

Eduardo José Lezcano Callén

Modificación de las rutas
metabólicas de las lipoproteínas
de alta densidad en fases
precoces del daño endotelial en
obesidad y diabetes: estudio en
modelo experimental animal

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Íñigo Gil, Pablo Javier
Osada García, Jesús de la

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MODIFICACIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS DE
LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD EN
FASES PRECOCES DEL DAÑO ENDOTELIAL EN
OBESIDAD Y DIABETES: ESTUDIO EN MODELO
EXPERIMENTAL ANIMAL

Autor

Eduardo José Lezcano Callén

Director/es

Íñigo Gil, Pablo Javier
Osada García, Jesús de la

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2013



**MODIFICACIÓN DE LAS RUTAS METABÓLICAS DE LAS
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD EN FASES PRECOCES
DEL DAÑO ENDOTELIAL EN OBESIDAD Y DIABETES.
ESTUDIO EN MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina presentada por:

Eduardo José Lezcano Callén

El interesado

Visto bueno de los directores de Tesis:

Dr. Pablo Iñigo Gil
Especialista Nefrología
Profesor Titular. Facultad de Medicina
Servicio de Nefrología.
Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa"

Dr. Jesús Osada García
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular y Celular
Facultad de Veterinaria, Instituto de
Investigación Sanitaria de Aragón
CIBEROBN

Zaragoza, mayo 2012

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por educarme en la perseverancia, la tenacidad y el esfuerzo diario.

A mi hermano por consentirme las horas que le ha robado esta tesis y resignarse a entenderme

A mis primas por soportar mis ausencias reiteradas

A mis amigos por darme ánimos en los momentos más necesarios

A Pablo y a Jesús por haberme dado la oportunidad de participar en esta parte del proyecto experimental. A Ana por su dedicación y el enorme trabajo que ha realizado.

TÍTULO

AGRADECIMIENTOS

- I. ÍNDICE (p.3)
- II. INTRODUCCIÓN (p.5)
 - A. Definición. Diabetes Mellitus (DM) y Obesidad (p.6)
 - B. Epidemiología.
 - I. *Prevalencia de DM y Obesidad (p.8)*
 - II. *Morbimortalidad asociada a DM y Obesidad (p. 12)*
 - C. Patogenia I
 - I. *Metabolismo de las Lipoproteínas (p.15)*
 - II. *Arteriosclerosis y metabolismo de las lipoproteínas (p.26)*
 - III. *DM, Obesidad y metabolismo de las lipoproteínas. Concepto de Dislipemia Aterógena (p.32)*
 - D. Patogenia II
 - I. *Lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estructura y función. Protección vascular por HDL (p.38)*
 - II. *Dislipemia aterógena y HDL. Modificación proaterogénica de las HDL (p.45)*
 - III. *Microalbuminuria (MAU) como signo precoz de daño endotelial (p.50)*
 - E. Enfoque general del tratamiento de la dislipemia en la DM y Obesidad. HDL como diana terapéutica.
 - I. *Manejo farmacológico y no farmacológico de la dislipemia en DM y Obesidad (p.51)*
 - II. *Las HDL como objetivo terapéutico. Aproximación desde la medicina traslacional al tratamiento de la dislipemia aterógena (p.55)*
 - 1.PPAR
 - 2.PPAR y Telmisartán. *Más allá de la HTA: nefroprotección y modulación del metabolismo lipídico.*
- III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS (p.61)
- IV. MATERIAL Y MÉTODOS (p.67)
 - A. El proyecto. Ámbito de trabajo (p.69)
 - B. Animales (p.69)
 - C. La dieta (p.73)
 - D. Dosificación de fármacos antiproteinúricos (Telmisartán) (p.74)
 - E. Parámetros séricos y de función renal (p.74)

- F. Lípidos y lipoproteínas (p.76)
 - I. *Determinación de colesterol total en plasma (p.76)*
 - II. *Determinación de colesterol HDL en plasma (p.76)*
 - 1. *Determinación colorimétrica de colesterol HDL*
 - 2. *Determinación fluorimétrica de colesterol HDL*
 - III. *Determinación de triglicéridos en plasma (p.77)*
 - IV. *Separación de lipoproteínas por cromatografía líquida de gel filtración*
 - 1. *Análisis del perfil lipoproteico*
- G. Determinación de APO A-I Y APO A-IV (p.79)
 - I. *Determinación de la concentración plasmática de apolipoproteínas mediante técnica inmunoenzimática (ELISA) (p.79)*
 - II. *Aislamiento de RNA (p 80)*
 - III. *Cuantificación de RNAm por RT-qPCR (p.81)*
- H. Ensayos de oxidación de lipoproteínas (DCF) (p.82)
- I. Análisis estadístico (p.83)

- V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (p.85)
- VI. CONCLUSIONES (p.129)
- VII. BIBLIOGRAFÍA (p.133)

INTRODUCCIÓN

La **Diabetes Mellitus (DM)** es una enfermedad que engloba un conjunto heterogéneo de desórdenes metabólicos con los elementos comunes de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, debidas al déficit de insulina, a su acción deficiente o a ambas. La DM se clasifica en base a su etiología y forma clínica de presentación en cuatro tipos: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional, y otros tipos específicos, que de forma muy general podríamos definir de la siguiente manera¹:

- **DM tipo 1**: también llamada insulina-dependiente, o diabetes juvenil, está causada por la destrucción autoinmune de las células pancreáticas productoras de insulina (células beta β - de los islotes de Langerhans), lo que da lugar a una producción menor o incluso nula de insulina. Puede afectar a personas en cualquier edad de la vida, pero normalmente ocurre en niños y adultos jóvenes, diagnosticándose frecuentemente antes de los 30 años. Afecta a cerca de 4.9 millones de personas en todo el mundo, de las que 1,27 millones son europeos. Su incidencia está aumentando por razones que, aunque no todas claramente establecidas, es probable que estén en relación con factores de riesgo ambientales como el mayor peso y altura durante el desarrollo, la mayor edad de las madres durante la gestación, y algunos aspectos de la dieta y otros relacionados con infecciones virales, que inducirían esa respuesta autoinmune.
- **DM tipo 2**: se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico con dos rasgos principales como son, la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos (deficiente utilización de la glucosa) y a un déficit parcial o relativo de ésta, pudiendo estar presentes ambos en el momento en que la diabetes se manifiesta clínicamente. Afecta principalmente a personas por encima de los 40 años, si bien en poblaciones con alta prevalencia de enfermedad, puede debutar precozmente como indican varios estudios realizados en población infantil². Se asocia frecuentemente, con la obesidad, que ya en sí puede provocar resistencia a la insulina e hiperglucemia. Además de factores ambientales, tiene un importante componente familiar aunque no se han identificado genes de susceptibilidad mayor a este trastorno. Algunos de estos factores que intervienen en el desarrollo de la diabetes tipo 2, y explican en parte el aumento de la prevalencia de la enfermedad, son:

La obesidad, dieta hipercalórica e inactividad física.
 Envejecimiento general de la población.
 Resistencia a la insulina de otro origen
 Historia familiar de diabetes.
 Ambiente desfavorable en el desarrollo uterino.
 Etnia/Raza.

Tabla 1. Factores que intervienen en el desarrollo de la diabetes tipo 2

- Diabetes Gestacional: es la intolerancia a la glucosa que se presenta con varios grados de severidad, y que comienza o al menos se conoce por primera vez durante el embarazo, independientemente de si se utiliza insulina en su manejo o si persiste después de la gestación. Aparece durante la gestación en un porcentaje de 1% a 14% de las pacientes, y casi siempre, debuta entre las semanas 24 y 28 del embarazo.
- Otros tipos específicos: Son varios, con base patogénica diversa, quedando fuera del ámbito de esta tesis su descripción detallada. Se mencionan en la tabla siguiente:

Diabetes MODY.
 Defectos genéticos de la insulina (leprecaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipotrófica).
 Enfermedades del páncreas: pancreatitis, neoplasia, fibrosis quística.
 Endocrinopatías: acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma y otros tumores endocrinos.
 Inducida por fármacos.
 Infecciones: rubéola, citomegalovirus, coxsackie,

Tabla 2. Otros tipos específicos de diabetes

La **obesidad** es un exceso de grasa corporal. Sin embargo, la definición de exceso no tiene unos límites claros (la adiposidad es una variable continua sin una marcada división entre normal y anormal; y además es difícil medir la grasa corporal directamente). Por tanto, la obesidad, de momento, se define como el exceso de peso corporal más que como el exceso de grasa. En adultos, el sobrepeso y la obesidad se clasifican utilizando el índice de masa corporal (IMC), que es el ratio del peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado [$\text{peso (Kg)}/\text{altura (m}^2\text{)]}^3$. Una de las clasificaciones más ampliamente utilizadas es la que propone la Organización Mundial de la Salud (OMS):

	IMC (Kg/m ²)
Infrapeso	< 18.5
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25.0-29.9
Obesidad grado I	30.0-34.9
Obesidad grado II	35.0-39.9
Obesidad extrema o grado III	≥ 40

Tabla 3. Clasificación del sobrepeso y la obesidad según el IMC (OMS)

La interpretación del IMC en términos de grasa corporal varía por sexo, edad, y otros factores (por ejemplo debido a diferencias en la composición corporal entre hombres y mujeres, para el mismo IMC las mujeres tienden a tener un considerable porcentaje mayor de grasa que los hombres; y un determinado valor dado de IMC entre los dos sexos, o entre dos edades diferentes podría no representar el mismo porcentaje de grasa corporal ni el mismo grado de riesgo. Otras medidas de obesidad como el perímetro de cintura o la razón cintura/cadera se han postulado como mejores predictores de los eventos adversos asociados a la obesidad, aunque hoy en día, todavía se sigue utilizando como indicador de adiposidad para definir la obesidad en gran parte de los estudios, el índice de masa corporal^{4,5}.

B. EPIDEMIOLOGÍA.

I. PREVALENCIA DE DM Y OBESIDAD

La **Diabetes Mellitus** es actualmente una de las enfermedades no transmisibles más frecuentes en el mundo entero. Representa un tema principal en las políticas de salud pública en todo el mundo, habiéndose convertido en una auténtica “epidemia”. Hace unos años, la preocupación por esta epidemia se restringía a algunos países de los llamados desarrollados e influencia anglosajona, pero desgraciadamente el escenario se ha transformado y actualmente no hay país alguno que se escape de la invasión de la DM⁶. Es la cuarta o quinta causa principal de muerte y adopta cifras de verdadera epidemia tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo. Las complicaciones atribuibles a la DM, como la enfermedad coronaria, vascular periférica, cerebrovascular, insuficiencia renal, ceguera y amputaciones de miembros, está aumentando las discapacidades, reduciendo la esperanza de vida y

constituyendo una enorme carga económica para las diferentes sociedades; es sin duda uno de los retos más importantes de este siglo XXI⁷.

Según la OMS, el número de casos de diabetes en el mundo en el año 2000 en adultos se estimaba en cerca de 171 millones de personas afectadas, un 2.8% de la población mundial (151 millones eran las estimaciones de la *International Diabetes Federation, IDF*, incluyendo el 90% de los países del mundo – 172 miembros-). Como muestran las figuras, el incremento para el año 2030 se espera que llegue hasta los 366 millones de enfermos; un 4.4% de la población mundial para la OMS, 438 millones, un 5.4% para la IDF ^{6,7}.

Region (all ages)	2000	2030	2000–2030		
	Number of people with diabetes	Number of people with diabetes	Percentage of change in number of people with diabetes*	Percentage of change in total population*	Percentage of change in population >65 years of age*
Established market economies	44,268	68,156	54	9	80
Former socialist economies	11,665	13,960	20	-14	42
India	31,705	79,441	151	40	168
China	20,757	42,321	104	16	168
Other Asia and Islands	22,328	58,109	148	42	198
Sub-Saharan Africa	7,146	18,645	161	97	147
Latin America and the Caribbean	13,307	32,959	148	40	194
Middle Eastern Crescent	20,051	52,794	163	67	194
World	171,228	366,212	114	37	134

Tabla 4. Cifras estimadas de personas con diabetes por regiones para el 2000 y 2030 y resumen de los cambios poblacionales. Adaptado de Wild et al. Diabetes Care 2004

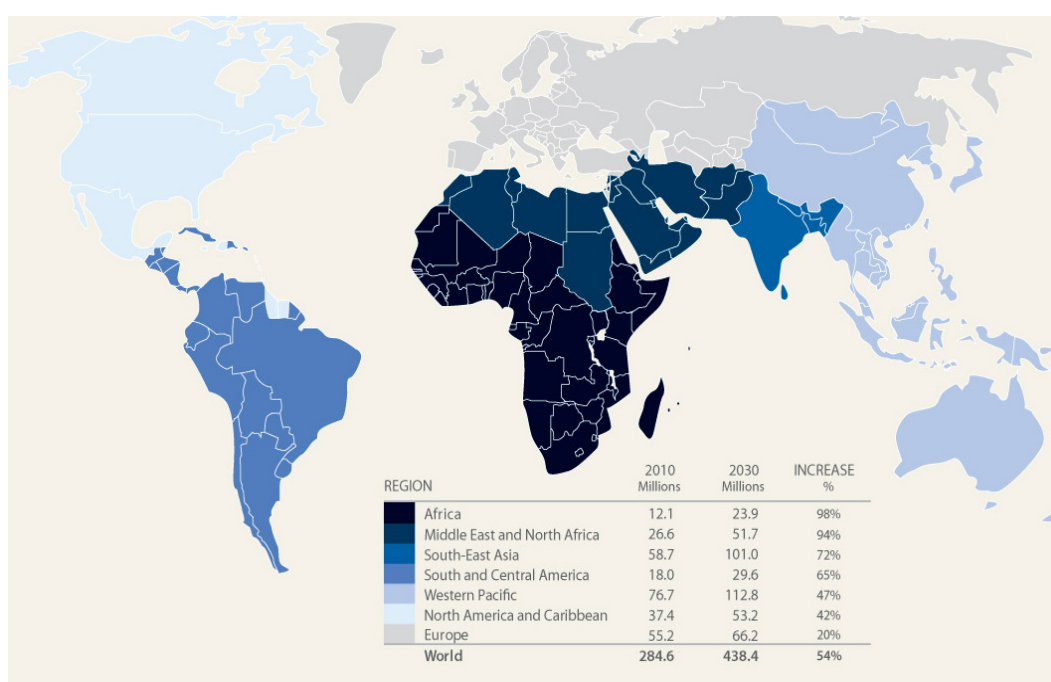


Figura 1. Estimaciones en número de personas entre 29 y 79 años enfermas de diabetes para los años 2010 y 2030. Adaptado de IDF Diabetes Atlas 4th ed. 2009.

Estas previsiones calculadas por grupos de expertos de la OMS y la IDF están probablemente infraestimadas ya que se basan solamente en la esperada evolución demográfica y no tienen en cuenta la evolución de la obesidad en las próximas décadas. Teniendo en cuenta el más que probable incremento en la prevalencia de la obesidad como un factor de riesgo para diabetes, el número de casos de diabetes podría ser incluso mayor del estimado. El aumento de la evidencia a favor de intervenciones efectivas, que incluyen cambios en la dieta y la actividad física, o tratamientos farmacológicos para reducir la prevalencia de diabetes, da un impulso para una más amplia introducción de enfoques preventivos^{8,9}.

La epidemia mundial de DM se explica en parte debido a un incremento en la prevalencia de obesidad ligado a un estilo de vida occidentalizado que ha modificado los hábitos nutricionales (ha aumentado la ingesta de grasas saturadas, azúcares refinados, y ha disminuido la ingesta de fibra) junto a una reducción de la actividad física. La obesidad, principalmente cuando la grasa se distribuye a nivel abdominal, es el principal factor de riesgo para la aparición de DM 2¹⁰. La influencia ambiental se demostró hace años comparando la prevalencia de DM entre zonas rurales y urbanas, siendo mayor en estas últimas. El impacto de este cambio cultural se demuestra en el estudio de Schultz donde los Indios Pima que habían migrado a Arizona eran más obesos que los nativos de un área remota de Méjico¹¹.

Otro de los factores determinantes en el incremento actual de diabetes es el envejecimiento progresivo de la población, ya que la esperanza de vida cada vez es mayor y esto supone un aumento no sólo en la prevalencia sino en la incidencia de enfermedad.

Obesidad. La prevalencia de obesidad se ha triplicado en las últimas 2 décadas¹². Según cifras de la OMS, se estima que 1.7 billones de personas alrededor del mundo padecen sobrepeso y 310 millones son obesos. El problema, al igual que la DM, no sólo afecta a los países catalogados como desarrollados, sino también está convirtiéndose en un problema en muchos países en vías de desarrollo, habiendo triplicado el número de personas que padecen obesidad en los últimos veinte años¹³. Las cifras que arrojan las estimaciones de la *International Obesity Task Force* son de 1.1 billones de adultos en el nivel de sobrepeso y 312 millones obesos. Bibbins-Domingo y colaboradores, en el año 2007, estimaron la prevalencia de la obesidad en las personas de 35 años para el 2020 basándose en los datos de sobrepeso en adolescentes en el año 2000. Predecían que para entonces, la prevalencia de la obesidad entre los adultos de 35 años, sería del 30-37% entre los hombres y del 34-44% entre las mujeres. Como consecuencia, ellos proyectaban que la prevalencia de la enfermedad arterial coronaria se

incrementaría entre un 5 y un 16% con un exceso de más de 100.000 casos atribuibles a la obesidad¹⁴.

Como se muestra en la tabla 5, en Europa se estima que el 35.9% de los adultos padecen sobrepeso y un 17.2% son obesos, resultando en un 53% de población europea. En total se estima que >143 millones de adultos están en la franja del sobrepeso y un 68.5 millones son obesos. Más hombres que mujeres tienen sobrepeso (>82 millones frente a 61 millones respectivamente), y, al contrario, más mujeres son obesas (37 millones comparados con 31 millones respectivamente)¹⁵.

	Number obese (BMI \geq 30 kg/m ²)	Number overweight (BMI 25-29.9 k/m ²)	Number either overweight or obese (BMI \geq 25 kg/m ²)
All Adults	68,520,922	143,047,617	211,568,538
Males	31,219,305	82,230,544	113,449,850
Females	37,301,616	60,817,072	98,118,689

Tabla 5. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en población adulta en Europa. Adaptado de IASO

Igual que en Europa, la prevalencia de obesidad en Estados Unidos se duplicó entre 1980 y 2004, manteniéndose estable en el periodo 2005-2006. Según los datos del registro NHANES (*The National Health and Nutrition Examination Survey*), el 17.1% de los niños y adolescentes padecían sobrepeso, y el 32.2% de los adultos eran obesos, con un incremento sustancial en la última década (del 27.5% del año 1999 al 31.1% del año 2004)¹⁶. Posteriormente en los años 2006 y también en el 2008, las estimaciones seguían siendo similares, con aproximadamente un tercio de la población adulta obesa, lo que suponía más de 72 millones de personas. (<http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/datalink.htm>).

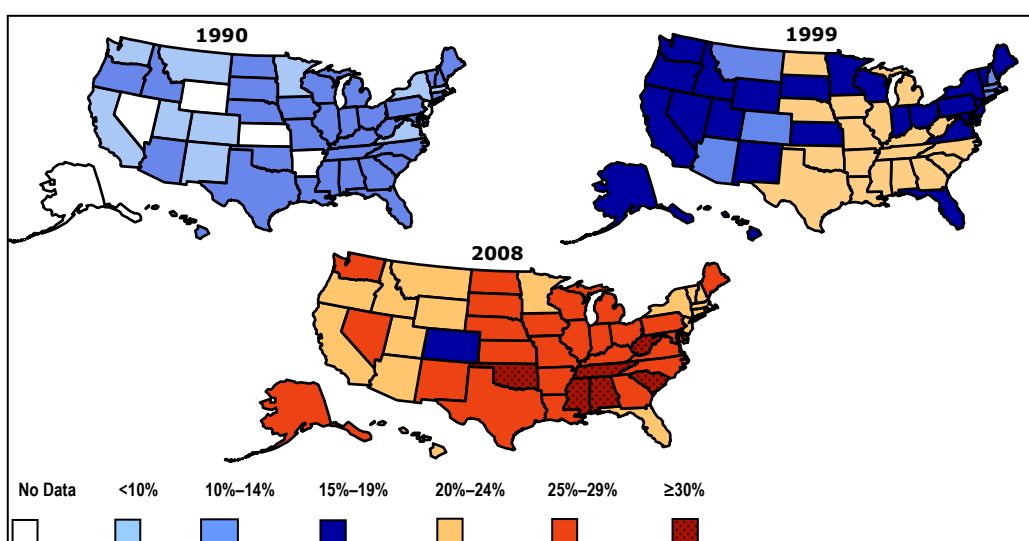


Figura 2. Tendencias de Obesidad entre adultos en EEUU. Adaptado del Behavioral Risk Factor Surveillance System, BRFS, años 1990,1999, y 2008.

La obesidad, la diabetes y la patología cardiovascular no sólo se circunscriben a nuestro medio, sino que se trata de un tema de gran preocupación en todo el mundo. Entre 1990 y el 2020, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en los países en desarrollo se espera que aumente un 120% en mujeres y un 137% en hombres, un incremento sustancialmente mayor que para los países desarrollados (29 y 48% respectivamente), siendo por ejemplo cercana a los 2 millones de personas en la India en el año 2010^{17,18}.

B. EPIDEMIOLOGÍA.

II. MORBIMORTALIDAD ASOCIADA A DM Y OBESIDAD

Diabetes. En un gran número de países alrededor del mundo, y principalmente en los económicamente más desarrollados, la diabetes es una de las principales causas de ceguera, insuficiencia renal, y amputación de miembros. También es conocida por ser una de las causas principales de mortalidad, fundamentalmente debido a un marcado aumento del riesgo de enfermedad coronaria e ictus. Así, los costes económicos de la diabetes son muy elevados; incluyendo los derivados de la atención sanitaria, y los gastos sociales derivados de la pérdida de productividad y los asociados a la pérdida de oportunidades para el desarrollo económico⁷.

Los mecanismos por los que la diabetes provoca complicaciones tan variadas es complejo y no del todo aclarado pero incluyen efectos directos tóxicos de la hiperglucemia, e indirectos por efecto de niveles anormales de lípidos y alteraciones funcionales y estructurales de los pequeños vasos sanguíneos. Las principales complicaciones crónicas de la diabetes son: la enfermedad cardiovascular, la nefropatía, la neuropatía, la amputación de miembros, y la retinopatía. De forma breve¹⁹:

- **Enfermedad cardiovascular.** Es la mayor causa de muerte en pacientes diabéticos, contribuyendo en la mayoría de poblaciones a más del 50% de la comorbilidad asociada a la diabetes. Engloba la enfermedad coronaria en sus varias manifestaciones clínicas, el accidente vascular cerebral, la enfermedad vascular periférica, y la insuficiencia cardíaca. La Diabetes puede incrementar el riesgo de enfermedad coronaria y accidente cerebral hasta en cinco veces^{20,21}.
- **Nefropatía.** La diabetes es una importante causa del aumento de fallo renal, y realmente se ha convertido en la causa aislada más común de enfermedad renal crónica terminal²².

- **Neuropatía.** El área más frecuentemente afectada por el exceso de glucosa en sangre, son los nervios periféricos de miembros inferiores, provocando una neuropatía periférica que cursa con disestesias/hipoestesia y que puede llevar a infecciones graves y amputaciones por heridas que pasan inadvertidas en un primer momento. Además, alteraciones digestivas, urinarias e impotencia son otras posibles manifestaciones²³.
- **Amputación.** A través de su acción sobre nervios periféricos y arterias, la diabetes puede llevar a la ulceración en zonas acras, principalmente los pies, con el riesgo consiguiente de infecciones graves y necesidad de amputación. El riesgo de un paciente diabético de sufrir una amputación es 25 veces mayor que el de alguien no diabético²⁴.
- **Retinopatía.** La diabetes es una importante causa de ceguera a través de varios mecanismos. La complicación más frecuente es la retinopatía proliferativa, que provoca disminución de la agudeza visual y puede llevar a la ceguera por hemorragias retinianas repetidas, aunque la causa más común de ceguera total, es el edema macular²⁵.

Morbilidad y mortalidad. Como se ha mencionado, la diabetes es una de las principales causas de enfermedad prematura y muerte en muchos países. Por ejemplo, de las 284000 muertes en 2007 atribuidas a la DM y a sus complicaciones en US, cerca del 65% eran debidas a eventos cardio o cerebrovasculares²⁶.

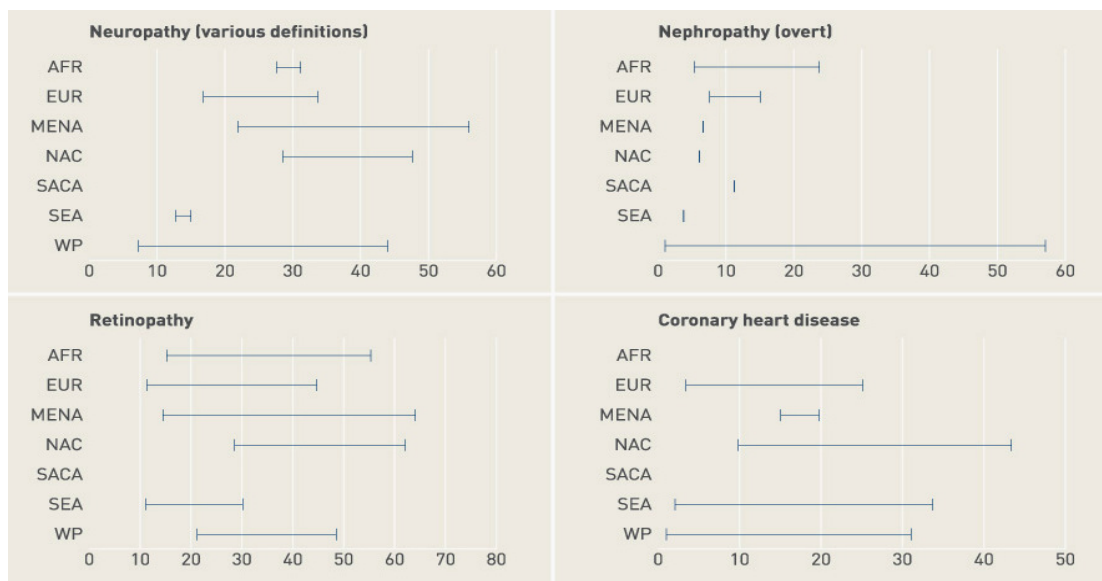


Figura 3. Rangos de prevalencia (%) de enfermos diabéticos con complicaciones, en diferentes estudios realizados en varias regiones del mundo. Adaptado de IDF Atlas, 3th editon, 2006.

A nivel global, se estimaba que cerca de 4 millones de muertes de personas en el grupo de 20 a 79 años, podrían ser atribuidas a la diabetes en el año 2010 (un 5.5% mayor que las previsiones para el año 2007), siendo un 6.8% de las causas de mortalidad global para ese grupo de edad, con una mayor proporción de mujeres respecto a hombres. Aunque se ha documentado una mejoría de la supervivencia de diabéticos en ciertos países desarrollados, el aumento de la prevalencia es fundamentalmente a expensas de un incremento en la incidencia de la enfermedad²⁷.

Impacto económico. La diabetes supone una gran carga económica para los sistemas nacionales de salud. Los gastos sanitarios se estimaron en alrededor del 11.6% del total del gasto sanitario global para el año 2010. Alrededor del 80% de los países estudiados por la IDF se prevé que gasten entre el 5% y el 13% del total de su gasto general en diabetes (por ejemplo, los gastos derivados de la atención sanitaria a la diabetes y sus complicaciones en USA, se estimaron en 376 millones de dólares en el año 2010). Además de en gasto sanitario directo, una de las grandes cargas económicas la asociada con la discapacidad y la merma en esperanza de vida como resultado de la propia enfermedad y sus complicaciones, así como pérdida de productividad y de crecimiento económico. En un estudio reciente (Straka y colaboradores) en el que se compararon casi 30000 enfermos hospitalizados por evento cardiovascular (cirugía coronaria, infarto de miocardio, angina, insuficiencia cardiaca, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica), los pacientes diabéticos generaban mayores costes en su atención durante el seguimiento a tres años, que los que no lo eran (en el primer año 8805 \$, en el segundo 13860\$, y en el tercero 16149\$, frente a los 6982\$, 10056\$, 12163\$, respectivamente)²⁸.

Obesidad. Es un trastorno para la salud alrededor del cual se originan y progresan diversas comorbilidades que influyen negativamente en el propio individuo así como en la sociedad a la que pertenece. El número de muertos por año atribuibles a la obesidad está cerca de 30.000 en el Reino Unido, siendo unas diez veces mayor en EEUU, donde la obesidad ha desplazado al tabaquismo como la principal causa prevenible de enfermedad^{29,30}. Entre otras, la obesidad tiene un importante impacto en la esperanza de vida, la DM2 y todas las enfermedades cardiovasculares. En el *Swedish National Diabetes Register*, con más de 13000 personas y seguimiento a 6 años, el riesgo relativo de enfermedad coronaria, ictus y mortalidad para un IMC basal incrementado en cinco unidades, era del 14%, 11% y 27% respectivamente tras ajustar por edad, sexo, tabaquismo y tratamiento hipolipemiante. Era del 9%, 7%, y 20%

respectivamente, ajustado por hemoglobina glicosilada (HbA1c), presión sanguínea, medicación hipolipemiente y microalbuminuria³¹. En una revisión sistemática, Guh y colaboradores observaron que existía asociación significativa entre la obesidad y la incidencia de diabetes tipo 2, hipertensión arterial, todas las enfermedades cardiovasculares, asma y algunos tipos de cáncer (mama, endometrio, colorrectal, riñón)³²

La obesidad ha demostrado que disminuye la esperanza de vida hasta en 7 años a la edad de 40. El incremento en el riesgo de muerte con cada unidad de aumento del IMC disminuye progresivamente con la edad pero persiste significativo hasta el grupo de edad mayor de 75³³. Por ejemplo el gobierno de UK estimaba en 2005 que un IMC de 25 Kg/m² disminuía la esperanza de vida en 2 años, y que dada la epidemia de obesidad, el efecto aumentaría hasta los 5 años en el 2050. La evidencia de la que se dispone sugiere que se puede prolongar la esperanza de vida mediante la reducción de peso en individuos obesos³⁴. El riesgo de HTA es hasta cinco veces mayor entre las personas obesas que en aquellas con peso normal. Los estudios poblacionales sugieren que más del 85% de la HTA aparece en individuos con IMC > 25 Kg/m², tanto por los efectos metabólicos de la grasa como por el tipo de dieta que les lleva a ese incremento del peso³⁵.

Resultados del *Asia-Pacific Cohort Collaboration Study*, con más de 300.000 adultos seguidos al menos 7 años, mostraban que por cada unidad de incremento en el IMC, existía un 9% de diferencia en los eventos por cardiopatía isquémica y del 8% en accidentes isquémicos cerebrales³⁶. También, otros estudios como el metaanálisis de McGee y colaboradores indica que la obesidad es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y de mortalidad. El análisis de este estudio mostró que la obesidad (IMC>30) estaba asociada a un riesgo relativo de mortalidad global de 1,22; de muerte por enfermedad coronaria de 1,57; y otras enfermedades cardiovasculares de 1,48. Esto es en parte debido a su asociación con factores de riesgo tradicionales de enfermedad cardiovascular como la hipertensión, la dislipemia (en particular los bajos niveles de HDL y la hipertrigliceridemia), y la resistencia a la insulina/tolerancia anormal a la glucosa³⁷.

C. PATOGENIA I

I. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

Metabolismo de las Lipoproteínas. El transporte de los lípidos en sangre -excepto el de los ácidos grasos no esterificados, que se unen a la albúmina- se hace mediante complejos

moleculares denominados lipoproteínas. Los lípidos se unen a ciertas proteínas (apolipoproteínas) que facilitan la estabilidad en un medio acuoso como es el plasma. Éstas adoptan una forma subsférica de manera que pueden albergar en su interior los lípidos más apolares - triglicéridos y ésteres de colesterol- y en su superficie los que no lo son tanto como fosfolípidos y colesterol libre. No son moléculas de composición y estructura fijas. Son poblaciones de microemulsiones, formadas por partículas con una gran composición porcentual de lípidos y proteínas, de diferente tamaño, densidad y carga. Esta variabilidad en la composición y estructura se debe a su metabolismo, un proceso continuo por el que estas partículas experimentan diferentes grados de exposición a la acción de diversas enzimas, así como al intercambio de componentes lipídicos y proteicos con otras lipoproteínas y con células durante distintos periodos³⁸.

Mediante técnicas como la ultracentrifugación podemos separar las diferentes clases de lipoproteínas del plasma según su peso específico:

- los quilomicrones, cuya principal apolipoproteína es la Apo B48.
- las lipoproteínas de muy baja y baja densidad, cuya proteína principal es la Apo B100: *very low density lipoproteins* (VLDL), *intermediate density lipoproteins* (IDL), *low density lipoproteins* (LDL) y lipoproteína a (Lpa).
- las de alta densidad, *high density lipoproteins* (HDL), y sus subfracciones las HDL₂ y HDL₃, que son el grupo de lipoproteínas que no contienen Apo B sino Apo A, con un metabolismo muy complejo y en cierto modo, opuesto al de los grupos anteriores.

La principal función de las lipoproteínas es pues la del transporte de lípidos, y esto tiene lugar a través de varias rutas metabólicas, íntimamente relacionadas, pero en sentidos, si no opuestos, diferentes, en función del origen y los diferentes destinos:

- La vía exógena: desde el intestino hacia los tejidos, que consumen ácidos grasos como fuente de energía, que los almacenan en forma de triglicéridos, o hacia el hígado.
- La vía endógena, desde el hígado (el colesterol que llega de la dieta o bien de síntesis propia) hacia los tejidos que lo consumen o almacenan.
- El transporte reverso, desde los tejidos ricos en colesterol hacia los que los que lo demandan para su metabolismo, o hacia el hígado para su eliminación.

En cada una de las rutas interviene principalmente una familia de lipoproteínas³⁹:

La vía exógena. Se basa en la maduración de quilomicrones, que se van transformando desde quilomicrón naciente, a maduro y a residual, mediante el intercambio de Apo C y E con las HDL

y a la acción de la lipoprotein lipasa (LPL), sobre parte de sus triglicéridos. El quilomicrón residual, es retirado de la circulación por la interacción de apo E con receptores hepáticos específicos.

La vía endógena. También denominada cascada lipolítica, se basa en la transformación de las VLDL en IDL, y estas en LDL, también, por la acción sucesiva de la LPL y el intercambio de apoproteínas con las HDL. Las LDL por medio de receptores celulares para apo B₁₀₀ son internalizadas y degradadas, liberando colesterol en el espacio intracelular. Cuando esta interacción es defectuosa, la LDL se acumula en el espacio extracelular, padeciendo modificaciones como la oxidación, siendo eliminadas por la vía del receptor denominado basurero (*scavenger*).

Transporte reverso. Es la última parte del metabolismo lipoproteico (si bien no es un proceso biológico lineal), que dirige el flujo de colesterol desde células donde abunda éste hacia células con menor contenido, o bien hacia el hígado para su reciclaje o eliminación por la bilis.

A modo de resumen, sin entrar en profundidad, se describen brevemente las diferentes etapas del metabolismo lipoproteico:

I. Absorción de lípidos de la dieta. Los lípidos complejos, esto es, los que contienen ácidos grasos esterificados en su estructura, deben ser hidrolizados para poder ser absorbidos posteriormente. De forma general, son dos los procesos fundamentales, la emulsión y la digestión, principalmente mediados por la secreción biliar y pancreática. El resultado es la formación de pequeñas vesículas y micelas, estables en el medio acuoso, por la disposición de sales biliares en el borde externo, albergando en su interior fosfolípidos y ácidos grasos libres⁴⁰. Las micelas atraviesan la capa de agua que recubre las microvellosidades de la mucosa intestinal y entran en contacto con la membrana apical de los enterocitos, permitiendo la absorción de los lípidos. Esta absorción es un proceso, que para los ácidos grasos libres y los monoglicéridos no implica gasto energético (principalmente lo hacen por difusión), y que en el caso de los esteroides de la dieta es más complejo. Existe un transporte micelar mediante el cual los esteroides de la dieta (colesterol, fitoesteroides y otros) alcanzan los lisosomas por vía endocítica; después:

- Los fitoesteroides salen a la luz intestinal por la acción de transportadores de la familia de las ABC (*ATP-binding-cassette*), ABCG5-ABCG8.
- Mientras, el colesterol es dirigido al retículo endoplasmático para su metabolización. Es esterificado con un ácido graso, principalmente ácido oleico por la acción de la

acilcoenzima A-colesterol aciltransferasa (ACAT), para luego depositarse en el citoplasma o bien incorporarse a las lipoproteínas para su exportación a la sangre⁴¹.

II. Metabolismo de los quilomicrones. Una vez en el citoplasma del enterocito, los lípidos de la dieta, junto con apolipoproteínas específicas, son ensamblados para formar quilomicrones, que serán secretados a los vasos linfáticos para su transporte a otros tejidos. Se sintetizan principalmente durante el periodo absorptivo, regulado por la composición de la ingesta y la disponibilidad de lípidos. Los quilomicrones son el medio de transporte de los ácidos grasos, el colesterol dietético y ciertas vitaminas liposolubles, desde el intestino hacia el hígado y el resto de tejidos. Los triglicéridos suponen el 85% de su masa, y aparte de otros lípidos y apolipoproteínas (que en el caso de la apo E, la adquieren una vez se encuentran en la linfa o en el plasma, por transferencia de otras lipoproteínas), la apo B₄₈, es el componente proteico esencial.

El proceso comienza con la síntesis de la apolipoproteína (apo) B₄₈. A medida que se transcribe el ARNm, en la misma luz del retículo endoplásmico, se van asociando los lípidos complejos, transferidos por la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP), que transfiere principalmente triglicéridos, pero también fosfolípidos y ésteres de colesterol. El complejo entre la apo B₄₈ y los lípidos va adoptando la conformación de una partícula lipoproteica, aunque pequeña y relativamente pobre en triglicéridos, que debe fusionarse con otro complejo rico en triglicéridos pero carente de apo B₄₈ para formar un quilomicron. Desde allí, a través del aparato de Golgi, son exocitadas a través de vesículas, por la membrana basolateral hacia la linfa mesentérica. Llegan a la sangre a través de conducto torácico, y allí adquieren apo C y E de las HDL. La presencia de apo C-II en este momento permite a los quilomicrones ser sustrato para la lipoproteinlipasa (LPL), que hidroliza sus triglicéridos, facilitando la provisión de ácidos grasos a los tejidos subyacentes. Los ataques lipolíticos sucesivos de la LPL, y la cesión de colesterol y fosfolípidos a las HDL, genera partículas cada vez más pequeñas y pobres en triglicéridos, hasta el quilomicron residual o remanente. La presencia de apo E permite que sean reconocidos por receptores hepáticos como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (r-LDL) y el receptor relacionado con el r-LDL (LRP), que median su captación y su eliminación final del plasma⁴³.

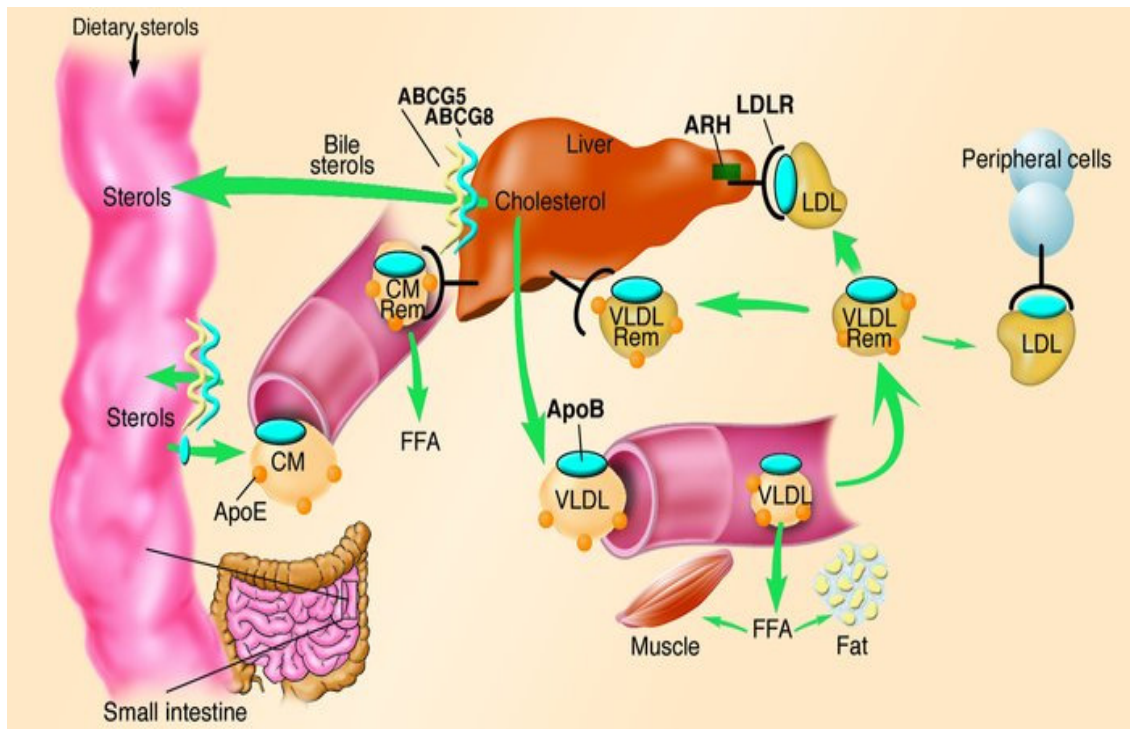


Figura 4. Metabolismo de los quilomicrones, VLDL, IDL y LDL. Adaptado de Rader, *J Clin Invest.* 2003

III. Metabolismo de las lipoproteínas de muy baja y baja densidad.

Las VLDL. La función de las VLDL es la del transporte de los triglicéridos de síntesis endógena a los tejidos periféricos. Son partículas sintetizadas en los hepatocitos en un proceso análogo a los quilomicrones, aunque su proteína constitutiva fundamental es la apo B₁₀₀. La síntesis se regula en función de la cantidad de ácidos grasos de la que disponga el hígado, suma de la propia síntesis, los procedentes del tejido adiposo y los cedidos por los quilomicrones.

Un vez secretadas al plasma, adquieren apo C-II y E de las HDL, convirtiéndose en sustrato para la LPL, hidrolizando sus triglicéridos y dejando los ácidos grasos en disposición de ser captados por las células de los tejidos subyacentes. A la vez que la lipólisis, las VLDL intercambian triglicéridos por ésteres de colesterol con las HDL, y con las VLDL más grandes y ricas en triglicéridos, mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). De esta manera, una proporción de las VLDL se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). El resto, abandona la circulación como VLDL residuales hacia el hígado previa interacción con los receptores específicos r-LDL y LRP, gracias a la presencia de apo E⁴².

Las IDL. Son las lipoproteínas intermedias en la cascada de la lipólisis. Conservan la apo B₁₀₀, que identifica su procedencia, y por la acción de la lipasa hepática endotelial acaban dando origen a las LDL.

Las LDL. Son el resultado del catabolismo de las VLDL e IDL. En condiciones normales, menos de la mitad de las VLDL se convertirán en LDL. Éstas constituyen una reserva circulante de colesterol: cuando las células requieren abastecerse de colesterol, expresan el r-LDL en su membrana y captan estas proteínas para degradarlas. El hígado es el principal destino de las LDL, que utiliza el colesterol para excretarlo a la bilis, utilizarlo para la síntesis de ácidos biliares, o bien devolverlo a la circulación en forma de VLDL. La concentración de LDL en plasma viene determinada por la tasa de producción de VLDL, por un lado, y la tasa de eliminación de VLDL residuales, IDL y las mismas LDL, por otro. Cuando el hígado recibe un exceso de colesterol y ácidos grasos de la dieta, se inhibe la expresión de r-LDL hepático. Al tiempo, se estimula la secreción de VLDL, y consecuentemente la producción de LDL en plasma. Se produce un desequilibrio entre la tasa de entrada del colesterol en el plasma y la tasa de eliminación de las LDL, aumentando su concentración en el plasma. Este desequilibrio metabólico, propiciado por las ingesta rica en colesterol y ácidos grasos, es la causa principal de hipercolesterolemia moderada en seres humanos⁴³.

IV. Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad. Profundizaremos un poco más en un capítulo más adelante. Existe una enorme heterogeneidad en la composición y la estructura de esta fracción lipoproteica, traduciéndose en un metabolismo muy complejo. La apo A-I es su componente proteico fundamental, de origen hepático e intestinal. Las HDL participan en lo que se denomina transporte reverso del colesterol (desde los tejidos periféricos hasta al hígado), aunque también desempeñan un papel importante en otros procesos fisiológicos (protección frente a lipoperoxidación lipídica, modulación de la función endotelial, etc....).

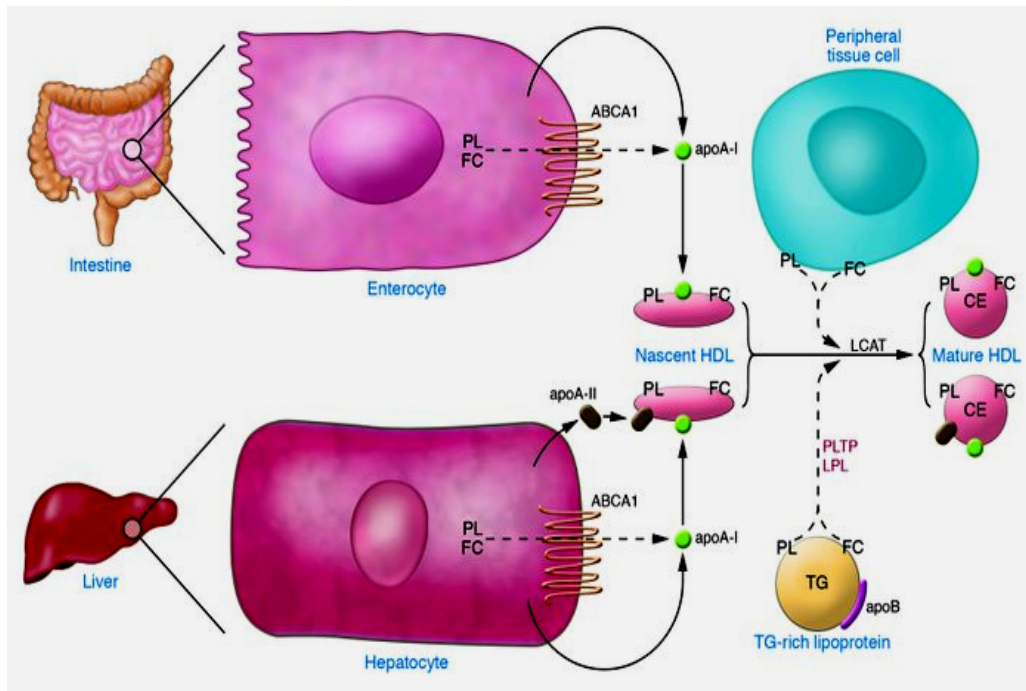


Fig 5. Metabolismo de las HDL. Biosíntesis de las HDL. Adaptado de Rader, J Clin Invest 2006

En el espacio intersticial, las HDL recogen el colesterol libre de las células, bien mediante difusión del colesterol a favor de gradiente desde la membrana celular al medio (poco eficiente y no específico de las HDL), bien por interacción de la partícula o parte de ella con la superficie celular, activándose la translocación del colesterol intracelular a la membrana y posteriormente incorporándose a la HDL⁴⁴. En este proceso hay que destacar el papel de dos proteínas: el receptor CLA-1/SR-BI, y una proteína de la familia de los transportadores de membrana ABC (*ATP Binding-Cassette*, con dominio de unión al ATP), la ABCA1, la función de la cual consiste en translocar el colesterol libre y los fosfolípidos desde la cara citoplasmática a la cara externa de la membrana, para ser donados a moléculas aceptoras, en un proceso que requiere el consumo de ATP⁴⁵. La expresión de ABCA1 se estimula en respuesta al aumento en el contenido celular de colesterol con lo que se favorece la eliminación de éste, y su actividad es limitante en el transporte reverso de colesterol y en la propia generación de HDL.

En el caso de los macrófagos, las HDL también pueden recoger el colesterol mediante un proceso denominado retroendocitosis, por el que la partícula lipoproteica es endocitada y posteriormente secretada portando colesterol. Además, estas células pueden excretar colesterol asociado a apo E de síntesis propia, originando un subtipo de HDL, las γ LpE⁴⁶.

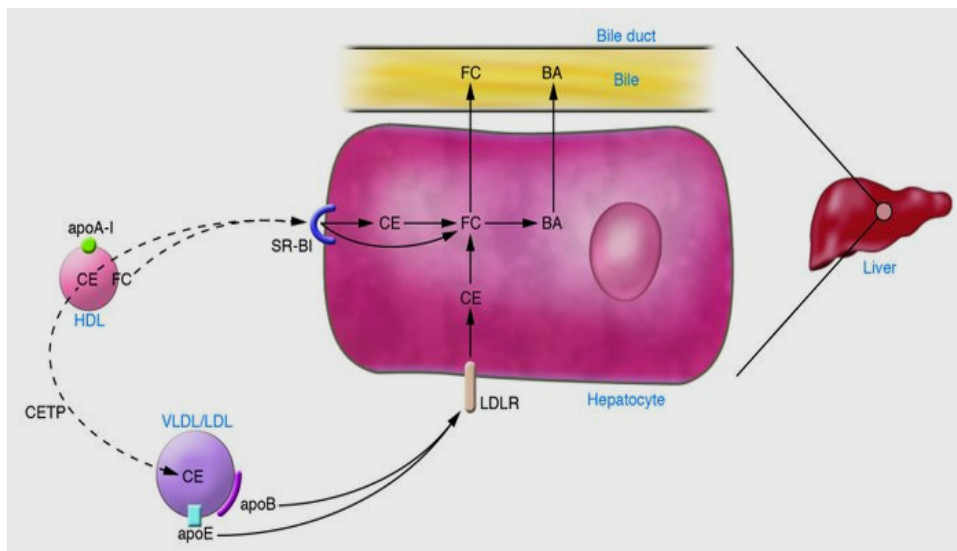


Fig 6. Metabolismo de las HDL. Captación hepática de las HDL. Adaptado de Rader, J Clin Invest 2006

Las partículas que más ávidamente captan el colesterol de las células son las formas inmaduras de HDL, $pre\beta_1$, que aumentan progresivamente de tamaño a medida que incorporan lípidos a su estructura ($pre\beta_2$ $pre\beta_3$), esterificándolos por la acción de la LCAT y disponiéndolos en su interior apolar, hasta transformarse en una HDL_3 , madura. Ésta sigue recogiendo colesterol y fosfolípidos de las células y de las apolipoproteínas con apo B para convertirse en HDL_2 de mayor peso molecular. Una vez en este punto, el destino del colesterol y de los otros lípidos se diversifica.

- La lipasa endotelial hidroliza los fosfolípidos y la LPL los triglicéridos, generando de nuevo HDL_3 , disociándose parte de la apo A_1 para reiniciar el ciclo receptor de colesterol, y facilitando la interacción de la HDL resultante con receptores específicos del hígado y los órganos esteroideogénicos.
- El colesterol, por su parte sigue varios caminos: una vez formada HDL_2 , por la acción de la CETP, cede ésteres de colesterol a VLDL y LDL, que lo ceden a los tejidos (principalmente al hígado), a cambio de triglicéridos.
- La fracción de HDL que ha adquirido apo E, puede ser reconocida por los receptores LRP y r-LDL de la superficie celular, para donar colesterol directamente, proceso que también puede darse si la partícula HDL interacciona con el receptor CLA-1/SR-BI, y sin ser captada, cede ésteres de colesterol, dando lugar a una partícula más pobre en colesterol que puede retomar el ciclo.

V. Control del metabolismo lipídico. La mayoría de los mecanismos de control de la homeostasis lipídica se basa en la regulación de la expresión genética de las proteínas clave en su metabolismo. Desde las enzimas asociadas a las lipoproteínas, a las propias estructurales o los receptores celulares que interactúan con ellas o que modulan las transformaciones de los ácidos grasos y lípidos más complejos. Esta regulación se efectúa de varias formas: mediante factores de transcripción (como los SREBP) que se activan en respuesta a la variación de las concentraciones celulares de ácidos grasos, esteroides y ácidos biliares, para mantener el aporte adecuado de lípidos a la célula, y prevenir los efectos tóxicos de un exceso de los mismos. También se puede regular la expresión proteica mediante receptores nucleares que se activan por ligandos de naturaleza lipídica, como el LXR (liver X receptor), FXR (farnesoid X receptor), RXR (retinoid X receptor), y PPAR (receptor de los activadores de proliferación peroxisomal).

SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*). Los factores SREBP presentan un procesamiento proteolítico dependiente del contenido celular de colesterol, el cual les faculta para unirse a elementos de respuesta (SRE) situados en los promotores de genes específicos. Ejercen una retroregulación positiva en respuesta a la disminución de la concentración celular de colesterol, incrementando su biosíntesis y la captación mediante la expresión de diversas enzimas (HMG-CoA sintasa, reductasa...) y del r-LDL respectivamente. De forma inversa, el colesterol y los ácidos grasos, provocan disminución de la forma activa de estos factores de transcripción⁴⁷.

Liver X receptor (LXR). A pesar de su nombre, sus dos isoformas, α y β , tienen una amplia distribución en diversos tejidos, no solamente en hígado. Estos receptores funcionan como sensores del contenido celular de colesterol, pero de forma contraria a los SREBP. LXR favorece el procesamiento y la eliminación del exceso de colesterol, utilizando como ligando a diversos oxisteroides cuyas concentraciones están en función de la afluencia de colesterol. Los efectos son diversos en función de los tipos celulares donde se expresa (principalmente en hepatocitos, adipocitos, macrófagos y enterocitos) pero de forma global, coordina el transporte reverso de colesterol y controla la absorción intestinal de esteroides^{48,49}:

- Estimula la expresión de transportadores de membrana de la familia de los ABC. Induce la expresión de ABCA1, y con ello, la exportación de colesterol, junto con fosfolípidos, a las formas inmaturas de HDL, iniciando el transporte reverso del colesterol. Activa la expresión de ABCG1 en los macrófagos (que también resulta en un aumento de la excreción de lípidos), y de ABCG5 y ABCG8 en intestino delgado e

hígado, reduciendo la absorción de esteroides y promoviendo la excreción de éstos a la bilis, respectivamente.

- Induce la síntesis de apo E en macrófagos y adipocitos, de forma que en respuesta a la carga de colesterol intracelular, se excretan al medio complejos lipoproteicos formados por apo E y colesterol.
- Regula el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas mediante la expresión de CETP, controlando así, el intercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre las HDL y las VLDL del plasma.

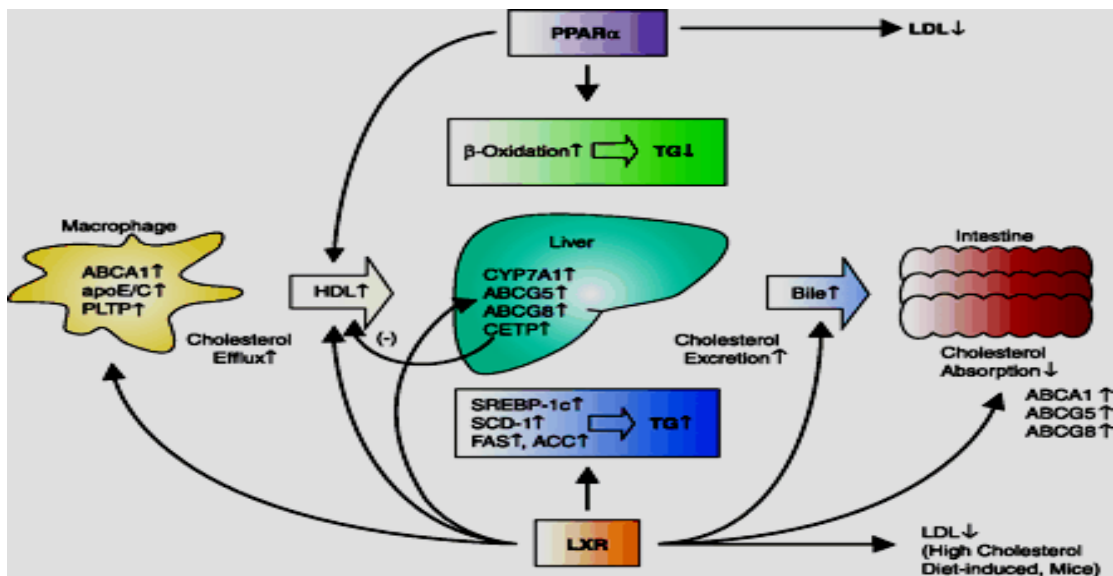


Fig 7. Efectos de LXR y PPARα sobre el metabolismo lipídico. Adaptado de Kino, Molecular Interv. 2004

Farnesoid X receptor (FXR). Controla el ciclo de los ácidos biliares, limitando la acumulación hepática de éstos por inhibición de la síntesis en respuesta a su concentración y mediante la estimulación de la excreción a la bilis; y facilitando su reciclaje desde el íleo hacia la circulación portal⁵⁰. También, al igual que otros receptores nucleares, regula la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo lipoproteico, como la PLTP (proteína transferidora de fosfolípidos) y la apo C-II.

PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). Son receptores presentes en diversas rutas metabólicas relacionadas con el equilibrio energético, además de la lipídica. Existen tres subtipos, alfa (α), β o δ (beta o delta), y gamma (γ). Son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por agentes sintéticos como los fibratos (PPAR α), que disminuyen la concentración circulante de triglicéridos, y las glitazonas (PPAR γ), que aumentan la sensibilidad a la insulina^{51,52}.

- PPAR α , regula el catabolismo de los ácidos grasos, estimulando su captación celular y la subsiguiente β y ω -oxidación en los orgánulos intracelulares. Por otra parte, controla el metabolismo extracelular de las VLDL porque regula directamente la transcripción de la apolipoproteína C-III (además de controlar la disponibilidad de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos), y de las HDL, estimulando la síntesis de apo A-I y apo A-II por las células hepáticas, resultando en un aumento de la concentración de HDL.
- PPAR γ , se expresa principalmente en el tejido adiposo y en los macrófagos. Este receptor promueve la diferenciación del adipoblasto en adipocito, resultando en un aumento de la captación y el almacenamiento de ácidos grasos, y estimula tanto la captación de LDL oxidadas por parte de los macrófagos, proceso importante en el desarrollo de la placa de ateroma como la expresión de CLA-1/SR-BI, potenciando la extracción de colesterol celular por las HDL, coordinando una respuesta crucial para eliminar el colesterol del organismo, limitando su acumulación en la íntima arterial.

La fisiopatología de la regulación de los receptores PPAR, y su relación con la arteriosclerosis, merece un capítulo aparte, y se verá más adelante.

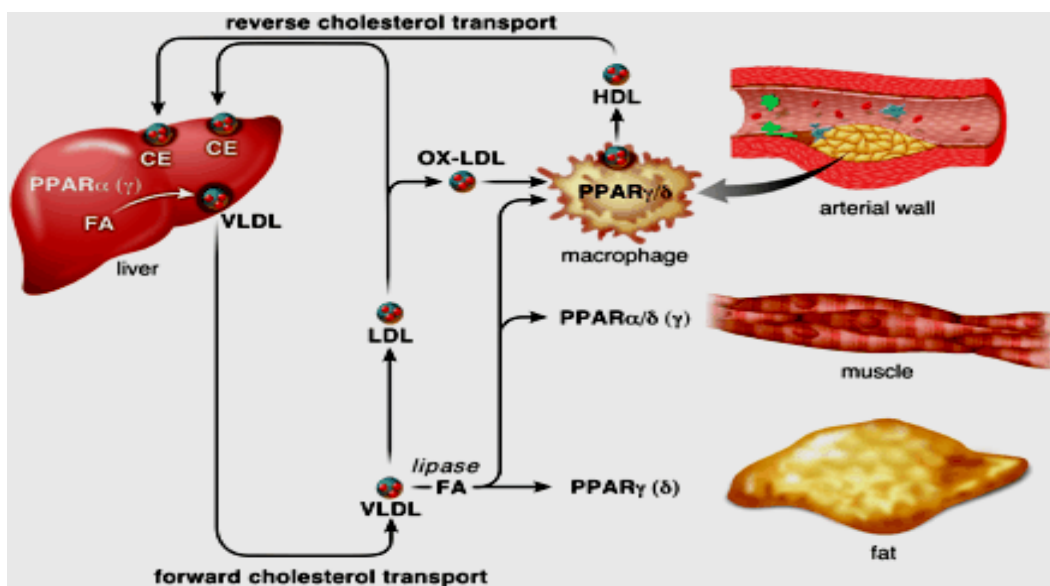


Fig 8. Efecto general de la activación de los receptores PPAR. Adaptado de Lee, Endocrinology 2003

C. PATOGENIA

II. ARTERIOSCLEROSIS Y METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

La arteriosclerosis. Es un proceso multifactorial en constante investigación, y la enorme prevalencia y el elevado coste social de las sus complicaciones justifican la intensidad y el coste de su estudio. A pesar de numerosos ensayos y un cada vez mayor conocimiento sobre el tema, no están bien definidos los parámetros que permiten predecir la progresión o regresión de las lesiones ateromatosas en sujetos con riesgo o ya con alteraciones establecidas. Así, resultan particularmente interesantes los factores que tienen un papel importante en el inicio y el desarrollo de la lesión, ya que la modificación de estos factores, que favorecen o predisponen el desarrollo de la arteriosclerosis puede conseguir un descenso de la morbimortalidad cardiovascular. El conocimiento en profundidad de estos aspectos podría alterar favorablemente la historia natural de las placas de ateroma, si logramos intervenir modificando la evolución de ciertos mecanismos patogénicos.

Muchos son los factores implicados en la aparición y el desarrollo de la placa de ateroma. Clásicamente se venían considerando dos grandes teorías patogénicas que apuntaban hacia lo que, hoy es sabido, son dos importantes procesos en la evolución de la aterosclerosis: el depósito de material lipídico en el espacio subendotelial y los fenómenos trombóticos. A ellos se les une el concepto de respuesta inflamatoria crónica de la pared vascular y de disfunción endotelial.

disfunción endotelial
depósito lipídico subendotelial
modificación de lipoproteínas de baja y alta densidad
respuesta inflamatoria crónica
fenómenos trombóticos

Tabla 6. Puntos clave en la formación de la placa de ateroma

Depósito lipídico. Papel del colesterol. A lo largo de este siglo se han ido acumulando un enorme volumen de argumentos que resaltan la trascendencia del colesterol, y los lípidos en general, como elemento crucial en el desarrollo de la placa de ateroma. A modo de resumen de todas las evidencias que permitiría considerar el papel etiológico del colesterol:

- El colesterol está presente en la placa de ateroma desde el comienzo de su formación y los lípidos en general pueden llegar a suponer hasta un 60% del peso de la placa⁵³.

Además el contenido en colesterol y lípidos es tanto mayor cuanto más grave es la placa de ateroma y procede del que circula en plasma unido a lipoproteínas⁵⁴.

- La hipercolesterolemia experimental en modelos animales da lugar a la aparición de placas de ateroma⁵⁵.
- Los estudios epidemiológicos, definieron cómo la hipercolesterolemia mantenida a largo de los años se asociaba con una elevada incidencia de episodios coronarios⁵⁶. Así, los estudios de intervención hipolipemiente, demuestran que una reducción mantenida en las concentraciones de colesterol plasmático produce una disminución en las manifestaciones clínicas de la enfermedad arteriosclerótica y a una detención en la progresión de las placas de ateroma^{57,58}.

Se entiende la aterosclerosis como una respuesta inflamatoria crónica ante el daño endotelial⁵⁹. Distintos estímulos (mecánicos, químicos, tóxicos, virales e inmunológicos) dañan el endotelio, el cual responde elaborando una serie de mediadores celulares que provocan la proliferación y también la migración de los macrófagos y miocitos hacia la íntima, además de la secreción de diversos componentes conjuntivos: proteoglicanos, fibras elásticas y colágenas.

La conjunción de las hipótesis lipídica e inflamatoria pasa por el hecho de que el endotelio dañado o disfuncionante tiene capacidad de modificar las LDL que contacten con su superficie, facilitando su atrapamiento subendotelial. A su vez, estas LDL oxidadas tendrían una importante capacidad quimiotáctica sobre monocitos circulantes y células del músculo liso de la capa muscular del vaso, posibilitando así el comienzo del fenómeno inflamatorio subendotelial, y destacando la importancia de las LDL modificadas como elementos proaterogénicos⁶⁰. Se explicaría así la distribución local de las placas de ateroma, que suele coincidir con zonas hemodinámicamente comprometidas o con puntos que tienen una superficie endotelial disfuncionante, y que las lesiones sean tanto más importantes cuanto mayores sean las cantidades de LDL circulantes y menor sea su capacidad intrínseca de resistir agresiones prooxidantes.

Este fenómeno se explica con más detalle más adelante. La contribución de la modificación de las HDL a la placa de ateroma, es motivo de un capítulo aparte.

La disfunción endotelial es un proceso patológico de afectación sistémica. El endotelio tiene numerosas funciones especializadas en la homeostasis vascular, de ahí que, su actividad deficiente, se haya detectado en prácticamente todas las enfermedades de origen

cardiovascular, existiendo no sólo cuando las manifestaciones clínicas son evidentes, sino en estadios tempranos preclínicos⁶¹.

Se define como la falta de relajación vascular endotelio-dependiente a través del sistema NO/GMPc (*óxido nítrico/monofosfato de guanosina cíclico*), y es un marcador excelente de riesgo cardiovascular, ya que su estado es un índice integrado de factores proaterogénicos y ateroprotectores^{62,63}. La edad, la hipertensión arterial, el tabaquismo, la hiper glucemia y la hiperlipemia entre otros, pueden afectar a la funcionalidad del endotelio. La disfunción del endotelio desempeña un papel muy importante en todas las etapas de la arteriosclerosis. Además de marcar que existe una deficiente respuesta vasomotora, denota lo que se llama un ambiente de “activación endotelial”, caracterizado por estados proinflamatorios, proliferativos y procoagulantes. Durante periodos prolongados en la historia natural de la arteriosclerosis, la disfunción endotelial es reversible si se corrige, por ejemplo, la hiperlipemia, ya sea por medio de la dieta o bien farmacológicamente⁶⁴.

Arteriosclerosis y modificación de las LDL. Como se ha dicho es fundamental para el desarrollo de la placa de ateroma, que en las fases iniciales se acumulen LDL en la matriz subendotelial. Esta acumulación es mayor cuando existen concentraciones elevadas de LDL circulantes. Las LDL nativas son modificadas por oxidación, lipólisis, proteólisis, glicosilación, asociación con proteoglicanos o incorporación en inmunocomplejos^{65,66}. En contacto con las LDL modificadas, los monocitos las fagocitan y se activan, transformándose en macrófagos, que acumulan en su interior colesterol en elevadas concentraciones, y les proporciona el aspecto de células espumosas⁶⁷. La endocitosis de LDL altamente oxidadas está mediada por un grupo de receptores que reconocen una gran variedad de ligandos (receptores basureros), cuya expresión está regulada por el PPAR γ , y por citocinas como TNF α y el IFN γ . En este proceso el macrófago libera proteasas que contribuyen a la rotura de la lámina elástica externa, y elabora citocinas que contribuyen a la migración, desdiferenciación y proliferación de las células del músculo liso⁶⁸.

Así, pues las anomalías lipídicas se han reconocido como factores patogénicos clave en el desarrollo de aterosclerosis. Tanto estudios en animales de experimentación como análisis epidemiológicos y ensayos de intervención farmacológica han mostrado un incremento de lesiones arteriosclerosas ante concentraciones séricas de colesterol elevadas. Los puntos clave de la hipótesis lipídica son:

- Las concentraciones elevadas de LDL y disminuidas de HDL son importantes factores de riesgo de aterosclerosis y sus consecuencias⁶⁹.

- En las fases iniciales de la aterogénesis, el aumento de la permeabilidad endotelial favorece el transporte de las LDL hacia la íntima arterial, donde interactúan con elementos de la matriz⁷⁰.
- La modificación oxidativa de las LDL es un prerrequisito para ser acumuladas en el interior de los macrófagos. Estas partículas causan daño endotelial y promueven cambios inflamatorios e inmunológicos⁷¹.
- La modificación de las LDL puede ser evitada por la acción de lipoproteínas de alta densidad y proteínas asociadas a éstas como la paraoxonasa 1 (PON 1)⁷².

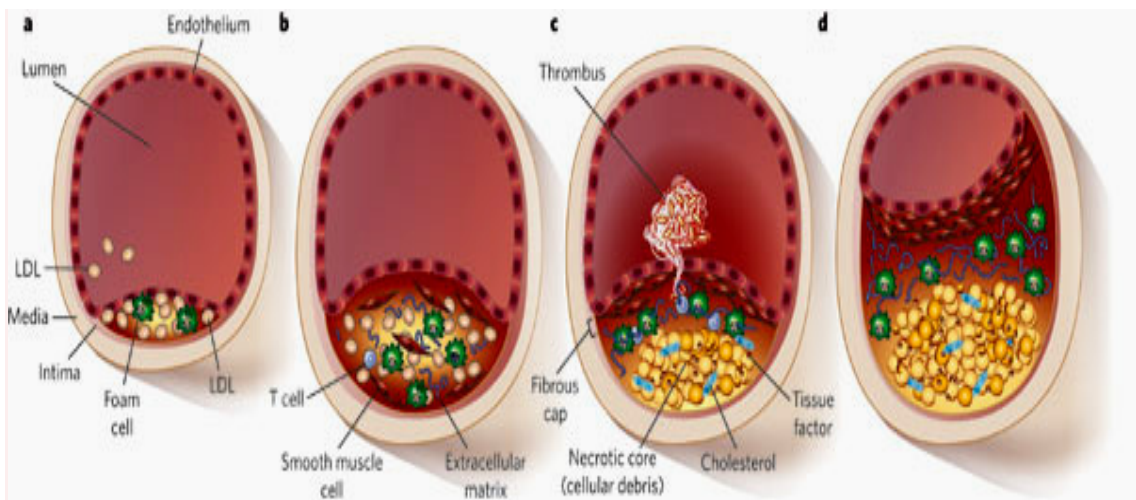


Fig 9. Arteriosclerosis; etapas: desde la estría grasa (a) hasta la lesión vulnerable (c) y/o obstructiva (d). Adaptado de

El primer cambio histopatológico en el proceso aterogénico se inicia con la acumulación local de lipoproteínas de baja densidad en el espacio subintimal donde por la asociación con componentes de la íntima. Estas interacciones van a incrementar el tiempo de estancia de estas partículas en la íntima y su sensibilidad a experimentar modificaciones, predominantemente oxidativas e hidrolíticas. Una vez las lipoproteínas apo B forman complejos con elementos de la íntima extracelular, se convierten en una partícula modificada, puesto que se encuentra limitada su capacidad de regresar al plasma. Cada uno de los componentes de las lipoproteínas puede ser degradado por enzimas que se encuentran en la íntima arterial⁷³.

Una vez que las LDL han formado complejos reversibles e irreversibles con los proteoglicanos arteriales de la íntima, y han sido expuestas a las reacciones de hidrólisis y oxidación, son internalizadas por los macrófagos derivados de los monocitos que han invadido la íntima y por las células del músculo liso que han migrado desde la media, lo que da lugar a

las características células espumosas, que reciben su nombre por el aspecto vacuolado que presentan⁷⁴. Las vacuolas están llenas de lípidos, principalmente ésteres de colesterol, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos⁷⁵. Esta vacuolización de los macrófagos es un mecanismo de defensa (en su interior el colesterol se encuentra esterificado) para evitar la lisis celular por la entrada excesiva de LDL y colesterol libre. Sin embargo, esto es una solución temporal, puesto que si el macrófago sigue captando LDL modificada, saturará la capacidad de neutralizar colesterol libre. Los centros necróticos en los ateromas es producto de la lisis de las células espumosas que han saturado su capacidad de control sobre el colesterol libre. La necrosis celular que acontece posteriormente, con liberación de lípidos a partir de las células espumosas y enzimas lisosomales, modifica o daña más las células de la íntima y los componentes intersticiales e induce una segunda cascada de respuestas inflamatorias dentro de la íntima arterial. Por tanto una gran parte de la respuesta tisular responde a un proceso inflamatorio crónico iniciado por la sedimentación de las LDL.

Las lipoproteínas apo B pueden incorporarse a macrófagos por dos vías: la fagocitosis de agregados formados en la íntima, y la endocitosis mediada por receptor. La internalización de las LDL nativas por esta vía, se realiza a través del receptor específico apo B/E y no lleva a la acumulación de colesterol porque puede disminuir la expresión de receptores, reducir la síntesis endógena de colesterol, y activar la esterificación del colesterol libre intracelular. Por el contrario, la LDL modificada, es únicamente reconocida por un receptor no específico cuya funcionalidad no se modifica por la entrada de colesterol a la célula. Esta familia de receptores son conocidos con el nombre de basureros (scavengers), y se caracterizan por su baja afinidad. El reconocimiento de la LDL por su receptor depende de la afinidad existente entre la carga negativa del dominio de unión del receptor celular para las LDL (r-LDL), con la carga positiva de los aminoácidos lisina y arginina presentes en la apoproteína (apo) B₁₀₀, que es la principal proteína de la LDL. La modificación química de la LDL enmascara la carga positiva de los residuos lisina de la apo B, provocando la pérdida de afinidad entre receptor y LDL⁷⁶. Al mismo tiempo, este incremento de la carga negativa de la LDL aumenta la afinidad de la LDL por el receptor *scavenger* (basurero). Se observó que la expresión del receptor scavenger no estaba regulada por el contenido intracelular del colesterol y, por lo tanto, permitía la acumulación incontrolada de ésteres de colesterol en el citoplasma del macrófago convirtiéndolo en célula espumosa⁷⁷.

Son diversas las modificaciones de la LDL que se pueden realizar *in vitro*, aunque difícilmente pueden darse en una situación fisiológica. Las modificaciones que tienen relevancia *in vivo* son: la oxidación (la más importante y estudiada de todas), la glicación no

enzimática, la desialización, la electronegatividad, la agregación, la formación de complejos con proteoglicanos, o algunos tipos de modificación inducidos por diversas enzimas lipolíticas.

Las LDL oxidadas intervienen prácticamente en todas las etapas del proceso de formación de la lesión arterosclerótica. Como resumen, los efectos de la LDL oxidada pueden resumirse en los siguientes puntos⁷⁸:

- *Formación de células espumosas.* La modificación de los residuos de lisina de la apo B por productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, elimina la afinidad por el r-LDL. Este hecho, implica, a su vez, el reconocimiento de la LDL oxidada por el receptor *scavenger*, y la consiguiente acumulación intracelular de ésteres de colesterol y formación de células espumosas.
- *Citotoxicidad.* La LDL oxidada es citotóxica para prácticamente todas las células de la pared arterial, pero especialmente para las células endoteliales⁷⁹.
- *Inflamación.* Productos de la oxidación son capaces de activar una serie de factores de transcripción (NF-kB, AP-1, PPAR alfa y gamma) para estimular la expresión de factores de crecimiento (factor estimulador de colonias, CSF; factor de crecimiento epidérmico, EGF), quimioquinas (proteína quimiotáctica para monocitos, MCP-1; moléculas de adhesión vascular, VCAM-1, e intercelular, ICAM-1) y citocinas (IL 1,6 y 8), etc...⁸⁰.
- *Inhibición de vasodilatación.* La LDL oxidada inhibe la acción vasodilatadora del óxido nítrico en células endoteliales⁸¹.
- *Actividad protrombótica.* La LDL oxidada induce la expresión de factor tisular, endotelina-1 e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)^{82,83}.
- *Respuesta inmunológica.* La LDL oxidada es capaz de actuar como antígeno, induciendo una respuesta inmunológica, y la generación de autoanticuerpos⁸⁴.

Como se explica en más detalle en capítulos posteriores, la LDL no es la única lipoproteína que padece modificaciones en sus propiedades químicas y físicas que acaban resultando en partículas aterogénicas. Otra familia de lipoproteínas, las HDL, si bien en sentido contrario, modifican su estructura y en consecuencia sus funciones ateroprotectoras, en determinados ambientes metabólicos.

C. PATOGENIA I

III. DM, OBESIDAD Y METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS. CONCEPTO DE DISLIPEMIA ATERÓGENA.

La dislipemia aterógena y su relación con la enfermedad arterial coronaria. La dislipemia aterógena, caracterizada principalmente por triglicéridos (TG) elevados y HDL-c bajo, es un fenotipo asociado con un incremento del riesgo cardiovascular. La concentración de triglicéridos elevados en ayunas, son de hecho, un factor de riesgo independiente para enfermedad arterial coronaria. Estaban independientemente asociados con la incidencia de enfermedad arterial coronaria en el “*Paris Prospective Study*”, el “*Prospective Cardiovascular Munster Study*” y el “*Copenhagen Male Study*”, y el análisis multivariante ajustado por HDL-c, obesidad, diabetes y otros factores de confusión, demostraron una asociación estadísticamente significativa^{85,86}. También el descenso del HDL-c es claramente un factor de riesgo independiente para enfermedad arterial coronaria, como se demostró ya en el “*Framingham Heart Study*” y confirmado en otros posteriormente⁸⁷.

La prevalencia de dislipemia aterógena, definida como anomalías en el eje TG-HDL-c, es muy alta en pacientes con enfermedad arterial coronaria. Por ejemplo en el “*Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial*”, el 33% tenían Triglicéridos elevados (>200 mg/dL) y el 64% tenían bajos niveles de HDL-c (<40 mg/dL)⁸⁸. En el “*Third National Health and Nutrition Examination Survey –NHANES III-*”, la prevalencia de triglicéridos elevados (>150 mg/dL) fue del 30%, y la de bajos niveles de HDL-c (<40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres) fue del 37%; en esta muestra la prevalencia de obesidad era del 39%, y existía un solapamiento significativo entre los tres fenotipos⁸⁹. La dislipemia aterógena está fuertemente asociada con la obesidad y la diabetes tipo II, es frecuente, y es un importante factor de riesgo para eventos cardiovasculares. Así, comprender las relaciones fisiopatológicas entre obesidad y dislipemia aterógena es de gran importancia para reducir el riesgo cardiovascular en personas obesas. El adipocito y las diversas vías metabólicas de las lipoproteínas son los puntos clave de esta relación, que cuando se alteran, favorecen la aparición de arteriosclerosis y sus consecuencias clínicas.

La captación de los ácidos grasos derivados de lipoproteínas y su almacenamiento por tejido adiposo. El tejido adiposo es responsable de la captación coordinada, el almacenaje, y la liberación de energía en forma de triglicéridos (almacenaje), y ácidos grasos (captación y liberación). Adquiere los ácidos grasos de la dieta por la vía del metabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos, principalmente quilomicrones. El músculo esquelético y cardiaco tiene la

habilidad de hidrolizar los triglicéridos de los quilomicrones y extraer ácidos grasos según sus necesidades metabólicas, pero la mayoría de la energía en forma de triglicéridos de los quilomicrones se dirige hacia el tejido adiposo durante la fase postprandial para el almacenaje. En los capilares del tejido adiposo, los quilomicrones se encuentran con la enzima lipoproteína lipasa (LPL), sintetizada por los adipocitos. La apoC-II de estas lipoproteínas actúa como cofactor de la LPL, iniciando la hidrólisis de los triglicéridos y la liberación de ácidos grasos no esterificados, que son captados por los adipocitos adyacentes. La expresión de la LPL derivada de adipocitos y su actividad se incrementa en la fase postprandial, mientras que en la fase de ayuno, disminuye. En contraste, la LPL muscular aumenta casi el doble que la del tejido adiposo en la fase de ayuno, dirigiendo los ácidos grasos derivados de los triglicéridos hacia el músculo para la utilización de energía. Una vez que los ácidos grasos son captados por el adipocito, se esterifican para poder ser atrapados en el interior celular y prevenir la difusión fuera⁹⁰.

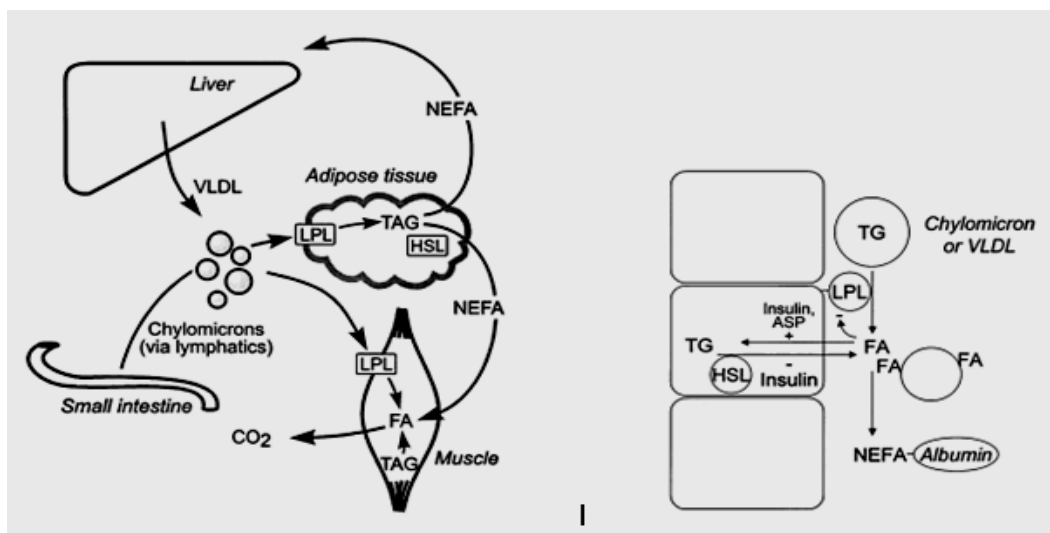


Fig 10. Captación de ácidos grasos y lipólisis. Acciones de LPL y HSL en el tejido adiposo. Adaptado de

Lipólisis de Triglicéridos y liberación de NEFAs por el tejido adiposo. La lipólisis se define como el catabolismo de los triglicéridos en respuesta a los requerimientos celulares de ácidos grasos, tanto cuando son necesarios como sustrato de energía o para la síntesis de muchos lípidos, como cuando es preciso retirarlos porque están presentes en exceso. Pueden ser tan sumamente importantes para la formación de membranas, la señalización celular o la obtención de energía como tóxicos cuando exceden la demanda; de ahí que exista un órgano especializado como el tejido adiposo que los convierte en moléculas inertes por esterificación con glicerol y formación de Triglicéridos.

Como ya se ha visto previamente, la hidrólisis de esos triglicéridos tiene lugar a tres niveles diferentes: la lipólisis gastrointestinal para la grasa dietética; la lipólisis vascular responsable de la hidrólisis de los triglicéridos asociados a lipoproteínas; y la lipólisis intracelular que cataliza la liberación de ácidos grasos desde las gotas lipídicas donde se almacenan Triglicéridos para la exportación desde el tejido adiposo, o su metabolismo en otros tejidos. Esta lipólisis intracelular se produce principalmente por la acción de lipasas neutras pero también por las lipasas ácidas lisosomales.

La hidrólisis neutra de los triglicéridos requiere tres pasos consecutivos que son llevados a cabo por al menos tres enzimas diferentes: la ATGL – *adipose triglyceride lipase*-, que cataliza el paso inicial convirtiendo los triglicéridos en diacilglicéridos (DGs); la HSL – *hormona sensitive lipase*- que convierte DGs en monoacilglicéridos (MGs); y la MG lipasa que los hidroliza en ácidos grasos y glicerol. En el tejido adiposo ATGL y HL son las responsables de más del 90% de la hidrólisis de los triglicéridos. La insulina y el la ingesta de comida son reguladores negativos de la acción de estas enzimas, promoviéndose el almacenaje de TG. Contrariamente, durante la fase de ayuno, los niveles de insulina están bajos, y se promueve la hidrólisis de los triglicéridos. También las catecolaminas, a través de la estimulación de los receptores β , los glucocorticoides y los agonistas de los receptores PPAR, regulan positivamente su activación^{91,92}.

Los triglicéridos también pueden ser hidrolizados por la enzima LAL –*lysosomal acid lipase*- en lo que se conoce como autofagia o lipólisis ácida ya que se produce en el interior de los lisosomas una vez se endocitan las gotas lipídicas. Tiene diferentes funciones según el tejido; en el hígado la autofagia contribuiría a la lipólisis en condiciones de dietas ricas en grasa o en periodos largos de ayuno; pero en el tejido adiposo se relaciona con la diferenciación de adipocitos y la lipogénesis pero no con la lipólisis.

Además de ser sustrato energético y precursores de otros lípidos los ácidos grasos están directamente involucrados en vías de señalización celular y transcripción genética. Pueden unirse y activar receptores nucleares de la familia de los factores de transcripción que controlan la expresión de genes implicados en la homeostasis energética. Tanto la concentración de ácidos grasos en plasma como en el interior celular está correlacionada positivamente con el aumento de la resistencia a la insulina. También el incremento del contenido celular en triglicéridos está fuertemente asociado a la resistencia a la insulina en el músculo esquelético y el hígado, pero sólo son marcadores y no reguladores de la acción y las vías de señalización de la insulina como lo es la propia lipólisis^{93,94}. La familia de receptores nucleares PPAR requieren ácidos grasos para su activación, sin embargo estos precisan un ciclo de esterificación y rehidrólisis por parte de enzimas como ATGL y HSL para poder actuar como

ligandos de PPAR. La lipólisis no sólo es necesaria para PPAR α , altamente expresado en tejidos oxidativos, sino también para activar PPAR γ , más implicado en la síntesis lipídica. Como ejemplos, la activación de PPAR γ por rosiglitazona se asociaba con un incremento de la lipólisis en tejido adiposo blanco en ratas por inducción de ATGL y HSL. Por otra parte, la deficiencia en HSL llevaba a la regulación a la baja de genes diana de PPAR γ en el tejido adiposo en modelos experimentales^{95,96}.

Resistencia a la insulina y alteración del atrapamiento de ácidos grasos por el tejido adiposo. La obesidad y la resistencia a la insulina que se observa en la DM2, se asocian tanto al atrapamiento defectuoso de los ácidos grasos en los adipocitos, como a la lipólisis excesiva, como al incremento de los NEFAs circulantes con niveles superiores a los requerimientos metabólicos de otros tejidos.

Se han postulado diversos mecanismos para esta relación de los ácidos grasos con la resistencia a la insulina. El incremento celular de NEFA puede facilitar la síntesis de lípidos lipotóxicos que interfieren en la señalización funcional de la insulina, como las ceramidas⁹⁷. También directamente o a través de la producción de especies reactivas del oxígeno pueden activar quinasas que inactivan la respuesta a la insulina⁹⁸.

La obesidad de forma aislada se asocia con trastornos funcionales de otra enzima lipolítica, la lipoprotein lipasa (LPL). La actividad global de la LPL en obesos está disminuida, y se incrementa en respuesta a la pérdida de peso y la terapia intensiva con insulina en los pacientes que además asocian diabetes tipo 2^{99,100}. La resistencia a la insulina, altera la regulación positiva de la LPL y el atrapamiento efectivo de los ácidos grasos¹⁰¹.

Este flujo aumentado de NEFA desde el tejido adiposo conlleva un incremento de la recaptación de estos ácidos grasos por el hígado, aumento de la lipogénesis hepática y la producción de VLDL, dando lugar al perfil lipídico plasmático conocido como dislipemia aterógena¹⁰².

Sobreproducción de VLDL hepáticas en estados de resistencia a la insulina. El aumento de lipoproteínas apo B, particularmente de lipoproteínas ricas en triglicéridos es una característica de la obesidad y la resistencia a la insulina. Como se ha dicho, uno de los principales motivos es el aumento del flujo de NEFA desde el tejido adiposo hacia el hígado. El hígado es un órgano eficiente en retirar los NEFA de la circulación. Algunos acaban en la vía de la β -oxidación de los ácidos grasos, pero muchos NEFAs son reesterificados en Triglicéridos¹⁰³. Estos triglicéridos sintetizados de nuevo por el hígado pueden ser cargados en apoproteínas apo B-100 e incorporados a VLDL para su secreción en un proceso que requiere de MTP (que

se encuentra regulada positivamente en estados de RI). Los triglicéridos que son transportados al interior del hígado tienen dos destinos posibles: almacenarse en el citoplasma, o ser secretados a la circulación como VLDL apo-B. Los precisos mecanismos moleculares que llevan de la resistencia a la insulina a la sobreproducción de VLDL están sin definir. Los ácidos grasos y la regulación de la lipólisis intra y extracelular, parece que tienen un papel importante.

Fisiopatología de HDL-c bajo en la obesidad. Los niveles bajos de HDL-c son muy comunes en la obesidad¹⁰⁴. Sin embargo, los mecanismos de la reducción de HDL-c en obesidad y otras situaciones de resistencia a la insulina no están bien establecidos y son diversas las causas que se postulan:

- Una de las causas son los niveles elevados de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Existe una interacción importante entre las lipoproteínas ricas en Triglicéridos y las HDL durante su metabolismo. Con la hidrólisis por parte de la LPL de los triglicéridos de los quilomicrones y VLDL, el exceso de fosfolípidos de superficie y apoproteínas (incluyendo apoA-I, apoC, y apoE) son transferidos a las HDL. Así, la alteración de la actividad LPL, que resulta frecuente en los estados de obesidad y resistencia a la insulina, es un factor que reduce los niveles de colesterol unido a HDL por un menor intercambio con VLDL.
- Como se ha visto, los ésteres de colesterol son transferidos desde las HDL a las lipoproteínas ricas en triglicéridos a cambio de Triglicéridos mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). El incremento de los niveles de partículasceptoras ricas en triglicéridos (QM, VLDL) aumenta la tasa de intercambio mediado por la CETP, resultando en un mayor contenido de colesterol fuera de las HDL y una reducción de los niveles de HDL-c¹⁰⁵. Además, el proceso de transferencia mediado por la CETP enriquece las HDL con Triglicéridos, resultando en partículas que son mejor sustrato para la lipasa hepática. La hidrólisis de los triglicéridos de las HDL por esta enzima lleva a la formación de partículas de HDL más pequeñas que son más rápidamente catabolizadas¹⁰⁶. También, por tanto, el incremento en la concentración de lipoproteínas ricas en triglicéridos, resulta en un mayor intercambio mediado por la CETP de colesterol fuera de las HDL y triglicéridos dentro de ellas, llevando a niveles más bajos de HDL-c. Los pacientes obesos frecuentemente tienen niveles bajos de HDL-c incluso cuando los triglicéridos en ayuno son normales, sugiriendo que existen otros mecanismos que contribuyen a esa disminución en su concentración más allá del aumento de las lipoproteínas ricas en Triglicéridos. El tejido adiposo secreta y es una fuente importante de CETP en plasma humano¹⁰⁷. Además, la actividad y la masa de CETP aumentan y se correlacionan con los niveles de leptina en plasma, por lo que se

sugiere que la producción de CETP por el tejido adiposo en estados de obesidad podría directamente llevar a la reducción de HDL-c, incluso sin aumento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos¹⁰⁸.

- Otras proteínas derivadas de los adipocitos podrían influir directamente en el metabolismo de las HDL, como por ejemplo la adiponectina, cuyos niveles se encuentran reducidos en los estados de obesidad y la resistencia a la insulina, y que se correlacionan con los niveles de HDL-c en plasma¹⁰⁹. Además, la pérdida de peso estaba asociada con el incremento de adiponectina así como de HDL-c, y los cambios en estos parámetros estaban correlacionados incluso después de ajustar por cambios en la adiposidad y la sensibilidad a la insulina¹¹⁰. También existe una fuerte correlación negativa entre la tasa de catabolismo de apo A-I y los niveles plasmáticos de adiponectina, consistente con una acción directa sobre el metabolismo de las HDL¹¹¹.
- Como se ha dicho, la lipasa hepática (HL) está incrementada en los estados de obesidad y resistencia a la insulina. Después del enriquecimiento de Triglicéridos mediado por CETP, las HDL son mejores sustratos para HL y son más rápidamente aclarados de la circulación, como resultado de la lipólisis mediada por esta enzima. La base del incremento en la actividad HL en la obesidad y la resistencia a la insulina tampoco está determinada todavía.
- La lipasa endotelial (EL), podría tener un papel importante contribuyendo a reducir los niveles de HDL-c en la obesidad y la resistencia a la insulina. EL tiene importantes efectos en el metabolismo de HDL en ratones; la sobreexpresión reduce los niveles de HDL-c mediante el aumento de su tasa de catabolismo, mientras que la inhibición o la deleción genética los aumenta por descenso de su catabolismo^{112,113}. También existen datos que señalan que la EL es relevante en el metabolismo de HDL en humanos, y que sus niveles están correlacionados significativamente de forma negativa en la obesidad y el síndrome metabólico. Es importante señalar, que la expresión de EL por células endoteliales y macrófagos está regulada positivamente por estímulos inflamatorios, y que la obesidad es un estado proinflamatorio caracterizado por la infiltración de macrófagos del tejido adiposo y los niveles elevados de marcadores plasmáticos de inflamación¹¹⁴.
- Finalmente, el tejido adiposo podría ser un importante origen de flujo de colesterol hacia HDL, que podría alterarse en los estados de resistencia a la insulina. El tejido adiposo contiene aproximadamente el 25% del colesterol corporal total en sujetos flacos y más aún en obesos, y la gran mayoría del colesterol está no esterificado¹¹⁵. Diversos estudios han demostrado que los adipocitos expresan los principales transportadores como ABCA1, ABCG1 y SR-BI. Es posible, aunque no demostrado, que estos transportadores

sean disfuncionantes en la obesidad y la resistencia a la insulina, con descenso de flujo de colesterol hacia HDL, resultando en una disminución de su concentración.

D. PATOGENIA II

I. LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL). ESTRUCTURA Y FUNCIÓN. PROTECCIÓN VASCULAR POR HDL.

Estructura. La HDL plasmática es una lipoproteína muy heterogénea formada por diversas subespecies de partículas con diferente forma, densidad, tamaño y composición en apoproteínas y lípidos. La mayoría del colesterol HDL se transporta en esféricas partículas de HDL₂ y HDL₃, clasificadas como α -HDL por su migración en el gel de agarosa de una electroforesis. Un porcentaje más pequeño lo forman partículas discoidales con movilidad electroforética pre β , más inmaduras. Esta heterogeneidad estructural tiene implicaciones funcionales: las densas y pequeñas HDL (principalmente pre β -HDL) muestran una gran capacidad para atraer el flujo de colesterol, permiten una protección más potente frente a la oxidación de las LDL y poseen más propiedades antiinflamatorias que las α -HDL¹¹⁶.

Como se ha dicho, las HDL son sintetizadas a través de una vía compleja. El ensamblaje inicial implica al transportador de la superficie celular ABCA1, para la transferencia de fosfolípidos y colesterol hacia apo A-I pobre en lípidos. A continuación sigue el remodelado en el plasma de las partículas de HDL mediante la esterificación del colesterol por la encima LCAT, el intercambio entre las HDL y otras lipoproteínas tanto de apoproteínas y lípidos, y la transferencia de colesterol celular adicional a las partículas crecientes por el receptor SR-BI y el transportador de la superficie celular ABCG1¹¹⁷.

Finalmente la hidrólisis de los lípidos que forman la partícula de HDL está mediada por varias lipasas (lipoprotein lipasa, lipasa hepática, y lipasa endotelial), y el intercambio de lípidos mediante la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) y la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP).

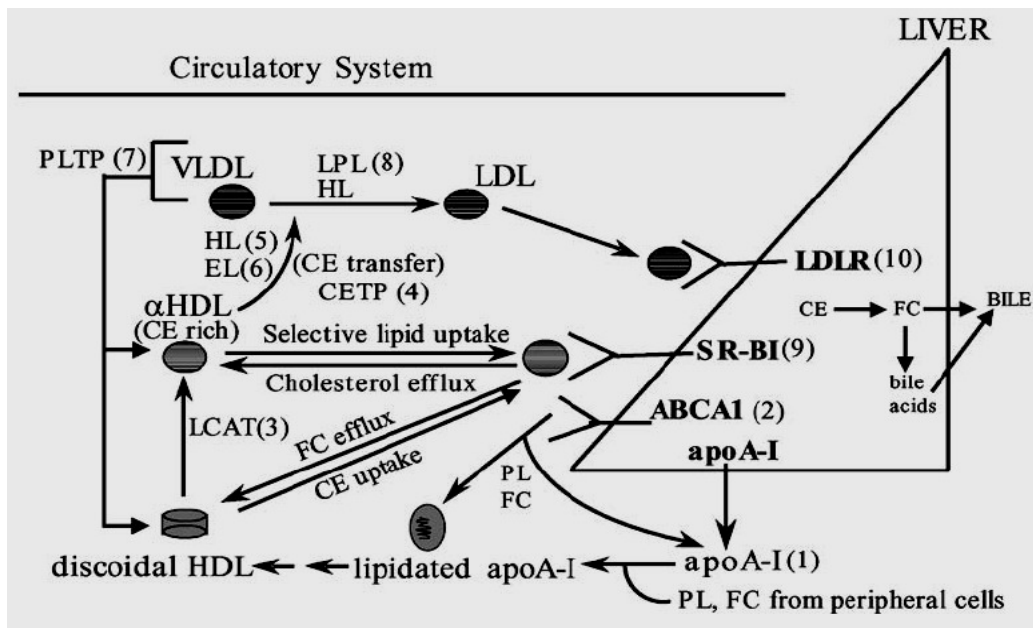


Fig 11. Biogénesis y catabolismo de las HDL. Adaptado de Zannis, J Mol Med 2006

La concentración, composición, forma y tamaño de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) además de por los factores moduladores que controlan el metabolismo lipoproteico general, y que ya se han comentado, están determinadas por numerosas proteínas que influyen su biogénesis, remodelado y catabolismo, y que tienen importantes papeles en las funciones pleiotrópicas de las HDL. Sin ser una descripción detallada, fuera del ámbito de esta tesis, las más importantes son:

- ApoA-I. La Apo A-I es el principal componente proteico de las HDL (casi un 70% de la masa proteica) pero también la encontramos en pequeñas cantidades asociada a los quilomicrones. Las partículas esféricas de HDL contienen de 2 a 4 moléculas de Apo A-I mientras que las discoidales únicamente dos. Se sintetiza en el hígado e intestino con una estructura secundaria consistente en unidades repetidas que forman diez hélices- α antipáticas.

No sólo tiene un papel estructural central, interviniendo en la maduración de las HDL (es cofactor de LCAT) sino que interviene en las principales funciones de estas partículas lipoproteicas. La apoproteína libre de lípidos interactúa funcionalmente con ABCA1 y promueve el flujo de colesterol y fosfolípidos. Cargada de lípidos, activa a la enzima LCAT, interactúa funcionalmente con el receptor para las HDL (SR-BI) y promueve la captación de los ésteres de colesterol transportados por las HDL por parte del hígado y los tejidos esteroideogénicos.

La sobreexpresión de Apo A-I previene la arteriosclerosis en modelos animales (ratones) deficientes en apo E que desarrollan arteriosclerosis masiva y en aquellos alimentados con una dieta aterogénica¹¹⁸. De forma similar, administrada en humanos durante 5 semanas, reportaba reducción en el tamaño de la placa de ateroma por ultrasonidos¹¹⁹. Sin embargo en ratones modificados genéticamente por inactivación del gen de la Apo A-I (knockout) no desarrollan más arteriosclerosis que los controles alimentados con dieta rica en grasa, aunque sí muestran un descenso importante de la cantidad de HDL y un déficit funcional de la enzima LCAT¹²⁰. Esto sugiere que el aumento de Apo AI y HDL previene la arteriosclerosis pero su deficiencia no favorece el desarrollo de la misma sin que existan otros factores asociados.

Además no es sólo un aspecto cuantitativo el que le confiere una importante función protectora a la Apo A-I. Los individuos que poseen la forma Apo A-I Milano, tienen bajos los niveles de HDL-C, pero paradójicamente están protegidos de la enfermedad arteriosclerótica, o al menos no muestran mayor incidencia de esta, posiblemente por una mejor funcionalidad¹²¹.

- Apo A-IV. Se expresa mayoritariamente en el intestino. Es también una apoproteína que se encuentra asociada a HDL y a la fracción no lipoproteica del plasma en situación de ayunas, o a los quilomicrones en el periodo postprandial.

Funcionalmente, tiene un efecto estabilizador de LCAT, activando el flujo de colesterol (interviniendo en el transporte reverso del colesterol) y afecta de forma indirecta a la acción de la LPL sobre los quilomicrones^{122,123}.

La sobreexpresión de esta apoproteína (en concreto Apo A-IV humana) en ratones transgénicos reduce las lesiones arteriosclerosas cuando se les alimenta con dieta rica en grasas y también en ratones knockout de Apo E¹²⁴.

- ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter type 1*). Forma parte del sistema de flujo centrífugo de colesterol y fosfolípidos celulares. Pertenece a la familia de los ATP binding-cassette, y su función consiste en translocar el colesterol libre y los fosfolípidos desde la cara citoplasmática a la cara externa de la membrana, para ser donados a moléculas aceptoras, en un proceso que requiere el consumo de ATP. La expresión de ABCA1 se estimula en respuesta al aumento en el contenido celular de colesterol con lo que se favorece la eliminación de éste, y su actividad es limitante en el transporte reverso de colesterol y en la propia generación de HDL. Tiene un papel fundamental en el RCT y en la susceptibilidad a la arteriosclerosis¹²⁵. Las mutaciones en ABCA1 bloquean la formación de HDL discoidales y esféricas, y su déficit de aumenta la susceptibilidad a la arteriosclerosis de los ratones apo E-/-¹²⁶.

- SR-BI. (*scavenger receptor class B type 1*). La interacción funcional de las HDL con este receptor promueve la captación selectiva de lípidos así como el flujo de colesterol celular no esterificado. La sobreexpresión en ratones induce el aclaramiento rápido de las HDL-c y su transporte hacia la bilis¹²⁷. También, la deficiencia de SR-BI aumenta la susceptibilidad a la arteriosclerosis de los ratones apo E-/-¹²⁸.

- CETP. (*cholesterol ester transfer protein*) La proteína transferidora de ésteres de colesterol media el intercambio de lípidos entre las HDL y las lipoproteínas que contienen apo B. El efecto neto es la depleción de ésteres de colesterol. Por una parte, la inhibición de la CETP favorece el transporte del colesterol por las HDL sobre las lipoproteínas aterogénicas, pero, en sí, la transferencia hacia estas lipoproteínas apo B es una forma de transporte reverso hacia el hígado. El tratamiento con inhibidores de CETP (p.e torcetrapib) produce un aumento de los niveles de HDL-C, lo cual no indica necesariamente un aumento de la funcionalidad y las propiedades protectoras de las partículas.

- PON-1, PON-2, PON-3 (*paraoxonase*). La paraoxonasa humana (PON-1) es una glicoproteína calcio-dependiente que se encuentra unida a las partículas de HDL. Se ha intentado demostrar que la paraoxonasa sérica disminuye el riesgo de enfermedad coronaria por su acción destructora de moléculas proinflamatorias involucradas en la iniciación y progresión de las lesiones arterioscleróticas. El potencial antiaterogénico de esta enzima vendría dado por su capacidad de hidrolizar lípidos oxidados, limitando su acumulación en las LDL. La unión entre la paraoxonasa y la partícula de HDL se constituyó, en parte, como una posible explicación a la relación inversa entre los valores de HDL y la enfermedad coronaria mostrada en distintos estudios poblacionales. Distintas situaciones fisiopatológicas vinculadas a un aumento del estrés oxidativo y factores ambientales producen una disminución de la actividad sérica paraoxonasa^{129,130}.

- PAF-AH. (*platelet-activating factor acetylhydrolase*) Las propiedades antioxidantes de las HDL no son exclusividad propia de la enzima paraoxonasa. La más importante es la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH). Aproximadamente el 70% de la actividad plasmática de esta enzima se asocia a las LDL y el resto a las HDL. La actividad enzimática PAF-AH, inactiva el factor activador de plaquetas e hidroliza lípidos peroxidados aunque su papel antiaterogénico es controvertido¹³¹.

En ausencia de PON-1, la actividad PAF-AH es incapaz de preservar las propiedades antioxidantes de las HDL, y por ello se ha propuesto una actuación coordinada de ambas enzimas in vivo, ya que difieren en su afinidad hacia fosfolípidos oxidados¹³².

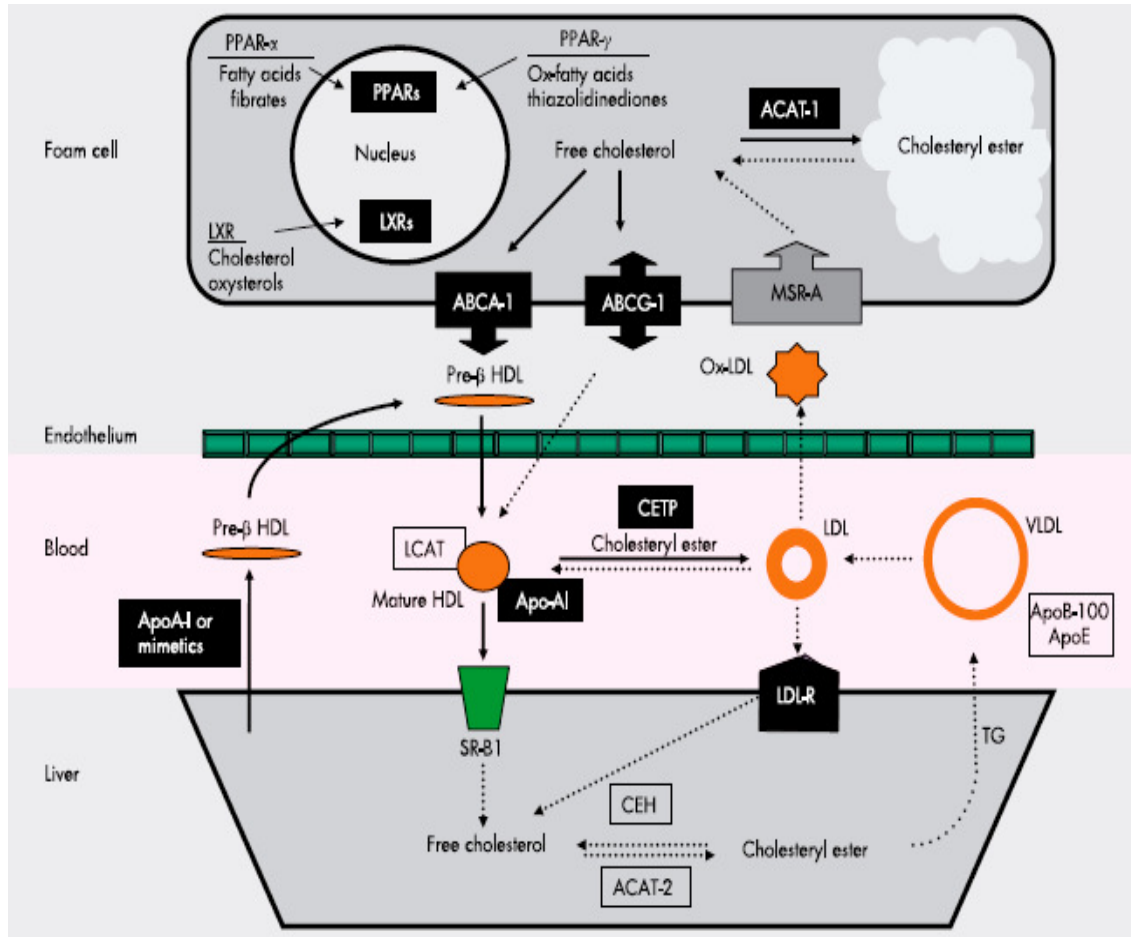


Fig 12. Metabolismo HDL y proteínas importantes como posibles dianas terapéuticas. Adaptado de Lee, Heart 2007

Funcionalidad HDL. Como se ha mencionado, haciendo referencia al pleiotropismo de los efectos biológicos de las HDL, sus funciones son varias:

- RCT (*reverse cholesterol transport*). El mecanismo más conocido para la ateroprotección mediada por HDL se basa en que estas partículas promueven la retirada del colesterol de células periféricas, incluidos los macrófagos del interior de la pared arterial, llevándolo al hígado para su excreción en las heces a través de la bilis. Este proceso, denominado, transporte reverso del colesterol (RCT), resulta en un transporte neto de colesterol desde la pared arterial hasta la bilis, previniendo la acumulación de colesterol a ese nivel, la

desestabilización de la placa de ateroma y los consiguientes eventos cardiovasculares agudos¹³³.

El movimiento de intercambio de colesterol no esterificado entre las células y aceptores extracelulares puede ocurrir simplemente por difusión a favor de gradiente de colesterol o a través de vías mediadas por proteínas:

- una vía unidireccional (célula hacia aceptor), dependiente de ATP, mediada por el transportador ABCA1 (ATP binding cassette A1)
- una ATP-dependiente mediada por el transportador ABCG1
- y una bidireccional, ATP-independiente que incluye a los receptores scavenger BI (SR-BI).

Las apoproteínas pobres en lípidos, principalmente Apo A-I, son los aceptores preferidos por ABCA1. La interacción de ABCA1 con Apo A-I promueve el flujo centrífugo de colesterol y fosfolípidos hacia Apo A-I, generando pequeñas y discoidales pre β -HDL, que todavía retiran más colesterol por la misma vía.

Por el contrario ABCG1 promueve el flujo de colesterol hacia las formas maduras de α -HDL pero no hacia las Apo A-I pobres en lípidos. Tanto ABCA1 como ABCG1 son proteínas de membrana abundantes en macrófagos, especialmente tras se cargados con colesterol, indicando la importancia en la ateroprotección mediada por HDL^{134,135}.

Una vez en las partículas HDL, el colesterol es esterificado por la acción de la enzima lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT). La mayor parte de los ésteres de colesterol son transferidos a las lipoproteínas ricas en triglicéridos por la acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), que se metabolizan hacia partículas remanentes y retiradas de la circulación por el hígado, bien directamente, o tras la conversión primero a LDL. La otra ruta alternativa que siguen los ésteres de colesterol es también hacia el hígado a través del receptor SR-BI (este receptor puede además promover la retirada directa del colesterol no esterificado por el hígado).

Además del papel del HDL en el RCT, otras funciones contribuyen a la ateroprotección mediada por estas lipoproteínas:

- HDL tiene propiedades antioxidantes a través de varios mecanismos. Puede limitar los efectos proaterogénicos de las partículas LDL oxidadas mediante la retirada de hidroperóxidos de los lípidos de las LDL, hecho que se ha demostrado tanto in vitro como in vivo^{136,137}. Se atribuye al alto contenido en antioxidantes, las propiedades antioxidantes de Apo A-1, y la asociación de esta lipoproteína con enzimas como la

paraoxonasa (PON), la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH), y la glutatión peroxidasa (GPX)¹³⁸.

- A nivel endotelial promueve la proliferación celular y disminuye la apoptosis celular¹¹².
- Previene la disfunción endotelial, uno de los eventos iniciales de la aterogénesis. El óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂) median en la relajación de las células de músculo liso y tienen un potente efecto antitrombótico; un descenso en su biodisponibilidad es un hecho prominente en la disfunción endotelial. En cultivos de células endoteliales, HDL activa la sintasa endotelial de NO (eNOS), a través de la unión de apo A-I con SR-BI, y por tanto aumenta la producción de NO. En plasma humano, HDL-C es un potente predictor independiente de la vasodilatación mediada por NO¹³⁹. HDL también mejora la producción de prostaglandina (PGI₂) en células endoteliales en cultivo, induciendo la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2).
- HDL regula negativamente la expresión de moléculas de adhesión (CAMs), inhibe la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, y aumenta la expresión de citocinas antiinflamatorias en cultivos celulares. En plasma humano, los niveles de HDL-C se correlacionan inversamente con niveles de CAMs solubles e IL-6¹⁴⁰.

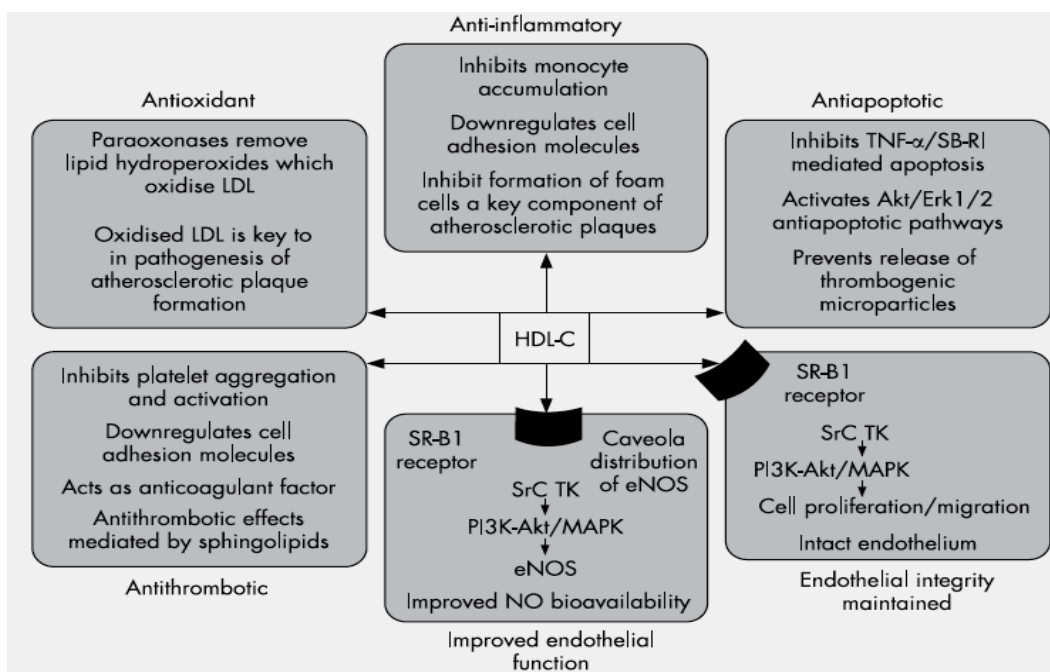


Fig 13. Propiedades y efectos antiaterogénicos de las HDL. Adaptado de Hausenloy, Heart 2008

Evidencia experimental de la protección vascular por HDL. Los modelos animales han contribuido considerablemente al conocimiento de la aterogénesis y la influencia de los lípidos y de los tratamientos que modifican su perfil. En las primeras líneas de investigación, monos

con dietas con alto contenido en grasa, acababan desarrollando hipercolesterolemia y arteriosclerosis acelerada, mientras que el seguimiento con dieta normal, hacía que la enfermedad regresara en parte¹⁴¹. Actualmente los modelos animales, son ratones o ratas, que permiten una precisa manipulación genética.

La primera evidencia experimental de los efectos protectores del HDL fue obtenida por Badimon y colaboradores que realizaron inyecciones de HDL purificado en conejos alimentados con dieta rica en colesterol, y observaron que disminuía la arteriosclerosis tras 90 días con respecto a los controles¹⁴². Más recientemente, la posibilidad de mantener elevaciones mantenidas de HDL-C en ratones mediante la expresión transgénica de su principal apoproteína, Apo A-I, ha permitido series de experimentos determinando el efecto de esos niveles de HDL en el tamaño y composición de la placa, además de en el remodelado avanzado de estas. La naturaleza dinámica y reversible mostrada en estos animales, eleva la posibilidad de que usando nuevos tratamientos se llegue a la regresión y el remodelado cínicamente importante de las placas de ateroma en humanos. Sin embargo los descubrimientos en modelos animales no siempre llevan a tratamientos clínicamente eficaces (ACAT inhibitors, CETP inhibitors...)¹⁴³.

D. PATOGENIA II

II. DISLIPEMIA ATERÓGENA Y HDL. MODIFICACIÓN PROATEROGENICA DE LAS HDL.

La DLP aterógena que caracteriza los estados de obesidad y DM2, que se postula como uno de los mecanismos fundamentales en el desarrollo de arteriosclerosis acelerada, posiblemente no sea únicamente una cuestión cuantitativa sino cualitativa. En algunos subgrupos poblacionales, los niveles bajos de HDL-C no confieren mayor riesgo CV como ocurre en los portadores de apo AI Milano; y al revés, como muestran los resultados de un estudio reciente de intervención farmacológica, con un inhibidor de la enzima CETP, en el que los pacientes tratados, presentaban incremento significativo de su HDL-C pero no experimentaban impacto favorable en cuanto a la arteriosclerosis sino lo contrario (el ensayo se suspendió por importante morbilidad asociada)¹⁴⁴. Es decir, la concentración de HDL en un momento determinado no da información directa sobre el estado del transporte centrípeto de colesterol desde las células al hígado, ni sobre las acciones antiinflamatorias, antioxidantes, antitrombóticas que tienen las HDL¹⁴⁵. Los niveles bajos de HDL son un importante factor de

riesgo cardiovascular, pero pueden no ser sino “la punta del iceberg” de un trastorno funcional subyacente de estas lipoproteínas y su capacidad para frenar y/o revertir la arteriosclerosis.

Las funciones protectoras frente a la arteriosclerosis están influenciadas por interacciones con proteínas de la propia vía metabólica u otras, lípidos, agentes oxidantes, etc... en los diversos ambientes celulares en los que se puede encontrar una molécula de HDL durante su metabolismo. Así, las partículas de HDL son susceptibles de modificaciones estructurales que pueden afectar al contenido en lípidos, apolipoproteínas, enzimas y proteínas transferidoras, provocando cambios sustanciales que llevan incluso a HDL disfuncionantes que podrían promover el proceso aterogénico. Estas modificaciones pueden tener lugar por diversos mecanismos, fundamentalmente en microambientes inflamatorios como la placa arteriosclerótica:

- no-enzimáticos, por iones metálicos en las placas de arteriosclerosis.
- enzimáticos, por enzimas celulares que degradan las apoproteínas, crean agregados, o inducen la oxidación de sus componentes
- por proteínas de fase aguda, que modifican la estructura de las HDL
- modificaciones metabólicas (glicosilación) que ocurre con exceso de glucosa.

Estos cambios se asocian con modificaciones en las funciones biológicas de las HDL, ya que se ha demostrado que disminuyen la capacidad de estas partículas para promover el transporte reverso del colesterol, provocan que tengan acción citotóxica sobre macrófagos y células linfoblastoides en cultivo, y se alteren sus propiedades antiinflamatorias. La gran mayoría de estos efectos se deben a las alteraciones que sufren las enzimas asociadas a las HDL¹⁴⁶.

Modificaciones enzimáticas.

- Mieloperoxidasa (oxidación, nitrosilación y tirosilación). La mieloperoxidasa (MPO) es una proteína secretada por fagocitos y se encuentra expresada en las lesiones ateroscleróticas. Es capaz de generar especies reactivas oxidantes, modificando las HDL de diversas maneras. El mayor producto de la actividad MPO es el ácido hipocloroso (HOCl), que puede modificar diferentes biomoléculas por clorinación y/o oxidación^{147,148}. En las HDL provoca la disminución de la actividad PLTP y de la formación de Apo A-I de elevado peso molecular (similar a las observadas tras oxidación mediada por Cu). Esto conlleva un descenso en el flujo centrífugo de colesterol por dos mecanismos: Las HDL modificadas por HOCl pierden la capacidad de

promover este flujo dependiente de los transportadores ABCA-1, y aunque aumenta su afinidad por SR-BI, la unión es defectuosa, incapaz de soportar eficientemente la transferencia bidireccional de colesterol por este receptor^{149,150}. Además se observa que la incubación de células endoteliales con HOCl-HDL atenúa la expresión y la actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico¹⁵¹.

Otros reactivos producidos por la MPO son el radical dióxido de nitrógeno, que promueve la nitrosilación de la apo A-I; y el radical tirosilo. En la nitrosilación, a diferencia de la clorinación (modificación por ácido hipocloroso), el flujo de colesterol mediado por ABCA1 se afecta sólo minimamente, sugiriendo que las dos modificaciones afectan a la conformación de ApoA-I de forma diferente^{152,153}.

La exposición de lipoproteínas a los radicales tirosilo induce el agregado de apoproteínas con la formación de dímeros y trímeros de apo A-I, y la formación de complejos Apo A-I/Apo A-III, y la peroxidación lipídica. Se observa que las HDL tirosiladas pueden promover el flujo de colesterol desde fibroblastos humanos y disminuir la formación de placas de ateroma en *ApoE-deficient mice*, aunque datos opuestos, sobre otras estirpes celulares, muestran que esta modificación hace que las HDL sean aceptores de colesterol menos eficientes^{154,155}.

- Enzimas de las células cebadas (chymase and tryptase). Las células cebadas son componentes del sistema inmune y están presentes en la íntima arterial. Tras ser activadas estas células se degranulan y liberan varios componentes con actividad biológica, entre ellos, enzimas proteolíticas como la quimasa y la triptasa. Estas, son capaces de degradar apoproteínas, principalmente las Apo A-I y IV que se encuentran en las partículas pre β . Por ello, las HDL modificadas por la acción de estas enzimas, muestran alteraciones en el flujo de colesterol mediado por ABCA-1, sin afectar la vía de SR-BI^{156,157}.

- MMPs. (Matrix metalloproteinases) Las metaloproteinasas de la matriz son una familia de proteasas que actúan en la degradación de componentes de la matriz extracelular. La actividad MMPs se ha implicado en el remodelado vascular tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, contribuyendo al adelgazamiento de la pared arterial y desestabilizando las placas de ateroma. Además podrían contribuir a la génesis de estas placas alterando el papel ateroprotector de las HDL, ya que como se ha demostrado, la incubación de HDL₃ con diferentes MMPs causa la pérdida completa de partículas pre β , reduciendo el componente de alta afinidad en el eflujo de colesterol desde los macrófagos¹⁵⁸.

- Enzimas asociadas a los Polimorfonucleares. Los leucocitos polimorfonucleares están presentes en las etapas iniciales del desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, y se les implica en la modificación de las lipoproteínas de baja y alta densidad mediante la producción de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno y enzimas proteolíticas. Las HDL modificadas por la acción de elastasas, son reconocidas por SR-BI y más eficientemente internalizadas por macrófagos^{159,160}.

- EL (endotelial lipase). La lipasa endotelial tiene una acción fundamentalmente fosfolipasa con las HDL como sustrato preferido. La expresión de EL se encuentra aumentada durante el proceso inflamatorio, y podría estar involucrada en la aterogénesis. La incubación de HDL con EL resulta en un descenso del contenido en fosfatidilcolina, y dado que la composición de fosfolípidos es una de los factores principales en el flujo de colesterol dependiente de SR-BI, las HDL modificadas por EL muestran una disminución en la capacidad de asociarse con estos receptores, y se altera el flujo de colesterol¹⁶¹.

- SAA (serum amyloid A protein). La proteína amiloide A del suero, es una proteína de fase aguda sintetizada por el hígado durante la inflamación. En el plasma se asocia a HDL, alterando sus propiedades fisicoquímicas. SAA desplaza a Apo A-I, induce un aumento de tamaño en la lipoproteína y altera la capacidad de proteger a las LDL de la oxidación, probablemente por afectar a sus enzimas. Además, in vitro, estas partículas modificadas, son menos eficaces en retirar el exceso de colesterol de los macrófagos.

- sPLA2 (secretory phospholipase A2) La fosfolipasa "secretory" A2 tipo II es una enzima que se expresa durante la inflamación, y posiblemente involucrada en la aterogénesis. De hecho, sus niveles circulantes están elevados en la aterosclerosis y a nivel de la placa de ateroma también¹⁶². El tratamiento de HDL con sPLA2 provoca hidrólisis de fosfolípidos, y la presentación de algunos dominios de apoproteínas en superficie, que podría ser el responsable de la elevada capacidad de unión a las células, y el rápido catabolismo de estas partículas modificadas¹⁶³.

Modificaciones no enzimáticas

- Metales de transición. Cu⁺⁺. Las placas de aterosclerosis contienen iones metálicos libres. La producción de radicales del oxígeno inducida por estos metales se sugiere tiene un papel en la enfermedad cardiovascular, probablemente debido a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. La modificación de las lipoproteínas de alta densidad por el cobre, induce la peroxidación de los lípidos, y la oxidación de las apoproteínas determinando la aparición de agregados con mayor peso molecular¹⁶⁴. A nivel de efectos biológicos:
 - En macrófagos. Las modificaciones en las HDL reducen la capacidad de estas partículas de estimular el flujo de colesterol desde los macrófagos cargados de lípidos. Además, se ha observado que son citotóxicas para este tipo de células¹⁵⁴.
 - En células endoteliales. Las HDL oxidadas por cobre se unen a las células endoteliales promoviendo la activación de kinasas intracelulares, NF-kB, Cox-2 y el aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y en la expresión de PAI-1¹⁶⁵.

Modificaciones metabólicas

- Glicosilación. Los individuos con diabetes del tipo 2 presentan niveles más bajos de HDL, que se cree es el responsable del riesgo cardiovascular aumentado que presentan. Los sujetos afectados de diabetes tipo 1 desarrollan aterosclerosis severa independientemente de los niveles normales o altos de HDL. Una posible explicación es que la hiperglucemia induce alteraciones funcionales en las HDL que contribuirían a acelerar la aterosclerosis. La glucosa induce una reacción no enzimática con proteínas formando primero productos reversibles (bases de Schiff, compuestos de Amatory), y posteriormente irreversibles (los AGEs o *advanced glycation end products*).

En los sujetos diabéticos, las HDL se encuentran altamente glicosiladas. La glicosilación in vitro de las HDL aumenta la peroxidación lipídica, acelera su catabolismo y reduce la capacidad de promover el RCT^{166,167}. Aumenta además la susceptibilidad de estas partículas por ser oxidadas. La glicosilación in vitro, reduce la habilidad de las HDL de retirar los lípidos peroxidados de las membranas aún preservando la actividad PON1, induce la apoptosis de células endoteliales, la liberación de peróxido de hidrógeno y la regulación negativa en la expresión de catalasa, CuZn-superóxido dismutasa, y sintasa endotelial de NO¹⁶⁸.

- Homocisteilación. Existe evidencia de que los niveles elevados de homocisteína están asociados con un aumento del riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Se ha

hipotetizado con que el daño vascular inducido por la homocisteína puede ser debido a un derivado reactivo, homocisteína-thiolactona (Hcy-thiolactona), que reacciona espontáneamente con los grupos amino de los residuos de lisina de la apoproteínas. Las homocystamida-LDL (Hcy-LDL), se agregan, inducen su captación por macrófagos y provocan daño oxidativo en las células endoteliales. Los cambios inducidos por la homocisteinación de las HDL, se reflejan en una disminución de la actividad PON¹⁶⁹.

D. PATOGENIA II

III. MICROALBUMINÚRIA (MAU) COMO SIGNO PRECOZ DE DAÑO ENDOTELIAL GENERALIZADO

El hallazgo de albúmina en orina es un fenómeno normal en todos los individuos que con métodos sensibles de medición, su valor normal es de menos de 30 mg/día. Valores persistentes entre 30 y 300 mg/día se consideran como microalbuminuria y mayores a 300 mg/día se consideran macroproteinuria o proteinuria clínica. La microalbuminuria es el hallazgo clínico más temprano de la enfermedad renal y es considerado un marcador independiente de enfermedad cardiovascular.

Para aparecer en la orina la albúmina es filtrada en los glomérulos renales atravesando tres niveles: las fenestraciones endoteliales, la membrana basal y las hendiduras diafragmáticas que dejan los pedicelos de los podocitos. Una vez filtrada la albúmina en el lumen del túbulo proximal puede seguir tres vías distintas. La primera, ser absorbida por la célula del túbulo por un proceso de endocitosis, transportada en su interior y finalmente ser secretada en la membrana opuesta por exocitosis. La segunda vía es entrar a la célula y ser destruida en los lisosomas de la misma total o parcialmente. Y por último la albúmina filtrada puede pasar inalterada por los túbulos renales y ser excretada en la orina.

Comenzó a utilizarse en diabéticos tipo 1, para los que demostró que era el marcador más temprano de daño renal y un predictor de riesgo de progresión hacia la insuficiencia renal terminal. Si bien, en pacientes con diabetes tipo 2 también es un marcador precoz de daño renal, el significado del hallazgo de microalbuminuria tiene un valor agregado, ya que es un mejor predictor de riesgo cardiovascular elevado, posiblemente por su mayor edad, años de

HTA o dislipemia y por lo tanto mayor riesgo cardiovascular. Aproximadamente un 30% de las personas con Diabetes tipo 1 y un 40% de aquellos con Diabetes tipo 2 tienen microalbuminuria, y en estos pacientes (DM 2) el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular podría aumentar en un 100-150 % en función del grado de MAU¹⁷⁰.

Las actuales recomendaciones del JNC 7 (*Seventh report of the Joint National Committee on the prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure*), reconocen a la MAU como un factor de riesgo cardiovascular¹⁷¹.

La MAU se asocia con los componentes del síndrome metabólico (fundamentalmente contribuyen a esto, las alteraciones del metabolismo hidrogenocarbonato, y la hipertensión arterial): obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa/hiperinsulinemia/resistencia a la insulina, dislipidemia característica (descenso de HDL y aumento de Triglicéridos), e hipertensión¹⁷², y sugiere aumento de permeabilidad vascular por daño endotelial precoz e inicio del proceso de arteriosclerosis.

Incluso en pacientes no afectados por hipertensión arterial ni diabetes, la presencia de MAU se relaciona con disfunción endotelial y riesgo cardiovascular, observándose un descenso de la hiperemia mediada por flujo tras oclusión braquial¹⁷³.

En resumen, la MAU es un indicador de daño endotelial generalizado, punto clave en el posterior desarrollo de aterosclerosis.

E. ENFOQUE GENERAL DEL TRATAMIENTO DE LA DISLIPEMIA EN LA DM Y OBESIDAD. HDL COMO DIANA TERAPÉUTICA.

I. MANEJO FARMACOLÓGICO Y NO FARMACOLÓGICO DE LA DISLIPEMIA EN DM Y OBESIDAD

Manejo No Farmacológico. Los pacientes con DM2 y/o obesidad frecuentemente padecen lo que denominamos dislipemia (mixta) aterógena, caracterizada por niveles bajos de HDL, elevados de Triglicéridos y partículas LDL pequeñas y densas.

Las diversas guías terapéuticas de práctica clínica que existen al respecto reconocen que la intervención sobre el estilo de vida es el primer peldaño en el manejo de la dislipemia de estos pacientes aunque frecuentemente cuando no se consiguen los objetivos se debe

asociar un tratamiento farmacológico. Los otros dos puntos importantes en el manejo no farmacológico de los pacientes con DM2 y obesidad son la actividad física y la dieta^{174,175}.

- Ejercicio físico. El incremento de la actividad física (no sólo en frecuencia sino en intensidad) tiene efectos beneficiosos en la sensibilidad a la insulina y el perfil lipídico.

- Dieta. La evidencia de diversos ensayos al respecto, sustenta que el uso de dietas hipocalóricas, pobres en grasas saturadas y ricas en ácidos grasos Omega3, junto con la restricción de la carga de carbohidratos (punto este, al parecer, con mayor impacto a largo plazo), son las que deberían ser prescritas a estos pacientes dada su contrastada eficacia en reducir el peso, y controlar el perfil metabólico de lípidos e insulina. El NCEP ATP III revisado (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) junto a la *American Heart Association Nutrition Committee* recomiendan una ingesta de grasa del 25-35% total de las calorías diarias como parte de los cambios terapéuticos en la dieta de los pacientes diabéticos y obesos, si bien no es el único punto importante a tener en cuenta^{161,176}.

Las dietas pobres en carbohidratos son útiles en mejorar los índices glucémicos así como los parámetros lipídicos (disminuyen Triglicéridos y elevan HDL), de forma aislada, incluso mejor que únicamente una dieta pobre en calorías¹⁷⁷. Las dietas restrictivas con la cantidad de calorías y grasas ingeridas, tal y como muestra el estudio de Howard y colaboradores¹⁷⁸, aunque efectivas en reducir el peso a largo plazo, serían menos efectivas en modificar y mejorar la dislipemia mixta (únicamente con mínimos cambios en HDL y Triglicéridos) si bien consiguen reducir el colesterol total y el LDL.

El enriquecimiento con ácidos grasos Omega3 tiene un particular beneficio sobretodo en los enfermos con enfermedad arterial coronaria, aunque en los estudios en que se demuestra, estaba siempre asociado a un tipo de dieta Mediterránea, rica en fruta, vegetales, cereales, y pobre en carnes y huevos^{179,180}.

Manejo Farmacológico. Al igual que con medidas no farmacológicas, las diversas guías terapéuticas de práctica clínica que existen sobre el tratamiento de la dislipemia en pacientes diabéticos y obesos (en muchas de ellas se hace mención al denominado Síndrome Metabólico) reconocen que tras la intervención sobre el estilo de vida, la siguiente actuación debe ir dirigida a reducir el exceso de LDL-c con una estatina como la primera intervención para reducir el riesgo cardiovascular de estos pacientes.

A modo de resumen, una breve descripción de las opciones terapéutica hipolipemiantes que existen hoy en día, sería:

Disminución intensiva de LDL.

1. Monoterapia con estatinas. Como se ha mencionado, la adición de una estatina en el primer escalón de tratamiento es una opción más que contrastada. Sólo a modo de ejemplo en el metaanálisis de Baigent y colaboradores, con 90.000 pacientes de 14 estudios, mediante el tratamiento con estatinas se consigue una reducción de eventos coronarios del 23% por cada mmol/L de reducción de LDL-c¹⁸¹.

Si bien existen diferencias entre guías de práctica clínica, el abordaje general pasa por reducir LDL-c > 30-40% hacia un objetivo de < 100 mg/dL. En algunos casos de alto riesgo se recomienda incluso hasta 70 mg/dl. La evidencia que sustenta esta estrategia se basa fundamentalmente en el ensayo TNT (*Treating to New Targets*) en el que 10.000 pacientes con enfermedad arterial coronaria conocida fueron randomizados al tratamiento con dosis altas (80 mg/día) o dosis convencionales (10 mg/día) de un tipo de estatina (Atorvastatina). Los resultados mostraban una reducción del riesgo relativo para eventos cardiovasculares del 25% en diabéticos y del 30% en los sujetos sin DM pero con síndrome metabólico¹⁸². Así, la última revisión del consenso NCEP ATP III, recomendaba un nivel objetivo de LDL-c de 70 mg/dL en pacientes de alto riesgo, como los diabéticos.

2. Disminución intensiva de LDL. Estatinas + Ezetimibe. Uno de los aspectos negativos del tratamiento intensivo con estatinas podría ser la tolerancia y efectos secundarios, de ahí el papel potencial del Ezetimibe asociado a dosis bajas de estatinas. La estrategia combinada se basa en ensayos clínicos en los que se demuestra que se reduce de forma significativa la concentración plasmática de LDL-c. Sin embargo en cuanto a la reducción de eventos cardiovasculares no ha demostrado superioridad a la monoterapia¹⁸³. Por eso se recomienda, asociado a estatinas, como segunda o tercera línea de tratamiento.

Modificación de la dislipemia aterógena

1. HDL y Triglicéridos. Las guías clínicas del NCEP ATP III, la ADA (*American Diabetes association*) y la ESC/EAS (*European Society of Cardiology/European Atherosclerosis Society*), recomiendan incrementar los niveles bajos de HDL a > 40 mg/dL en varones y >50 mg/dL en mujeres, así como reducir los Triglicéridos a <150 mg/dL en sujetos de riesgo^{160,161}. Las estatinas tienen modestos efectos en los componentes de la dislipemia aterógena característica de diabéticos y obesos. Así, en la práctica clínica lo recomendado es la adición de

un fibrato o niacina en su formulación modificada a la terapia con estatinas para el manejo de esta dislipemia mixta.

2. HDL y Triglicéridos. Combinación de estatinas y fibratos. Los fibratos se unen al receptor PPAR α regulando la expresión de genes diana que controlan el metabolismo lipídico, así como procesos celulares con influencia en la progresión de la arteriosclerosis. Las acciones hipolipemiantes incluyen al reducción de la concentración de Triglicéridos plasmáticos entre 30-50% y el aumento de las concentraciones de HDL entre un 5-15%. Asimismo la eficacia de la terapia combinada de fibratos y estatinas (a considerar, el fenofibrato, en concreto, por el menor riesgo de producir miopatía) se ha demostrado en varios estudios que incluyen pacientes diabéticos y obesos con dislipemia aterógena¹⁸⁴.

3. HDL y Triglicéridos. Combinación estatinas y Niacina. La Niacina es el fármaco más potente para aumentar los niveles de HDL-c y también es efectivo en reducir los Triglicéridos y el LDL. Su uso no está demasiado extendido por la intolerancia que provocaba (flushing, principalmente), si bien las últimas formulaciones comercializadas lo han controlado¹⁸⁵. El ácido nicotínico o niacina:

- Inhibe la síntesis de Triglicéridos hepáticos mediante la supresión de la actividad diacilglicerol aciltransferasa 2. Esto provoca la degradación acelerada de apo B intracelular y la disminución de la secreción de partículas VLDL y LDL.
- Retrasa el catabolismo de Apo AI en el hígado y aumenta la vida media de las partículas HDL, promoviendo el transporte reverso del colesterol.
- Inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias y radicales libres del oxígeno en la pared vascular.

Clínicamente los beneficios del uso de Niacina en monoterapia, y mejor en combinación con estatinas, no sólo suponen un beneficio metabólico en el perfil lipídico, sino también una disminución significativa de la mortalidad cardiovascular, como se vio en el Coronary Drug Project¹⁸⁶.

E. ENFOQUE GENERAL DEL TRATAMIENTO DE LA DISLIPEMIA EN LA DM Y OBESIDAD. HDL COMO DIANA TERAPÉUTICA.

II. LAS HDL COMO OBJETIVO TERAPÉUTICO. APROXIMACIÓN DESDE LA MEDICINA TRASLACIONAL AL TRATAMIENTO DE LA DISLIPEMIA ATERÓGENA

PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción de diversos genes implicados en la homeostasis energética de todo el organismo, la adipogénesis, y la sensibilidad a la insulina. Su actividad se regula por la unión de pequeños ligandos lipofílicos –principalmente ácidos grasos- que derivan de la nutrición y el metabolismo¹⁸⁷. Se podría decir que ayuda a traducir “qué comes” en “qué eres” ya que permite a los ácidos grasos alimentarios (ligandos de PPAR γ) modular la transcripción de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos, su almacenaje en Triglicéridos, así como en la diferenciación de adipocitos; esto es forma grasa. Su actividad, pues, tiene una relación lineal con la adiposidad, y de forma indirecta (tanto por activación como por inhibición, a través de la grasa y adipocinas) modula favorablemente la sensibilidad a la insulina¹⁸⁸.

PPAR γ existe como un complejo con el receptor Retinoide X en el interior del núcleo celular. Se expresa fundamentalmente en el tejido adiposo blanco (fundamental para modular la sensibilidad a la insulina), en el hígado y en tejido muscular.

Agonistas PPAR γ totales/parciales. Los receptores PPAR γ están compuestos de cinco dominios diferentes; la región N-terminal o dominio A/B, el dominio C de unión al DNA (DBD), el E de unión a ligando (LBD), los D y F. Los PPAR controlan la expresión genética mediante la unión a las secuencias de DNA denominadas elementos de respuesta a la proliferación peroxisomal (PPREs) en las regiones reguladoras de los genes de respuesta a PPAR. LBD es un dominio inusualmente grande permitiendo a los PPARs interactuar con varios ligandos estructuralmente diferentes.

Cada complejo receptor-ligando asume una conformación 3D ligeramente diferente. Así cada interacción con cofactores, histonas y otros factores de transcripción es única y diferente, generando diferentes pero solapados patrones de expresión génica (figura). Las diferencias en la conformación que promueven los agonistas parciales (como Telmisartán) podría contribuir a diferencias en la activación de los receptores, confiriendo un potencial adipogénico bajo en comparación con agonistas totales (glitazonas) que es sabido que tienen un potencial adipogénico alto y promueven la ganancia de peso la retención de líquidos¹⁸⁹.

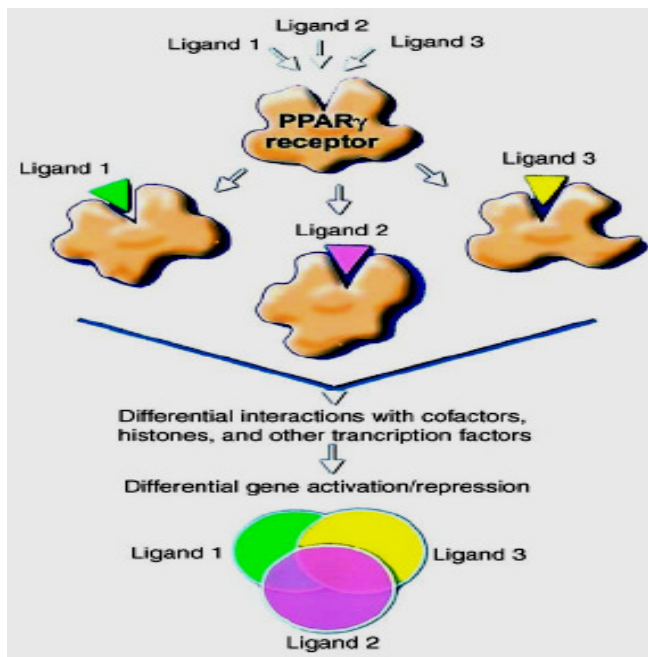


Fig 14. PPAR γ es un receptor multivalente que modula la expresión de diferentes genes. Adaptado de Pershadsingh, IJCB 2006

PPAR γ : de la inflamación a la arteriosclerosis. Además de las actividades ahorrativas en cuanto al metabolismo energético en el tejido graso blanco, otras actividades PPAR γ modulan la homeostasis lipídica de los macrófagos arteriales, en cuanto a la captación de lipoproteínas aterogénicas y al flujo de colesterol.

La captación por parte de los macrófagos de lipoproteínas aterogénicas en la pared arterial genera depósito de ésteres de colesterol y formación de células espumosas, puntos clave en el inicio y el desarrollo de la placa arteriosclerótica. En este punto, el papel de PPAR γ es ambiguo:

- Por una parte, la activación de PPAR γ induce la expresión del receptor “scavenger” CD36, la recaptación de las LDL oxidadas y la formación de células espumosas. Además de la adquisición de colesterol, los macrófagos se proveen de ligandos naturales de PPAR γ llevando a la regulación positiva de CD36. En este sentido, sería pro-aterogénico¹⁹⁰.
- Por otra parte, la activación de PPAR γ promueve la extracción de colesterol de los macrófagos mediante ABCA1, estimulando la formación de HDL y el transporte reverso de colesterol. La expresión de ABCA1 está estrechamente regulada por el contenido de colesterol celular mediante la activación dependiente de esteroides de otro factor nuclear, el LXR. PPAR γ ha demostrado activar ABCA1 indirectamente a través de la transcripción de LXR¹⁹¹.

Se podría decir, que uno de los mecanismos responsables del incremento de la incidencia de arteriosclerosis, podría ser una mala adaptación de los macrófagos, inducida o al

menos mediada por PPAR γ , que ocurriría cuando los beneficios (estimulación de la inmunidad innata y el transporte reverso del colesterol) serían desbordados por los efectos proaterogénicos (aumento de la captación de LDLox), en condiciones en las que hubiera una sobrecarga crónica de lípidos, como lo son el estilo de vida y alimentación actual¹⁹².

Telmisartán como agonista PPAR γ . Recientemente se ha demostrado, que Telmisartán, un antagonista no peptídico, competitivo y altamente selectivo del receptor AT1 de la Angiotensina II o AT II (un ARA-II) con eficacia para el manejo de la hipertensión, tiene actividad como agonista parcial de PPAR γ . El comportamiento mostrado por Telmisartán tiene importantes consecuencias desde el punto de vista terapéutico: sólo induce la activación parcial de los receptores, lo que resulta en mejoras en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, teniendo menos efectos secundarios indeseables¹⁹³. En modelos animales ha demostrado el potencial para atenuar la ganancia de peso y la adipogénesis mientras que los agonistas PPAR γ convencionales promueven lo contrario.

Telmisartán modula selectivamente la expresión de genes diana de PPAR γ , cuando se prueba en concentraciones terapéuticas. Por ejemplo:

- en adipocitos humanos, Telmisartán mejora la expresión del gen PCK1, que codifica PEPC-C (fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa), la enzima responsable de la glucogénesis y la re-esterificación de ácidos grasos, poniendo en relieve la habilidad de los activadores de los PPAR γ para reducir los niveles de ácidos grasos¹⁹⁴.
- en preadipocitos 3T3L1, Telmisartán provoca un aumento de las concentraciones del ARNm de los genes aP2 y adiponectina. También induce la recaptación de glucosa y la expresión del transportador de glucosa GLUT4. La acción antidiabética asociada a su actividad moduladora de PPAR γ ha sido testada en ratas alimentadas con dieta rica en grasa y carbohidratos. Tras 50 días se redujo la concentración de insulina en suero, la glucosa plasmática, y se atenuó la ganancia de peso con los controles¹⁹⁵.

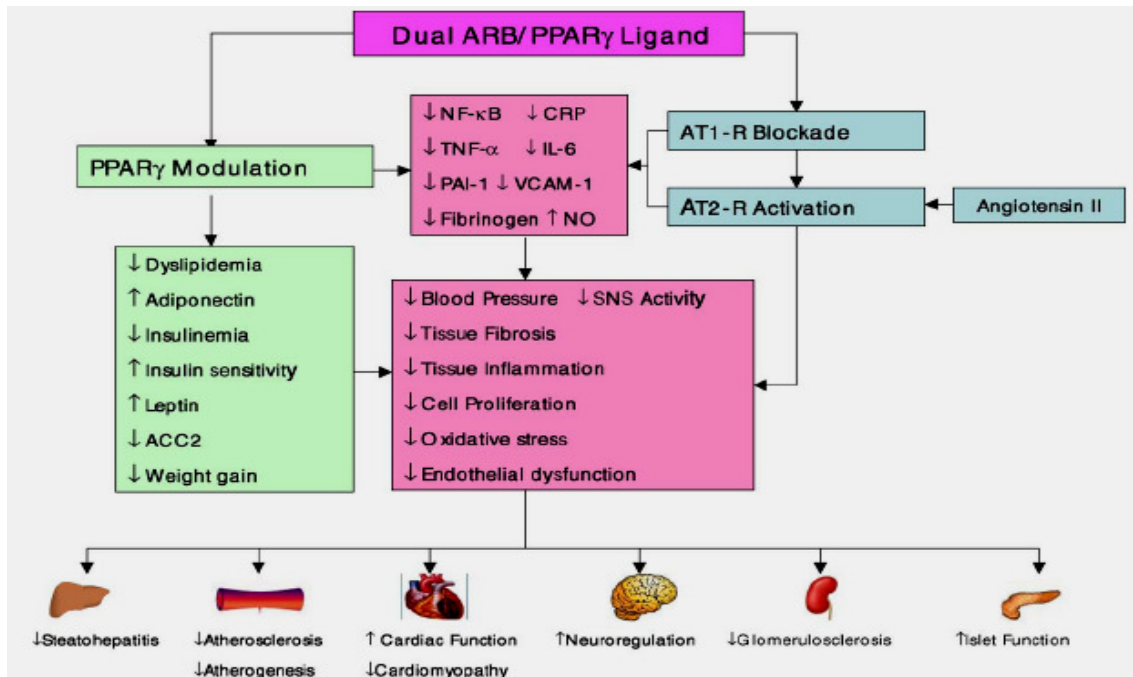


Fig 15. Efectos de la modulación de receptores PPAR γ y ATII. Adaptado de Pershadsingh, IJBCB 2006

Telmisartán: nefroprotección y modulación del metabolismo lipídico. Varios ensayos clínicos prospectivos, han confirmado la eficacia antihipertensiva en un amplio espectro de pacientes, tanto en monoterapia como asociado a diurético, y frente a otros fármacos antihipertensivos. Estos efectos beneficiosos también se producen en los individuos hipertensos con otras afecciones concomitantes como la DM2 y la insuficiencia renal (incluso pacientes sometidos a diálisis), y no sólo a nivel de la presión arterial. Telmisartán ha demostrado que en hipertensos diabéticos mejora el perfil lipídico¹⁹⁶, y que en hipertensos con nefropatía crónica tiene efectos nefroprotectores ralentizando la progresión a nefropatía terminal¹⁹⁷.

Telmisartán. Papel potencial en aterogénesis. Las propiedades moduladoras de PPAR γ podrían tener implicaciones terapéuticas en la prevención y el manejo de la arteriosclerosis. La arteriosclerosis es una enfermedad multifactorial causada por la combinación de, dislipidemia, estrés oxidativo, inflamación y proliferación celular. Algunos activadores de PPAR γ han demostrado inducir regresión de la placa de arteriosclerosis, reducir la progresión de engrosamiento de la íntima-media de carótida común, y reducir los marcadores de activación de células endoteliales y reactantes de fase aguda en pacientes con enfermedad arterial coronaria y/o síndrome metabólico¹⁹⁸. Telmisartán, mediante el bloqueo de la acción de la angiotensina y la estimulación de la actividad PPAR γ , podría no sólo inhibir los mecanismos proaterogénicos mediados por A-II, sino estimular las vías de PPAR γ para prevenir la arteriosclerosis.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad cardiovascular secundaria a aterotrombosis es la principal causa de mortalidad en países occidentales y está convirtiéndose en la primera en países en desarrollo. Por ello la investigación en el campo de la arteriosclerosis es fundamental para poder paliar esta situación: desde la arteriosclerosis subclínica y el diagnóstico precoz/prevencción primaria; hasta las enfermedades secundarias a la progresión de la placa de ateroma y su tratamiento efectivo cuando se manifiesta clínicamente.

Entre las causas que se identifican como responsables de esta situación figuran, como dos de las más importantes, el incremento en la prevalencia de la Diabetes Mellitus (principalmente tipo 2) y la Obesidad, frecuentemente asociadas, y que han adquirido dimensiones de verdaderas epidemias en muchos países.

La diabetes y la obesidad han incrementado su incidencia y prevalencia de forma alarmante en las últimas décadas. El número de casos de diabetes en el mundo se estima actualmente en 284 millones de personas. Igualmente la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso entre adultos mayores de 35 años, se estima en 1.7 billones de personas alrededor del mundo que padecen sobrepeso y 310 millones de personas obesas. Ambas condiciones, como se ha dicho frecuentemente asociadas, suponen un exceso de morbilidad, mortalidad y costes económicos derivados de las enfermedades consecuencia de ambas, entre las que destaca la enfermedad cardiovascular, debida a arteriosclerosis.

La arteriosclerosis es una enfermedad sistémica (aunque con manifestaciones locales), de naturaleza inflamatoria, que se caracteriza como hecho fundamental por el depósito de lípidos en la pared de las arterias de mediano y gran calibre. Así uno de los grandes hitos de la investigación traslacional aplicada a la medicina, y un punto de inflexión importante en la historia natural de la enfermedad arteriosclerótica, haya sido la posibilidad de modificar el metabolismo del colesterol con las conocidas estatinas (inhibidoras de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa); fármacos capaces de disminuir los niveles de colesterol total y unido a lipoproteínas de alta densidad (LDL), así como tener propiedades antiinflamatorias y antitrombóticas.

Aún así, pese al tratamiento efectivo con estatinas y la reducción del colesterol total y LDL, un gran porcentaje de pacientes sigue padeciendo eventos cardiovasculares. Se ha considerado responsable de este exceso de riesgo a los niveles disminuidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Es cierta la observación de que las concentraciones elevadas de colesterol

ligado a LDL, y sobretodo el descenso de colesterol ligado a HDL, son importantes predictores de riesgo de eventos cardiovasculares (en realidad cada aumento de LDL eleva el riesgo aproximadamente lo mismo, y sin embargo, cada descenso de HDL se acompaña de un riesgo entre 2 y 3% mayor). Sin embargo la cuantificación aislada de los niveles de HDL no predice adecuadamente su composición, ni su función protectora frente a la arteriosclerosis (antioxidante, moduladora de la inflamación, la adhesión plaquetaria, la coagulación, etc...). Además, en situaciones con una importante carga de stress oxidativo como son la diabetes y la obesidad, la estructura y por tanto la función de estas lipoproteínas se altera, perdiendo propiedades antiaterogénicas e incluso promoviendo el efecto contrario.

La DM2 y la obesidad, se caracterizan por un perfil lipídico llamado Dislipemia Aterógena, haciendo referencia a la asociación que existe entre las alteraciones de las lipoproteínas que transportan lípidos en sangre y el desarrollo, progresión y desestabilización (responsable de los eventos clínicos) de las placas de ateroma. Se define por niveles elevados de partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL, *small-dense LDL*) frecuentemente con niveles de LDL totales normales, elevación de triglicéridos (Triglicéridos); y un descenso de la concentración plasmática de HDL.

Un atractivo campo de interés para la investigación de posibles dianas terapéuticas en el campo de la arteriosclerosis, es pues, el metabolismo de las HDL (ya que en sí, la función de estas partículas está ligada a su composición en un momento dado, y ésta depende de en qué momento de su ciclo metabólico se encuentre), para que interviniendo de una manera controlada sobre enzimas, proteínas reguladoras, receptores, etc... se pueda modificar la historia natural de la placa de ateroma y el exceso de riesgo cardiovascular que conllevan la diabetes y la obesidad.

Se ha demostrado que la proteinuria puede ser un marcador precoz del daño que ambas entidades (DM y obesidad) producen en el árbol vascular. Este daño inicial se debe a un trastorno en la barrera de filtrado (membrana glomerular). Se produce a nivel de los podocitos y en estudios recientes se ha relacionado con la alteración o disminución en la expresión de una proteína estructural denominada Nefrina. Esta precocidad en conocer el impacto de la diabetes y la obesidad en la pared vascular se podría correlacionar en el tiempo con las alteraciones en el metabolismo de las HDL y comprender mejor la magnitud de las modificaciones proaterogénicas que sufren estas lipoproteínas

Estudiando en un modelo animal de enfermedad cardiovascular precoz, secundaria a Diabetes y Obesidad (y por tanto asumiendo el papel fundamental que tienen las lipoproteínas en la aterogénesis), el metabolismo tisular de las HDL, y modificando su curso natural con intervenciones no farmacológicas (dieta) y farmacológicas (antagonismo de los receptores PPAR γ) se pueden conocer cómo (a nivel histológico, bioquímico y transcriptómico) se altera el metabolismo de las HDL desde las primeras etapas, en que ya la Diabetes y la Obesidad han provocado daño vascular. Utilizaremos para ello un modelo experimental animal con ratas obesas y/o diabéticas (Zücker) para estudiar los cambios de estos parámetros debidos a la evolución de la enfermedad y valorar el efecto del tratamiento con un antagonista de la angiotensina-II (Telmisartán) que tiene también efectos moduladores del metabolismo lipídico y de la glucosa (efecto PPAR- γ) comparado con un tratamiento basado en medidas higiénico-dietéticas semejantes a las que se aplican de entrada a un paciente en la práctica clínica habitual (ejercicio y dieta hipocalórica).

El receptor nuclear PPAR- γ actúa como factor de transcripción de diversos genes implicados en el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina. Además de favorecer la captación de Triglicéridos y la diferenciación de adipocitos en el tejido adiposo blanco, modulan la captación de lipoproteínas aterogénicas y al flujo de colesterol en los macrófagos arteriales (puntos clave en la progresión de la lesión aterosclerótica).

El Telmisartán es un antagonista no peptídico, competitivo y altamente selectivo del receptor AT1 de la Angiotensina II (ARA-II) con eficacia para el manejo de la hipertensión, que además tiene actividad como agonista parcial de PPAR γ , y puede modular selectivamente la expresión de genes diana de este factor de transcripción. Esto, podría tener implicaciones terapéuticas en la prevención y el manejo de la arteriosclerosis.

OBJETIVOS

Objetivo Principal.

El objetivo principal será valorar algunos aspectos del metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en una situación patológica marcadamente aterogénica como es la diabetes asociada a obesidad, antes de la fase clínica de la enfermedad, aunque ya con evidencia de disfunción endotelial por aparición de microalbuminuria. Conocer así, marcadores de precocidad de daño vascular en el campo de los lípidos y su respuesta a la intervención dietética y farmacológica.

Objetivos Secundarios.

- Demostrar que las alteraciones de las HDL que se observan en la llamada dislipemia aterógena de los estados de Diabetes y Obesidad, son modificaciones estructurales que se han producido por cambios en su metabolismo tisular desde fases tempranas.
- Conocer algunas de esas modificaciones estructurales mediante el estudio del hígado, del plasma y de la orina.
 - o A nivel bioquímico (parámetros séricos de lípidos, glucosa, propiedades antiinflamatorias/antioxidantes de HDL).
 - o A nivel transcriptómico, de elementos de la propia vía del metabolismo del HDL. En concreto las apoproteínas constituyentes, Apo A-I y Apo A-IV
- Ver cómo influyen las modificaciones farmacológicas (interviniendo sobre los receptores PPAR γ) y no farmacológicas (dieta) en ese metabolismo y en la estructura de las HDL.
- Valorar la aparición y el seguimiento de la microalbuminuria (MAU) como signo o marcador de lesión vascular y su relación con los parámetros lipídicos de los sujetos a estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EL PROYECTO. ÁMBITO DE TRABAJO

El proyecto sobre el metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su relación con el daño endotelial y renal es una prolongación de otro proyecto de investigación que ya estaba en marcha y contaba con fondos de la Beca Multidisciplinar del Departamento de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Aragón, PM010/2006, "*Expresión de nefrina como marcador de daño renal en un modelo experimental de obesidad y diabetes mellitus tipo 2. Efecto renoprotector de medidas higiénico-dietéticas y fármacos antiproteinúricos*" cuyo investigador principal es el Dr. Pablo Iñigo.

El lugar de la realización del proyecto ha sido la Unidad Mixta de Investigación en el ámbito del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza, el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud y la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Las determinaciones relacionadas con la oxidación de lipoproteínas, el perfil lipídico y la cuantificación de apoproteínas se llevaron a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza dirigido por el Profesor Jesús de la Osada.

2. ANIMALES

Los animales de experimentación utilizados pertenecen a tres tipos de ratas de uso habitual en numerosas líneas de investigación biomédica sobre diabetes y obesidad y que representan las características de la población humana a estudio:

- *Ratas Sprague-Dawley* (Grupo SD, n=5), que representan la población sana, sin diabetes ni obesidad.
- *Ratas Zucker* (Grupo Z, n= 5) que representan la población con obesidad, sin diabetes mellitus.
- *Ratas Zucker obesas y diabéticas* (Grupo ZDF, n=28). Dentro de este grupo se formaron varios subgrupos:
 - en dos de ellos dejamos evolucionar la enfermedad sin tratamiento. Grupos Vehículo o placebo (ZDFV n=8), y el grupo Control (ZDFC n=4).
 - otro grupo fue el de las ratas sometidas a dieta hipocalórica para valorar el efecto de medidas higiénico-dietéticas sobre las lesiones en órganos diana; grupo Dieta (ZDFD, n=8)

- y un tercer grupo de ZDF tratado con Telmisartán, un fármaco antiproteinúrico, antagonista de los receptores AT-1 de la Angiotensina-II con demostrado efecto agonista PPAR-gamma (ZDFT, n=8)

Los animales (machos) fueron suministrados por la empresa Charles River (*Charles River Laboratories International, Inc. USA*). Llegaron al estabulario con 8 semanas de vida, unos 250gr. de peso aproximadamente, y fueron puestos en cuarentena durante 2 semanas. Se mantuvieron en la Unidad Mixta de Investigación de la Universidad de Zaragoza (Animalario registrado *ES 50290012007*), en jaulas de makrolón, transparentes y autoclavables, provistas de tapa del mismo material con filtro (*BIOSIS S.L.*) El lecho estaba formado por un granulado de madera con un tamaño de 1000 a 3000 micras obtenido de BedCo. Los animales estuvieron en un microclima controlado, con una temperatura máxima de 23º C y mínima de 20º C, humedad máxima del 60% y mínima del 50% y con una relación de ciclo luz-oscuridad de 12 horas para cada una de las fases.

Los animales se manipularon de acuerdo a las condiciones sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 1201/2005) siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Las dietas normal (pienso estándar para mantenimiento según el tipo de animal) e hipocalórica 30% fueron suministradas por la firma comercial Purina (*Nestlé Purina PetCare España S.A*) y el contenido de las mismas valorado por un veterinario experto en Nutrición que colabora con la Unidad Mixta de Investigación.

Las muestras de orina se recogieron tanto de orina de 24 horas como de muestras de orina reciente de la mañana mediante el uso de jaulas metabólicas.

La obtención de muestras sanguíneas realizadas a lo largo del estudio fueron extraídas bien de la parte proximal de la cola del animal (dorsal) o bien, si no era posible o la muestra era escasa, por punción femoral.

El último día del modelo experimental se mantuvo a los animales 18 horas en ayuno, tras lo cual se les anestesió con Fluorane líquido sol. inhalatoria 100% (Isoflurano) de *Abbott Laboratories* +O₂ . Todo el procedimiento se realizó bajo anestesia.

Se extrajeron muestras de sangre por punción en vena cava, esta muestra inicial sirvió para determinar los parámetros bioquímicos de cada animal. Se realizó la extracción de muestras de tejido renal, hepático y grasa subcutánea. Al final de la cirugía, se guardó tejido muscular cardíaco y aprovechando esta extracción de tejido se procedió a la cardiectomía para llevar a cabo el sacrificio del animal. Estas muestras se almacenaron congeladas a -70°C hasta el momento de su análisis. Otra parte del hígado se conservó en formaldehído para análisis histológicos. Por último el animal se guardó en formaldehído conservándose a temperatura ambiente.

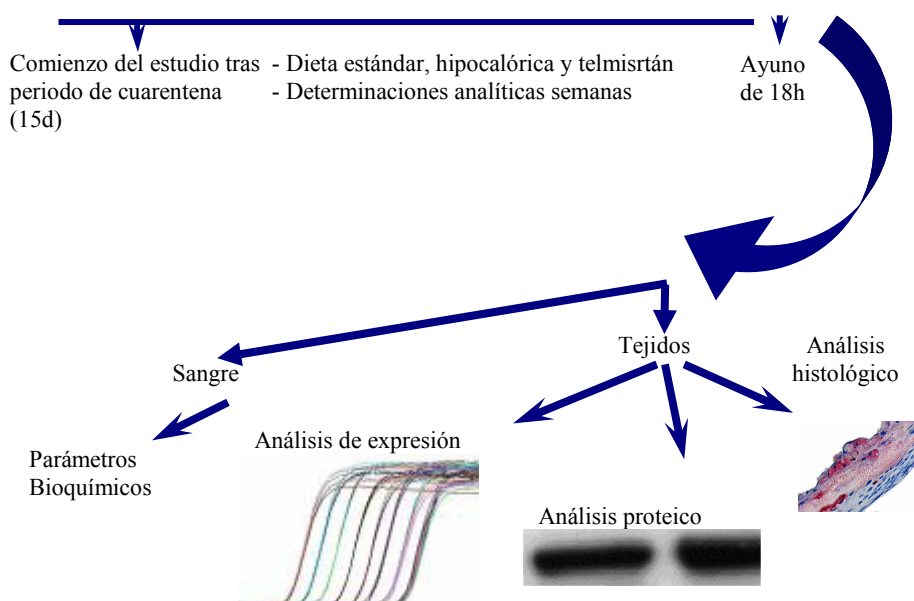


Figura 16. Calendario y esquema general del diseño experimental del estudio.

La rata SD (Sprague-Dawley). Es una línea no endogámica de rata albina usada de forma muy amplia en investigación. Su gran ventaja es su conducta calmada y la facilidad de manejo. Esta raza fue criada por primera vez en 1925 en las granjas Sprague Dawley, Wisconsin, USA.

Se han usado en prácticamente todos los modelos de investigación biomédica incluyendo toxicología, modelos de terapia génica, de nutrición, stress oxidativo, estudios de conducta y de memoria, de stress psíquico, de daño neuronal, etc... No son ratas obesas ni con predisposición a la diabetes. El peso medio de un adulto varía desde los 300 g de una hembra, a los 520 g de un macho.

La rata Z (Zücker). Estas ratas fueron criadas para ser un modelo genético de investigación en obesidad e hipertensión. Su nombre se lo deben a Lois M. Zücker y Theodore F. Zücker, investigadores pioneros en la genética de la obesidad. Existen dos tipos de ratas Zücker: la rata

delgada con el rasgo dominante o heterocigoto (Fa/Fa; Fa/fa), y la característicamente rata obesa, que es en realidad la portadora del rasgo recesivo en homocigosis (fa/fa) para la mutación *fa* en el dominio extracelular del receptor de leptina, capaces de llegar a pesar más de 1000 gramos y duplicar su peso. Las ratas Zucker obesas tienen altos niveles de lípidos y colesterol sangre, son resistentes a la acción de la insulina sin llegar a ser hiperglucémicas, y ganan peso por el aumento tanto el número como el tamaño de los adipocitos. Esta obesidad está vinculada a su naturaleza hiperfágica, si bien las características metabólicas mencionadas no se pueden explicar completamente por la cantidad de comida que ingieren.

La contribución más valiosa de la rata Zucker ha sido el ser utilizada como modelo de obesidad precoz (hiperplásica e hipertrófica), y poder estudiar aspectos como la etiología, los mecanismos, las patologías asociadas y el tratamiento de la obesidad¹.

La rata ZDF (*Zücker Diabetic Fatty; Rat ZDF-Lep^{fa}/Crl*). Es un modelo de rata endogámico que, a través de mutaciones génicas (mutación *fa* en el dominio extracelular del receptor de leptina) y una dieta específica, desarrolla diabetes tipo 2 y sus complicaciones de una forma muy similar a los humanos. Sólo unas pocas líneas de ratas Zucker obesas (fa/fa) muestran tanto resistencia a insulina como hiperglucemia y diabetes, criándose de forma separada al resto, para conseguir un modelo de obesidad y de diabetes no insulino dependiente.

Alimentados con una dieta *Purina LabDiet® 5008* los homocigotos recesivos ZDF machos (fa/fa) desarrollan obesidad, hiperlipidemia, hiperglucemia postprandial y finalmente diabetes mellitus a las ocho semanas de vida si en su dieta existe al menos un 6.5% de grasa. En su estado prediabético, el macho ZDF, inicialmente experimenta un incremento en su insulinemia basal y en la concentración de ácidos grasos libres. Una vez se desarrolla hiperglucemia (entre las 8 y 10 semanas), se colapsa la secreción de insulina y se convierten en diabéticos². Las cepas homocigotas dominantes (+/+) y las heterocigotas (fa/+), permanecen normoglucémicas³.

1. ILAR Journal 1990 V32(3). New Rat Models of Obesity and Type II Diabetes

2. Diabetes 1995 Dec;44:1447-57. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat.

3. Proc Soc Exp Biol Med 1983 May;173:68-75. The diabetic Zucker fatty rat.

3. LA DIETA

Todos los grupos desde su recepción y a lo largo del estudio, salvo el de ratas ZDF con restricciones dietéticas (ZDF D), recibieron una dieta estándar normal para ratas de laboratorio

Purina LabDiet® 5008 diet y agua, *ad libitum*. El grupo de intervención dietética recibió una dieta hipocalórica con un 30% menos de calorías pero con una distribución similar de estas (27% proteínas, 57% carbohidratos, 16% grasa). Este tipo de dieta estándar es el aconsejado por el suministrador de los animales, que de forma consistente ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el desarrollo espontáneo de diabetes en la rata ZDF.

Peso	Calorías
Proteínas 23%	Proteínas 26,8%
Carbohidratos 58,5%	Carbohidratos 56,4%
Grasa 6,5%	Grasa 16,7%
- AG saturados (2,51%), monoinsaturados (2,32%)	
Fibra	
“Ash”/Minerales 8,0%	

Tabla 7. Distribución porcentual por peso y calorías

4. DOSIFICACIÓN DE FÁRMACOS ANTIPROTEINÚRICOS (Telmisartán)

El Telmisartán fue proporcionado por el propio fabricante del fármaco (*Boehringer-Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., USA*) en forma de principio activo puro. La dosis a la que fue suministrado, según datos recogidos de la bibliografía, era de 1,5 mg/Kg de peso v.o. Se siguieron las recomendaciones del fabricante diluyendo el fármaco (polvo) en 1N NAOH y posteriormente en agua y HCL para pH 7.4. Las dosis se administraban cada 24h, por la mañana, para asegurar que los animales ingerían toda la cantidad de solución que se les suministraba

5. PARÁMETROS SÉRICOS Y DE FUNCIÓN RENAL

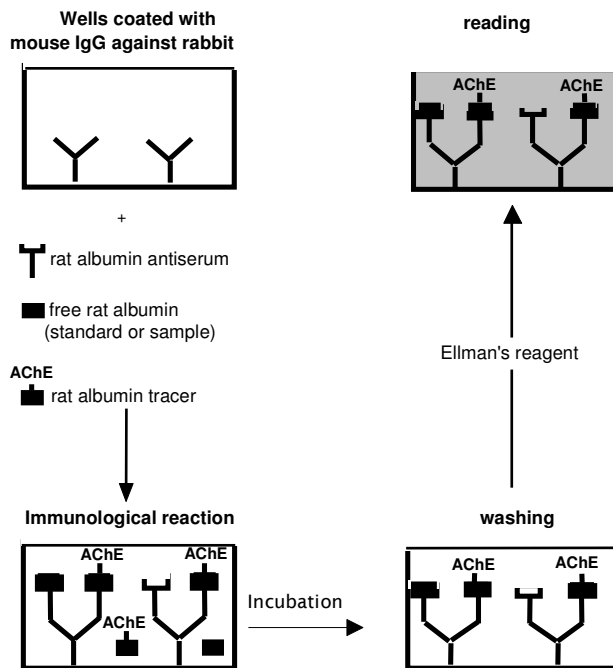
Se analizaron parámetros bioquímicos habituales como glucosa y creatinina en suero (mg/dL), y creatinina y albúmina (mg/día) en muestra de orina reciente y orina de 24h, recogidas mediante el método de la jaula metabólica.

Albuminúria de 24h

Se utilizó un kit de ensayo inmunoenzimático Rat Albumin EIA kit (*SPI bio, Société de Pharmacologie et d'Immunologie – BIO. 2, rue du Buisson aux Fraises Z.I. de la Bonde F-91741 -*

Massy Cedex France) para determinación de la concentración de albúmina en orina de 24h que previamente se había recogido en jaula metabólica.

Este ensayo inmunoenzimático (EIA) se basa en la competencia entre la albúmina no marcada y la acetilcolinesterasa (AChE) unida a albúmina de rata (actúa como trazador) para sitios específicos y limitados de antisuero de conejo anti-albúmina de rata. Como se muestra en la figura, el complejo antisuero de conejo anti-albúmina (albúmina libre o el trazador) se une a anticuerpos monoclonales de ratón anti-conejo que se encuentran adheridos a las placas. Posteriormente estas son lavadas y se añade Reactivo de Ellman's (sustrato enzimático para AChE y cromógeno) a la muestra. El trazador AChE actúa sobre el Reactivo de Ellman's para producir un compuesto amarillento. La intensidad del color (determinada por espectrofotometría) es proporcional a la cantidad de trazador unida e inversamente proporcional a la cantidad de albúmina libre presente.



Creatinina en suero y orina. Albuminúria en muestra reciente:

Se utilizó el kit de ensayo colorimétrico QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (*DICT-500*) (*BioAssay Systems · 3423 Investment Boulevard, Suite 11, Hayward, CA 94545, USA*), para los tres tipos de muestra. Está diseñado para medir creatinina/albumina directamente en muestras biológicas sin tratamiento previo. Basado en el método Jaffe utiliza picrato que forma un compuesto rojizo con creatinina. La intensidad del color, medida a 510 nm, es

directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Esta concentración se calcula:

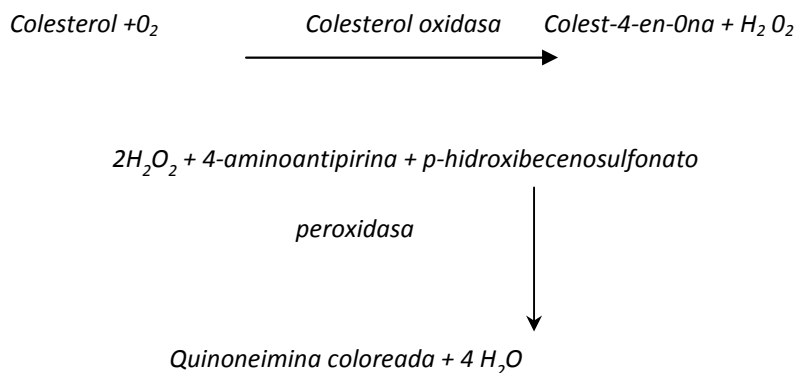
$$[Cr] = (OD_{muestra5} - OD_{muestra1} / OD_{std5} - OD_{std1}) \times [STD] \text{ (mg/dL)}$$

en donde OD 1 y 5 son valores de la muestra y de un estándar para OD510 nm en los minutos 1 y 5

6. LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

Determinación del colesterol total en plasma

La determinación cuantitativa de colesterol total se realizó previa hidrólisis de los ésteres de colesterol mediante la colesterol esterasa y posterior oxidación del colesterol por la colesterol oxidasa. El peróxido de hidrógeno liberado se utilizó para formar una quinona coloreada cuya absorbancia máxima es a 500 nm



Para efectuar la reacción, se incubaron 2 µl de muestra y 100 µl de reactivo durante 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar que las reacciones se hubieran completado. En cada placa se incluyeron un blanco, un calibrador de colesterol de 200 mg/dl de concentración, un control interno de calidad para verificar la reacción (*Cardiolipid Control Level 1 de Sigma*) y las muestras, todos ellos por triplicado. La lectura de las absorbancias se llevó a cabo en un lector de ELISA Multiskan equipado con un filtro de 492 nm.

Determinación del colesterol HDL

Determinación colorimétrica del colesterol HDL

El colesterol HDL se determinó por el método enzimático descrito anteriormente después de la precipitación de las partículas que contenían la apolipoproteína B con ácido fosfotúngstico-MnCl₂ (*Roche, Barcelona*). La precipitación se llevó a cabo con PBS, plasma y

reactivo precipitante en una proporción 1:1:5 mezclando y dejando actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó durante 7 minutos a 13000 rpm y se recogió el sobrenadante. Para efectuar la reacción se mezclaron 15µl de muestra y 50 µl de reactivo dejando actuar 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar la completa reacción.

Determinación fluorimétrica del colesterol HDL

Mezcla de reacción

Enzimas: Peroxidasa de rábano (HRP) 1U/ml, colesterol oxidasa 1U/ml y colesterol esterasa 0,1 µM

Amplex Red (ARr) 150 µM (Molecular Probes)

Tampón 1x

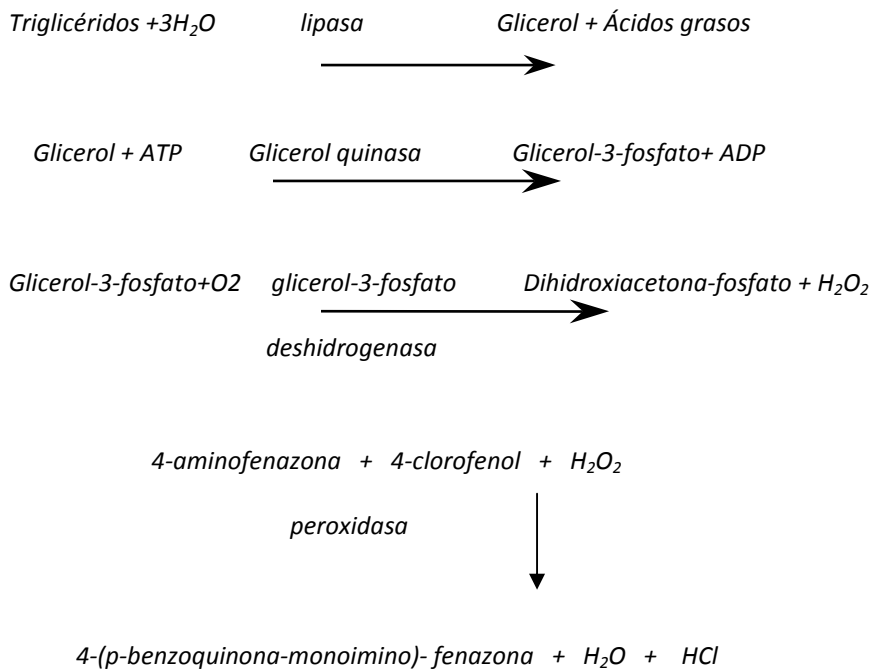
Agua destilada y desionizada (ADDE)

Procedimiento

Se realizó una recta patrón de colesterol en un rango de 1,25 a 10µM. En cada placa se añadieron 50µl de los estándares de colesterol y de las muestras diluidas 100 veces (sobrenadante resultante de la precipitación del plasma con el reactivo precipitante) y 50µl de la mezcla de reacción. Se incubó 30 minutos a 37° C y se midió la fluorescencia usando un filtro de excitación de 550 nm y un filtro de 595 nm para la emisión, se corrigió restando la fluorescencia del blanco y se interpoló en la recta de calibración realizada con los estándares de colesterol.

Determinación de triglicéridos totales en plasma

Esta determinación se realizó siguiendo el protocolo de Roche en placa de 96 pocillos basado en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y la determinación subsiguiente del glicerol formado en una reacción colorimétrica. Para determinar la concentración de triglicéridos se utilizó un lector de ELISA Multiskan con un filtro de 492. En cada placa se incluyeron un blanco, un control interno de calidad para verificar la reacción (Cardiolipid Control Level 1 de Sigma) y las muestras, todos ellos por triplicado. Se incluyó también una recta de calibrado con 7 puntos por duplicado en el rango de concentraciones de 0,1 a 3mM. La recta de calibrado fue lineal hasta 3mM y se preparó a partir de diluciones sucesivas de la solución 6mM de glicerol en agua. Para los valores superiores a 3mM las muestras se diluyeron para conseguir que los valores quedasen dentro del rango de linealidad de la recta de triglicéridos. Para efectuar la determinación se mezclaron 2µl de muestra y 100 µl del reactivo dejando actuar 30 minutos a Tª ambiente para asegurar que la reacción se hubiera completado.



Separación de lipoproteínas por cromatografía líquida de gel de filtración

Reactivos

Tampón de elución PBS pH 7,4 (NaCl 136mM, KCl 0,2g/l, Na₂HPO₄ 1,44g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l).

Tampón de almacenamiento PBS pH 7,4, 0,1% NaN₃.

Columna cromatográfica HR 10/30 (GE Healthcare).

Matriz Superose 6B (GE Healthcare).

Equipo de FPLC (GE Healthcare).

Colector de fracciones (GE Healthcare).

Tubos Centricon nº 10 (Amicon Inc. Beverly, MA, USA).

Procedimiento

La cromatografía en gel se utilizó para separar las lipoproteínas según su tamaño. La matriz de la columna está formada por pequeñas esferas porosas formadas por un polímero entrecruzado de agarosa, con poros de tamaño seleccionado para un rango de separación óptima de 5x10³–5x10⁶ de peso molecular. Esto permite la entrada de proteínas de un cierto tamaño las cuales son retenidas temporalmente, mientras que las moléculas mayores no pueden penetrar y son eluidas más rápidamente. La salida de las proteínas de la columna cromatográfica se detecta normalmente por absorción de la luz, a una longitud de onda de 280 nm. Debido a la composición de sus aminoácidos, las proteínas absorben dicha radiación y utilizando un espectrofotómetro se puede detectar las proteínas eluidas en la cromatografía. Los datos se registran en lo que se denomina diagrama de elución indicando la posición de las proteínas que se han separado. Después pueden realizarse estudios de actividad biológica, enzimática, etc. de las proteínas fraccionadas.

Calibrado de la columna

Para calibrarla fue necesario el cálculo del volumen de vacío de la misma, volumen que rodea a las bolitas del gel y es el único accesible a las moléculas grandes o excluidas y el cálculo del volumen total accesible sólo para moléculas muy pequeñas y que sería la suma del volumen de vacío y del volumen del gel. Para ello se utilizaron azul dextrano (Pm 2.000.000) de Pm tan elevado que es excluido de la columna y ferricianuro potásico (Pm 329) que penetra en cualquiera de los poros del gel.

Análisis del perfil lipoproteico

Para analizar el perfil lipoproteico del plasma, se cargaron 100 µl de muestra procedente de un pool de los animales de cada grupo en la columna. La filtración se realizó con un volumen de flujo de 0,3 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml en un colector. El colesterol contenido en cada una de las fracciones lipoproteicas obtenidas se cuantificó según el método del apartado III.4.a o b pero utilizando un volumen de muestra de 100 µl ya que las muestras se habían diluido al pasarlas por la columna. Las fracciones fueron concentradas por centrifugación mediante tubos Centricon 10 anotándose el volumen final y cuantificándose la concentración proteica por el método de Bradford.

7. DETERMINACIÓN DE APO A-I Y APO A-IV

Determinación de la concentración plasmática de apolipoproteínas mediante técnica de inmunoenzimática (ELISA)

Reactivos

Tampón fosfato salino: PBS (pH 7,4) (NaCl 136mM, KCl 0,2g/l, Na₂HPO₄ 1,44g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l)

Tampón de bicarbonato 0,2 M (pH 9,6)

Tampón de dietanolamina al 10% en MgCl₂ 0,5mM (pH 9,8)

TPBS: PBS con Tween 20 al 0,2% (pH 7,4)

Solución de bloqueo: PBS con leche en polvo desnatada al 5% (pH 7,4)

Placas de 96 pocillos de poliestireno MAXISORP (Nunc)

Solución de revelado: p-nitrofenilfosfato al 0,1% en tampón de dietanolamina.

Anticuerpos primarios: Inmunoglobulina anti apoA-I de ratón generada en conejo ref K23001R (Biodesign, Saco, ME), inmunoglobulina anti apoA-IV de ratón generada en cabra (Santa Cruz Biotechnology).

Anticuerpos secundarios: Inmunoglobulina anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (Sigma), inmunoglobulina anti IgG de cabra unido a fosfatasa alcalina (Sigma)

Procedimiento

Las diluciones del plasma total utilizadas para cada ensayo fueron las siguientes:

<i>DILUCIÓN</i>	<i>MUESTRA</i>	<i>AC PRIMARIO</i>	<i>AC SECUNDARIO</i>
<i>APOA-I</i>	<i>1/25.000</i>	<i>1/800</i>	<i>1/10.000</i>
<i>APOA-IV</i>	<i>1/20.000</i>	<i>1/500</i>	<i>1/5.000</i>

Se dispusieron 100 µl de la muestra diluida en tampón bicarbonato por pocillo y se incubaron toda la noche a 4º C. Se invirtió la placa para eliminar la muestra no fijada y se añadieron 200 µl/pocillo de la disolución de bloqueo y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se hizo un lavado para eliminar el bloqueo. Se añadieron 200 µl/pocillo de TPBS dejándolo 5 minutos con agitación a temperatura ambiente repitiendo tres veces el proceso. Posteriormente se añadieron 200 µl por pocillo del anticuerpo correspondiente diluido en TPBS dejándolo actuar durante 1h 30 min a 37º C. Una vez terminada la incubación se realizó un lavado igual que el anterior. A continuación, se incubó con 200 µl/pocillo de anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina diluido en TPBS durante 1h 30 min a 37º C. Una vez realizado el lavado se añadieron 200 µl/pocillo de la solución de revelado, preparado extemporáneamente, dejando que se formara color durante 30 min. Se detuvo la reacción añadiendo 50µl de NaOH 1M en cada pocillo y tras 10 min en agitación para estabilizar el color y permitir que desaparecieran las burbujas se midió la absorbancia a 430 nm utilizando el SPECTRAfluor Plus (*Tecan*).

Aislamiento de RNA

Reactivos

Agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,05% (v/v), dejar que actúe el DEPC durante una noche y posteriormente autoclavar durante 1 hora a 1 atmósfera.

Tris/HCl 1 M (pH 8).

Na₂EDTA 0,5 M (pH 8.0).

Solución de Etanol al 75%.

10xTBE: Tris base 0,9 M, EDTA 0,5 M (pH 8,0), ácido bórico 0,9 M.

1xTE (pH 8,0): Tris/HCl 10 mM, (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8.0).

Tampón de carga de RNA: Azul de Bromofenol 0,25% (p/v), Xileno de cianol 0,25% (p/v), Glicerol 50% (p/v) EDTA 1 mM.

Reactivo de extracción de RNA: Tri-Reagent (Sigma).

Cloroformo.

Isopropanol.

Procedimiento

Antes de comenzar la extracción de RNA, se debe esterilizar todo el material y trabajar con guantes para conseguir una atmósfera lo más limpia posible y libre de RNAsas que degradarían el RNA.

Las muestras de hígado se transportaron en viales dentro de nitrógeno líquido o nieve carbónica para evitar la degradación del RNA. Con unas pinzas estériles, se tomó una alícuota del tejido de aproximadamente 100 mg y se introdujo inmediatamente en un tubo de cristal o polipropileno estéril que contenía 1 ml del reactivo de extracción. Se homogeneizó inmediatamente y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, transfiriéndolo a continuación a un tubo tipo Eppendorf. A cada tubo se le añadieron 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente por inversión y se dejaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron durante 20 minutos a 13000 rpm y 4º C recogiendo la fase superior acuosa en un nuevo tubo, a la que se le añadió 0,5 ml de isopropanol. Se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente durante 7 minutos, pasados los cuales se centrifugó 15 minutos a 13000 rpm y 4º C. Posteriormente, se eliminó con cuidado el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75%, centrifugando de nuevo durante 5 minutos a 13000 rpm y 4º C para adherir el precipitado. Se decantó de nuevo el sobrenadante y se dejó secar el precipitado resuspendiéndolo después en 100 µl de agua tratada con DEPC.

La concentración de RNA, se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm, de tal modo que la relación 260/280 debe ser superior a 1,7 para tener un RNA libre de proteínas. La concentración del RNA se calculó teniendo en cuenta que 1 A₂₆₀= 40 µg/ml. La calidad del RNA se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1xTBE con bromuro de etidio poniendo en cada pocillo 500 ng de la muestra. El resultado se visualizó en un transiluminador de UV. Las muestras se almacenaron a -70ºC.

Cuantificación del RNAm por RT-qPCR

Tratamiento con DNasa

Mezcla de reacción (50µl)

1 µl de Turbo Dnase AMBION

0,1 volúmenes de Turbo Dnase Buffer (5 µl)

0,1 volúmenes de Dnase Inactivation Reagent (5 µl)

Agua libre de RNAsas

Procedimiento

Para eliminar el posible DNA genómico contaminante se trató el RNA con la enzima TURBO DNase de AMBION (AMBION Inc. Austin, TX, USA). Para ello, el volumen

correspondiente a 5 μ g de RNA total, medido espectrofotométricamente, se completó con agua libre de RNasas hasta un volumen de 39 μ l. Se añadió 1 μ l de la Dnasa (TURBO DNase) y 5 μ l del buffer de reacción (*TURBO DNase buffer*). La mezcla se agitó suavemente y se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 30 minutos. La inactivación de la enzima se produjo añadiendo 5 μ l del inactivador obteniéndose un volumen final de 50 μ l, se mezcló bien y se dejó incubar 2 minutos a temperatura ambiente agitando dos o tres veces durante el proceso. Tras la incubación se centrifugó la muestra a 10.000g durante 1,5 minutos, el sobrenadante que contenía el RNA limpio se transfirió a un tubo limpio con cuidado de no arrastrar restos del pellet donde se encuentra el inactivador ya que podrían interferir en posteriores reacciones enzimáticas.

Retrotranscripción. Obtención de cDNA

Mezcla de reacción inicial

1 μ l *Random primers* 50ng/ μ l (*Invitrogen*).

1 μ l *dNTP mix* 10mM (*Invitrogen*).

Volumen correspondiente a 500ng de RNA limpio con el kit *Turbo Dnase Free*.

Agua hasta un volumen final de 12 μ l.

Se incubó la mezcla a 65 $^{\circ}$ C durante 5 minutos y se enfría inmediatamente en hielo. Se recoge el contenido del tubo por centrifugación y a continuación se añade la siguiente mezcla:

Mezcla de reacción de retrotranscripción

4 μ l *5X First-Strand Buffer* (*Tris-HCl* 250 mM (pH 8,3 a temperatura ambiente), *KCl* 375 mM, *MgCl₂* 15 mM) (*Invitrogen*).

2 μ l 0,1 M *DTT* (*Invitrogen*).

Se agita suavemente y se incubó a 25 $^{\circ}$ C durante 2 minutos y se añade la enzima *retrotranscriptasa* :

1 μ l *SuperScript™ II RT* (200 U/ μ l). (*Invitrogen*).

Se incubó a 25 $^{\circ}$ C 10 minutos, 42 $^{\circ}$ C durante 50 minutos y finalmente se inactiva la reacción calentando a 70 $^{\circ}$ C durante 15 minutos.

Preparación de la reacción de Real Time PCR (PCR a tiempo real)

Se utilizaron cantidades iguales de RNA /cDNA en el análisis cuantitativo por real time PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el kit comercial *Platinum SYBRGreen qPCR Supermix–UDG* (*Invitrogen, Madrid, Spain*) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

12,5 μ l de *Supermix UDG*

0,5 μ l de *ROX* (50x)

9 μ l de agua estéril para uso en PCR

0,5 μ l de primer directo

0,5 µl de primer reverso

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes:

Apoa1-directo, 5'-GCT GAA CCT GAA TCT CCT GGAA-3'

Apoa1-reverso 5'-ACT AAC GGT TGA ACC CAG AGT GTC-3';

Apoa4-directo, 5'- ACCCTCTCCAGGACAAACTTG -3'

Apoa4-reverso 5'- CCTTGGTTAGATGTCCACTCAGTTG -3';

Ciclofilina B directo, 5'- GGA GAT GGC ACA GGA GGAA-3'

Ciclofilina B reverso 5'-GTA GTG CTT CAG CTT GAA GTTCTC AT-3'

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador ABI PRISM 7700 Sequence Detector (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) siguiendo el protocolo estándar. La cantidad relativa de todos los RNAs se calculó usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La ciclofilina B se utilizó como control interno de referencia.

8. ENSAYOS DE OXIDACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS (DCF)

Se estudió la capacidad de las HDL de prevenir la formación e inactivar fosfolípidos oxidados mediante el método de la diclorofluoresceína. Es un método rápido que no precisa cultivos celulares para analizar la capacidad de HDL para prevenir la formación o inactivar fosfolípidos oxidados. El compuesto diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (*Sigma*) emite fluorescencia al reaccionar con especies reactivas del oxígeno. En este ensayo un sustrato oxidable (LDL) es incubada junto con DCF y transcurrido un tiempo se mide la fluorescencia que la oxidación de las LDL ha producido sobre el DCF. Las HDL al evitar la oxidación de la LDL evitan también la aparición de la fluorescencia, pudiendo medir así su capacidad antioxidante.

Reactivos y procedimiento: diclorofluoresceína, 25 µg palmitoil, araquidonil-fosfatidil colina (*Avanti*), 1 µg de ácido hidroxiperoxiocetadecadienoico (*Cayman*) se mezclan con 25 µl de HDL preparadas por FPLC. Se incuban a temperatura ambiente durante 8 horas en la oscuridad. La lectura de fluorescencia se lee con excitación a 485 nm y la emisión se recoge a 530 nm.

El ensayo se realizó en microplacas de fluorímetro negras (*Nunc*) con 3 µg de apoB de LDL, 2 nmoles de fosfolípidos de HDL y 2 µg de DCF por pocillo en salino con 0,02% de azida en un volumen final de 150 µL. Después de un tiempo de incubación de 3 h a 37°C se midió la fluorescencia con λ de excitación de 485 nm y λ de emisión de 530 nm.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estudiaron las diferencias en los valores medios obtenidos a lo largo de las mediciones efectuadas en las semanas 10, 14 y 19 o al final en las variables analizadas.

Se obtuvieron en primer lugar los estadísticos descriptivos: la media, como índice de tendencia central por tratarse de variables cuantitativas; la desviación típica, como índice de variabilidad o de dispersión; el error típico de estimación del estadístico; el valor mínimo y el valor máximo.

Para el análisis comparativo, inicialmente se decidió, tras comprobar el supuesto de homogeneidad de las varianzas necesario para la aplicación de métodos paramétricos de contraste de medias, realizar un ANOVA para muestras independientes de un solo factor y de efectos fijos para cada una de las variables medidas. Después, utilizando la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples sin asumir el supuesto de homogeneidad de las muestras, averiguar entre qué grupos se daban estas diferencias cuando las hubiera.

Dado que en la prueba de homogeneidad de varianzas realizada sólo unas pocas de las variables del estudio cumplían dicho supuesto, se decidió utilizar los estadísticos robustos de igualdad de medias para el análisis comparativo, en concreto el test de Brown-Forsythe.

Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS15 (SPSS Inc.) para PC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obesidad y la diabetes, que en muchos casos se asocian, son estados de resistencia a la insulina que generan una considerable morbilidad y mortalidad, principalmente por enfermedades cardiovasculares que derivan de ambas situaciones, directa e indirectamente tanto por los trastornos metabólicos a nivel lipídico (dislipidemia aterógena) e hidrocarbonado, como por un estado de inflamación crónica y disfunción endotelial sistémica que predispone a la arteriosclerosis.

En los últimos años, ha aumentado de forma considerable la prevalencia de estas dos entidades patogénicas con una cada vez mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, y unas estimaciones para el futuro que han adoptado dimensiones de verdadera epidemia. Por tanto ya no se trata únicamente de un manejo terapéutico de las complicaciones mencionadas (enfermedad coronaria, cerebrovascular, renal, etc...) sino de abordar de forma preventiva no sólo la incidencia de obesidad y diabetes, sino los trastornos y alteraciones metabólicas iniciales que posteriormente, a modo de cascada de eventos sucesivos, generan una serie de cambios que afectan a la regulación de la correcta homeostasis de múltiples órganos; desde la expresión génica a la disfunción sistémica.

Las ratas Zucker obesa (*fa/fa*) es un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de la obesidad en humanos, con el rasgo *fa* recesivo en homocigosis que resulta de una mutación génica en el receptor de la leptina. Estos animales no presentan hiperglucemia, aunque sí la mayoría de las características de la diabetes mellitus no insulino dependiente como la hiperinsulinemia, la resistencia insulínica, la intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia. El rasgo *fa/fa* provoca también hiperfagia, siendo en parte responsable de los rasgos mencionados.

Por su parte las ratas Zucker obesas y diabéticas (ZDF/Gmi-*fa*), que derivan de la reproducción controlada de una línea de ratas Zucker obesas que desarrollaron hiperglucemia, mantienen además las características de la obesidad asociada a la diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) en humanos (principalmente los machos, con una aparición de las diferentes alteraciones metabólicas más predecible). En estos animales la hiperglucemia se desarrolla entre las 7 y las 9 semanas de edad, precedidos del desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina, primero, con niveles de insulina normales, luego elevados y finalmente disminuidos sobre las 20 semanas de edad (de una forma similar a la pérdida progresiva de respuesta insulínica a la glucosa que se observa en la NIDDM). Estos animales también desarrollan neuropatía y retinopatía diabéticas, así como proteinuria y glomerulosclerosis focal espontánea que deriva finalmente en fallo renal.

Son múltiples los abordajes que se están realizando en el campo de la obesidad y la diabetes. Uno de ellos se desarrolla en el ámbito del metabolismo lipídico y la dislipidemia aterógena, por sus implicaciones directas con el desarrollo de arteriosclerosis. Las lipoproteínas de alta densidad tienen un papel muy importante en la homeostasis de lipoproteínas y colesterol, como parte de un sistema que almacena y utiliza los lípidos según necesidad, expulsando los excesos en situaciones normales, pero también evitando la inflamación y la oxidación de otras lipoproteínas en situaciones patológicas, el depósito y acúmulo subintimal de estas y la formación de la placa de ateroma.

Con el modelo que se presenta en este estudio se quería hacer una caracterización del perfil lipídico y lipoproteínas con especial interés en las HDL (expresión de apo AI, efectos sobre la oxidación de LDL mediante ensayo con DCF) en un estadio muy precoz de enfermedad vascular como es el desarrollo de microalbuminuria, punto común de todos los elementos del síndrome metabólico, y señal de alarma sobre la función endotelial y el riesgo de progresión de enfermedad renal y cardiovascular.

El hecho original de este estudio frente a otros que ya habían explorado lípidos, lipoproteínas, daño en la barrera de filtración glomerular y progresión de nefropatía, etc... en ratas ZDF, es la utilización de una dieta hipocalórica y un fármaco agonista de PPAR γ como el Telmisartán para valorar su efecto en las fases precoces de la albuminuria y la dislipemia aterógena. Ambas son estrategias de la terapéutica habitual en muchos pacientes con hipertensión arterial, diabetes y enfermedad renal crónica, incidiendo en la finalidad clínica con potencial utilidad en personas que tiene este proyecto, aún utilizando un modelo animal.

SEGUIMIENTO DEL INCREMENTO DE PESO EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES:

Figura 17. Incremento medio de peso

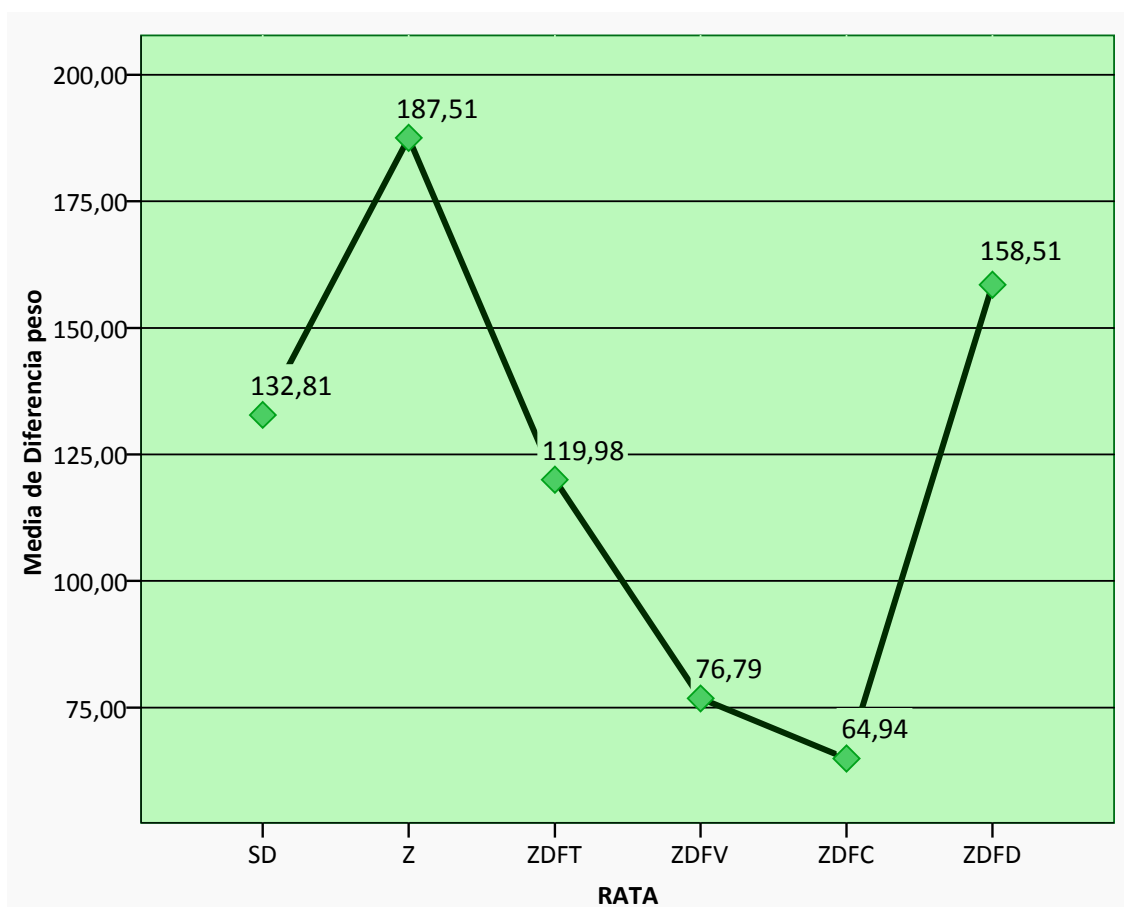


Tabla 8. Incremento de peso medio

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Diferencia peso	SD	5	132,8	34,9	87,0	171,1
	Z	5	187,5	35,4	154,9	239,6
	ZDFT	8	119,9	62,1	52,5	237,5
	ZDFV	8	76,8 ^a	22,2	46,6	104,1
	ZDFC	4	64,9 ^{a,b}	6,0	59,8	72,4
	ZDFD	8	158,5	13,8	138,3	175,0
	Total	38	123,8	52,9	46,6	239,6

Los datos se muestran como medias (g), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en la concentración plasmática de colesterol en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus Z, ^b versus ZDFD)

Existen diferencias significativas entre los incrementos de unos grupos y otros cuando comparamos las medias de esos incrementos en las 19 semanas. Dichas diferencias se dan entre el grupo Z y los grupos ZDFV y ZDFC siendo significativamente mayor el incremento de

peso para el grupo Z. Del resto es significativa también la diferencia entre los incrementos ZDFC y ZDFD, siendo mayor el incremento en este último grupo. Entre ZDFV y ZDFD, aunque no se llegue al grado de significación, la tendencia de la gráfica muestra un mayor incremento de peso en el grupo dieta controlada.

Si consideramos que el peso pueda ser un indicador de obesidad (como lo hacemos en humanos cuando medimos el IMC), es un resultado poco esperable (si acaso las ratas con dieta hipocalórica, así como las obesas no diabéticas y por supuesto las SD, deberían tener un peso inferior a las otras ZDF). Sin embargo si consideramos la obesidad como exceso de adiposidad (hecho que explica mucho mejor todos los cambios metabólicos que ocurren), que el peso de SD, Z y ZDFD sea mayor puede ser simplemente debido a la relación entre materia magra/grasa y a un catabolismo acelerado en diabéticos.

Corsetti y colaboradores²²⁴ observaron que en el caso del grupo de ratas macho (que desarrollaban hiperglucemia incluso con dietas con bajo contenido calórico), el peso disminuyó con los aumentos en contenido graso de la dieta, en los diversos momentos de medición aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Esta tendencia a un menor peso (o a un incremento menor de peso) con dietas más calóricas y con glucemias significativamente más elevadas para cada uno de los grupos en las diferentes semanas de vida, les sugería que estaba en relación con un estado catabólico severo, asociado con el desarrollo más precoz y severo de diabetes¹⁹⁹.

En otro estudio anterior, Ohneda y colaboradores²⁰⁰, observaron que el grupo de ratas ZDF con acceso libre a una dieta sin restricciones, a medida que desarrollaban hiperglucemia la diferencia inicial de peso (al principio la diferencia de peso a favor de las obesas-diabéticas es muy evidente) frente a un grupo de ratas delgadas iba disminuyendo, apuntando a esa menor ganancia de peso en diabéticos descontrolados (y una ganancia progresiva en el resto de los grupos).

La intervención con fármacos antidiabéticos con actividad moduladora de PPAR γ en ratas ZDF (tiazolidinedionas, y una agonista experimental) en el estudio de Upton y colaboradores²⁰¹ también provocaba un mayor incremento del peso durante el seguimiento.

Así, nuestro grupo de intervención con dieta hipocalórica, que desarrolla menos hiperglucemia que los grupos vehículo y control, muestra un incremento de peso mayor que estos y similar a las ratas delgadas y a las obesas no diabéticas.

Los resultados de la comparación de ganancias de peso medias de ratas obesas y obesas diabéticas con y sin tratamiento farmacológico (agonismo PPAR γ), frente a un grupo de ratas delgadas control de este estudio es muy similar al que podemos observar en nuestro estudio con el grupo Telmisartán.

Este hecho hay que separarlo del que se ha observado en pacientes diabéticos en tratamiento con algunas tiazolidinedionas (no otros fármacos con actividad PPAR γ como Telmisartán), que incrementan el peso por retención de agua²⁰²

En personas, el peso no es el mejor indicador de obesidad, con o sin diabetes asociada, como se ha demostrado en numerosos estudios, si bien en muchos casos puede ser suficiente. Actualmente se sigue definiendo y categorizando la obesidad por medio del peso, en concreto relacionado con la altura, el índice de masa corporal o IMC²⁰³. Sin embargo el IMC no refleja aspectos de la obesidad como el exceso de riesgo cardiovascular y la mortalidad porque no es un buen indicador de adiposidad ni de arteriosclerosis. Diversos estudios epidemiológicos relacionando eventos cardiovasculares y mortalidad con obesidad han dado resultados equívocos, con asociaciones lineales, en forma de J, de U... etc, e incluso inexistentes. En todos estos estudios se ha utilizado el peso como indicador de obesidad en lugar de otras medidas alternativas como la razón cintura/cadera, circunferencia de cintura que parecen tener mejor correlación²⁰⁴.

SEGUIMIENTO DEL INCREMENTO DE LA CANTIDAD DE ALBUMINURIA DIARIA EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 18. Incremento de albuminuria diaria media

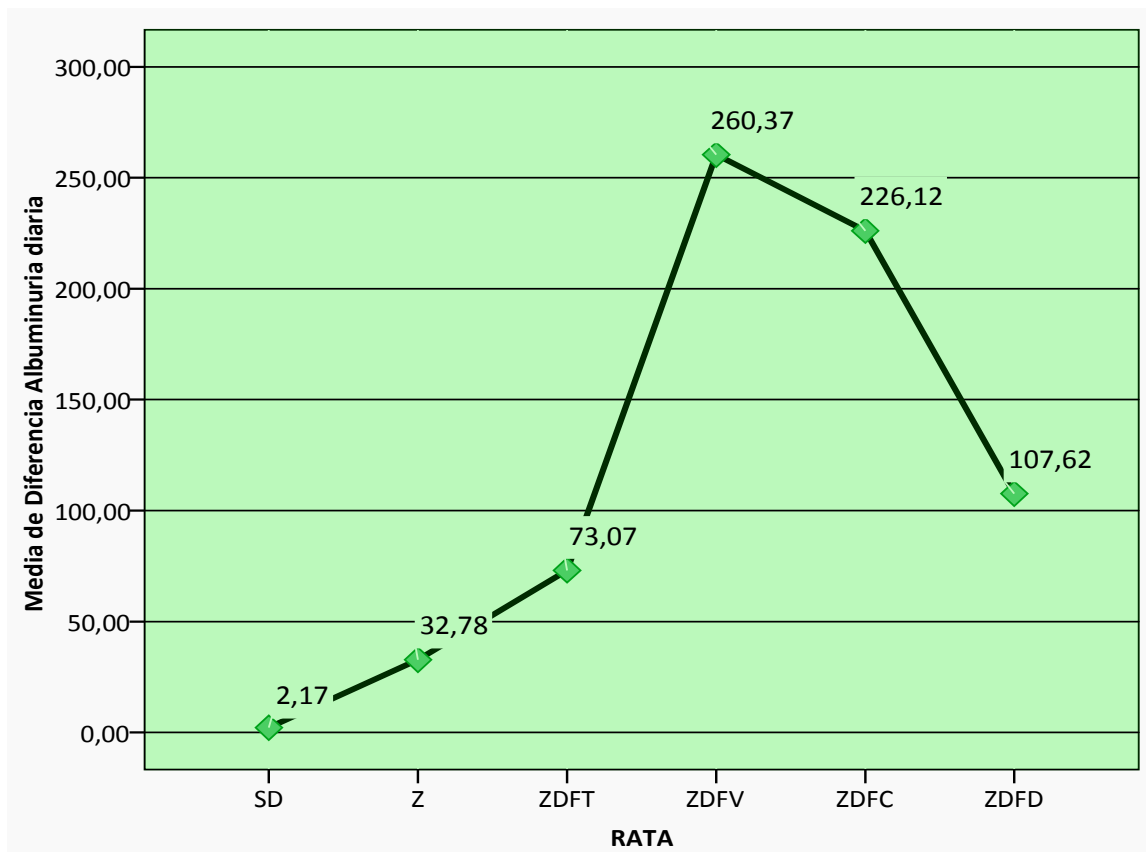


Tabla 9. Incremento de albuminuria diaria media

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Diferencia albuminuria diaria	SD	4	2,2	3,6	-0,7	7,5
	Z	5	32,8	17,5	7,8	52,6
	ZDFT	8	73,1	54,2	-7,6	134,3
	ZDFV	7	260,3 ^{a,b}	124,8	28,8	412,4
	ZDFC	4	226,1 ^{a,b,c}	48,1	182,7	269,7
	ZDFD	7	107,6	64,5	39,4	199,9
	Total	35	121,1	114,1	-7,6	412,4

Los datos se muestran como medias (mg/dL), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en la concentración plasmática de colesterol en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus SD, ^b versus ZDFD, ^c versus ZDFT)

La excreción de albúmina en orina se asocia con patologías como la hipertensión arterial, la diabetes, la obesidad, la resistencia a la insulina y la dislipemia asociadas a la

obesidad. Dicho de otra forma, la encontramos en la progresión hacia la severidad en todos los componentes del síndrome metabólico²⁰⁵. La microalbuminuria (MAU), hecho más precoz, se relaciona con la disfunción endotelial, punto crítico y precoz en el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Estos cambios microvasculares pueden ser reversibles, y la microalbuminuria puede regresar con el control de la hipertensión y la obesidad/diabetes. En caso contrario, la microalbuminuria y el desarrollo progresivo de arteriosclerosis lleva a cambios estructurales, enfermedad macrovascular, albuminuria, y pérdida de función renal. Se podría considerar que la MAU es una señal que da el riñón sobre la presencia de alteraciones en la función endotelial (aumento de permeabilidad; alteración de la respuesta vascular), la predisposición a la arteriosclerosis generalizada y el riesgo cardiovascular que ello conlleva. Actualmente la MAU se considera un factor predictor de enfermedad y mortalidad cardiovasculares^{206,207} independientemente de otros factores de riesgo cardiovasculares clásicos y de la función renal^{208,209}.

En nuestro estudio, y valorando la albuminuria como marcador de daño vascular, podemos considerar que estos resultados son esperables ya que los grupos de ratas obesas y diabéticas sin ningún tipo de intervención terapéutica tienen pérdidas mayores durante el seguimiento y ya desde las primeras semanas:

- Los grupos SD y Z muestran menor incremento de albuminuria que los ZDF de los grupos no tratados ni con dieta ni con agonistas PPAR. Entre ellos, aunque con diferencias pequeñas, parece que el grupo de ratas obesas, pierde algo más de albúmina en orina. Quizá con más tiempo de evolución estas diferencias se vieran más grandes.
- Las ratas ZDF poseen un fenotipo realmente proaterogénico y con predisposición al daño vascular precoz/microvascular²¹⁰, así que los resultados de los grupos no tratados, V y C son los esperados, con incrementos significativamente mayores.
- El Telmisartán es un potente fármaco antiproteinúrico y protector renal²¹¹, de ahí las diferencias significativas. Interesante remarcar, sobretodo, la precocidad con la que se observan estos cambios.
- El grupo ZDFD se comporta de una forma similar a ZDFT aunque sin alcanzar la significación estadística. Parece que una dieta hipocalórica puede proteger o enlentecer la progresión de la enfermedad vascular precoz.

Kasike y colaboradores²¹² estudiaron la función y la estructura renal en ratas Zucker obesas. Se basaban en experimentos previos en los que se observaba que la hiperfagia y la obesidad de ese tipo de ratas se asociaban con glomeruloesclerosis espontánea focal (FGS). El grupo de ratas obesas, frente a un grupo control de ratas delgadas desarrollaban expansión de la matriz mesangial glomerular a las 14 semanas de edad, independientemente del *clearance* de inulina y la fracción de filtración renal normales. A las 28 semanas de edad la FGS era evidente en 7 de 8 ratas, y todas, mostraban marcada FGS a las 68 semanas de estudio. Demostraban que la albuminuria y la expansión de la matriz mesangial precedían el desarrollo de FGS.

El mismo grupo, unos años después, investigó el papel del metabolismo lipídico en el desarrollo de albuminuria y FGS precoz en ratas Zucker, mediante la administración de tratamiento hipolipemiante con dos fármacos diferentes (mevinolina, y ácido clofíbrico)²¹³. Los grupos de tratamiento hipolipemiante redujeron el colesterol en ayunas (sólo la mevinolina redujo también los triglicéridos), y también la excreción de albúmina en orina frente al grupo vehículo. En estos grupos de intervención farmacológica se observaba una reducción de la albuminuria y de la expansión de la matriz mesangial y la celularidad. Además el porcentaje de FGS fue significativamente menor que en el grupo vehículo. Los resultados indicaban que un metabolismo lipídico anormal era importante en la patogénesis de la albuminuria y la FGS.

Para investigar el efecto de la obesidad, la hiperinsulinemia, y la resistencia a la insulina en la barrera de filtración glomerular y el potencial efecto protector de las estatinas, Whaley-Connell y colaboradores diseñaron un experimento con ratas Zucker obesas y otras delgadas a las que se les administraba rosuvastatina o placebo durante 3 semanas²¹⁴. Estudios en animales y en humanos señalan los efectos beneficiosos de las estatinas en la reducción de la albuminuria y sobre la progresión de la enfermedad renal crónica, por sus efectos hipolipemiantes así como reduciendo la inflamación y el estrés oxidativo a nivel glomerular²¹⁵. Observaron un aumento importante de la glucemia y los niveles de insulina en los grupos de ratas obesas frente a las delgadas, sin que las obesas tratadas con el fármaco mostraran reducción en ninguno de los parámetros. Tampoco el peso de las obesas con o sin tratamiento difería significativamente.

Analizaron la barrera de filtración mediante microscopía electrónica, y estudiaron su funcionalidad mediante la cuantificación de albuminuria. Observaron un incremento sustancial del ratio albúmina/creatinina en el grupo de ratas obesas no tratadas, frente a las tratadas con rosuvastatina, y también, en ambos grupos, frente a las Zucker delgadas. Los niveles bajos de β -N-acetylglucosaminidasa marcaban el origen de la albuminuria en la barrera de filtración y

no en el túbulo proximal. Observaron también la alta correlación de la insulinemia con la albuminuria, no así con la glucemia.

No encontraron diferencias en el grosor de la membrana basal glomerular entre los controles obesos y delgados, aunque sí con el grupo de las obesas con fármaco, que mostraban un grosor significativamente menor. Observaron también un aumento de la amplitud de la base de los podocitos en las obesas control frente a las delgadas, y una tendencia hacia la disminución en el grupo de obesas con rosuvastatina, que se correlacionaba con la albuminuria y la insulinemia.

Los resultados de este estudio sugieren un papel importante de la hiperinsulinemia y el estrés oxidativo en la patogenia del daño de podocitos/barrera de filtración y la albuminuria, independientemente de la hipertensión, demostrando la importancia de una actuación hipolipemiente, en este caso con estatinas.

El efecto beneficioso de la dieta hipocalórica en nuestras ratas ZDF (que además de obesas son diabéticas) sobre la hiperlipidemia/dislipemia lo podríamos interpretar en este sentido.

En el estudio de Buckingham y colaboradores donde se administraba un fármaco antidiabético del grupo de las tiazolidinedionas con actividad PPAR γ (Rosiglitazona)²¹⁶, la administración del fármaco retrasaba la aparición de proteinuria de los 3 a los 6 meses en el grupo prevención, y reducía la tasa de progresión de la misma en ambos grupos (prevención y tratamiento) una vez se establecía. La albuminuria tenía resultados superponibles.

En el estudio histológico de los riñones y el páncreas del grupo prevención se observó la ausencia de glomeruloesclerosis focal, así como de hiperplasia de los islotes pancreáticos; ambos, hallazgos prominentes en el grupo Zucker obeso control. En el grupo tratamiento, los cambios morfológicos eran intermedios.

Los mecanismos por los que la Rosiglitazona protegía frente al daño glomerular, y una vez establecido retrasaba su progresión, pudieran estar en relación con su actividad PPAR γ , la mejora de la sensibilidad a la insulina, los efectos hipolipemiantes y el aumento de la disponibilidad de ácidos grasos en la membrana celular.

Numerosos estudios epidemiológicos han mostrado la gran interrelación patológica y las complicaciones del fallo cardiorenal en población con diabetes tipo II²¹⁷. Baynes y Murray investigaron la relación temporal entre la enfermedad cardiaca y la renal en el modelo de obesidad-diabetes de las ratas ZDF, para valorar el impacto del inicio de cada una de las enfermedades en la otra²¹⁸.

En el grupo de las ratas obesas, observaron que la excreción de albúmina en orina aumentaba de forma muy marcada a partir de las 24 semanas de edad, mientras que los niveles de creatinina en orina disminuían significativamente desde el inicio del estudio frente al grupo de delgadas, posiblemente por el efecto dilutorio (el consumo de agua y el volumen de orina era superior). La ratio albúmina/creatinina, un indicador de microalbuminuria, se mantenía constante en las delgadas pero se incrementaba significativamente a partir de las 10 semanas en las obesas y diabéticas.

En nuestro estudio, también las ratas sin intervención (grupos vehículo y control) muestran incrementos progresivos de albuminuria en orina muy superiores que las ratas delgadas del grupo SD y que las Zucker que no son diabéticas.

Coimbra, y colaboradores²¹⁹ estudiaron la evolución de los cambios bioquímicos y morfológicos que conducían al fallo renal en la diabetes tipo II y que precedían a la proteinuria manifiesta, la glomerulosclerosis y el daño tubulointersticial en ZDF. Inicialmente las diferencias de peso eran significativas (mayor en las obesas), y en su caso, se mantenían así durante todo el estudio. El aumento de peso era progresivo y paralelo a la hiperinsulinemia y a la hiperlipemia (principalmente a expensas de un incremento de los triglicéridos en plasma y del colesterol asociado a las HDL) del grupo obeso, que ya mostraban diferencias significativas con el grupo delgado desde el principio. La hiperglucemia se desarrollaba a partir de las 14 semanas de edad en las ratas *fa/fa*. Hasta las 60 semanas de edad las lecturas de tensión arterial de ambos grupos eran comparables y se mantuvieron en el rango de la normalidad. La función renal, medida como concentración de creatinina y de urea en plasma se mantuvo normal hasta la semana 40. Se observó un progresivo aumento de la proteinuria en las ratas obesas, significativamente superior a los controles delgados, sobretodo a partir de la semana 18. La enfermedad renal progresiva de las ratas obesas y diabéticas se caracterizaba por un daño precoz a los podocitos seguido de la infiltración glomerular de leucocitos, de daño tubulointersticial y de hipertrofia glomerular por depósito de fibronectina y colágeno, sin todavía proliferación celular mesangial, que formaría parte, entre otros procesos, de la vía común más tardía de enfermedad renal por otras causas. Sobre la patogenia que llevaba al daño inicial de los podocitos, proponían un mecanismo combinado entre la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia.

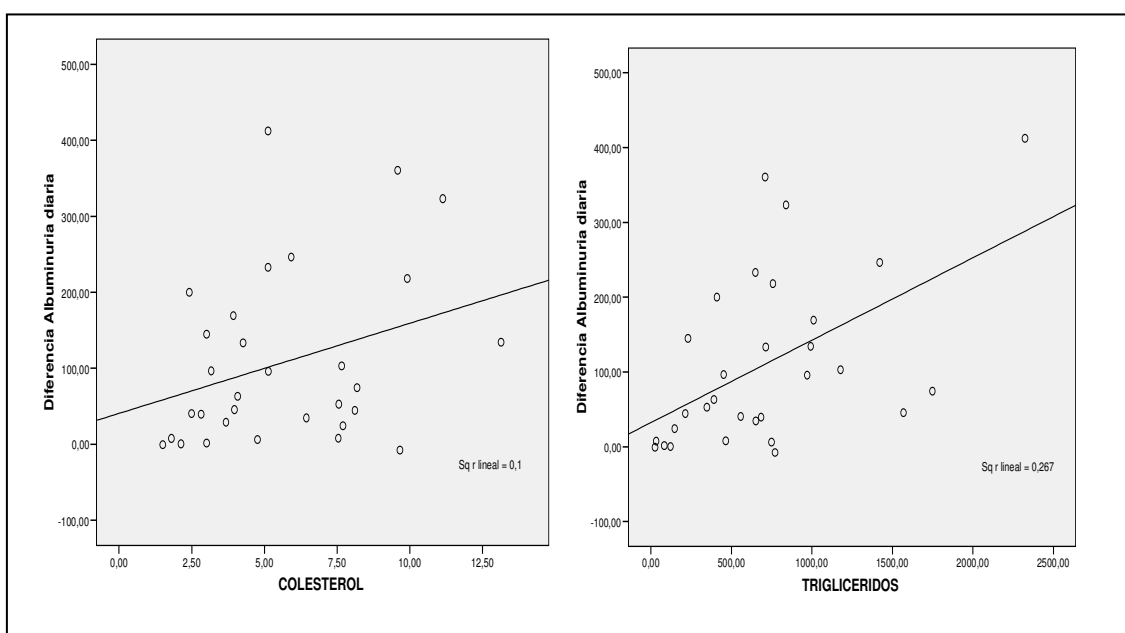
El mismo grupo, había observado que la rata hiperinsulinémica GK (Goto-Kakizaki) con diabetes tipo II no desarrollaba glomerulosclerosis ni albuminuria pero sí daño a nivel de podocitos²²⁰. El exceso de insulina precisaba de otro estímulo para el daño en podocitos y fallo

renal en las ratas *fa/fa*, que sugerían era la hiperlipidemia. Se había descrito para entonces que, in vivo las hipercolesterolemia en ratas se asociaba a glomerulosclerosis; la hipertrigliceridemia aislada, a albuminuria, daño podocitario y glomerulosclerosis; y que la reducción de hiperlipidemia con intervenciones dietéticas o con fármacos reducía la glomerulosclerosis²²¹.

También en nuestro estudio, los dos grupos de ratas obesas y diabéticas sometidas a tratamiento con Telmisartán o con dieta, muestran niveles significativamente inferiores de albuminuria. Si bien no disponemos de un estudio morfológico de los glomérulos de estos animales que confirme el incipiente daño podocitario, otros lo han hecho, con el mismo tipo de animales en condiciones similares, y los resultados de albuminuria de sus ratas concuerdan con los de nuestros grupos control y vehículo.

El efecto de la dieta en comparación con el vehículo/control es paralelo al de variables como los triglicéridos y colesterol, remarcando la importancia del metabolismo lipídico en la aparición de albuminuria. El efecto del Telmisartán podría estar en relación tanto con su actividad sobre el sistema angiotensina-aldosterona, como por su actividad PPAR γ y la modulación del metabolismo de los ácidos grasos. Observamos una correlación moderadamente positiva entre triglicéridos e incremento de albuminuria ($r = 0,52$ $p < 0,05$) y ligeramente positiva entre colesterol total e incremento de albuminuria ($r = 0,32$ $p < 0,05$), como se muestra en las gráficas.

Figura 19. Análisis de asociación entre diversos parámetros



SEGUIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE GLUCOSA EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 20. Incremento de la glucemia media

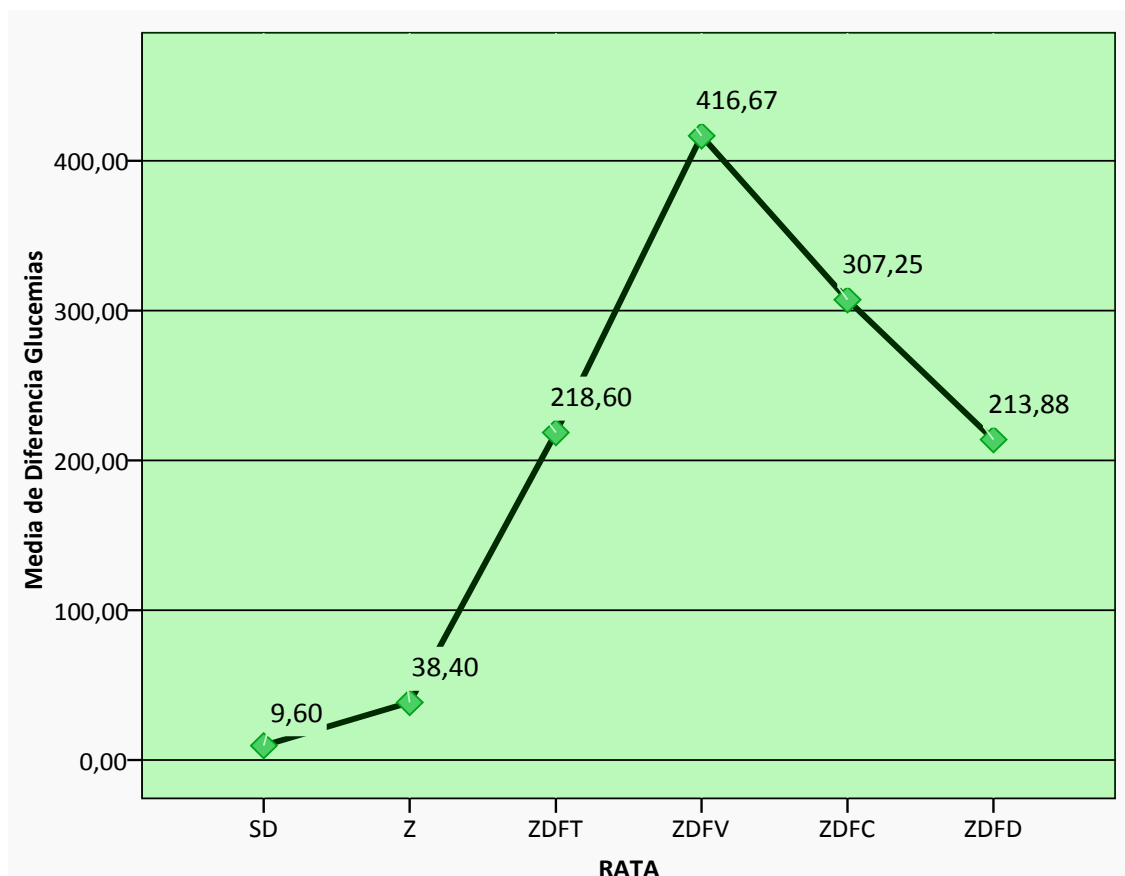


Tabla 10. Comparación del incremento de glucemia media

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Diferencia Glucemias	SD	5	9,6	36,5	-34,0	53,0
	Z	5	38,4	71,7	-28,0	154,0
	ZDFT	5	218,6 ^a	121,5	110,0	413,0
	ZDFV	6	416,7 ^{a,b}	103,5	229,0	540,0
	ZDFC	4	307,5 ^{a,b}	83,9	211,0	402,0
	rZDFD	8	213,8 ^a	130,2	71,0	368,0
	Total	33	205,3	169,6	-34,0	540,0

Los datos se muestran como medias (mg/dL), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus SD, ^b versus Z)

El incremento de glucemias en el grupo SD es significativamente inferior al incremento en ZDFV. También el incremento de glucemias en el grupo Z es significativamente inferior a ZDFV, aunque ya no a los grupos intervención. Por su parte, en los grupos de ratas obesas y

diabéticas no existen diferencias entre los incrementos de ZDFT, ZDFV, ZDFC y ZDFC a lo largo de las 19 semanas aunque sí valores más elevados en aquellos animales que reciben vehículo o simplemente son controles. Los cambios que se producen entre los grupos ZDF, en concreto ZDFT y ZDFD con ZDFV, no son estadísticamente significativos, pero sí que muestran una tendencia a la diferencia: las ratas desarrollan diferentes grados de hiperglucemia en función de la dieta que reciben, y el Telmisartán parece que puede proteger de ello.

Clark y colaboradores fueron los primeros en obtener una línea de ratas diabéticas no insulino dependientes a partir de una colonia de ratas Zucker obesas en 1980 en la Universidad de Indiana. La rata Zucker obesa (fa/fa) se debe a un gen recesivo autonómico, y está caracterizada por ser hiperinsulinémica pero euglucémica. Se realizaron determinaciones de glucemia a dos ratas macho Zucker que observaron que orinaban excesivamente. Tenían una glucemia en ayuno de 544 mg/dL y 474 mg/dL, que disminuyó en 3 semanas con dieta restrictiva (únicamente 15g/día) a 184 mg/dL y 175 mg/dL, respectivamente²²². Además de la incidencia de diabetes en la descendencia de las Zucker obesas (observaron que en caso de que se tratara de un rasgo monogénico, no estaba ligado al gen fa y se comportaba como dominante) estudiaron en plasma y posteriormente en tejido (hígado, páncreas y músculo) el comportamiento de la glucosa y la insulina con sobrecargas orales de glucosa; así como ácidos grasos, colesterol y triglicéridos; comparando grupos de ratas obesas diabéticas con y sin restricción dietética, frente a otras ratas únicamente obesas y otras delgadas. Observaron que los animales diabéticos eran siempre obesos y típicamente con una edad de aparición de hiperglucemia en ayuno de 6 meses (hecho que se observa de forma mucho más precoz en nuestro experimento y en otros previos). Los niveles plasmáticos basales de insulina de los animales diabéticos estaban tan elevados como los de los obesos no diabéticos y euglucémicos (y ambos superiores a las ratas delgadas). Sin embargo, los test de tolerancia a la glucosa mostraron que los animales obesos y diabéticos no experimentaban un marcado aumento de niveles de insulina en plasma en respuesta a la carga oral de glucosa; indicando un estado mayor de resistencia a la acción de la hormona a nivel tisular. En el estudio de los tejidos, observaron que las ratas obesas tenían un contenido de insulina pancreática hasta 5 veces superior que las obesas diabéticas, con concentraciones similares a las delgadas. Así, además de una sensibilidad tisular a la insulina disminuida, su capacidad secretora de insulina también era menor, como ocurre en la diabetes tipo II en humanos.

Como se especifica en la ficha del suministrador, las ZDF macho (nuestro modelo) desarrollan hiperglucemia alrededor de las 7 semanas de vida con la dieta adecuada. Leonard y

colaboradores²²³ describieron las alteraciones metabólicas del estado de resistencia a la insulina en ratas Zucker diabéticas frente a un fenotipo delgado, usando el método de la “pinza hiperinsulinemia-euglucemia”. Las ZDF, precisaban un 89% menos de glucosa infundida para mantener los valores normales de glucosa en plasma. También mostraban una captación de glucosa mediada por insulina en músculo esquelético significativamente menor. Así la cantidad de glucógeno en músculo esquelético y cardiaco era significativamente menor, aunque al revés en hígado, en comparación con el grupo de ratas delgadas.

El estudio fue realizado con ratas de 10 semanas de edad y claramente mostraba la resistencia a la insulina de las ZDF para entonces, dada la menor o nula capacidad de la insulina para estimular el uso y almacenamiento de la glucosa, aunque el desarrollo de hiperglucemia siempre es posterior.

La hiperglucemia de las ZDF *fa/fa* (no las cepas salvajes) se inicia sobre las 7 semanas de vida, y son completamente diabéticas entre la 10 y la 12 a medida que los niveles de insulina descienden.

Ohneda y colaboradores²⁰⁰ estudiaron el impacto que tenía la dieta no controlada en el desarrollo de diabetes en animales predispuestos, ZDF *fa/fa*, frente a delgados. Observaron que, las ZDF controles desarrollaban hiperglucemia, poliuria y glucosuria a las 8 semanas de edad, mientras que el grupo de ratas en tratamiento dietético se mantenían euglucémicas durante los 3 meses de seguimiento. Así, en las ratas control la estimulación de secreción de insulina era nula a las 12 semanas de edad y la cantidad de células beta pancreáticas GLUT-2 positivas había descendido un 30%. Por el contrario la restricción dietética durante 3 meses previno la pérdida de secreción de insulina estimulada por glucosa y la reducción de células beta pancreáticas GLUT-2 positivas. Concluyen los autores, que en las ratas ZDF, la incompetencia de las células beta y su reducción en número coinciden con la aparición de la hiperglucemia, y que las alteraciones metabólicas descritas, en su caso, ocurrían sólo cuando la ingesta calórica es excesiva (a pesar de ser un modelo de obesidad genética con tendencia a la diabetes).

Corsetti y colaboradores²²⁴ estudiaron el efecto de la cantidad de grasa de la dieta, en concentraciones crecientes, en el desarrollo de diabetes no insulino dependiente, dislipidemia, y alteraciones de marcadores séricos de disfunción orgánica en ratas ZDF obesas machos y hembras). Las ratas macho, incluso alimentadas con dietas con bajo contenido en grasa, desarrollaron diabetes, pero el proceso se mostraba mucho más acelerado en función del contenido de grasa de la dieta (hiperglucemia marcada y ya estadísticamente significativa a

partir de las 13 semanas entre los grupos alimentados con un 12,3 Kcal% de grasa y un 25,9 Kcal%). Las hembras por su parte, sólo desarrollaban hiperglucemia con dietas marcadamente lipídicas (48 Kcal%) –de una forma rápida y glucemias muy elevadas-, e hiperglucemia moderada a partir de las 9 semanas con la dieta 25,9 Kcal%. Por tanto en ZDF ratas machos como hembras la hiperglucemia y la progresión hacia la diabetes están en función del contenido en grasa de la dieta aunque de formas diferentes.

También el incremento de la glucemia de nuestro grupo de ZDF con dieta hipocalórica (30%) es casi la mitad del que observamos para el grupo vehículo y control, aunque todavía muy superior a los que muestran las ratas no diabéticas delgadas y obesas.

El mismo efecto que tiene la dieta hipocalórica parece que se observa en el grupo de ratas en tratamiento con Telmisartán.

Brown y colaboradores²²⁵ estudiaron el efecto del tratamiento con diferentes agonistas PPAR γ (el compuesto GW1929 –agonista selectivo PPAR γ - y una tiazolidinediona) sobre varios parámetros metabólicos (glucemia y hemoglobina glicosilada, ácidos grasos, triglicéridos, etc.), la sensibilidad a la acción de la insulina y sobre la estructura pancreática en ratas ZDF. EL agonista selectivo se mostró más potente que la tiazolidinediona. La administración de GW1929 durante 14 días consiguió un descenso significativo de la glucosa plasmática en ayunas en todos aquellos animales que recibían la dosis de 5 mg/Kg, en el 75% de los que recibían 1 mg/Kg, y en el 37.5% de los que recibían dosis de 0.5 mg/Kg. También la hemoglobina glicosilada HbA1 descendía significativamente comparándola con el grupo vehículo control.

Tras dos semanas de tratamiento los niveles endógenos de insulina descendían significativamente (entre un 40 y un 70%) frente a los valores pretratamiento debido al fallo pancreático progresivo dependiente de la edad característico de las ratas ZDF. Al finalizar el periodo de tratamiento los niveles séricos de insulina de los grupos dosificados con 1 y 5 mg/Kg de GW1929 no eran significativamente diferentes del grupo vehículo; sin embargo la glucemia y la concentración de ácidos grasos eran inferiores. A pesar de niveles circulantes similares de insulina plasmática en ayuno, los animales que recibían tratamiento con el fármaco experimental agonista PPAR γ , tenían una glucemia diaria más normalizada tal y como indicaban unos niveles de hemoglobina glicosilada significativamente inferiores al grupo vehículo. La sensibilidad tisular a la insulina, medida mediante la técnica de la “pinza euglucémica-hiperinsulinémica”, mostraba que los animales tratados con la dosis de 5mg/Kg de GW1929 eran significativamente más sensibles a la acción de la insulina que las ratas

tratadas con vehículo. El estudio funcional e histológico de los páncreas perfundidos demostró la preservación de la función de las células beta en las ratas ZDF tratadas con GW1929, así como de la morfología de los islotes pancreáticos.

En nuestro estudio, el estado de resistencia a la insulina de las ratas Zucker obesas y diabéticas, seguidas durante 19 semanas explica las diferencias entre los grupos no diabéticos (SD y Z) y los diabéticos. Aunque sin diferencias significativas entre los grupos ZDF (son grupos pequeños), la tendencia de las ratas tratadas con dieta o con Telmisartán es clara frente a las ratas tratadas con vehículo o simplemente control, ya que estas muestran glucemias muy superiores. Esta observación está en consonancia con los resultados de los estudios previos mencionados, bien por el efecto de la reducción de la ingesta calórica, bien por el efecto que el agonista selectivo de PPAR γ , Telmisartán, pueda tener sobre la sensibilidad a la acción de la insulina en tejidos.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 21. Concentración plasmática de triglicéridos

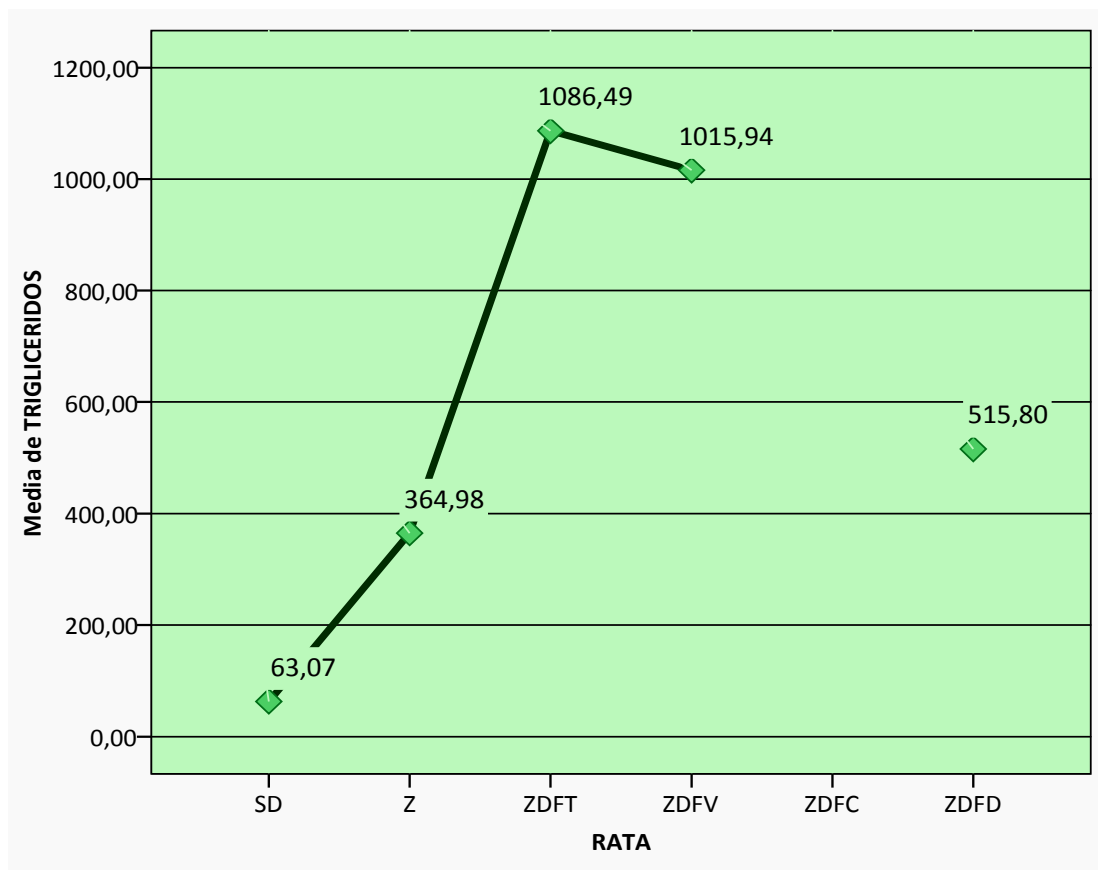


Tabla 11. Comparación de la concentración de triglicéridos

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
TRIGLICERIDOS	SD	5	63,1	39,8	25,2	121,7
	Z	5	364,9	201,8	147,5	652,2
	ZDFT	8	1086,5 ^{a,b,c}	388,1	713,2	1748,6
	ZDFV	7	1015,9 ^a	654,2	411,2	2324,1
	ZDFD	8	515,8 ^a	239,9	230,7	1010,5
	Total	33	668,8	527,9	25,2	2324,1

Los datos se muestran como medias (mg/dL), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en la concentración plasmática de triglicéridos en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus SD, ^b versus Z, ^c versus ZDFD)

La concentración de triglicéridos en los diferentes grupos se comporta de forma esperable, aunque en algunos casos sin que las diferencias alcancen la significación. Las ratas delgadas SD muestran la concentración menor de todos los grupos, con diferencias

significativas respecto a las ratas obesas y diabéticas sea cual sea el tipo de intervención a la que se sometían. Por su parte las ratas ZDF en tratamiento con vehículo y Telmisartán muestran los niveles más elevados (este último grupo ligeramente superior) de todos. Remarcar el efecto de la dieta sobre la cantidad de triglicéridos en plasma, puesto que las ratas reducen su concentración a valores cercanos al grupo de ratas no diabéticas en las que solamente se expresa el rasgo obesidad.

La hiperlipemia/dislipidemia de las ZDF tiene un origen muy importante en el aumento de triglicéridos en plasma. La gran mayoría de los estudios que se han mencionado en el apartado anterior desarrollando la variable incremento de la glucemia plasmática, arrojan resultados sobre la concentración de triglicéridos en plasma en los diversos modelos experimentales que han utilizado sobre ratas Zucker y/o Zucker diabéticas en comparación con animales delgados no hiperlipémicos ni diabéticos, en un sentido similar a los de nuestro estudio. Los animales obesos muestran más hipertrigliceridemia que los que no lo son, y si además se añade el rasgo diabetes, el incremento es mayor. Por otra parte según qué intervenciones dietéticas (las dietas ricas en aceite de pescado y las calóricamente restrictivas) disminuyen la concentración de triglicéridos en plasma y algunos tejidos analizados, como veremos.

Aunque el principal objetivo del trabajo de Strobl y colaboradores²³⁶ era el estudio de la regulación de la expresión del gen de Apo AIV en ratas Zucker frente a diferentes tipos de dieta, también analizan otros parámetros del metabolismo lipídico como es el colesterol total y los triglicéridos. La media de triglicéridos en plasma en el grupo de las obesas sin ninguna intervención dietética especial era casi 6 veces la del grupo de ratas delgadas. Ellos como otros²²⁶ también observaron cómo la dieta rica en aceite de pescado reducía de forma significativa la concentración plasmática de Triglicéridos, aunque todavía permanecía muy superior al del grupo de ratas no obesas. La dieta enriquecida con sacarosa no mostraba ese efecto, y la concentración de Triglicéridos era similar al del grupo de ratas obesas con dieta habitual.

Al igual que en nuestro estudio, las Zucker obesas tienen cantidades muy superiores de triglicéridos en plasma frente a las ratas delgadas. El tipo de dieta y la ausencia de animales obesos y además diabéticos hace que no podamos extrapolar los resultados a nuestro grupo ZDFD, aunque en ambos estudios la dieta hipocalórica tiene un efecto hipolipemiante muy importante.

La concentración de triglicéridos (también de colesterol) en el plasma de las ratas obesas Zucker era muy superior a la de las ratas delgadas en el estudio de Blay y colaboradores²²⁷. Hicieron una descripción cuantitativa y cualitativa de las diferentes fracciones lipoproteicas del plasma comparando ratas obesas (no diabéticas) y no obesas. Uno de los resultados más evidentes era la gran cantidad de triglicéridos en el plasma de las obesas que se acumulaban principalmente en los quilomicrones. Así, se incrementaba el número de quilomicrones y también su tamaño por un mayor contenido lipídico. También en las VLDL se producía un déficit relativo de apoproteína como en los quilomicrones debido al exceso de triglicéridos.

La acumulación de triglicéridos no sólo ocurre en el plasma de las ratas obesas. En el estudio anteriormente mencionado de Leonard y colaboradores²²³, analizaron la concentración de triglicéridos tanto en plasma como a nivel tisular (músculo, hígado y tejido adiposo) en ratas Zucker obesas y diabéticas, comparándola con la de un grupo de ratas Zucker pero no obesas. Como en los experimentos anteriores, básicamente, la cantidad de triglicéridos plasmáticos era muy superior en el grupo de las ZDF. Durante el “clamp” de la pinza “euglucémica-hiperinsulinémica” la cantidad de triglicéridos en plasma aumentaba en ambos grupos manteniendo diferencias significativas entre ellos; posteriormente, disminuían progresivamente de la misma forma.

A nivel tisular, observaron que también la cantidad de triglicéridos era muy superior en el grupo de ratas obesas y diabéticas. Se duplicaba en el corazón, aumentaba por cinco en hígado y por siete en el músculo esquelético. Paradójicamente no encontraron diferencias significativas en el tejido adiposo blanco entre uno y otro grupo. Una pequeña parte de esta acumulación de triglicéridos se debía a una mayor incorporación de glucosa a lípidos en los tejidos mencionados.

En nuestro experimento Telmisartán parece tener un efecto nulo sobre la cantidad de triglicéridos en plasma, con unos niveles similares al grupo vehículo. Sin embargo en el estudio de Brown antes mencionado, el tratamiento durante 14 días con el agonista selectivo PPAR γ GW1929, produjo un descenso significativo de la concentración de Triglicéridos en plasma (de 928 mg/dL del grupo vehículo a 121 mg/dL del tratado con dosis de 5 mg/Kg), con reducciones paralelas de NEFA y glucemia.

También Benson y colaboradores, observaron una disminución de triglicéridos y de glucemia, en un modelo de ratas con diabetes inducida por una dieta de alto contenido en

hidratos de carbono y grasa (ratas Sprague-Dawley) cuando se las trataba con Telmisartán a dosis de 5 mg/Kg durante 5 semanas.²²⁸

Desconocemos si el tratamiento crónico o a dosis mayores con el fármaco (que pudiera tener menor potencia que el experimental GW1929) produciría esas modificaciones en ratas ZDF, pero lo único que podemos decir es que así como el resultado de otras variables es esperable en este grupo (glucemia, albuminuria y quizá NEFA), los triglicéridos no muestran el descenso esperado.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA Y LA DISTRIBUCIÓN RELATIVA DE COLESTEROL EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 22. Concentración plasmática de colesterol medio

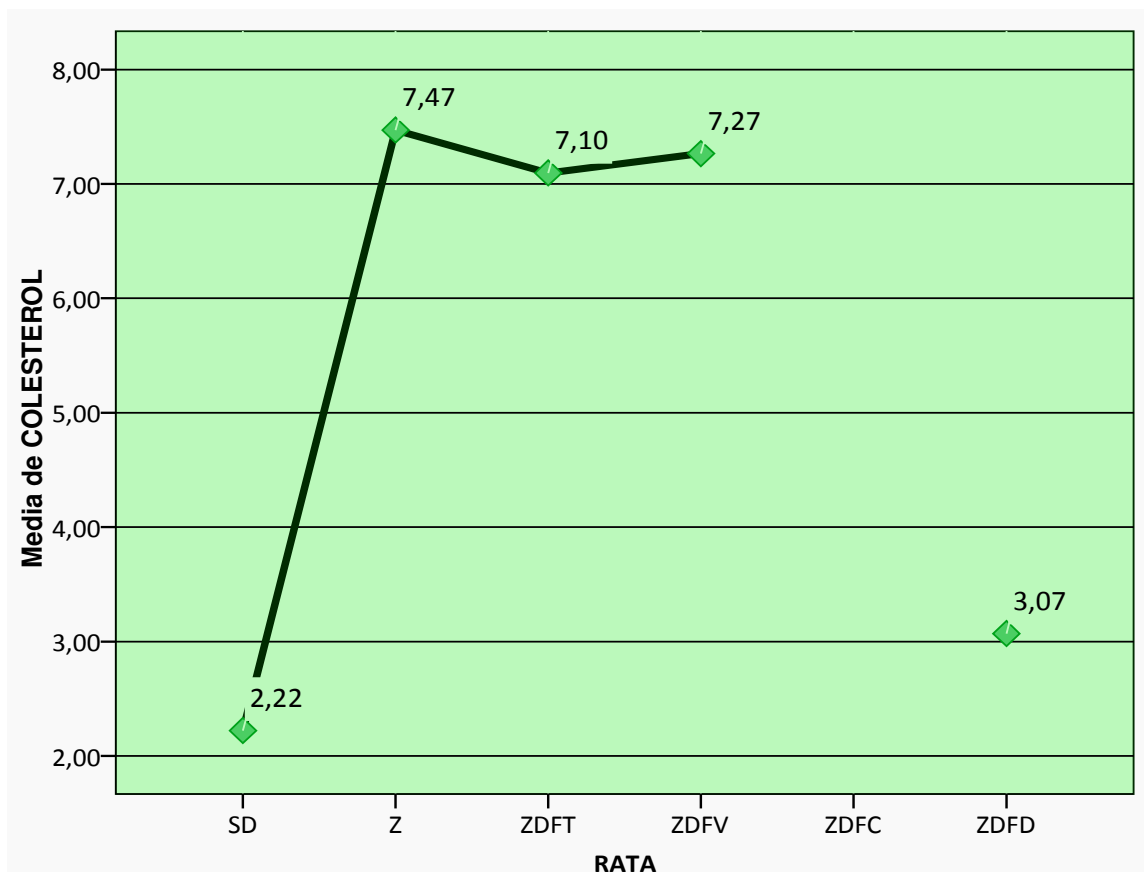


Tabla 12. Comparación de la concentración de colesterol plasmático

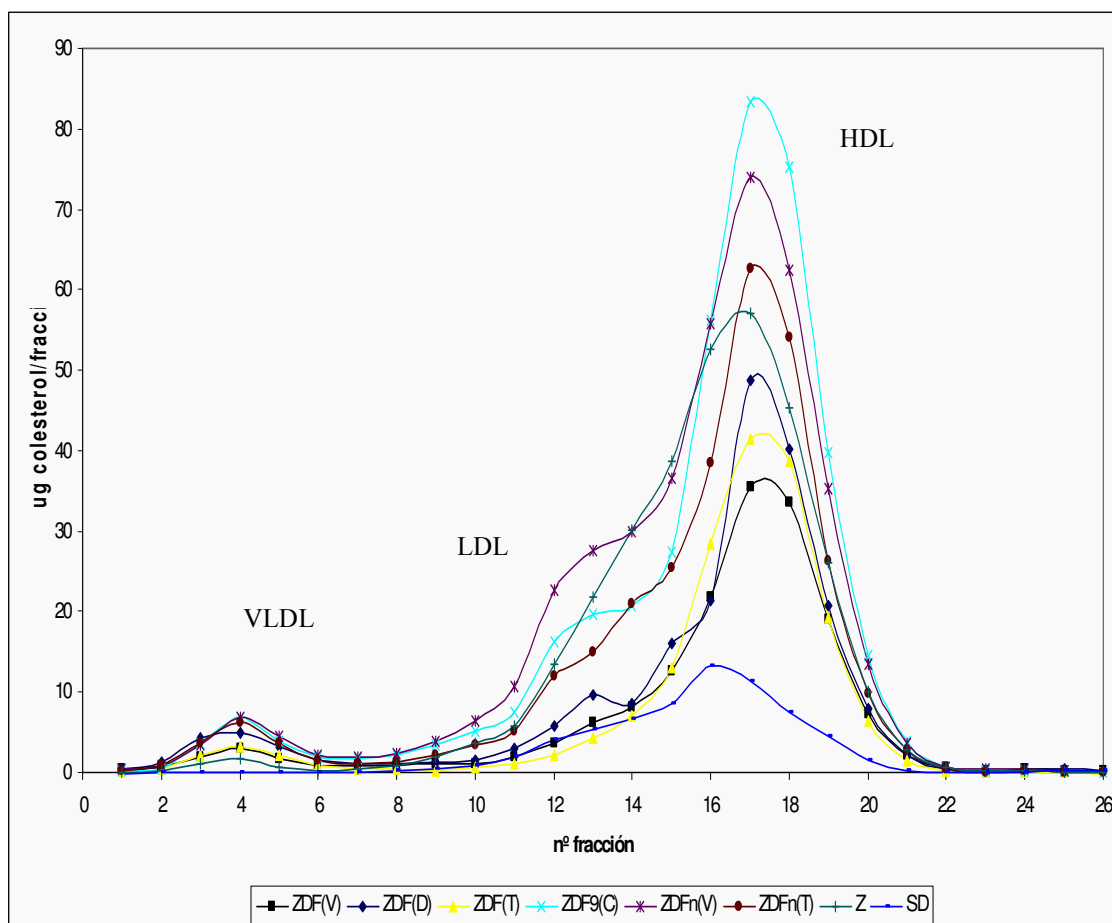
		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
COLESTEROL	SD	5	2,2	,62	1,50	3,01
	Z	5	7,4 ^{a,b}	,62	6,44	8,11
	ZDFT	8	7,1 ^a	3,19	3,97	13,14
	ZDFV	8	7,2 ^{a,b}	2,70	3,68	11,13
	ZDFD	8	3,1	,63	2,42	4,08
	Total	34	5,5	2,98	1,50	13,14

Los datos se muestran como medias (mmol/L), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en la concentración plasmática de colesterol en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus SD, ^b ZDFD)

El aumento del colesterol total también contribuye a la dislipidemia de las ratas ZDF, siendo una de sus características basales. Según analizaron Blay²²⁷ y colaboradores, la

hiperlipemia que mostraban las ratas Zucker obesas (significativamente mayor que las delgadas) se debía a la acumulación de Triglicéridos fundamentalmente en quilomicrones, y de colesterol total, que lo hacía aumentando en todas las fracciones lipoproteicas.

Figura 23. Perfiles FPLC representativos de colesterol en plasma



Distribución de la cantidad de colesterol en plasma en las diferentes fracciones lipoproteicas mediante el análisis por cromatografía líquida de muestras de plasma. Se observan diferencias en cantidad absoluta de colesterol entre grupos por ambas técnicas pero no diferencias en composición relativa de colesterol para la fracción de las HDL.

El grupo de Blay tampoco observó diferencias en la composición lipídica porcentual (aunque sí en el tamaño y la distribución de apoproteínas en las ratas obesas) entre las fracciones lipoproteicas.

Las ratas SD de nuestro estudio son las que presentan las concentraciones de colesterol más bajas, significativamente inferiores a las ratas obesas que no se encuentran en tratamiento dietético, independientemente de que sean diabéticas o no. Es interesante remarcar la precocidad con la que la dieta hipocalórica administrada consigue reducir la

concentración de colesterol total a cifras similares a las del grupo de ratas delgadas. También en el trabajo de Clark y Palmer el grupo de ratas ZDF con dieta restrictiva mostraba niveles de colesterol y triglicéridos muy inferiores a las obesas (no había grupo ZDF control), aunque ligeramente superiores a las ratas delgadas, como en nuestro caso.

La concentración de colesterol total en el plasma de las ratas del estudio de Corsetti y colaboradores²²⁴ aumentaba progresivamente a lo largo de las 19 semanas de estudio, más cuanto mayor era el contenido en grasa de la dieta, de una forma paralela a la disminución de insulina y el desarrollo de hiperglucemia. Mientras, los triglicéridos se mantenían constantes hasta la semana 19, cuando aumentaban de forma brusca, también más cuanto mayor era el contenido en grasa.

Ya hemos visto cómo la respuesta a la dieta rica en aceite de pescado fue una disminución de la concentración de triglicéridos, pero sin embargo, ocurría lo contrario con el colesterol, que ya basalmente mostraba una concentración dos veces superior que el grupo de ratas delgadas, y además aumentaba en el grupo de ratas obesas que recibían ese tipo de dieta. En nuestro caso la dieta es hipocalórica sin cambiar el tipo de grasa con respecto a la dieta basal, sólo su cantidad.

El hecho que el resultado del grupo de Telmisartán no sea significativo respecto a la dieta, puede ser efecto del fármaco pero no podemos decir en qué sentido. Parece que la tendencia es a que se comporte como los grupos Z y ZDFV, pero no sabemos si en grupos más grandes de ratas y/o de mayor edad podría tener efecto hipolipemiante con respecto al colesterol total.

La adición de un agonista PPAR γ como la Rosiglitazona desde las 6 semanas de edad (grupo prevención) a las ratas obesas diabéticas hacía disminuir de forma significativa las concentraciones de triglicéridos y colesterol analizadas a las 31 semanas frente a los grupos de ratas control y tratamiento (este recibía Rosiglitazona a partir de las 24 semanas de edad)²¹⁶. El descenso de la concentración de colesterol del grupo prevención, fue significativo pero todavía persistía más elevado que en el grupo de ratas delgadas.

En nuestro caso, no podemos asegurar que Telmisartán tenga efecto nulo como ocurría para los Triglicéridos, o si bien, como otros agonistas PPAR γ , reduce el colesterol si el tratamiento se prolonga durante más tiempo.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HDL-COLESTEROL EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 24. Concentración plasmática de HDL-colesterol

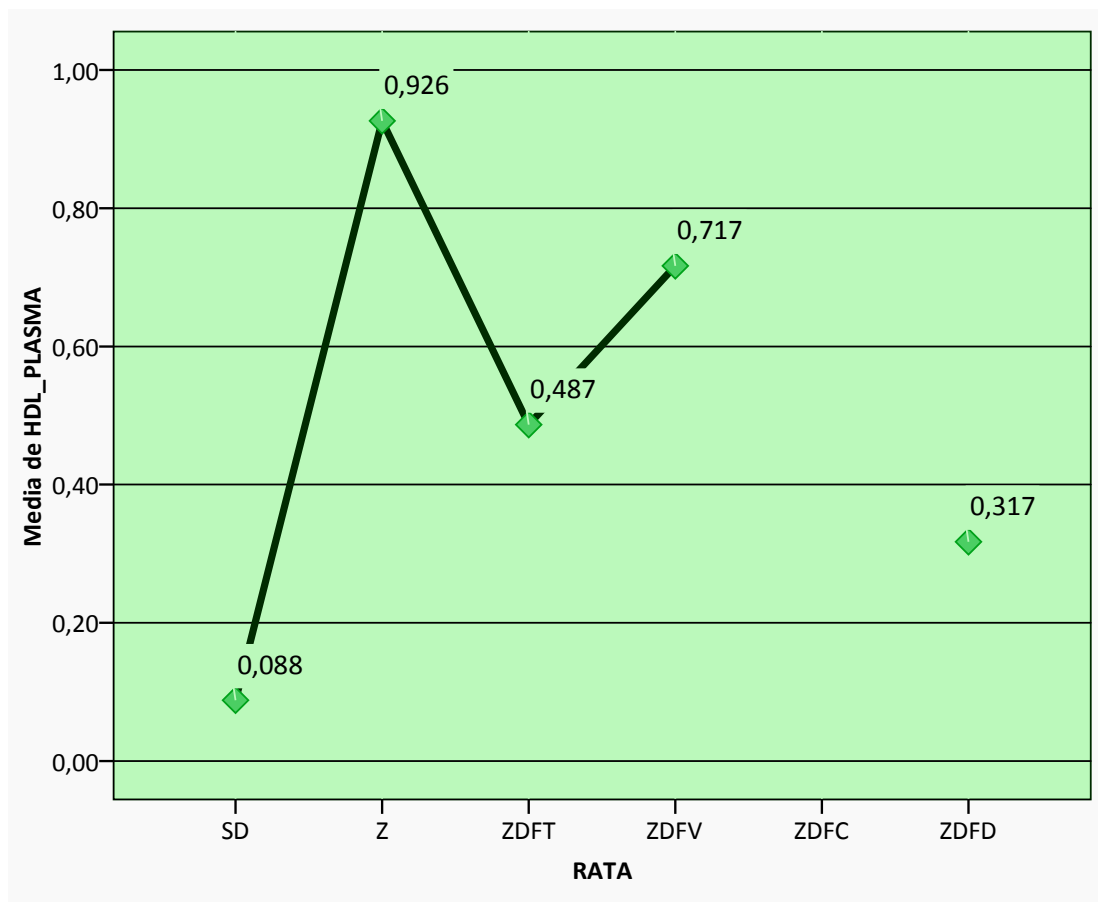


Tabla 13. Comparación de la concentración plasmática de HDL-colesterol

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
HDL_PLASMA	SD	5	,08	,087	,03	,24
	Z	5	,92 ^a	,26	,54	1,27
	ZDFT	8	,48 ^a	,19	,14	,72
	ZDFV	8	,71 ^a	,40	,14	1,37
	ZDFD	8	,31 ^a	,074	,24	,45
	Total	34	,50	,35	,03	1,37

Los datos se muestran como medias (mmol/L), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas en la concentración plasmática de HDL-colesterol en función de los distintos tratamientos, $p < 0.05$ (^a versus SD)

Era de esperar que esta variable fuese muy similar a la del colesterol total, teniendo en cuenta que en ratas, la mayoría del colesterol en plasma se transporta en partículas de HDL. Así el grupo SD muestra la concentración menor con diferencias significativas respecto al resto,

y el grupo de las ZDF que recibe una dieta hipocalórica experimenta un descenso importante de HDL-colesterol comparado con los grupos de ratas obesas y obesas-diabéticas que se alimentan sin restricciones. El grupo de Telmisartán parece que se asemeja más al de la dieta que en las variables Triglicéridos y colesterol, como por otra parte era de esperar inicialmente.

Sparks y colaboradores²²⁹ estudiaron las anomalías en los parámetros lipídicos, lipoproteínas y apoproteínas en ratas ZDF de forma basal, en dos momentos de la evolución de la diabetes como ocurre en humanos (a las 10 semanas – hiperglucemia e hiperinsulinemia- y a las 20 semanas – hiperglucemia insulínopénica-), y también tras tratamiento con insulina, en dos estudios diferentes.

Al igual que otros, observaron que a lo largo de la evolución de la diabetes asociada a la obesidad (hacia la hiperglucemia franca y la disminución progresiva de insulina) aumentaba la concentración de todos los parámetros lipídicos y apoproteínas, con cambios en las composiciones relativas de las diferentes fracciones lipoproteicas. Existía un marcado aumento de los triglicéridos desde el inicio y tanto los ácidos grasos como el colesterol sérico se incrementaban principalmente a partir de la semana 10 de edad frente a un grupo control de ratas delgadas. A las 10 semanas, LDL y HDL eran similares en ambos grupos, con un aumento significativo a partir de entonces en las ratas obesas y diabéticas, mientras que la fracción VLDL ya se encontraba significativamente elevada en la semana 10. Así, la hiperlipemia de la fase hiperinsulinémica de las ratas ZDF era debida predominantemente a cambios en las lipoproteínas ricas en Triglicéridos (VLDL) con ligeros cambios en el resto de fracciones, y el aumento de las LDL y HDL se producía en la fase insulínopénica de los animales de 20 semanas, a expensas de un aumento del colesterol asociado a estas lipoproteínas.

En nuestro caso, el análisis en la semana 19, muestra esto en las ratas que no reciben ningún tipo de intervención, un marcado incremento de HDL-colesterol frente a ratas delgadas. La disminución en el grupo de intervención con dieta hipolipemiante va en consonancia con los resultados previos de colesterol total; a menor contenido en grasa de la dieta, menor es la cantidad de colesterol y HDL-colesterol en plasma.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA) EN LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES

Figura 25. Concentración plasmática de NEFA

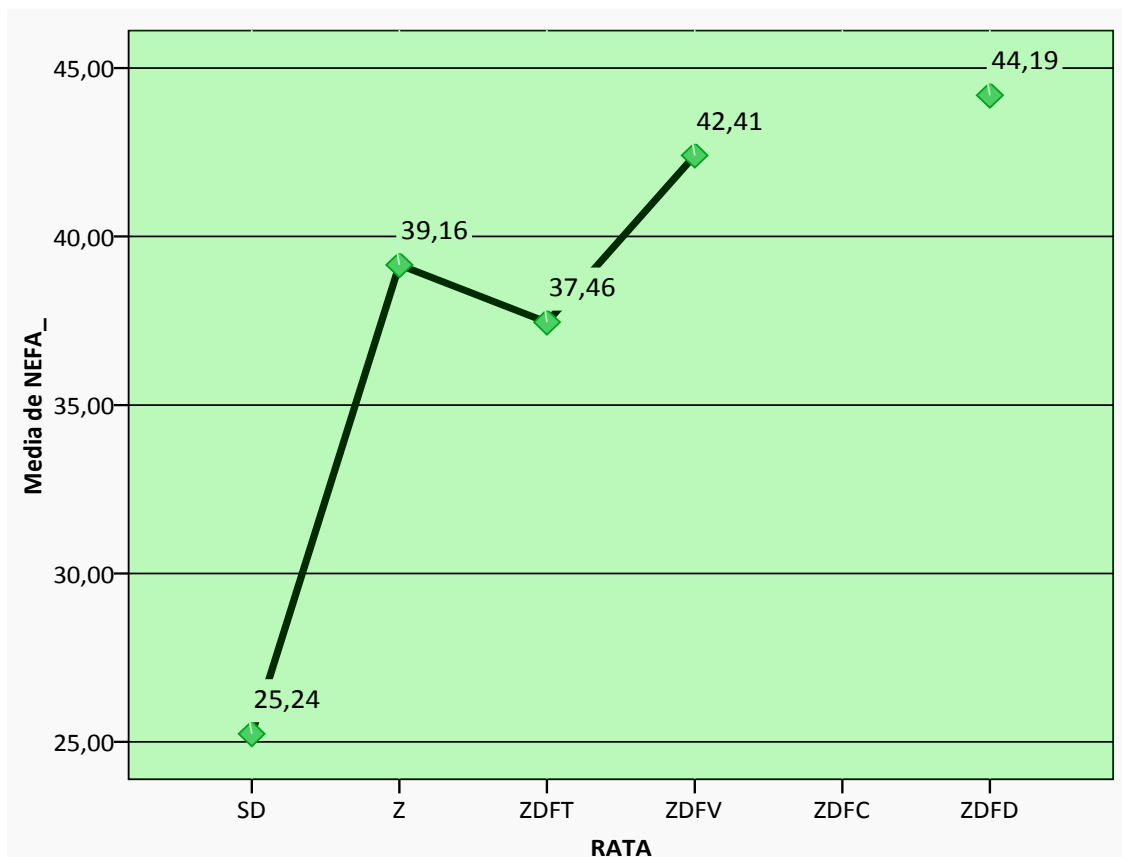


Tabla 14. Comparación de la concentración de NEFA plasmáticos

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
NEFA_	SD	5	25,24	3,24	21,95	29,75
	Z	5	39,15	8,27	30,08	49,01
	ZDFT	8	37,45	16,72	15,24	62,04
	ZDFV	8	42,41	20,01	14,18	65,14
	ZDFD	8	44,19	6,15	35,52	52,16
	Total	34	38,66	14,15	14,18	65,14

Los datos se muestran como medias (mg/dL), desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. No existen diferencias significativas en la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en función de los distintos tratamientos.

Las ratas obesas Zücker, diabéticas o no, presentan niveles más elevados de NEFA en plasma, independientemente de dieta o tratamiento farmacológico, que el grupo de ratas delgadas. Quizá era de esperar que las ratas diabéticas y obesas tuvieran niveles superiores a

las que sólo son obesas dada la estrecha relación entre NEFA y resistencia a la insulina. También, que la dieta tuviera un efecto más evidente sobre la concentración de NEFA. El grupo de intervención farmacológica con Telmisartán parece que sí muestra una tendencia hacia una ligera disminución de la concentración de NEFA, como en el estudio de Benson y colaboradores.

Los niveles basales de ácidos grasos en plasma de ratas Zucker obesas y diabéticas en el estudio de Leonard y colaboradores²²³ eran superiores a los del grupo control de ratas delgadas. Durante la infusión de insulina y glucosa se producía un descenso significativo de los NEFA en el grupo de las delgadas y sin embargo se mantenían constantes sin apenas cambios en el grupo de las ZDF.

El incremento de NEFA plasmáticos basales es uno de los factores que disminuyen la acción de la insulina y la captación tisular periférica de glucosa por el músculo, así como la tasa de extracción de glucosa hepática²³⁰. La ausencia de modificación de la concentración de NEFA en el grupo de obesas diabéticas durante la infusión glucosa/insulina refleja la incapacidad de la insulina para suprimir la lipólisis del tejido adiposo.

En el estudio de Clark y colaboradores²²², la concentración de ácidos grasos en plasma era significativamente superior en los grupos de obesas y obesas-diabéticas con dieta frente a los grupos delgadas y obesas con dieta. En tejido hepático, sin embargo, no se observaban esas diferencias y los grupos mostraban concentraciones de ácidos grasos similares. No se hizo ningún grupo de seguimiento de ratas obesas y diabéticas sin intervención dietética bien como control o con vehículo.

En ambos estudios se cumple que el grupo de ratas delgadas (si bien no eran ratas Sprague-Dawley) muestra concentraciones en plasma y en tejido inferiores a los grupos de obesas y diabéticas, tanto de forma basal como tras estimulación con glucosa e insulina. En el grupo de sólo obesidad del experimento de Clark, la dieta reduce significativamente la concentración de NEFA, mientras que en las obesas que además padecen diabetes no tiene ese efecto (aunque no podemos comparar con un grupo ZDF sin dieta).

También en nuestro estudio la concentración de ácidos grasos es menor en las delgadas, y parece que la dieta tiene un efecto nulo sobre la cantidad de NEFA circulantes en las ratas obesas diabéticas.

En el estudio de Upton y colaboradores²⁰¹, las ratas Zucker obesas y diabéticas, así como las Zucker obesas, en tratamiento durante 3 semanas con una tiazolidinediona (MC-555) experimentaron una significativa mejoría de su sensibilidad a la insulina. La concentración de NEFA disminuyó significativamente en ambos grupos y en el grupo de las obesas, incluso los redujo por debajo de los valores plasmáticos basales de las ratas delgadas tratadas con vehículo. Este efecto hipolipemiante estaba en relación con la acción del fármaco sobre PPAR γ , incrementando la expresión de genes que codifican enzimas reguladoras de la lipólisis en el tejido adiposo.

El grupo de Oakes diseñó un estudio dinámico del metabolismo lipídico²³¹. Utilizaron ratas delgadas, obesas, y obesas en tratamiento con dos fármacos con efecto PPAR γ (rosiglitazona a dosis de 1 o 10 $\mu\text{mol/Kg/día}$; y darglitazona con una potencia similar a dosis altas de la rosiglitazona). Estudiaron la producción de VLDL/triglicéridos en el hígado, su aclaramiento, y la movilización y el destino de los ácidos grasos del plasma. En las ratas obesas sin tratamiento se observaba mayor disponibilidad sistémica de ácidos grasos, con niveles en plasma más elevados y mayor tasa de movilización que en el grupo de ratas delgadas. A diferencia de otros, el tratamiento con tiazolidinedionas incrementó esa disponibilidad de ácidos grasos, principalmente a expensas de una mayor movilización. Las TZD aumentaban el aclaramiento de los ácidos grasos en plasma, pero también la tasa de aparición, y así la concentración de NEFA en el plasma del grupo con TZD no disminuía como ocurría en otros experimentos.

En nuestro caso ya se ha comentado que el grupo de ratas obesas presentan más NEFA en plasma que las delgadas, y por el contrario a este estudio (aunque en consonancia con otros), el Telmisartán provoca un descenso de esa concentración, posiblemente con ese balance aclaramiento/aparición de NEFA.

DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE APOLIPOPROTEÍNA PLASMÁTICA Y DE LA CANTIDAD DE RNAm EN TEJIDO HEPÁTICO DE APO AI y APO AIV

APO AI EN PLASMA

Figura 26. Medias de Apo AI en plasma

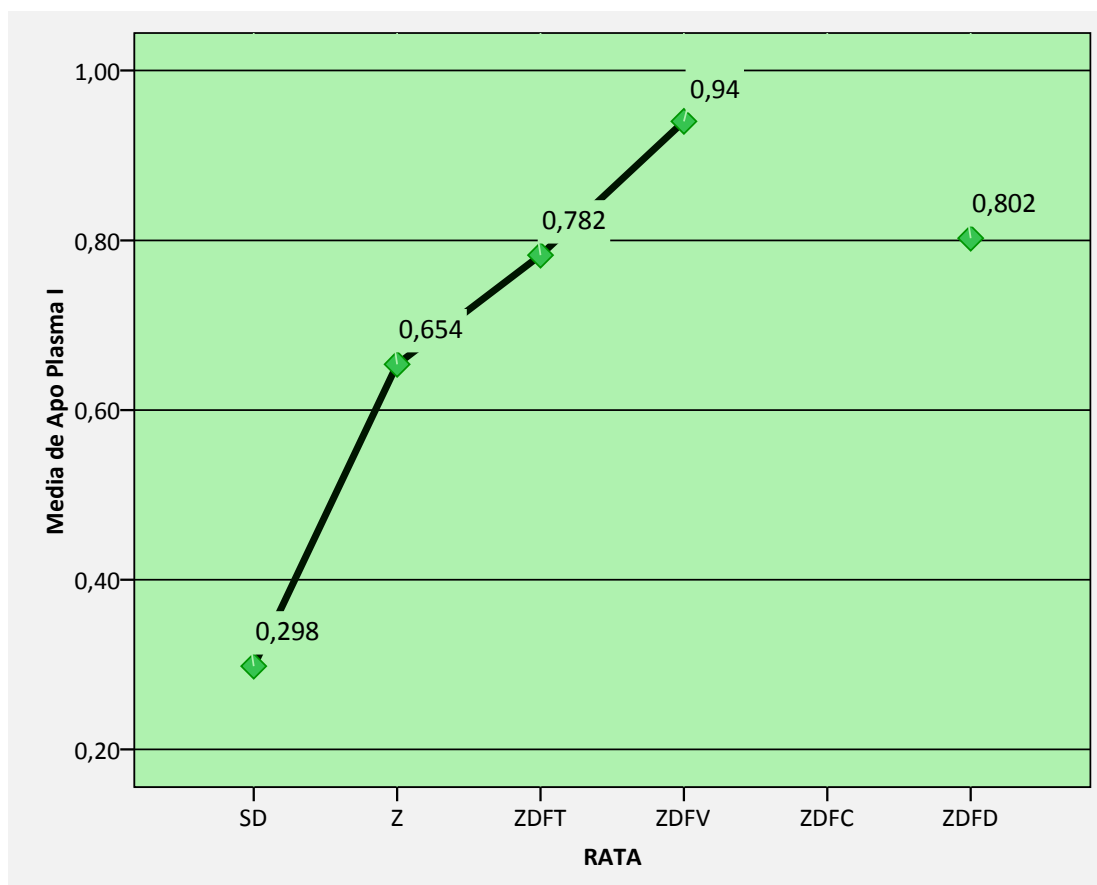


Tabla 15. Cantidad de Apo AI en plasma

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Apo AI	SD	5	,29	,07	,18	,37
	Z	5	,65 ^a	,03	,61	,70
	ZDFT	8	,78 ^a	,14	,48	,92
	ZDFV	8	,94 ^{a,b}	,14	,76	1,17
	ZDFD	8	,80 ^{a,b}	,06	,72	,88
Total		34	,73	,22	,18	1,17

Los datos se muestran como medias, desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas entre los grupos experimentales, $p < 0,05$ (^aversus SD, ^b versus Z)

En nuestro estudio obesidad y diabetes parecen tener un efecto sumatorio para determinar la cantidad de Apo AI en plasma: las ratas delgadas del grupo SD tienen cantidades de apoproteína en plasma significativamente inferiores a todas las obesas, y las ratas del grupo

Z, únicamente obesas, también inferiores respecto a las ZDF, obesas y diabéticas, aunque sólo son significativas las diferencias frente a los grupos vehículo y dieta. En el caso de las ZDF, no se observan diferencias entre las ratas con o sin tratamiento del tipo que sea. Quizás se pueda sugerir que la tendencia de alguno de ellos (en este caso el grupo vehículo, con mayor cantidad) sea hacia diferencias más importantes con el resto.

No existen estudios en ratas ZDF como el que presentamos, que analicen en profundidad la cantidad y la expresión de Apo AI en las condiciones en las que lo hacemos (bajo tratamiento con dieta o con fármacos agonistas PPAR γ) en relación con capacidad antioxidante de HDL y la aparición de microalbuminuria como marcador de daño vascular.

En relación a las diferencias que observamos entre el grupo SD y el grupo de ratas Zucker no diabéticas, otros como Blay-Peinado o Schonfeld y colaboradores, también habían descrito ese aumento en Apo AI sérica entre fenotipos delgados y obesos²³². En el segundo caso, el incremento del nivel de Apo AI en plasma era hasta cuatro veces mayor, pero sin embargo la tasa de secreción hepática era similar entre las ratas obesas y las delgadas, sugiriendo un papel muy importante del intestino en ese incremento de la cantidad de apoproteína circulante.

En el estudio de Sparks y colaboradores la cantidad global y el contenido relativo de algunas apoproteínas sufría modificaciones en los diferentes grupos²²⁹. Mientras que en las delgadas la mitad de la Apo E sérica se encontraba en las HDL (el resto entre VLDL y LDL a partes similares), a las 10 semanas el 75% de esa apoproteína se asociaba a VLDL y sólo un 8% a HDL, volviendo a algo menos del 20% a las 20 semanas de edad (40% en VLDL y algo más en LDL). En cuanto a Apo C dos tercios aproximadamente estaba presente en las HDL en el grupo de las delgadas, con una distribución totalmente diferente en las ZDF que pasaban de un 37% a valores similares al grupo delgado durante esas 20 semanas por traslocación desde las VLDL. El contenido en suero de Apo AI se debía principalmente a la cantidad asociada a las HDL, y lo hacía en todos los grupos de forma similar (90% aprox. tanto en delgadas, como en ZDF de 10 y 20 semanas).

De forma global se observaba un incremento de la cantidad de Apo B y Apo C respecto a las ratas delgadas. Los cambios específicos que ocurrían en las ZDF entre las 10 (estado hiperinsulinémico) y las 20 semanas (estado insulino pénico) incluían un aumento significativo de Apo B100, un ligero déficit relativo de Apo E (el incremento en el grupo de las delgadas era algo mayor que en las ZDF) y un marcado incremento tanto de Apo AIV como de Apo AI, como ocurre en nuestro modelo.

Cuando, en otro estudio, hicieron un grupo de ZDF tratadas con insulina, observaron que ese marcado incremento de HDL y Apo AI a las 20 semanas, se producía sólo en las que no recibían tratamiento²³³.

En ratas Sprague-Dawley, Murao y colaboradores habían observado que glucosa e insulina tenían efectos antagónicos sobre el promotor hepático del gen de Apo AI: la glucosa disminuía y la insulina aumentaba la actividad del promotor de Apo AI in vitro, y la acción combinada de ambos (se conseguía un estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia sin otros trastornos metabólicos añadidos, alimentando a ratas SD con una dieta rica en fructosa) conseguía aumentar tanto a nivel de Apo AI RNAm como a nivel de proteína (la insulina activa el promotor y además es hipoglucemiante).

Así, en nuestras ratas ZDF de 19 semanas era de esperar que la hiperglucemia y la falta de insulina resultaran en una disminución de Apo AI y no lo contrario. Aunque no disponemos de un modelo hiperglucémico/hiperinsulinémico para comparar. De momento conocemos que el rasgo “diabetes” genera un aumento de Apo AI en plasma frente a ratas delgadas o sólo obesas en consonancia con los primeros estudios mencionados de Blay-Peinado o Sparks.

Destacar también el hecho de que estas diferencias entre Zucker y Zucker diabéticas no se dan para la variable HDL, sugiriendo la posibilidad de que el incremento de HDL en Zucker se deba a cambios en la composición relativa de otras apoproteínas, o que el aumento de Apo AI en plasma de las Zucker diabéticas se deba a la traslocación de ese aumento de apo a otras lipoproteínas por cambios en la contribución del intestino a esa cantidad circulante total.

Apo AI es la proteína estructural fundamental de las HDL, con un papel muy relevante en todas las etapas del metabolismo de esta lipoproteína. Es el aceptor de fosfolípidos y colesterol, cofactor enzimático en su maduración, y ligando de receptores que median en la captación de ésteres de colesterol por el hígado y los órganos que sintetizan hormonas esteroideas. El déficit de Apo AI se asocia con deficiencia de HDL, así como la sobreexpresión da lugar a un incremento de HDL capaz de prevenir la arteriosclerosis en modelos animales predispuestos a ello²³⁴.

Es un factor decisivo en la capacidad antioxidante de las HDL demostrado tanto in vivo como in vitro. El grupo de Navab y colaboradores^{241,242} observó en cultivo de células de la pared arterial, que Apo AI era capaz de retirar moléculas “semilla” de las partículas de LDL y hacerlas resistentes a la oxidación. Cuando se añadía LDL al sistema de cultivo, quedaba

atrapada en el espacio subendotelial, produciéndose fosfolípidos oxidados que estimulaban la respuesta inflamatoria. Tras dos horas de incubación con Apo AI se observaba que LDL en contacto con el cultivo no se oxidaba. Ocurría lo mismo in vivo tanto en ratones como en humanos, a los que se les administraba Apo AI. Se incubaban las muestras de LDL en el cocultivo de células de la pared arterial a las pocas horas de la infusión de Apo AI, y se observaba su resistencia a la oxidación.

En nuestro estudio, observamos que los grupos de ratas diabéticas son las que presentan unos niveles plasmáticos más elevados de Apo AI, sin que se aprecien diferencias importantes en los grupos de intervención farmacológica o dietética (existe un ligero aumento de la cantidad de apoproteína en el grupo vehículo). Sin embargo, si son importantes las diferencias en la capacidad antioxidante de las HDL de esos grupos como se observa en la menor fluorescencia que genera el grupo de ratas con dieta en el ensayo con DCF. Otros factores como las enzimas PON, PAF-AH... se han implicado en la protección antioxidante y frente al daño vascular de las HDL y no han sido determinadas en nuestro estudio.

No sólo la señal fluorescente del ensayo con DCF es menor, sino que también lo es la cantidad de albúmina que se encuentra en la orina del grupo de ratas con tratamiento dietético, sugiriendo un papel protector a nivel vascular (a pesar de que el grupo con mayor cantidad de Apo AI en plasma es el vehículo).

La implicación de otras enzimas y otros mecanismos no relacionados con la oxidación de las LDL podría explicar la menor albuminuria del grupo de Telmisartán, aún no mostrando una clara diferencia en su señal de DCF respecto al grupo vehículo.

Por otra parte la menor cantidad de Apo AI en el grupo SD, no implica mayor daño vascular, porque además de un perfil lipídico menos aterogénico, se observó que ratones deficientes en Apo AI no tienen una susceptibilidad aumentada a la arteriosclerosis ni siquiera cuando son alimentados con dieta rica en grasa, sugiriendo la necesidad de un segundo factor predisponente²³⁵.

Figura 27. Expresión hepática de RNAm Apo AI

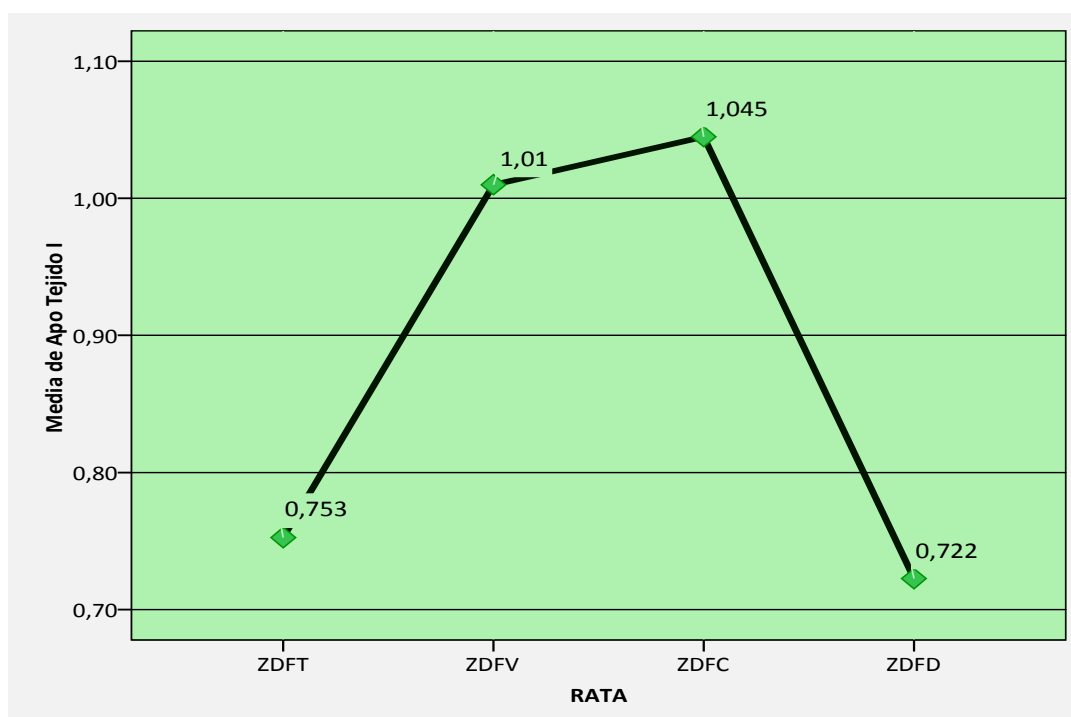


Tabla 16. Determinación de la expresión de RNAm Apo AI

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Apo AI Tejido	ZDFT	8	,75	,19	,55	1,07
	ZDFV	8	1,01	,42	,66	1,96
	ZDFC	4	1,04	,32	,58	1,30
	ZDFD	8	,72	,31	,30	1,28
	Total	28	,85	,33	,30	1,96

Los datos se muestran como medias, desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. No existen diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales para $p < 0,05$

Para valorar el origen de las pequeñas diferencias (hay algo menos en T-D que en V) que observamos en la cantidad de apoproteína en plasma, se midió la expresión hepática de Apo AI mediante Real Time PCR. Para el análisis de la expresión génica y la cuantificación de RNAm recuperamos todos los grupos de ratas obesas y diabéticas y nos centramos en la influencia de la dieta y el tratamiento con Telmisartán sobre estas apoproteínas.

El análisis de Apo AI muestra diferencias entre grupos, aunque no alcanzan la significación estadística. Aún así parece que la tendencia de los grupos tratamiento (bien dietético o farmacológico) es a tener una cantidad celular de Apo AI inferior a los grupos que

no reciben intervención (vehículo o sólo control), como ocurría en la cantidad de proteína en plasma aunque de forma menos marcada.

Se ha mencionado ya el estudio de Murao sobre la actividad del promotor de Apo AI frente a insulina y glucosa, in vitro, y en un modelo de rata con hiperglucemia e hiperinsulinemia (ratas SD alimentadas con dieta rica en fructosa). Aunque no se ha determinado la cantidad de insulina en plasma, por datos indirectos y por similitud de nuestro modelo con otros, las ratas ZDF a las 19 semanas son, además de insulínopénicas, resistentes a la acción de la insulina. Así, sería de esperar que las ratas vehículo y control expresaran menos el gen de Apo AI. Sin embargo, en caso de que las diferencias en nuestro estudio sean ciertas, la tendencia parece ser la contraria. In vitro es cierto que la glucosa y la insulina realizan acciones contrarias, mientras que in vivo en el modelo de Murao, la hiperglucemia/hiperinsulinemia resulta en un incremento neto de Apo AI. No conocemos, pues, el efecto in vivo sobre el promotor del gen de Apo AI, de un modelo con hiperglucemia/insulinopenia como son nuestras ZDF a las 19 semanas que además exhiben una serie de alteraciones metabólicas variadas del metabolismo lipídico/lipoproteico.

Además carecemos de datos suficientes, en relación a nuestros resultados, para sugerir que las pequeñas diferencias en la cuantificación de RNAm de Apo AI son una tendencia hacia lo significativo; o bien asumir que no existen diferencias entre grupos.

APO AIV EN PLASMA

Figura 28. Medias de Apo AIV en plasma

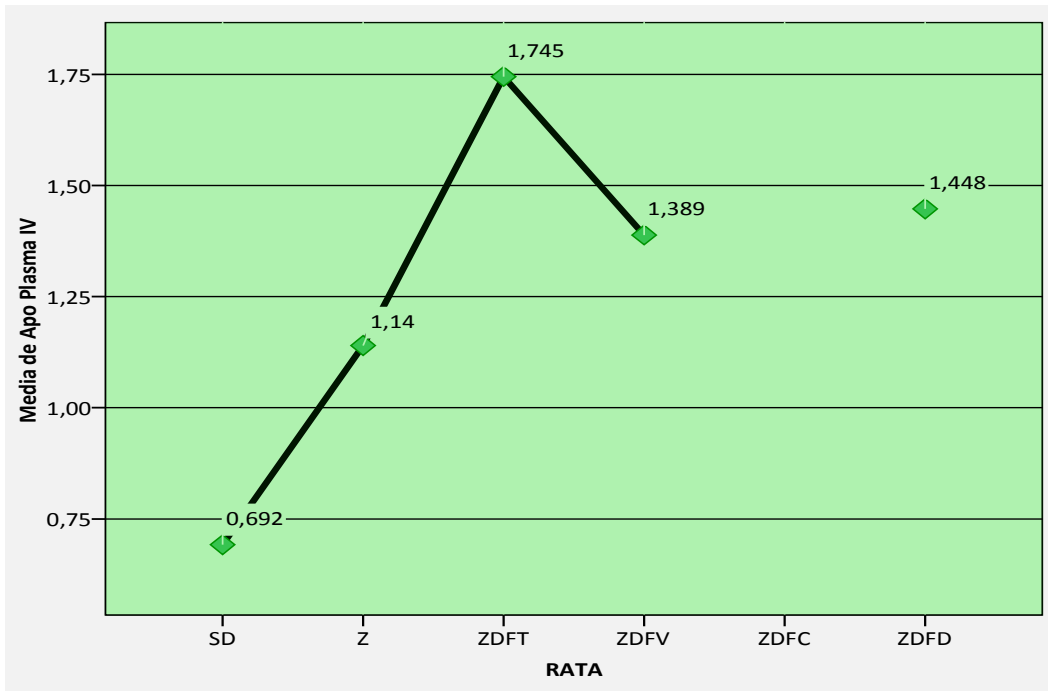


Tabla 17. Determinación de Apo AIV en plasma

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Apo AIV	SD	5	,69	,31	,15	,89
	Z	5	1,14	,10	1,00	1,29
	ZDFT	8	1,74 ^{a,b}	,32	1,26	2,10
	ZDFV	8	1,38 ^a	,23	,87	1,60
	ZDFD	8	1,44 ^{a,b}	,15	1,19	1,71
Total		34	1,34	,40	,15	2,10

Los datos se muestran como medias, desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. Existen diferencias significativas entre los diferentes grupos, para $p < 0,05$ (^a versus SD, ^b versus Z)

Los grupos de ratas no diabéticas muestran menor cantidad de Apo AIV en plasma que el resto (son significativas las diferencias de SD frente a todas las demás, y las diferencias de Z frente a los grupos obesas y diabéticas que reciben intervención farmacológica o dietéticas); además las delgadas también tienen menor cantidad de esa apoproteína en plasma respecto a las obesas no diabéticas.

Entre las ratas obesas y diabéticas hay ligeras diferencias entre los grupos, y, aunque no con suficiente potencia estadística, sí que la tendencia del grupo tratado con Telmisartán (mayor cantidad de apoproteína) frente al grupo vehículo sugiere que esas diferencias sean reales. El grupo tratado con dieta se comporta de una manera similar al vehículo aunque las diferencias que existen no permiten extraer ninguna conclusión a ese respecto salvo hipótesis.

EXPRESIÓN HEPÁTICA DE RNAm DE APO AIV

Figura 29. Expresión hepática de Apo AIV

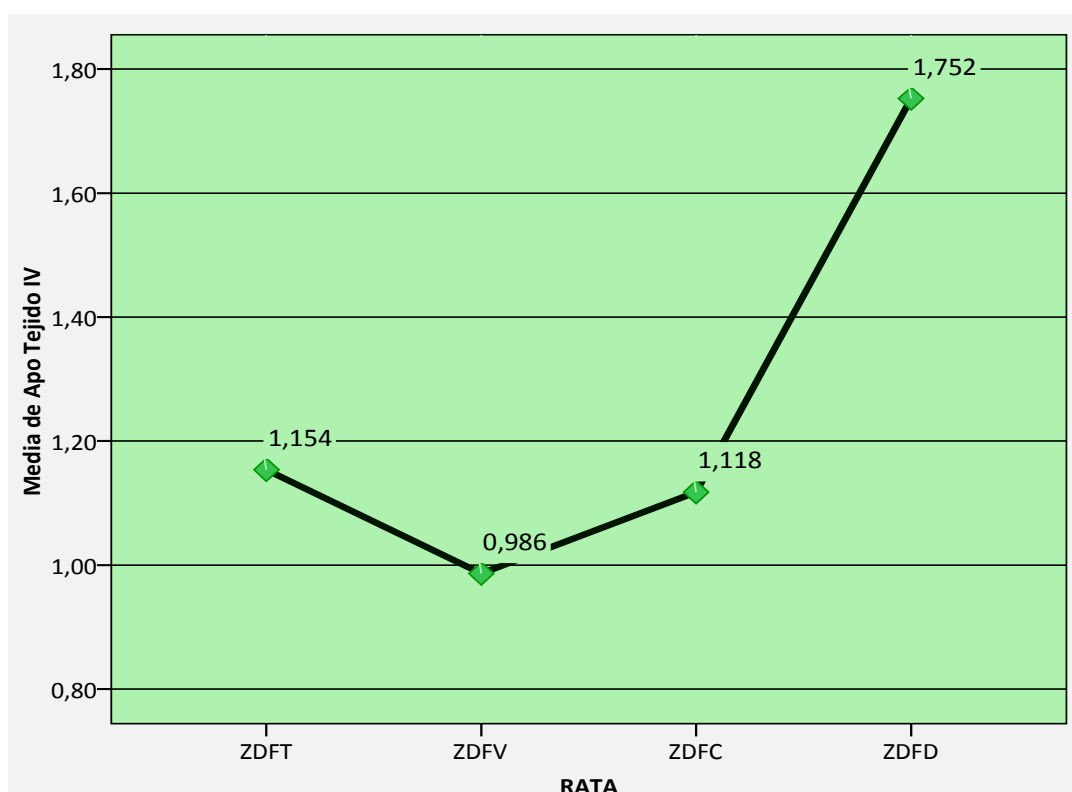


Tabla 18. Expresión de RNAm de Apo AIV

		N	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Apo AIV	ZDFT	8	1,15	,76	,30	2,12
	ZDFV	8	,98	,59	,31	2,15
	ZDFC	4	1,11	,61	,60	1,95
	ZDFD	8	1,75	,66	1,30	3,14
	Total	28	1,27	,70	,30	3,14

Los datos se muestran como medias, desviación típica y valores mínimo y máximo. Se utilizó el test de Brown-Forsythe como prueba robusta de igualdad de varianzas y la prueba post-hoc de Tamhane de comparaciones múltiples. No existen diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales para $p < 0,05$

Recuperando el grupo control y centrándonos en las ZDF, como ocurría con Apo AI, tampoco las diferencias son significativas, aunque sí que el resultado en las ratas con dieta controlada parece tener una tendencia diferenciada con respecto a los otros tres grupos de ratas obesas y diabéticas.

La cantidad de RNA de Apo AIV celular global en el grupo ZDFD es superior a los demás, de forma inversa a lo que ocurría con Apo AI. Además en plasma las diferencias eran pequeñas, y en todo caso, la cantidad de Apo AIV circulante era inferior al grupo ZDFT y muy similar al grupo ZDFV. También, el grupo de Telmisartán también parece tener resultados

inversos en cuanto a cantidad de RNA de Apo AIV y proteína circulante respecto al grupo vehículo. Menos Apo AIV en plasma que ZDFV pero más a nivel de RNA celular; ambas cantidades, eso sí, sólo ligeramente diferentes.

No existen muchos estudios sobre estas apoproteínas en ratas Zucker diabéticas, ni descriptivos ni en los que se hayan comparado estrategias terapéuticas y su relación con otros parámetros importantes del metabolismo lipídico.

Strobl y colaboradores²³⁶ estudiaron la regulación de la expresión del gen de Apo AIV por factores genéticos y nutricionales. Determinaron la cantidad nuclear y celular total de RNAm de Apo AIV en hígados de ratas Zucker obesas (no diabéticas) frente a ratas Zucker sin obesidad genética (Fa/-) no hiperlipémicas. También estudiaron la transcripción del gen Apo AIV, en un modelo experimental en el que se modificaba la dieta de los animales: una dieta habitual frente a una enriquecida con aceite de pescado y otra enriquecida en sacarosa. Observaron que, basalmente, sin intervenciones dietéticas, los niveles de RNAm de Apo AIV en el hígado de ratas Zucker obesas eran muy superiores a los de las no obesas como ya habían mostrado otros²³⁷. Entre las ratas con dieta habitual la cantidad de RNAm a nivel hepatocelular era al menos el doble en los animales obesos que en los delgados. Para determinar a qué nivel de la expresión génica se incrementaba la expresión de Apo AIV en las ratas Zucker obesas, midieron la transcripción del gen aisladamente en el núcleo celular de los hepatocitos, observando que no existían diferencias entre ambos grupos de ratas. Así, serían mecanismos postranscripcionales los responsables de esa mayor cantidad de RNAm de Apo AIV en el grupo de las obesas: bien por estabilización postranscripcional o bien por un más eficiente procesado (o ambos) de un transcrito primario de RNAm en el núcleo de los hepatocitos de las obesas; ya que la tasa de transcripción nuclear era similar a las no obesas, pero sin embargo existía más RNAm en el citoplasma de las obesas.

La expresión hepática de Apo AIV está sujeta a regulación dietética. Una dieta rica en sacarosa incrementó la producción de Triglicéridos en el hígado y reguló positivamente la transcripción hepática de RNAm de Apo AIV²³⁸, mientras que una dieta rica en aceite de pescado redujo la producción de Triglicéridos y la transcripción de Apo AIV en cultivos de hepatocitos²³⁹.

En el estudio de Strobl, en el caso de la dieta rica en aceite de pescado se observó una reducción de la transcripción génica de RNAm en las ratas delgadas pero no se produjo ningún cambio en las genéticamente obesas, sugiriendo que la obesidad genética alteraba la influencia de la dieta en la regulación génica de estas apoproteínas. Los resultados que

obtuvieron en el grupo de ratas delgadas eran consistentes con otros trabajos. Obtuvieron resultados similares in vivo, con una menor abundancia de RNAm ApoIV en el hígado de las ratas delgadas alimentadas con una dieta rica en aceite de pescado; postulando que se debía a un mecanismo posttranscripcional de regulación negativa, y que aunque no podían explicar el significado fisiológico de este hecho, sí que sugerían que ya que Apo AIV participaba de manera importante en el transporte de Triglicéridos en plasma (transferencia ApoC II hacia las Lp rica en Triglicéridos –VLDL- para posterior catabolismo), el efecto de la dieta rica en aceite de pescado sería parte de los mecanismo de regulación del metabolismo de los triglicéridos (los ácidos grasos Omega 3 que contiene el aceite de pescado serían los mediadores en la reducción de Triglicéridos y VLDL)

La conclusión importante del estudio, era que la obesidad genética anulaba la supresión de la transcripción del gen de Apo AIV que provoca el aceite de pescado.

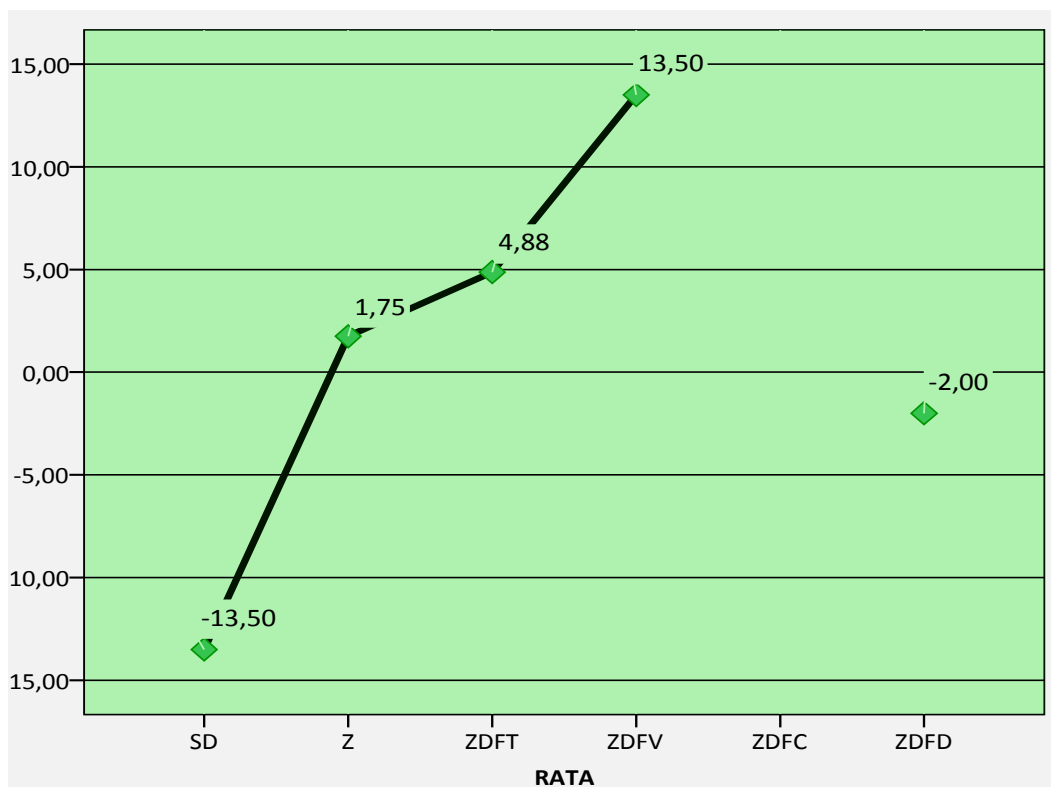
En nuestro caso también observamos un incremento de Apo AIV en ratas obesas , sobretodo si además son diabéticas, y aunque no disponemos de RNAm de SD ni Z, podrían tratarse de mecanismos postranscripcionales similares ligados a los ácidos grasos no esterificados y el metabolismo de lipoproteínas ricas en Triglicéridos. En el grupo de la dieta controlada frente al resto de obesas observamos que la cantidad de transcrito es mayor sin que se traduzca en mayor cantidad de proteína en plasma, y en cambio para el grupo de Telmisartán el efecto es inverso. Desconocemos los mecanismos precisos.

En los estudios mencionados de Sparks y Blay-Peinado se observaba un aumento de la cantidad total de AIV aunque sin embargo parecía que existía cierta discordancia en la cantidad relativa que va asociada a HDL u otras lipoproteínas. Sparks vio que Apo estaba en plasma >90% asociado a HDL en todos los grupos. (Apo IV aumentaba un 73% en el grupo de las 20, mientras que delgadas y 10 semanas eran similares), sin embargo, Blay-Peinado observó un incremento muy importante de quilomicrones con aumentos moderados del resto de lipoproteínas, aumentando la fracción de Apo AIV asociada a Qm y permaneciendo estable la de HDL (disminución relativa al ligero aumento de HDL).

Quizá las diferencias que observamos en nuestro estudio sobre la cantidad circulante de Apo AIV y la expresión hepática en los diferentes grupos, pueda tener origen en esos cambios relativos y la translocación de parte de la fracción proteica hacia otras lipoproteínas, como hipotetizamos para Apo AI.

ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE LAS HDL MEDIANTE EL ENSAYO CON DCF (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína)

Figura 30. Protección de la oxidación de las LDL



Se representa el ensayo de oxidación y medida de fluorescencia de DCF, tal y como se describe en Material y Métodos. Vemos la gráfica de las diferencias medias de señal fluorescente entre muestras de LDL y LDL+HDL de los diferentes grupos. Se observa tendencia hacia las diferencias entre grupos, sobretodo entre SD, ZDFV y ZDFD

El ensayo de incubación de LDL con diacetato de fluoresceína (DCF) desarrollado por el grupo de Navab²⁴⁰ se basa en el hecho de que las especies reactivas generadas por las LDL oxidadas reaccionan con DCF emitiendo fluorescencia de una forma proporcional al grado de oxidación. Es un ensayo rápido que evita la necesidad de utilizar cultivos celulares para estudiar la habilidad de las HDL para prevenir la formación o inactivar los fosfolípidos oxidados de las LDL, y que muestra buena correlación con los resultados obtenidos los métodos de estudio en cultivos celulares (en un medio de cultivo de células endoteliales y musculares lisas en cultivo junto a LDL, por la acción de compuestos derivados del metabolismo de los ácidos linoleico y araquidónico, los fosfolípidos de las moléculas de LDL se oxidan e inducen una respuesta proinflamatoria como la trans migración de monocitos).

Cultivaron LDL control en un medio con células de la pared arterial, junto HDL de pacientes con arteriosclerosis coronaria documentada, y también junto a HDL de un grupo control sano. La formación de LDL oxidadas por las células de la pared arterial, podía ser

inhibida por HDL “normales”^{241,242}, que además inhibían la actividad quimiotáctica y la trans migración de monocitos.

De la misma manera, utilizaron el ensayo con DCF para testar el HDL de esos pacientes frente al de los sujetos sanos ante la presencia de partículas LDL ligeramente oxidadas, y observaron un incremento significativo de la señal fluorescente con las HDL de los pacientes, indicativo de la incapacidad de estas para frenar y/o inactivar la oxidación de fosfolípidos.

El mismo grupo de Navab observó cómo las HDL de ratones susceptibles a aterosclerosis inducida por la dieta, funcionaba de forma deficiente y era además proinflamatorio en comparación con el mismo grupo de ratones alimentado con una dieta pobre en grasa, y también frente a ratones apoE “knockout” resistentes a aterosclerosis²⁴³.

Gowri y colaboradores²⁴⁴ habían observado que la fracción de HDL₂ de sujetos diabéticos tipo II con mal control glucémico (con un mayor contenido en triglicéridos que HDL₃) carecía de efecto para prevenir la oxidación de LDL en un cultivo de macrófagos, y no así la fracción HDL₂ de sujetos sanos. En el grupo diabético tanto la Apo B100 de las LDL como Apo AI de las HDL mostraban cambios estructurales importantes. También observaron que existía correlación positiva entre la capacidad antioxidante de las HDL la actividad acetilhidrolasa (*PAF-AH*) sólo en los sujetos sanos; así como una correlación negativa entre la concentración de triglicéridos y esa capacidad antioxidante en el grupo de los diabéticos.

La cantidad de HDL en plasma depende del colesterol total y muestra gran heterogeneidad en su composición, y como ya hemos visto no refleja su funcionalidad. Sin embargo, la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (así como la eficiencia en el transporte reverso del colesterol), permite valorar la integridad estructural y funcional de las partículas de HDL.

Volviendo a nuestros resultados, el grupo de ratas delgadas y no hiperlipémicas, SD, muestra una señal de fluorescencia baja que indica menor oxidación de sus LDL. Es interesante ver la relación que existe entre las ratas obesas, y entre las que además de obesidad padecen diabetes:

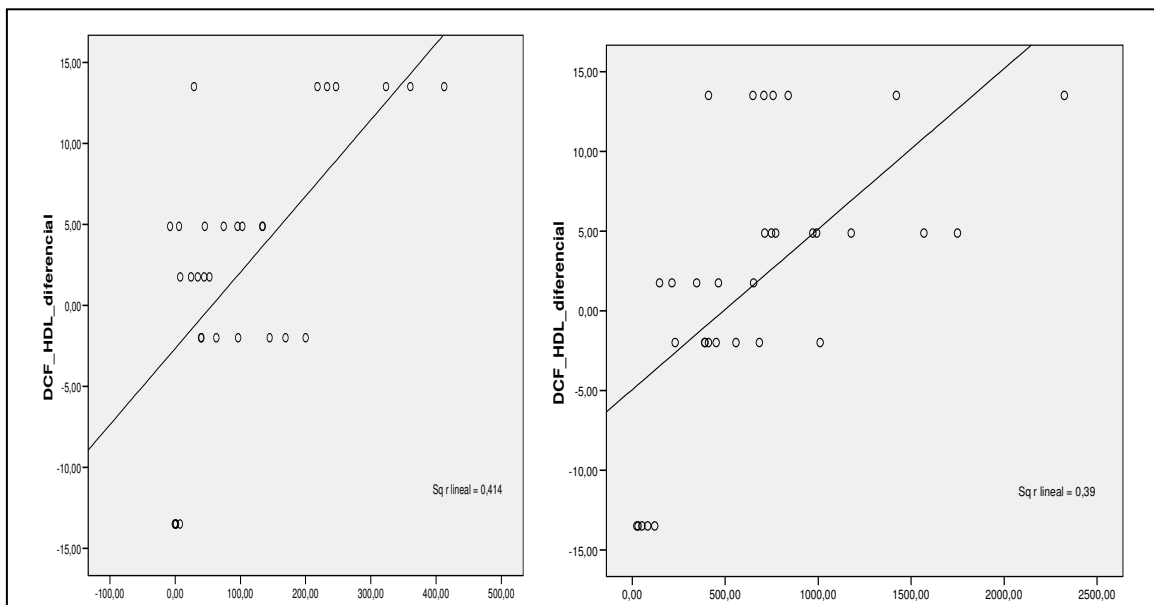
- Las HDL de las ratas ZDFV son más disfuncionantes que las de las SD y las de las ZDFD a la hora de evitar la formación de fosfolípidos oxidados en las LDL, o por inactivación de los mismos). Una dieta controlada e hipocalórica, pues, parece frenar los efectos de la obesidad/diabetes sobre las HDL.

- En el grupo de las ratas con Telmisartán la interpretación puede ir en ambas direcciones: el efecto del fármaco no es importante y la funcionalidad de las HDL se asemeja al grupo vehículo, o simplemente que su efecto es más lento que el efecto de una dieta hipocalórica.

No hemos encontrado otros estudios que evalúen la capacidad antioxidativa y antiinflamatoria de las HDL en las situaciones que desarrollamos en este experimento, como son la de un grupo de ratas obesas y diabéticas (que, por similitud a los modelos murinos y humanos mencionados, tendrían unas partículas HDL poco eficientes y en cierto modo proaterogénicas) sometidas a dieta y/o bajo tratamiento con un fármaco modulador del metabolismo de los ácidos grasos como el Telmisartán.

Atendiendo al resto de resultados, como vemos en las gráficas, parece existir correlación entre la actividad antioxidante de las HDL medida por DCF y la albuminuria ($r= 0,64$ $p< 0,01$), indicativo de ese papel protector frente al daño endotelial que provocarían las especies oxidadas de las LDL y la inflamación posterior. Igual que en el estudio de Gowri vemos una correlación positiva entre la concentración de triglicéridos y la señal DCF ($r= 0,62$ $p<0,01$).

Figura 31. Asociación entre diferentes parámetros.



Nuestro abordaje experimental nos ha permitido extraer conclusiones interesantes cuando se compran los grupos intervención frente al vehículo, y que se podrían resumir de una forma gráfica en la siguiente figura (se describen con más detalle en el correspondiente apartado de la discusión de cada una de las variables).

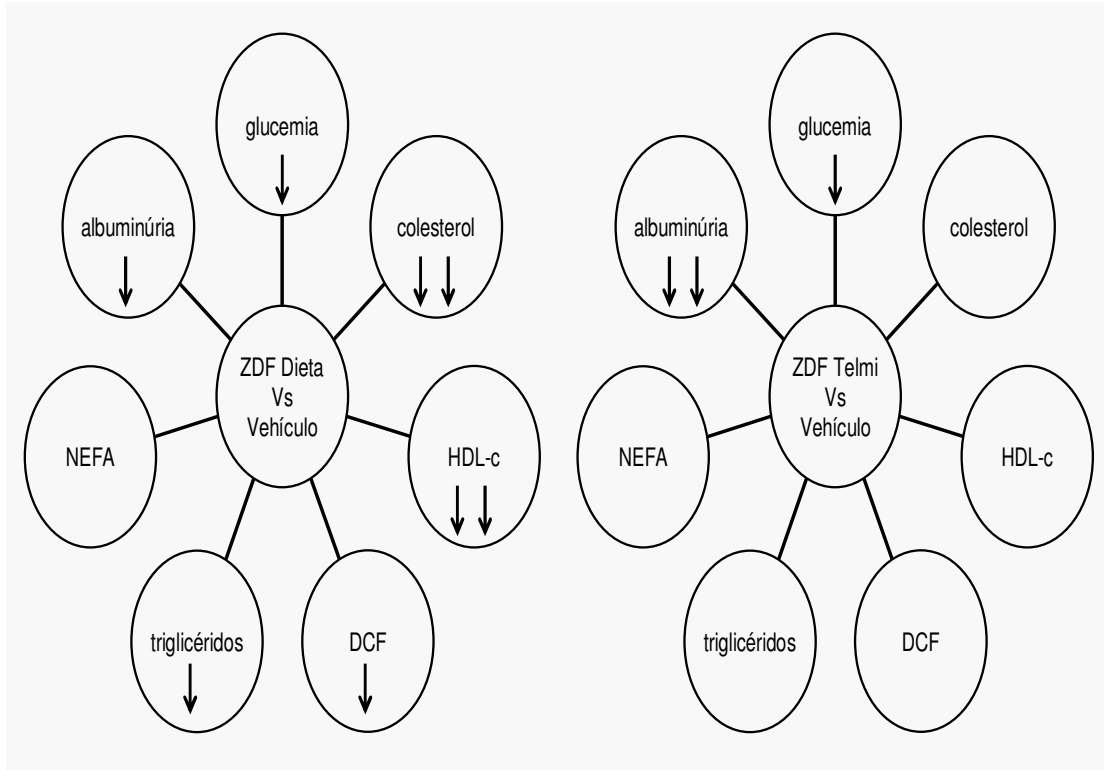


Figura 32. Representación esquemática de los resultados en los grupos intervención.

CONCLUSIONES

1. La asociación de diabetes y obesidad en este modelo de rata ZDF genera una serie de alteraciones metabólicas desde etapas muy tempranas, con hiperglucemia y un tipo de dislipidemia no sólo caracterizado por el exceso de lípidos en sangre (hiperlipemia) sino por un perfil que se ha demostrado promueve el desarrollo de arteriosclerosis (dislipemia aterógena): hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, y aumento de ácidos grasos no esterificados en plasma.
2. La asociación de diabetes y obesidad en este modelo de rata ZDF genera una serie de alteraciones metabólicas, que ya desde la semana 10, provocan la aparición y un rápido incremento de microalbuminuria.
3. La intervención dietética y farmacológica con agonistas PPAR γ (Telmisartán) en ratas ZDF revierte en algunos casos, o atenúa en otros, las alteraciones metabólicas que de forma espontánea genera la diabetes y la obesidad en este modelo animal.
 - La dieta hipocalórica disminuyó de forma significativa la concentración de colesterol total y colesterol-HDL respecto a los grupos vehículo y control. También consiguió disminuir la glucemia, la concentración de triglicéridos en plasma y la albuminuria.
 - El tratamiento con un fármaco con actividad agonista de PPAR γ consiguió disminuir la albuminuria, y la glucemia a casi la mitad con respecto a los grupos vehículo y control.
4. La intervención dietética y farmacológica con agonistas PPAR γ (Telmisartán) en ratas ZDF, mejora o enlentece el daño vascular y la aparición de microalbuminuria que de forma espontánea genera la diabetes y la obesidad en este modelo animal.
5. La obesidad pero sobretodo la asociación de diabetes y obesidad en este modelo de rata genera un tipo de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disfuncionantes, con una menor capacidad de inhibir la oxidación de las partículas de baja densidad (LDL).
6. La intervención con una dieta hipocalórica mejora la capacidad de las HDL para inhibir la oxidación de las partículas de baja densidad (LDL)
7. Existe una correlación positiva media entre la señal de DCF, y por tanto la oxidación de las LDL y la alteración funcional de las HDL, con el daño endotelial precoz y la aparición de microalbuminuria.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Alberti KGMM. The diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Voice, Bulletin of the International Diabetes Federation* 1999;44:35-41.
- ² Harris M, Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. In Alberti K, Zimmet P, Defronzo R, editors. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Second Edition. Chichester: John Wiley and Sons Ltd; 1997. p9-23.
- ³ Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894:I-xii:1-253
- ⁴ Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993;58:463-467.
- ⁵ Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 53 countries: a cas-control study. *Lancet* 2005;366:1640-9.
- ⁶ Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-1053
- ⁷ International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 4th ed*. 2009. Brussels, International Diabetes federation 2009.
- ⁸ Diabetes Prevention Program Research Group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Eng J Med*. 2000; 346:393-403.
- ⁹ Tuomilehto J, Lindstrom J, Ericsson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilianne-Parikka P. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Eng J Med*. 2001;344:1343-1350.
- ¹⁰ Virally M, Blicklé J-F, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau P-J. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes and Metabolism* 2007;33:231-244.
- ¹¹ Schulz L, Bennett P, Ravussin E, Kidd J, Kidd K, Esparza J, Valencia M, Effects of Traditional and Western Environments on Prevalence of Type 2 Diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care* 2006;26:1866-1871
- ¹² Haslam D, James P. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-1209
- ¹³ Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:s9-s30
- ¹⁴ Bibbins-Domingo K, Coxson P, Pletcher MJ, Lightwood J, Goldman L. Adolescent overweight and future adult coronary heart disease. *N Eng J Med* 2007;357:2371-2379
- ¹⁵ Estimates for overweight and obesity in Europe. International Association for the Study of Obesity, IASO infobase. July 2008
- ¹⁶ Ogden C, Carroll M, Curtin L. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006;295(13):1549-1555.
- ¹⁷ Yach D, Hawkes C, Gould CL, Hofman KJ. The global burden of chronic diseases: overcoming impediments to prevention and control. *JAMA* 2004;291:2616-2622
- ¹⁸ Basnyat B, Rajapaksa LC. Cardiovascular and infectious diseases in South Asia: the double whammy. *BMJ* 2004;328:781
- ¹⁹ Roglic G, Unwin N, Bennett PH, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* 2005; 28 (9): 2130-2135.
- ²⁰ Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ* 2006;332(7533):73-8.
- ²¹ Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999; 353 (9164): 1547-1557.
- ²² Kramer H, Molitch ME. Screening for kidney disease in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1813-1816
- ²³ Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2003;26:1553-1579
- ²⁴ Eckel RH, et al. Natural history of macrovascular disease and classic risk factors for atherosclerosis. *Diabetes Care* 1999;22(suppl 3):C21-C24
- ²⁵ Kevin R. Screening interval for retinopathy in type 2 diabetes. *Lancet* 2003;361:190-191
- ²⁶ American Diabetes Association. *Estándares para la asistencia médica de la diabetes* 2008. *Diabetes Care* 2008;31(supl 1):s12-s54
- ²⁷ Colagiuri S, Borch-Johnsen K, Glümer C, et al. There really is an epidemic of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48 (8): 1459-1463.
- ²⁸ Straka R, Liu L, Girase P, DeLorenzo A, Chapman R. Incremental cardiovascular costs and resource use associated with diabetes: an assessment of 29,863 patients in the US managed-care setting. *Cardiovascular Diabetology* 2009;8:53-64
- ²⁹ National Audit Office. *Tackling obesity in England: a report by the Comptroller and Auditor General*. London: National Audit Office, 2001.
- ³⁰ Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stephens J, Vanitallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999;282:1530-38

- ³¹ Eeg-Olofsson K, Cederholm J, Nilsson PM, Zethelius B, Nunez L, Gudbjörnsdóttir S, Eliasson B. Risk of cardiovascular disease and mortality in overweight and obese patients with type 2 diabetes: an observational study in 13,087 patients. *Diabetologia* 2009;52:65-73
- ³² Guh D, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis A. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2009;9:88-108
- ³³ Stevens J, Cai J, Panuk ER, Williamson DF, Thun MJ, Wood JL. The effect of age on the association between body-mass index and mortality. *N Eng J Med* 1998;338:1-7
- ³⁴ Williamson DF, Parnuk E, Thies M, Flanders D, Byers T, Heath C. Modest intentional weight loss increases life expectancy in overweight women. *Am J Epidemiol* 1995;141:1128-41.
- ³⁵ Wolf HK, Tuomilehto J, Kuulasmaa K. Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA project. *J Hum Hypertens* 1997;11:733-42
- ³⁶ Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ*. 2006 January 14;332: 73-78.
- ³⁷ McGee D, and the Diverse Populations Collaboration. Body Mass Index and Mortality: A Meta-analysis Based on Person-level. Data from Twenty-six Observational Studies. *Ann Epidemiol* 2005;15:87-97.
- ³⁸ Lasunción MA, Suarez Y, Gómez-Coronado C. Lipoproteínas: características, clasificación y proteínas que intervienen en su metabolismo. Sección VII, Capítulo 1. En Millán Nuñez-Cortés, *Medicina Cardiovascular*, ediciones Masson, 2005.
- ³⁹ Gómez-Gerique JA, Fabiani F. Métodos de estudio de lípidos y lipoproteínas. Sección VII, Capítulo 4. En Millán Nuñez-Cortés ed. *Medicina Cardiovascular*, ediciones Masson, Barcelona 2005.
- ⁴⁰ Shen H, Howles P, Tso P. From the interaction of lipid vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:S103-125
- ⁴¹ Gómez-Coronado D, Suarez Y, Lasunción MA. Metabolismo de las lipoproteínas y su regulación. Sección VII, Capítulo 2. En Millán Nuñez-Cortés ed. *Medicina Cardiovascular*, ediciones Masson, Barcelona, 2005.
- ⁴² Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:151-157.
- ⁴³ Packard CJ, Sheperd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3542-3556
- ⁴⁴ Fielding CJ, Fielding PE. Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 2001;1553:175-189
- ⁴⁵ Oram JF, Lawn RM, ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:1173-1179.
- ⁴⁶ Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11358-11363
- ⁴⁷ Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-340
- ⁴⁸ Charla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology. Opening the X-files. *Science* 2001;294:1866-1870
- ⁴⁹ Lafitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL. Autoregulation of the human liver X receptor, a promoter. *Mol Cell Biol* 2001;21:7558-7568
- ⁵⁰ Edwards PA, Kast HR, Anisfield AM. BAREing it all: The adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res* 2002;43:2-12
- ⁵¹ Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart J-C, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: From transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:245-254
- ⁵² Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;26:93-109
- ⁵³ Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N Eng J Med* 1986;314:488-500
- ⁵⁴ Katz DR. The culprit lesion. *Curr Opin Lipidol* 1992;3:257-262
- ⁵⁵ Small DM. Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insight from lipid physical biochemistry. *Arteriosclerosis* 1988;8:103-129
- ⁵⁶ Castelli WP, Garrison RI, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835-2838
- ⁵⁷ MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994;344:633-638
- ⁵⁸ Pitt B, Manzini GBJ, Ellis SG, Rosean HS, McGovern ME, for the Plac I Investigators. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC 1). *J Am Coll Cardiol* 1994;131A:739
- ⁵⁹ Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Nelly JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 1991;14(Suppl1):1-16
- ⁶⁰ Autio I, Jaakkola O, Solavikivi T, Nikkari T. Oxidized low-density lipoprotein is chemotactic for arterial smooth muscle cells in culture. *FEBS Lett* 1990;277:247-249
- ⁶¹ Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:631-638
- ⁶² Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, Selwing AP, Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995;75:71B-74B

- ⁶³ Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844
- ⁶⁴ Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwing AP, Ganz P. The effect of cholesterol lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Eng J Med* 1995;332:488-493
- ⁶⁵ Witztum JL. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993;69 (Suppl):S12-S18
- ⁶⁶ Lusis, AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241
- ⁶⁷ Rosenfeld ME, Lipton BA. Cellular response to oxidized LDL. *Curr Opin Lipidol* 1992;3:318-323
- ⁶⁸ Lobby P. Vascular biology of atherosclerosis: Overview and state of the art. *Am J Cardiol* 2003; 91:3A-6A
- ⁶⁹ Smith S Jr. Risk-reduction therapy: The challenge to change. *Circulation* 1996;93:2205-2211
- ⁷⁰ Nodestgaard B, Nielsen L. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:252-257
- ⁷¹ Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994;344:793
- ⁷² Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah MG, Navab M, Fogelman A. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95:764-772
- ⁷³ Mangas A, Toro R, Biedma D, Macías A, Barba A. Depósito lipídico intra y extracelular. Sección II, Capítulo 6. En Millán Nuñez-Cortés ed. *Medicina Cardiovascular*, ediciones Masson, Barcelona 2005.
- ⁷⁴ Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983;52:223-261
- ⁷⁵ Heinicke J, Suits A, Aviram M, Chait A. Phagocytosis of lipase aggregated low density lipoprotein promotes macrophage foam cell formation: Sequential morphological and biochemical events. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1643-1651
- ⁷⁶ Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 1990;31:1387-1398
- ⁷⁷ Brown MS, Goldstein JL. Scavenging for receptors. *Nature* 1990;343:508-509
- ⁷⁸ Sanchez JL, Ordoñez J. Modificación y oxidación de las lipoproteínas. Sección VII, Capítulo 3. En Millán Nuñez-Cortés ed. *Medicina Cardiovascular*, ediciones Masson, Barcelona 2005.
- ⁷⁹ Sevanian A, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res* 1995;36:1971-1986
- ⁸⁰ Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ et al. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-842
- ⁸¹ Yang X, Cai B, Sciacca RR, Cannon PJ. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ Res* 1994;74:318-328
- ⁸² Drake TA, Hannani K, Fei H, Lavi S, Berliner JA. Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:601-607
- ⁸³ Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Naïbone G, Lafont H. Stimulating effect of oxidized low-density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:1821-1829
- ⁸⁴ Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R. Autoantibodies against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339:883-887
- ⁸⁵ Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary heart disease. *Eur Heart J* 1998;19(Suppl):M8-14
- ⁸⁶ Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 1998;97:1029-1036
- ⁸⁷ Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1997;62:707-714
- ⁸⁸ Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Iranmanesh A, Kilt YJ, Mann D, et al. Distribution of lipids in 8,500 men with coronary artery disease. Department of Veterans Affairs HDL Intervention Trial Study Group. *Am J Cardiol* 1995;75:1196-1201
- ⁸⁹ Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002;287:356-359
- ⁹⁰ Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996;37:693-707
- ⁹¹ Zechner, Zimmermann, Eichmann, Kohlwein, Haemmerle, Lass, Madeo. Fat signals—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signalling. *Cell Metabolism* 2012;15:279-291
- ⁹² Haemmerle G, Zimmermann R, Zechner R. Letting lipids go: hormone-sensitive lipase. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:289-297
- ⁹³ Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease; old questions and new insights. *Science* 2011;332:1519-1523
- ⁹⁴ Boden G, Shulman G. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002;32 (Suppl 3):14-23
- ⁹⁵ Festuccia WT, Laplante M, Berthiaume M, Gélinas Y, Deshaies Y. PPAR γ agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 2006;49:2427-2436

- ⁹⁶ Shen WJ, Yu Z, Patel S, Jue D, Liu LF, Kraemer FB. Hormone-sensitive lipase modulates adipose metabolism through PPAR γ . *Biochim Biophys Acta* 2011;1811:9-16
- ⁹⁷ Summers SA. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr Opin Lipidol* 2010;21:128-135
- ⁹⁸ Vallerie SN, Hotamisligil GS. The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med* 2010;2:60-65
- ⁹⁹ Berman D, Nicklas BJ, Ryan AS, Rogu e EM, Dennos KE, Goldberg AP. Regulation of lipolysis and lipoprotein lipase after weight loss in obese, postmenopausal women. *Obesity Res* 2004;12:32-39
- ¹⁰⁰ Miyashita Y, Ebisuno M, Ohhira M, He ido K, Saiki A, Koide N, et al. Enhancement of serum lipoprotein lipase mass levels by intensive insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;72:61-67
- ¹⁰¹ Panarotto D, Remillard P, Boufard L, Meaux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *Eur J Clin Invest* 2002;32:84-92
- ¹⁰² Yu YH, Ginsberg HN. Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 2005;96:1042-1052
- ¹⁰³ Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14(Suppl):S41-49
- ¹⁰⁴ Ashen MD, Blumenthal RS. Clinical practice. Low HDL cholesterol levels. *N Engl J Med* 2005; 353:1252-1260
- ¹⁰⁵ Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96:1221-1232
- ¹⁰⁶ Rashid S, Barret PH, Uffelman KD, Watanabe T, Adeli K, Lewis GF. Lipolytically modified triglyceride-enriched HDLs are rapidly cleared from the circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:483-487
- ¹⁰⁷ Arai T, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Kotani K, et al. Increased plasma cholesteryl ester transfer protein in obese subjects. A possible mechanism for the reduction of serum HDL cholesterol levels in obesity. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1129-1136
- ¹⁰⁸ Dullaart RP, de Vries R, Dallinga-Thie GM, van Tol A, Sluiter WJ. Plasma cholesteryl ester transfer protein mass and phospholipids transfer protein activity are associated with leptin in type 2 diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 2006;
- ¹⁰⁹ Martin LJ, Woo JG, Daniela SR, Goodman E, Dolan LM. The relationships of adiponectin with insulin and lipids are strengthened with increasing adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4255-4259
- ¹¹⁰ Baratta R, Amato S, Degano C, Farina MG, Patane G, Vigneri R, Frittitta L. Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2665-2671
- ¹¹¹ Verges B, P etit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, Gambert P. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1364-1369
- ¹¹² Badellino KO, Rader DJ. The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:392-395
- ¹¹³ Ma K, Ciringiroglu M, Otros JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2748-2753
- ¹¹⁴ Weiberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-1808
- ¹¹⁵ Krause BR, Hartman AD. Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J Lipid Res* 1984;25:97-110
- ¹¹⁶ Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: Biological and pathophysiological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:371-386
- ¹¹⁷ Zannis V, Chroni A, Krieger M. Role of apo A-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med* 2006;84:276-294
- ¹¹⁸ Plump AS, Scout DJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:967-11
- ¹¹⁹ Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart* 2008;94:706-714
- ¹²⁰ Li H, Reddick RL, Maeda N. Lack of Apo A-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1814-1821
- ¹²¹ Alexander ET, Tanaka M, Kono M, Saito H, Rader DJ, Phillips MC. Structural and functional consequences of the Milano mutation (R173C) in human apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 2009;50:1409-19.
- ¹²² Von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Sarmadi As, Schwarz S, Steinmetz A, Assmann G. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1755-63
- ¹²³ Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein Apo C-II activation of lipoprotein lipase; modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1990;265:4266-72
- ¹²⁴ Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, Emmanuel F, Castro G, Fruchart JC, Steinmetz A, Deneffe P. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science* 1996;273:966-8
- ¹²⁵ Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001;42:1717-1726

- ¹²⁶ Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:630-637
- ¹²⁷ Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:721-727
- ¹²⁸ Braun A, Trigatti BL, Post MJ, Sato K, Simona M, Edelberg JM, Rosenberg RD, Schrenzel M, Krieger M. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2002;90:270-276
- ¹²⁹ Getz GS, Reardon CA. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:261-267
- ¹³⁰ Reardon CA, Kan HY, Cabana V, Blachowitz L, Lukens R, Wu Q, Liadaki K, Getz GS, Zannis VI. In vivo studies of HDL assembly and metabolism using adenovirus-mediated transfer of ApoA-I mutants in ApoA-I-deficient mice. *Biochemistry* 2001;40:13670-13680
- ¹³¹ Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40:643-672
- ¹³² Chen CH. Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:337-341
- ¹³³ Calabresi L, Gomasaschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 2003;23:1724-1731
- ¹³⁴ Jessup W, Gellissein IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:247-257
- ¹³⁵ Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and atherosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27
- ¹³⁶ Navab, M., S. Hama, J. Cooke, G. M. Anantharamaiah, M. Chaddha, L. Jin, G. Subbanagounder, K. F. Faull, S. T. Reddy, N. E. Miller, and A. M. Fogelman. Normal HDL inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL—step 1. *J. Lipid Res* 2000; 41: 1481-1494
- ¹³⁷ Navab, M., S. Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, K. Hassan, G. P. Hough, A. D. Watson, S. T. Reddy, A. Sevanian, G. C. Fonarow, A. M. Fogelman. Normal HDL inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL—steps 2 and 3. *J. Lipid Res* 2000;41:1495-14508
- ¹³⁸ Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109(III):8-14
- ¹³⁹ Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence, Lu P. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7:853-857
- ¹⁴⁰ Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;05:764-772
- ¹⁴¹ Small DM, Bond MG, Waugh D, et al. Physicochemical and histological changes in the arterial wall of nonhuman primates during progression and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1984;73:1590-605.
- ¹⁴² Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990;85:1234-41.
- ¹⁴³ Lee J, Choudhury R. Prospects for atherosclerosis regression through emerging therapeutic targets increase in high-density lipoprotein and other. *Heart* 2007;93;559-564.
- ¹⁴⁴ Barter PJ, Caulfield M, Ericsson M; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Eng J Med* 2007;357:2109-2122
- ¹⁴⁵ Hausenloy DJ, Yellon CM. Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart* 2008;94:706-714
- ¹⁴⁶ Ferretti G, Bachetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006;184: 1-7
- ¹⁴⁷ Prutz WA. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch Biochem Biophys* 1996;332:110-20.
- ¹⁴⁸ Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 1993;290(Pt 1):165-72.
- ¹⁴⁹ Marsche G, Hammer A, Oskolkova O, Kozarsky KF, Sattler W, Malle E. Hypochlorite-modified high density lipoprotein, a high affinity ligand to scavenger receptor class B, type I, impairs high density lipoprotein-dependent selective lipid uptake and reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 2002;277:32172-9.
- ¹⁵⁰ Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13032-7.
- ¹⁵¹ Marsche G, Heller R, Fauler G, Kovacevic A, Nuzkowski A, Graier W, et al. 2-Chlorohexadecanal derived from hypochlorite-modified high-density lipoprotein-associated plasmalogen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2302-6.

- ¹⁵² Shao B, Bergt C, Fu X, Green P, Voss JC, Oda MN. Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *J Biol Chem* 2005;280:5983-93.
- ¹⁵³ Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2004;114:529-41.
- ¹⁵⁴ Macdonald DL, Terry TL, Agellon LB, Nation PN, Francis GA. Administration of tyrosyl radical-oxidized HDL inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1583-8
- ¹⁵⁵ Suc I, Brunet S, Mitchell G, Rivard GE, Levy E. Oxidative tyrosylation of high density lipoproteins impairs cholesterol efflux from mouse J774 macrophages: role of scavenger receptors, classes A and B. *J Cell Sci* 2003;116:89-99.
- ¹⁵⁶ Lee M, Sommerhoff CP, von Eckardstein A, Zettl F, Fritz H, Kovanen PT. Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:2086-91.
- ¹⁵⁷ Favari E, Lee M, Calabresi L, Franceschini G, Zimetti F, Bernini F, et al. Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004;279:9930-6
- ¹⁵⁸ Eberini I, Calabresi L, Wait R, Tedeschi G, Pirillo A, Puglisi L, et al. Macrophage metalloproteinases degrade high-density-lipoprotein-associated apolipoprotein A-I at both the N- and C-termini. *Biochem J* 2002;362:627-34.
- ¹⁵⁹ Cogny A, Paul JL, Atger V, Soni T, Moatti N. Structural changes of high-density-lipoprotein apolipoproteins following incubation with human polymorphonuclear cells. *Eur J Biochem* 1994;222:965-73.
- ¹⁶⁰ Pirillo A, Ghiselli G. Enhanced macrophage uptake of elastase-modified high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:386-91.
- ¹⁶¹ Gauster M, Oskolkova OV, Innerlohinger J, Glatter O, Knipping G, Frank S. Endothelial lipase-modified high density lipoprotein exhibits diminished ability to mediate SR-BI (scavenger receptor B type I)-dependent free cholesterol efflux. *Biochem J* 2004;382:75-82.
- ¹⁶² Jaross W, Eckey R, Menschikowski M. Biological effects of secretory phospholipase A(2) group IIA on lipoproteins and in atherogenesis. *Eur J Clin Invest* 2002;32:383-93.
- ¹⁶³ de Beer FC, Connell PM, Yu J, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. HDL modification by secretory phospholipase A(2) promotes scavenger receptor class B type I interaction and accelerates HDL catabolism. *J Lipid Res* 2000;41:1849-57.
- ¹⁶⁴ Hurtado I, Fiol C, Gracia V, Caldu P. In vitro oxidised HDL exerts a cytotoxic effect on macrophages. *Atherosclerosis* 1996;125:39-46.
- ¹⁶⁵ Nakajima T, Origuchi N, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Nakamura H, et al. Localization of oxidized HDL in atheromatous plaques and oxidized HDL binding sites on human aortic endothelial cells. *Ann Clin Biochem* 2000;37(Pt 2): 179-86.
- ¹⁶⁶ Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 2001;38:163-9.
- ¹⁶⁷ Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000;43:312-20.
- ¹⁶⁸ Matsunaga T, Nakajima T, Miyazaki T, Koyama I, Hokari S, Inoue I, et al. Glycated high-density lipoprotein regulates reactive oxygen species and reactive nitrogen species in endothelial cells. *Metabolism* 2003;52:42-9.
- ¹⁶⁹ Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G. Effect of homocysteinylation on human high density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 2003;52:146-51
- ¹⁷⁰ Dinneen SF, GErstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Intern Med.* 1997;157:1413-1418
- ¹⁷¹ The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-2572
- ¹⁷² Chen J, Muntaner P, Hamm LL, et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Ann Intern Med.* 2004;140:167-174.
- ¹⁷³ Clausen P, Jensen G, et al. Elevated urinary albumin excretion is associated with impaired arterial dilatory capacity in clinically healthy subjects. *Circulation* 2001;103:1869-1874
- ¹⁷⁴ American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl 1): S16-27
- ¹⁷⁵ ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemia. *Eur Heart J* 2011; 32:1769-1818
- ¹⁷⁶ Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 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.
- ¹⁷⁷ Ebbeling CB, Leidig MM, Feldman HA, Lovesky MM, Ludwig DS. Effects of a low-glycemic load vs low-fat diet in obese young adults: a randomized trial. *JAMA* 2007;297:2092-2102.

- ¹⁷⁸ Howard BV, Manson JE, Stefanick ML, Beresford SA, Frank G, Jones B, Rodabough RJ, Snetselaar L, Thomson C, Tinker L, Vitolins M, Prentice R. Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial. *JAMA* 2006;295:39-49.
- ¹⁷⁹ GISSI-Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999;354:447-455.
- ¹⁸⁰ Leaf A. On the re-analysis of the GISSI-Prevenzione. *Circulation* 2002;105:1874-1875.
- ¹⁸¹ Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Back G, Pollicino C. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267-78
- ¹⁸² LaRosa JC, Grundy S, Waters D, Shear C, Barter P, et al. Treating to new targets Investigators. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Eng J Med* 2005;352:1425-1435
- ¹⁸³ SHARP Collaborative Group. Study of Heart and Renal Protection (SHARP): randomized trial to assess the effects of lowering low-density lipoprotein cholesterol among 9,438 patients with chronic kidney disease. *Am Heart J* 2010;160:785-794
- ¹⁸⁴ Grundy SM, Vega GL, Yuan Z, Battisti WP, Brady WE, Palmesano J. Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia (the SAFARI trial). *Am J Cardiol* 2005;95:462-468
- ¹⁸⁵ Perry C. Extended-release Niacin (nicotinic acid)/Laropirant. *Drugs* 2009;69:1665-1679
- ¹⁸⁶ Berge KG, Canner PL. Coronary Drug Project research group. Coronary drug project: experience with niacin. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40(Suppl 1):S49-S51
- ¹⁸⁷ Sanders TA. Dietary fat and postprandial lipids. *Curr Atheroscler Rep* 2003;5:445-451
- ¹⁸⁸ Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276:37731-37734
- ¹⁸⁹ Pershadsingh HA. Treating the metabolic syndrome using angiotensin receptor antagonists that selectively modulate peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *IJBCB* 2006;38:766-781
- ¹⁹⁰ Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 1998;93:229-240
- ¹⁹¹ Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001;7:48-52
- ¹⁹² Cock TA, Houten SM, Auwerx J. Peroxisome Proliferator-activated receptor- γ : too much of a good thing causes harm. *EMBO reports* 2004;5:142-147
- ¹⁹³ Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR- γ -modulating activity. *Hypertension* 2004;43:993-1002
- ¹⁹⁴ Schupp M, Janke J, Clasen R. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation* 2004;109:14-20
- ¹⁹⁵ Fujimoto M, Masuzaki H, Tnaka T. An Angiotensin II AT $_1$ receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2004;576:492-7
- ¹⁹⁶ Derosa G, Cicero AF, Bertone G. Comparison of the effects of telmisartan and nifedipine gastrointestinal therapeutic system on blood pressure control, glucose metabolism, and the lipid profile in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hypertension: a 12-month, randomized, double-blind study. *Clin Ther* 2004;26:1228-36
- ¹⁹⁷ Sharma AM, Hollander A, Köster J. Telmisartan in patients with mild/moderate hypertension and chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 2005;63:250-257
- ¹⁹⁸ Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and adipose tissue-understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:386-395
- ¹⁹⁹ Unger RH, Foster DW. Diabetes mellitus. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, editors. *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia, PA: Saunders, 1998:1010
- ²⁰⁰ Ohneda M, Inman LR, Unger RH. Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia* 1995;38:173-179
- ²⁰¹ Upton R, Widdowson PS, Ishii S, Tanaka H, Williams G. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with thiazolidinedione, MCC-555. *Br J Pharmacol* 1998;125:1708-1714
- ²⁰² DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, et al. ACT NOW Study. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2011 Mar 24;364(12):1104-15.
- ²⁰³ Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894:i-xii:1-253
- ²⁰⁴ See R, Abdullah S, McGuire D. The Association of Differing measures of overweight and Obesity with Prevalent Atherosclerosis. The Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:752-9
- ²⁰⁵ Palaniappan L, Carnethon M, Fortnabb SP. Association between microalbuminuria and the metabolic syndrome: NHANES III. *Am J Hypertens* 2003;16:952-958
- ²⁰⁶ Mangrum A, Bakris GL. Predictors of renal and cardiovascular mortality in patients with non-insulin-dependent diabetes: a brief overview of microalbuminuria and insulin resistance. *J Diabetes Complications* 1997;11:352-357
- ²⁰⁷ Yudkin JS. Hyperinsulinemia, insulin resistance, microalbuminuria and the risk of coronary heart disease. *Ann Med* 1996;28:433-438

- ²⁰⁸ Ninomiya T, Perkovic V, Galan BE, et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1813-1821
- ²⁰⁹ Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* 2010;303:423-429
- ²¹⁰ Danis R, Yang Y. Microvascular Retinopathy in the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2367-2371
- ²¹¹ Sharma Am, Hollander A, Köster J. Telmisartan in patients with mild/moderate hypertension and chronic kidney disease. *Clin Nephrol* 2005;63:250-257
- ²¹² Kasiske BL, Cleary MP, O'Donell MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. *J Lab Clin Med* 1985;106:598-604
- ²¹³ Kasiske BL, O'Donell MP, Cleary MP, Keane WF. Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int* 1988;33:667-672
- ²¹⁴ Whaley-Connell A, DeMarco V, Lastra G, Manrique C, Nistala R, Cooper SA, et al. Insulin Resistance, Oxidative Stress, and Podocyte Injury: Role of Rosuvastatin Modulation of Filtration Barrier Injury. *Am J Nephrol* 2008;28:67-75
- ²¹⁵ S, Bigazzi R, Caiazza A, Campese VM. A controlled prospective study of the effects of atorvastatin in proteinuria and progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;41:565-570
- ²¹⁶ Buckingham RE, Al-Barazanji KA, Toseland N, Slaughter M, Conor S, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonist, Rosiglitazone, Protects Against Nephropathy and Pancreatic Islet Abnormalities in Zucker Fatty Rats. *Diabetes* 1998;47:1326-1334
- ²¹⁷ Dragenais GR, Gerstein HC, Holman R. Effects of ramipril and rosiglitazone on cardiovascular and renal outcomes in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: results of the Diabetes Reduction Assessment with ramipril and rosiglitazone medication trial (DREAM). *Diabetes Care* 2008;31:1007-14
- ²¹⁸ Baynes J, Murray D. Cardiac and renal function are progressively impaired with aging in Zucker diabetic fatty type II diabetic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2009;2:328-334
- ²¹⁹ Coimbra TM, Janssen U, Gröne HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 2000;57:167-182
- ²²⁰ Phillips AO, Baboolal K, Riley S, Gröne H, Janssen U, Steadman R, Williams J, Floege J. Association of prolonged hyperglycemia with glomerular hypertrophy and renal basement membrane thickening in the Goto Kakizaki model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2001;37:400-10.
- ²²¹ Wheeler DC, Nair DR, Persaud JW, Jeremy JY, Chappell ME, Varghese Z, Moorhead JF. Effects of dietary fatty acids in an animal model of focal glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1991;39:930-937
- ²²² Clark JB, Palmer CJ, Shaw W. The Diabetic Zucker Fatty Rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;173:68-75
- ²²³ Leonard BL, Watson RN, Loomes KM, Philips ARJ, Cooper GJ. Insulin resistance in Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol* 2005;42:162-170
- ²²⁴ Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE. Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis* 2000;148:231-241
- ²²⁵ Brown KK, Henke BR, Blanchard SG, Cobb JE, Mook R, et al. A Novel N-Aryl Tyrosine Activator of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Reverses the Diabetic Phenotype of the Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes* 1999;48:1415-1424
- ²²⁶ Mohan, Philips, Cleary. Metabolic effects of coconut, sunflower, or menhaden oil feeding in lean and obese Zucker rats. *Br J Nutr* 1991;66:285-299
- ²²⁷ Blay M, Peinado-Onsurbe J, Julve J, Rodriguez V, Fernandez-Lopez A, Remesar X, Alemany M. Anomalous lipoproteins in obese Zucker rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2001;3:259-270
- ²²⁸ Benson S, Pershadsingh HA, Ho C, Chittiboyina A, Desai P, et al. Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist With Selective PPAR- γ -Modulating Activity. *Hypertension* 2004;43:993-1002
- ²²⁹ Sparks J, Ohung T, Bolognino M, Cianci J, Khurana R, Peterson R, Sowden M, Corsetti J, Sparks C. Lipoprotein alterations in 10- and 20-week-old Zucker diabetic fatty rats: hyperinsulinemic versus insulinopenic hyperglycemia. *Metabolism* 1998;47:1315-1324
- ²³⁰ Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest* 103:365-372
- ²³¹ Oakes ND, Thalén PG, Jacinto SM, Ljung B. Thiazolidinediones Increase Plasma-Adipose Tissue FFA Exchange Capacity and Enhance Insulin-Mediated Control of Systemic FFA Availability. *Diabetes* 2001;50:1158-1165
- ²³² Schonfeld G, Felski C, Howald M. Characterization of the plasma lipoproteins of the genetically obese hyperlipoproteinemic Zucker fatty rat. *J Lipid Res* 1974;15:457-464
- ²³³ Sparks J, Shaw W, Corsetti J, Bolognino M, Pesek J, Sparks C. Insulin-treated Zucker diabetic fatty rats retain the hypertriglyceridemia associated with obesity. *Metabolism* 2000;49:1424-1430
- ²³⁴ Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9607-11
- ²³⁵ Li H, Reddick RL, Maeda N. Lack of Apo AI is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1725-9

-
- ²³⁶ Strobl W, Knerer B, Gratis R, Arbeiter K, Lin-Lee Y, Patsch W. Altered regulation of Apolipoprotein AIV gene expression in the liver of the genetically obese Zucker rat. *J Clin invest* 1993;92:1766-1773
- ²³⁷ Witztum JL, Schonfeld G. Lipoproteins in the plasma and hepatoc perfusates of the Zucker Fatty rat. *Diabetes* 1979;28:509-516
- ²³⁸ Radosavljevic, M., Y. C. Lin-Lee, S. M. Soyak, W. Strobl, C. Seelos, A. M. Gotto, W. Patsch. Effect of sucrose diet on expression of apolipoprotein genes A-I, C-III and A-IV in rat liver. *Atherosclerosis* 1992;95:147-156.
- ²³⁹ Ribeiro, A., M. Mangeney, P. Cardot, C. Lorient, Y. Rayssiguier, J. Chambaz, and G. Bereziat. Effect of dietary fish oil and corn oil on lipid metabolism and apolipoprotein gene expression by rat liver. *Eur. J. Biochem.* 1991;196:499-507.
- ²⁴⁰ Navab M, Hama S, Hough G, Subbanagounder G, Reddy S, Fogelman A. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001;42:1308-1317
- ²⁴¹ Navab, M., S. Hama, J. Cooke, G. M. Anantharamaiah, M. Chaddha, L. Jin, G. Subbanagounder, K. F. Faulk, S. T. Reddy, N. E. Miller, and A. M. Fogelman. Normal HDL inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL—step 1. *J. Lipid Res* 2000; 41: 1481-1494
- ²⁴² Navab, M., S. Y. Hama, G. M. Anantharamaiah, K. Hassan, G. P. Hough, A. D. Watson, S. T. Reddy, A. Sevanian, G. C. Fonarow, A. M. Fogelman. Normal HDL inhibits three steps in the formation of mildly oxidized LDL—steps 2 and 3. *J. Lipid Res* 2000;41:1495-14508
- ²⁴³ Navab, M., S. Y. Hama-Levy, B. J. Van Lenten, G. C. Fonarow, C. J. Cardinez, G. P. Hough, L. W. Castellani, M-L. Brennan, B. N. La Du, A. J. Lusis, and A. M. Fogelman. 1997. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J. Clin. Invest* 1997;99:2005-2019.
- ²⁴⁴ Gowri, M. S., D. R. Van der Westhuyzen, S. R. Bridges, J. W. Anderson. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 2226–2233.