)	15 μ L
Colesterol Oxidasa (0.05 μ U/mL)	30 μ L

- Se mezcla las enzimas con la solución A diluida. El reactivo de color está listo para usarse

En un pozo de microplaca se depositan 50 μ L de muestra + 150 μ L de reactivo de color. Hacer la determinación por duplicado

- Curva patrón:

	Concentración
Estándar I	2.5 mg/dL
Estándar II	5 mg/dL
Estándar III	10 mg/dL
Estándar IV	15 mg/dL
Estándar V	20 mg/dL

Depositar 50 μ L de cada estándar en un pozo de microplaca por duplicado. Finalmente se adiciona 150 μ L de reactivo de color con enzimas. La curva patrón se realiza por duplicado.

- Incubar muestras y curva patrón durante una hora a 37 °C. Leer a una longitud de onda de 499 nm.

ANEXO 2

Determinación de proteínas por el método de Lowry.⁴⁸

FUNDAMENTO. En un medio alcalino los aminoácidos de las proteínas se unen a los iones de cobre (Cu^{2+}), formando un complejo azul, que absorbe a 750 nm. La sensibilidad de esta coloración incrementa al adicionar el reactivo de Folin Ciocalteus. El uso de SDS como detergente permite exponer las zonas hidrófobas de las proteínas.

SOLUCIONES

- ⊕ Solución de Na_2CO_3 : 20 % en H_2O
- ⊕ Solución de tartrato de Na y K: 1 g + CuSO_4 :0.5g
- ⊕ Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL H_2O
- ⊕ Solución de SDS al 10%
- ⊕ Solución patrón de albúmina: 1 mg/mL
- ⊕ Solución A. Preparar al momento

1 volumen de tartrato de Na y K

- 1 volumen de Na_2CO_3
- 2 volúmenes de NaOH
- 2 volúmenes de SDS
- 2 volúmenes de H_2O

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	Muestra
MUESTRA (μL)	0	0	0	0	0	0	5
ST (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (μL)	100	90	80	60	20	0	95
MEZCLAR							

Posteriormente se agrega 1 mL de solución A y se mezclan las soluciones. Las soluciones de reacción se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, al término de este tiempo se agregan 500 μ L de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Esta mezcla de reacción se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se analiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia con los datos de la curva patrón. Interpolar la absorbancia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

ANEXO 3

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

SOLUCIONES

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA

Sacarosa 50% + Azul de bromofenol al 0.05% c.b.p. 20 mL

A: Tris 0.09 M + Ac. Bórico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

B: 48 g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100mL

C: persulfato de amonio 10%

	3%	30%
Volumen total	5 mL	5 mL
Solución A	500 µL	500 µL
Solución B	300 µL	3 mL
H2O destilada	4.2 mL	750 µL
Glicerol	---	750 mL
TEMED	4 µL	4 µL
Solución C	20 µL	20 µL

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se colocan por separado en los compartimientos de la cámara generadora de gradiente y se mezclaron lenta y progresivamente con agitación constante mientras se va vertiendo entre las placas para formar el gel.

Una vez polimerizado el gel, éste se recorre 15 min a 60 V para estabilizarlo. A continuación se cargan las muestras de la siguiente manera:

- I. Depositar 25 µg de proteína HDL/ 2 µL de amortiguador de muestra en cada carril.
- II. Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

La separación electroforética se realizó primero durante 30 min a 70 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este periodo, la separación se continuó durante 22 h a 180 V.

Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda y se tiñe según el método seleccionado (proteína o lípidos)

ANEXO 4

Tinción para la determinación de la distribución de lípidos en gel de Poliacrilamida

- Preparación de reactivo para Colesterol Total y Colesterol Esterificado

Reactivo	Concentración	
	<i>Colesterol total</i>	<i>Colesterol libre</i>
Solución Salina Isotónica (0.9%)	7456 µL	7474 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
Solución Stock [Colato de Sodio(3mM)/Tritón de sodio (0.1%)]	500 µL	500 µL
Carboximetilcelulosa	120 mg	120mg
Peroxidasa (0.25 µU/mL)	12 µL	12 µL
Colesterol Esterasa (0.075 µU/mL)	10 µL	
Colesterol Oxidasa (0.05 µU/mL)	13 µL	13 µL
Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel)		
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 µL	400 µL
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 µL	600 µL

- Preparación del reactivo para Triglicéridos y Fosfolípidos

Reactivo	Concentración			
	<i>Triglicéridos</i>	<i>Fosfolípidos</i>		
Solución Salina Isotónica (0.9%)	5500 µL	5500 µL		
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL		
Carboximetilcelulosa	120 mg	120 mg		
Lipasa (37.5 µU/mL)	Reactivo Comercial 2500 µL			
Glicerol Cinasa (0.1µU/mL)				
Glicerol -3-fosfato oxidasa (0.4 µU/mL)				
Peroxidasa (0.13 µU/mL)				
ATP (0.25 µmol/L)	Reactivo Comercial 2500 µL			
Fosfolipasa D (0.12 µU/MI)				
Colina Oxidasa (62 µU/mL)				
Peroxidasa (1.1 µU/mL)				
Aminopiridina (0.24 mmol/mL)				
N-etil-N-DAOS (0.77 mmol/mL)	Reactivo Comercial 2500 µL			
Mezclar hasta homogenizar sin dejar grumos (Añadir aprox. 15 min. Antes de aplicar la mezcla en el gel)				
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM			400 µL	400 µL
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 µL	600 µL		

Colocar reactivo sobre gel, Incubar durante 1 hora a 36 C

ANEXO 5

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE PEARSON

Cuadro 14 Correlación entre proteínas-HDL y C-LDL

		<i>Subclases de HDL</i>				
		<i>Valor estadístico</i>	HDL _{2b}	HDL _{2a}	HDL _{3a}	HDL _{3b}
<i>Proteína CT-HDL</i>	Coeficiente r	-0.051	0.004	0.043	-0.026	0.026
	Significancia p	0.584	0.966	0.648	0.78	0.777
<i>Proteína CL-HDL</i>	Coeficiente r	-0.077	-0.032	0.14	0.183	-0.068
	Significancia p	0.424	0.742	0.144	0.055	0.425
<i>Proteína Ph-HDL</i>	Coeficiente r	-0.129	-0.067	-0.011	0.056	0.097
	Significancia p	0.169	0.472	0.906	0.549	0.300
<i>Proteína Tg-HDL</i>	Coeficiente r	-0.068	-0.074	-0.053	0.120	0.037
	Significancia p	0.477	0.438	0.576	0.204	0.699

Análisis de Correlación de Pearson

Cuadro 15 Correlación entre proteínas-HDL e IMC

		<i>Subclases de HDL</i>				
		<i>Valor estadístico</i>	HDL _{2b}	HDL _{2a}	HDL _{3a}	HDL _{3b}
<i>Colesterol Total</i>	Coeficiente r	-0.122	-0.126	-0.090	0.019	-0.043
	Significancia p	0.209	0.195	0.355	0.843	0.664
<i>Colesterol Libre</i>	Coeficiente r	-0.019	0.000	0.036	0.046	0.060
	Significancia p	0.85	0.999	0.719	0.645	0.549
<i>Colesterol Esterificado</i>	Coeficiente r	0.018	0.006	0.053	0.152	-0.008
	Significancia p	0.862	0.957	0.612	0.143	0.940
<i>Fosfatidilcolina</i>	Coeficiente r	0.017	0.076	0.145	0.210*	0.140
	Significancia p	0.861	0.445	0.143	0.033	0.160
<i>Triglicéridos</i>	Coeficiente r	0.130	0.146	0.168	0.152	0.108
	Significancia p	0.209	0.157	0.104	0.141	0.300

Análisis de Correlación de Pearson

Cuadro 16. Correlaciones entre proteína-HDL y Creatinina, Ácido Úrico, Glucosa.

	<i>Creatinina</i>		<i>Ácido Úrico</i>		<i>Glucosa</i>	
	Coefficiente r	Sig. p	Coefficiente r	Sig. p	Coefficiente r	Sig. p
Prot.HDL_{2b} CT	-0.167	0.088	-0.027	0.787	-0.159	0.087
Prot.HDL_{2a} CT	-0.229*	0.019	-0.110	0.263	-0.004	0.968
Prot.HDL_{3a} CT	-0.218*	0.025	-0.254*	0.009	0.179	0.054
Prot.HDL_{3b} CT	0.058	0.558	-0.009	0.927	0.079	0.398
Prot.HDL_{3c} CT	0.286**	0.000	0.188	0.055	-0.009	0.920
Prot.HDL_{2b} CL	-0.267**	0.008	-0.137	0.175	-0.250**	0.008
Prot.HDL_{2a} CL	-0.181	0.074	-0.102	0.317	-0.246**	0.009
Prot.HDL_{3a} CL	-0.094	0.353	-0.045	0.659	0.068	0.481
Prot.HDL_{3b} CL	0.109	0.284	0.130	0.200	0.158	0.097
Prot.HDL_{3c} CL	0.259**	0.010	0.107	0.292	0.164	0.085
Prot.HDL_{2b} Ph	-0.163	0.098	-0.074	0.452	-0.224*	0.016
Prot.HDL_{2a} Ph	-0.117	0.235	0.017	0.864	-0.193*	0.038
Prot.HDL_{3a} Ph	-0.114	0.251	-0.053	0.591	0.054	0.567
Prot.HDL_{3b} Ph	-0.038	0.703	-0.095	0.339	0.147	0.116
Prot.HDL_{3c} Ph	0.218*	0.027	0.107	0.278	0.142	0.129
Prot.HDL_{2b} Tg	-0.218*	0.228	-0.154	0.125	-0.137	0.147
Prot.HDL_{2a} Tg	-0.213*	0.033	-0.183	0.067	-0.062	0.516
Prot.HDL_{3a} Tg	-0.181	0.069	-0.177	0.077	0.072	0.448
Prot.HDL_{3b} Tg	0.045	0.654	0.092	0.358	0.028	0.767
Prot.HDL_{3c} Tg	0.286*	0.004	0.205*	0.040	0.068	0.475

* p< 0.05, ** p< 0.01. Nivel de correlación con significativo estadístico.

Cuadro 17. Correlaciones entre proteína-HDL y C-HDL, Triglicéridos y CAC.

	<i>C-HDL</i>		<i>Triglicéridos</i>		<i>CAC</i>	
	Coefficiente r	Sig. p	Coefficiente r	Sig. p	Coefficiente r	Sig. p
Prot.HDL_{2b} CT	0.460**	0.000	-0.209*	0.024	-0.170	0.066
Prot.HDL_{2a} CT	0.315**	0.001	-0.119	0.201	0.002	0.981
Prot.HDL_{3a} CT	0.126	0.177	0.030	0.752	-0.046	0.623
Prot.HDL_{3b} CT	-0.238**	0.010	0.076	0.415	0.054	0.561
Prot.HDL_{3c} CT	-0.400**	0.000	0.146	0.117	0.114	0.218
Prot.HDL_{2b} CL	0.556**	0.000	-0.223*	0.018	-0.165	0.082
Prot.HDL_{2a} CL	0.343**	0.000	-0.167	0.080	-0.107	0.262
Prot.HDL_{3a} CL	0.016	0.866	0.015	0.876	-0.022	0.816
Prot.HDL_{3b} CL	-0.263**	0.005	0.121	0.205	0.024	0.803
Prot.HDL_{3c} CL	-0.426**	0.000	0.163	0.088	0.155	0.102
Prot.HDL_{2b} Ph	.0613**	0.000	-0.292**	0.001	-0.247**	0.007
Prot.HDL_{2a} Ph	0.418**	0.000	-0.191*	0.039	-0.101	0.227
Prot.HDL_{3a} Ph	0.077	0.413	-0.018	0.851	-0.019	0.841
Prot.HDL_{3b} Ph	-0.320**	0.000	0.090	0.338	0.020	0.832
Prot.HDL_{3c} Ph	-0.484**	0.000	0.243**	0.009	0,209*	0.024
Prot.HDL_{2b} Tg	0.541**	0.000	-0.278**	0.003	-0.096	0.309
Prot.HDL_{2a} Tg	0.353**	0.000	-0.296**	0.001	-0.092	0.332
Prot.HDL_{3a} Tg	-0.106	0.262	-0.096	0.313	-0.019	0.838
Prot.HDL_{3b} Tg	-0.261**	0.005	0.068	0.472	-0.020	0.830
Prot.HDL_{3c} Tg	-0.332**	0.000	0.305**	0.001	0.128	0.174

C-HDL = Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; CAC= calcio arterial coronario.

* p< 0.05, ** p< 0.01. Nivel de correlación con significativo estadístico.

Cuadro 18. Correlaciones entre Lípidos-HDL IMC, Cintura, TAD y TAS

<i>Subclases</i>	<i>IMC</i>		<i>Cintura</i>		<i>TAD</i>		<i>TAS</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
CT-HDL_{2b}	-0.122	0.209	-0.263*	0.007	-0.095	0.332	-0.240*	0.013
CT-HDL_{2a}	-0.126	0.195	-0.241*	0.014	-0.030	0.755	-0.208*	0.032
CT-HDL_{3a}	-0.090	0.355	-0.174	0.077	-0.013	0.895	-0.191*	0.049
CT-HDL_{3b}	0.019	0.843	-0.039	0.695	-0.019	0.842	-0.124	0.200
CT-HDL_{3c}	-0.043	0.664	-0.022	0.825	0.067	0.495	0.110	0.263
CL-HDL_{2b}	-0.019	0.85	-0.095	0.351	-0.094	0.349	-0.182	0.067
CL-HDL_{2a}	0.000	0.999	-0.071	0.482	-0.083	0.406	-0.138	0.167
CL-HDL_{3a}	0.036	0.719	-0.015	0.884	-0.073	0.467	-0.111	0.266
CL-HDL_{3b}	0.046	0.645	0.016	0.877	-0.086	0.388	-0.109	0.277
CL-HDL_{3c}	0.060	0.549	0.036	0.726	-0.082	0.409	-0.044	0.656
CE-HDL_{2b}	0.018	0.862	-0.151	0.152	-0.018	0.863	-0.128	0.220
CE-HDL_{2a}	0.006	0.957	-0.141	0.182	0.078	0.457	-0.106	0.309
CE-HDL_{3a}	0.053	0.612	-0.066	0.536	0.094	0.367	-0.069	0.510
CE-HDL_{3b}	0.152	0.143	0.036	0.736	0.137	0.186	0.076	0.467
CE-HDL_{3c}	-0.008	0.940	0.012	0.913	0.114	0.273	0.161	0.120
Ph-HDL_{2b}	0.017	0.861	-0.114	0.257	0.011	0.910	-0.103	0.299
Ph-HDL_{2a}	0.076	0.445	-0.033	0.746	0.010	0.917	-0.070	0.485
Ph-HDL_{3a}	0.145	0.143	0.059	0.563	0.039	0.697	-0.017	0.863
Ph-HDL_{3b}	0.210*	0.033	0.146	0.147	0.085	0.393	0.035	0.728
Ph-HDL_{3c}	0.140	0.160	0.175	0.082	0.089	0.371	0.043	0.668
Tg-HDL_{2b}	0.130	0.209	0.044	0.678	0.076	0.465	0.000	0.998
Tg-HDL_{2a}	0.146	0.157	0.085	0.419	0.099	0.342	0.045	0.668
Tg-HDL_{3a}	0.168	0.104	0.128	0.223	0.077	0.460	0.065	0.533
Tg-HDL_{3b}	0.152	0.141	0.158	0.131	0.053	0.608	0.085	0.413
Tg-HDL_{3c}	0.108	0.300	0.174	0.096	0.034	0.747	0.049	0.637

IMC = Índice de masa corporal; TAS = presión arterial sistólica; TAD = presión arterial diastólica; CT-HDL= Colesterol total de lipoproteínas de alta densidad; CL-HDL= Colesterol Libre de lipoproteínas de alta densidad; CE-HDL= Colesterol Esterificado de lipoproteínas de alta densidad; Tg-HDL= Triglicéridos de lipoproteínas de alta densidad; Ph-HDL= Fosfatidilcolina de lipoproteínas de alta densidad.

*p< 0.05, Nivel de correlación con significativo estadístico.