



INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO SST-I DEL GEN DE LA APOLIPOPROTEINA C-III SOBRE EL METABOLISMO LIPOPROTEICO EN PACIENTES HIPERTENSOS ESENCIALES

Tesis presentada por D. Manuel Barrios Artillo, licenciado en Medicina y Cirugía, para optar al grado de doctor.

Fdo.: Manuel Barrios Artillo

Sevilla a veinte de febrero de dos mil seis.

DON ANTONIO ESPINO MONTORO, PROFESOR TITULAR DE SEMIOLOGÍA CLÍNICA Y BIOQUÍMICA EN LA ESCUELA UNIVERSITARIA “FRANCISCO MALDONADO” DE OSUNA (DIPLOMATURA DE ENFERMERÍA), ADSCRITA A LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

DON JOSÉ VILLAR ORTIZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

HACEMOS CONSTAR:

Que el trabajo titulado “Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III sobre el metabolismo lipoproteico en pacientes hipertensos esenciales” ha sido realizado por D. Manuel Barrios Artillo bajo nuestra dirección, en la Unidad de Investigación del Hospital de la Merced de Osuna (Sevilla).

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser presentado como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Lo que firmamos en Sevilla a veinte de febrero de dos mil seis.

Fdo.: Dr. D. Antonio Espino Montoro

Fdo.: Dr. D. José Villar Ortiz

A mi padre, in memóriam.

A mi madre.

*A mi esposa, Rosa,
y a mis hijos, Manolo y Julia,
por el tiempo que no les dediqué.*

AGRADECIMIENTOS

- *Al Prof. Dr. D. Antonio Espino Montoro, por la dirección y supervisión de esta tesis; por su dedicación, paciencia y estímulo en la realización de este trabajo; y sobre todo, por haber sembrado en mí la inquietud y el gusto por la investigación clínica. Por su amistad.*
- *Al Prof. Dr. D. José Villar Ortiz, por su apoyo y confianza depositada en mi persona; por su ayuda en la búsqueda y recopilación de datos.*
- *Al Dr. D. José Manuel López Chozas, por el apoyo prestado como Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital de la Merced de Osuna; por haberme ofrecido la oportunidad de iniciarme en la investigación clínica. Por su amistad.*
- *A los Dres. D. Andrés Jiménez Marín y D. Jesús Cordobés López, y D. Carlos Álvarez Lacayo (licenciado en Biología), compañeros de penas y alegrías en la ardua y excitante tarea de la investigación clínica; por los consejos, ayuda y ánimos ofrecidos. Por su amistad.*
- *Al personal técnico de la Unidad de Investigación del Hospital de la Merced de Osuna, D^a. M^a Ángeles Ojeda Morón y D. Rafael Díaz Gómez (licenciados en Biología) y, especialmente, a D^a. María del Carmen González Fernández (técnica superior en Laboratorio de Análisis Clínicos), por sus enseñanzas, apoyo y ayuda en el manejo y procesamiento de las muestras para el estudio genético.*
- *Al Dr. D. Juan Porras Gracia, especialista en Análisis Clínicos del Hospital de la Merced de Osuna, por el apoyo técnico prestado para las determinaciones bioquímicas de laboratorio.*
- *Al Dr. D. Aurelio Cayuela Domínguez, por su aportación en el procesamiento y análisis estadístico de los datos.*

- *Al Dr. D. Antonio Ramos Corpas, por sus consejos y orientaciones iniciales sobre investigación clínica.*
- *A la Unidad de Investigación y a la Comisión de Investigación del Hospital de la Merced de Osuna, por el apoyo mostrado para la realización de este trabajo.*
- *A D^a. María José Fernández-Galiano Peyrolón, por su ofrecimiento, paciencia y ayuda recibidas en la búsqueda bibliográfica de este trabajo.*
- *Y, muy especialmente, a D^a. Rosa Jiménez Álvarez, por su imprescindible ayuda en la labor de diseño gráfico y procesamiento de textos de esta tesis, por su paciencia y por su continuo apoyo y confianza en mi labor.*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Lipoproteínas plasmáticas y metabolismo lipoproteico	3
1.1. Lípidos plasmáticos	3
1.1.1. Colesterol	3
1.1.2. Triglicéridos	4
1.1.3. Fosfolípidos	4
1.1.4. Ácidos grasos libres	6
1.2. Estructura y composición de las lipoproteínas	6
1.3. Apoproteínas	8
1.3.1. Apoproteína C-III	9
1.3.2. Otras apoproteínas	20
1.4. Enzimas y proteínas de transferencia lipídica	24
1.4.1. Lipoprotein lipasa endotelial (LPL)	24
1.4.2. Lecitin-colesterol-aciltransferasa (LCAT)	25
1.4.3. Lipasa hepática (LH)	26
1.4.4. HMG CoA reductasa	26
1.4.5. Proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC)	27
1.5. Receptores	27
1.5.1. Receptores de LDL	27
1.5.2. Receptor scavenger clase A (tipos I y II)	29
1.5.3. Receptor scavenger clase B	29
1.6. Metabolismo de las lipoproteínas	30
1.6.1. Lipoproteínas ricas en triglicéridos	30
1.6.1.1. Metabolismo de los quilomicrones	31
1.6.1.2. Metabolismo de las VLDL e IDL	32
1.6.2. Lipoproteínas ricas en colesterol.	33
1.6.2.1. Metabolismo de las LDL	33
1.6.2.2. Metabolismo de las HDL	34
2. Hipertensión arterial y riesgo cardiovascular	36
3. Genética de la aterosclerosis	55
3.1. Generalidades. Polimorfismos	56

3.2. Polimorfismos de la apo C-III	60
3.2.1. Polimorfismo Sst-I	61
3.2.2. Otros polimorfismos de la apo C-III.	70
3.3. Polimorfismos relacionados con aterosclerosis	76
3.3.1. Polimorfismo relacionado con el metabolismo lipídico	76
3.3.2. Polimorfismo relacionado con el sistema renina-angiotensina	81
3.3.3. Polimorfismo relacionado con el sistema de la coagulación y de la fibrinólisis	82
3.3.4. Polimorfismo genético de la homocisteína	84
3.3.5. Polimorfismo del gen de la sintasa del óxido nítrico endotelial	85
3.3.6. Polimorfismo genético de la paraoxonasa	85
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	87
III. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS	93
A) Diseño	95
B) Sujetos	97
C) Material	99
D) Métodos	101
1. Medición de la tensión arterial	101
2. Medidas antropométricas	101
3. Técnicas de biología molecular	102
3.1. Aislamiento del ADN	102
3.2. Genotipo de la apo C-III	104
3.3. Genotipo de la apo E	108
4. Determinaciones analíticas	108
4.1. Determinación de colesterol y triglicéridos	108
4.2. Determinación de lipoproteínas	109
4.3. Determinación de apoproteínas	110
4.4. Determinación de glucemia e insulinemia	110
5. Análisis estadístico	111
6. Métodos de búsqueda bibliográfica	112
7. Recursos financieros	112
IV. RESULTADOS	113
1. Distribución de variables	115
2. Características generales del grupo de pacientes hipertensos esenciales	116

3. Influencia del sexo sobre las variables lipídicas estudiadas en los pacientes hipertensos esenciales	117
3.1. Colesterol	117
3.2. Triglicéridos	119
3.3. Apolipoproteínas A-I y B	121
3.4. Índices aterogénicos	122
4. Influencia del sexo sobre el metabolismo hidrocarbonado en los pacientes hipertensos esenciales	123
5. Frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III	124
6. Características clínicas de los pacientes hipertensos esenciales según el genotipo de la apo C-III	126
7. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico en los pacientes hipertensos esenciales	128
7.1. Colesterol	128
7.2. Triglicéridos	130
7.3. Apolipoproteínas A-I y B	132
7.4. Índices aterogénicos	133
8. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo hidrocarbonado en los pacientes hipertensos esenciales.....	134
9. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en el subgrupo de varones hipertensos esenciales	136
9.1. Colesterol	136
9.2. Triglicéridos	137
9.3. Apolipoproteínas A-I y B	138
9.4. Índices aterogénicos	139
9.5. Metabolismo hidrocarbonado	140
10. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales	140
10.1. Colesterol	140
10.2. Triglicéridos	142
10.3. Apolipoproteínas A-I y B	144
10.4. Índices aterogénicos	145
10.5. Metabolismo hidrocarbonado	146
11. Relación entre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado.....	147
11.1. Correlación entre el índice HOMA y lípidos	147
11.2. Asociación entre resistencia insulínica y glucosa basal alterada con el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III, en función del sexo	149

V. DISCUSIÓN	153
1. Selección de los pacientes	156
2. Características clínicas de los pacientes hipertensos esenciales	157
3. Influencia del sexo sobre las variables bioquímicas estudiadas.....	158
4. Frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III.....	160
5. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico en pacientes hipertensos esenciales.....	161
6. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo hidrocarbonado en pacientes hipertensos esenciales.....	163
7. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en pacientes hipertensos esenciales según el sexo	165
VI. CONCLUSIONES	171
VII. ABREVIATURAS	175
VIII. BIBLIOGRAFÍA	181
IX. APÉNDICE	203
Artículo publicado a partir de esta tesis	205

I

INTRODUCCIÓN

1. Lipoproteínas plasmáticas y metabolismo lipoproteico.

Las lipoproteínas son un grupo de macromoléculas complejas cuya función es transportar los lípidos plasmáticos, que por razones de solubilidad no pueden ir disueltos en el plasma. En su estructura se distingue una fracción proteica, las apoproteínas, y una fracción lipídica que determinan, según su composición, muchas de sus propiedades fisicoquímicas y de sus funciones metabólicas. Describiremos brevemente los lípidos plasmáticos, la estructura de las lipoproteínas y las diferentes apoproteínas.

1.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS.

Los componentes lipídicos del plasma son el colesterol (30% en forma libre y 70% esterificado), los triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. Con excepción de estos últimos, que circulan unidos a la albúmina, el transporte por la sangre de los otros tres componentes, insolubles en agua, se lleva a cabo por las lipoproteínas.

1.1.1. Colesterol.

El colesterol es un importante componente de las lipoproteínas y las membranas plasmáticas, regulando sobre todo su fluidez y estabilidad. Asimismo, es precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas. Su estructura corresponde a un alcohol policíclico de 27 átomos de carbono, derivado del compuesto esteroideo perhidro-ciclopentano-fenantreno. El grupo hidroxilo permite la esterificación con un ácido. Así, en el hombre aparece tanto en forma libre como unido a un ácido graso de cadena larga (colesterol esterificado). La mayoría de los tejidos posee la capacidad de sintetizar colesterol, pero en circunstancias normales, todo el colesterol sintetizado "de novo" en el organismo se origina en el hígado y en la porción distal del intestino delgado. La enzima limitante que regula el estadio inicial de la síntesis de colesterol es la β -hidroxi- β -

metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), sujeta a un mecanismo de retroinhibición por parte del mismo colesterol. La mayor parte del colesterol plasmático se encuentra en forma esterificada, siendo los ésteres que predominan el linoleato y el oleato de colesterol. Ambos se forman en el plasma por acción de la enzima lecitin colesterol aciltransferasa (LCAT) y en menor proporción por la acción de la enzima acil-colesterol aciltransferasa (ACAT) en el intestino delgado y en el hígado. Al contrario de lo que sucede con los ésteres de colesterol, el colesterol libre en plasma se intercambia fácilmente con el de las membranas celulares.

1.1.2. Triglicéridos.

Los triglicéridos representan el 95% de los lípidos del tejido adiposo y son la fuente de energía durante los periodos de ayuno. Estructuralmente son ésteres de ácidos grasos con glicerol y generalmente contienen una mezcla de dos o tres ácidos grasos diferentes. Los triglicéridos procedentes de la dieta se absorben principalmente en forma de quilomicrones, penetrando en los linfáticos intestinales y, a través del conducto torácico, en el sistema circulatorio. Normalmente se absorbe el 90% de los triglicéridos, lo que equivale a decir que penetran en la circulación entre 70 y 150 gramos de triglicéridos exógenos al día. En el intestino delgado también se producen triglicéridos a partir de ácidos grasos de origen endógeno, pero la fuente principal de los mismos es el hígado, eliminándose en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Los triglicéridos tienen una vida media corta en el plasma, del que se extraen mediante un proceso que implica hidrólisis y captación por varios órganos, sobre todo tejido adiposo. Tras la ingestión de una comida grasa, los niveles de triglicéridos de los quilomicrones se aclaran en un plazo de doce horas, por lo que la determinación de los niveles plasmáticos en ayuno refleja la cantidad de triglicéridos endógenos presentes en la circulación.

1.1.3. Fosfolípidos.

Los fosfolípidos o diacilfosfátidos son lípidos complejos que forman parte integral de todas las membranas celulares y de las lipoproteínas. Su estructura responde a una molécula de glicerol a la que se encuentran unidos dos ácidos grasos y una molécula de

fosfato. El grupo fosfato se puede esterificar con diversas moléculas, tales como colina, etanolamina y serina. Los dos fosfolípidos principales que se detectan en el plasma son la fosfatidilcolina o lecitina y la esfingomiélin (fosfolípido distinto a los fosfátidos). Contienen grupos polares que los convierten en compuestos anfipáticos. Esto hace que en un medio acuoso formen estructuras con superficie polar (hidrófila) e interior apolar (hidrófoba), desempeñando así un papel clave para el mantenimiento de los lípidos no polares, como los triglicéridos y los ésteres de colesterol, en una fase insoluble. La síntesis de los fosfolípidos tiene lugar en casi todos los tejidos, aunque proceden fundamentalmente del hígado, contribuyendo el intestino delgado con la lecitina de los quilomicrones. Su composición en ácidos grasos se ve marcadamente influida por la naturaleza de la grasa de la dieta.

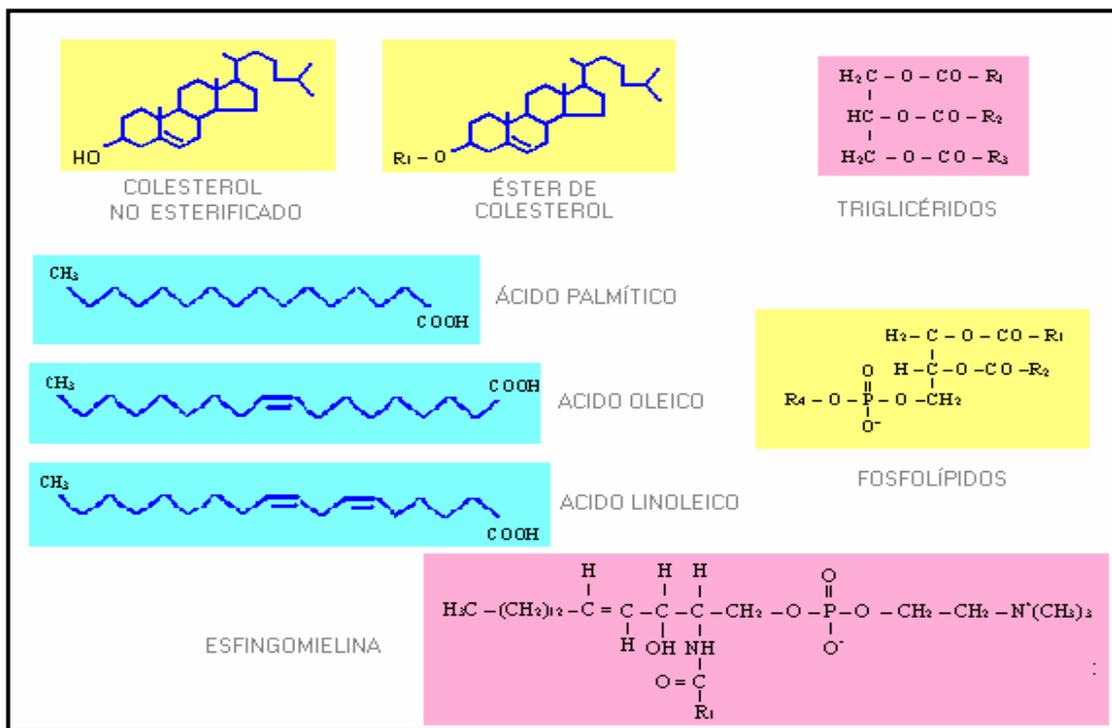


Fig. 1. Estructura de los principales lípidos plasmáticos. R_1 , R_2 , R_3 son cadenas de ácidos grasos. R_4 corresponde a moléculas tales como colina, etanolamina o serina.

1.1.4. Ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos son una clase de compuestos que contienen una larga cadena hidrocarbonada y un grupo terminal carboxilo. Se clasifican de acuerdo con el tamaño de sus cadenas, la cantidad de dobles enlaces presentes y la posición de estos. Dichas características determinan la nomenclatura y la actividad metabólica de cada ácido graso. Los ácidos grasos naturales, por lo general, contienen un número par de átomos de carbono. Los ácidos grasos sin dobles enlaces se denominan saturados, entre los que destacan el palmítico, esteárico, mirístico y laúrico. Los que poseen un doble enlace se denominan monoinsaturados (oleico y palmitoleico), y los que poseen dos o más, poliinsaturados (linoleico, linolénico y araquidónico). Así mismo, los insaturados se pueden clasificar en función de la posición del doble enlace en relación con el grupo metilo terminal, denominado carbono omega. Los omega-3, que generalmente se encuentran en el aceite de pescado, tienen tres átomos de carbono entre el extremo omega y el primer doble enlace. La configuración cis de un doble enlace implica que los átomos de hidrógeno de los dos carbonos unidos por ese doble enlace están del mismo lado, siendo ésta la configuración de la mayoría de los ácidos grasos naturales. En la configuración trans, los átomos de hidrógeno están en lados opuestos. Estos últimos se suelen producir industrialmente por hidrogenación de los aceites vegetales para convertirlos en mantequillas de repostería y margarinas. Los ácidos grasos se transportan desde la zona de almacenamiento en el tejido adiposo a otras zonas de utilización en el hígado y en el músculo en forma de ácidos grasos libres. La enzima limitante de la movilización es una lipasa hormonosensible, siendo promovida su actividad por hormonas como la noradrenalina y los glucocorticoides.

1.2. ESTRUCTURA DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas son un conjunto heterogéneo de partículas de un tamaño entre 80 y 1500 Å, cuya función es transportar el colesterol, triglicéridos y otros componentes lipídicos, que por razones de solubilidad no pueden ir disueltos en el plasma. Su estructura básica consiste en un núcleo central de lípidos no polares compuesto por ésteres del colesterol y triglicéridos hidrófobos, rodeado de un monoestrato hidrófilo de fosfolípidos

cuyas cabezas polares están dirigidas hacia el exterior de la partícula, es decir, hacia el medio iónico, mientras que sus ácidos grasos se orientan hacia el interior de la partícula formando un núcleo apolar. La cubierta presenta algunas moléculas de colesterol libre con un grupo hidroxilo dirigido hacia las cabezas polares de los fosfolípidos. En esta parte de la lipoproteína se encuentran también una serie de cadenas polipeptídicas llamadas apolipoproteínas o apoproteínas (fig. 2).

La distinta proporción de lípidos y proteínas confiere a las lipoproteínas unas propiedades fisicoquímicas características en cuanto a densidad, tamaño, carga eléctrica y movilidad electroforética; así, por ejemplo, a medida que aumenta el contenido en proteínas respecto al contenido en lípidos se observa un aumento de densidad de las partículas. Además, cada clase de lipoproteína está integrada por una población de partículas semejantes pero no idénticas, según el estadio de procesamiento metabólico en el que se encuentre.

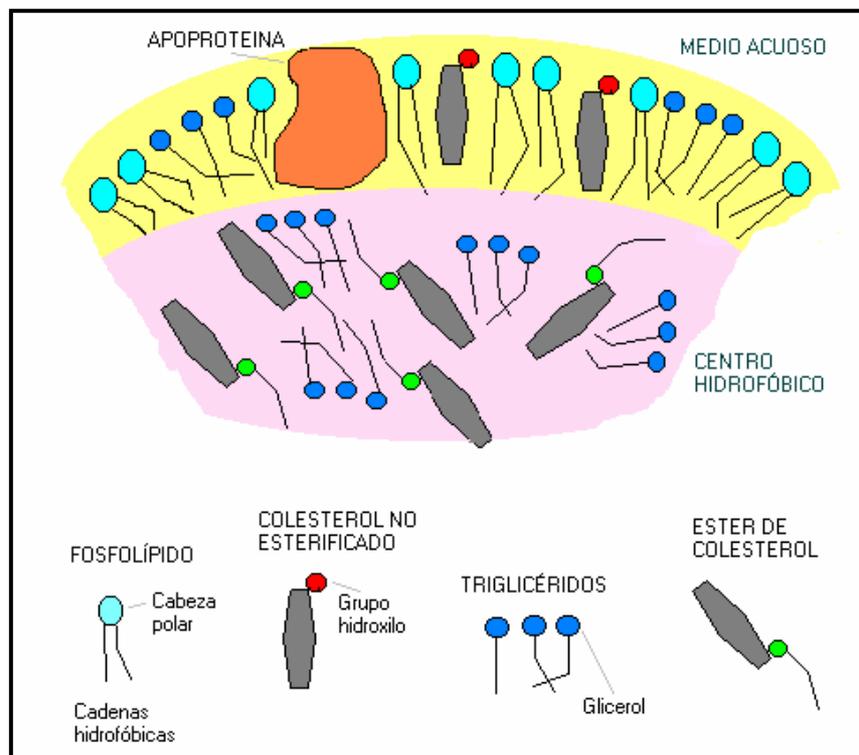


Fig. 2. Modelo de la estructura de una lipoproteína.

La densidad de la partícula constituye el principal criterio de clasificación de las lipoproteínas en diferentes familias¹. Las principales lipoproteínas son:

- Quilomicrones: $d < 0,95$ g/mL.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL): $d = 0,95 - 1,006$ g/mL.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL): $d = 1,006 - 1,019$ g/mL.
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL): $d = 1,019 - 1,063$ g/mL.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL): $d = 1,063 - 1,210$ g/mL.

En el plasma de la mayoría de los humanos también se encuentran pequeñas cantidades de la denominada lipoproteína (a), con una densidad de 1,050-1,150 g/mL. Esta lipoproteína, de función aún desconocida, está compuesta por una partícula de LDL unida covalentemente mediante un puente disulfuro entre la apoproteína B-100 y una glucoproteína, apoproteína (a). Tiene una estructura similar al plasminógeno. Altos niveles sanguíneos de Lp(a) se han asociado a un mayor riesgo de enfermedad coronaria².

A menudo las lipoproteínas son secretadas de una forma, para después ser transformadas en otras de un subtipo o de una clase diferente. Este proceso dinámico se desarrolla a medida que las lipoproteínas interactúan con enzimas circulantes o unidas al endotelio y con otras lipoproteínas. Por ello, casi todas las apoproteínas pueden cambiar sus asociaciones lipoproteicas durante su estancia en el torrente circulatorio.

1.3. APOPROTEÍNAS.

Son los componentes proteicos de las lipoproteínas. Están dotadas de importantes propiedades estructurales y funcionales, con zonas polares y no polares que les confieren actividad anfipática y permiten que los lípidos sean hidrosolubles. Las apoproteínas también actúan como ligandos, lo que les permite unirse a determinados receptores de la superficie celular. Las alteraciones de las propiedades de unión de las apoproteínas o de sus receptores originan dislipemias. Otra de las funciones de las apoproteínas es activar o inhibir varias enzimas esenciales para el metabolismo lipídico.

Las apoproteínas se designan por las letras mayúsculas A, B, C, etc., a veces acompañadas de números romanos. Todas las apoproteínas, excepto la B-48, B-100 y apo (a), parecen capaces de disociarse de una lipoproteína e incorporarse a otra. Esto no sólo sirve para aumentar el procesamiento metabólico de una partícula lipoproteica dada, sino también para prolongar el tiempo de estancia de las apoproteínas en plasma.

1.3.1. Apoproteína C-III.

La apoproteína C-III es una glicoproteína de 79 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 8.750 Da. El residuo amino terminal corresponde a una serina y el carboxilo terminal a una alanina, razón por la cual fue denominada apo Ala^{3, 4}. Es sintetizada fundamentalmente en el hígado, y en menor grado en el intestino, como un propéptido de 99 aminoácidos, perdiendo finalmente un péptido señal de 20 aminoácidos para dar lugar a la apo C-III madura⁵. El gen que la codifica está situado en el cromosoma 11, en íntima relación con los genes que codifican la apo A-I y la apo A-IV⁶. Constituye aproximadamente el 50% de las proteínas de las VLDL y el 2% de las HDL, aunque el 60% de la apo C-III plasmática pertenece a las partículas de HDL y el 25% a las VLDL, debido al alto contenido proteico de las HDL. Su concentración plasmática es de 12-14 mg/dL.

El sitio de unión del residuo glucídico es un aminoácido treonina en posición 74 (fig. 3). Este residuo está compuesto por una molécula de N-acetil-galactosamina, una molécula de galactosa y 0, 1 ó 2 moléculas de ácido siálico. El número de moléculas de ácido siálico da nombre a las tres isoformas existentes más frecuentes de apo C-III: apo C-III₀, apo C-III₁ y apo C-III₂⁷. Jabs et al han descrito otra variante, apo C-III₃, con 3 moléculas de ácido siálico, asociada con hipertrigliceridemia⁸.

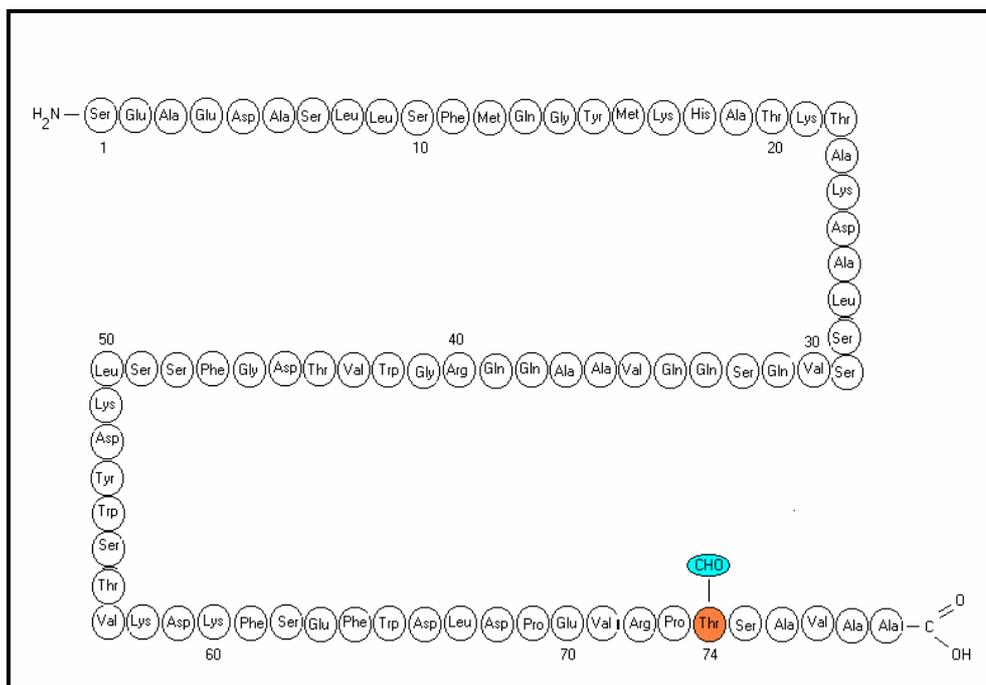


Fig. 3. Secuencia de aminoácidos de la apolipoproteína C-III. Unida al aminoácido treonina en posición 74, se encuentra la cadena carbohidratada (CHO). Tomado de Brewer et al.⁴.

La apo C-III₁ es la isoforma más abundante en el ser humano (59%), estando la molécula de ácido siálico unida a la posición C-3 de la galactosa. La apo C-III₂ (27%) añade a la estructura de la apo C-III₁ una nueva molécula de ácido siálico en la posición C-6 de la N-acetil-galactosamina (fig.4). La apo C-III₀, que sólo constituye un 14% del total de las formas de apo C-III parece que, además de carecer de la molécula de ácido siálico, tampoco posee las moléculas de galactosa ni de N-acetil-galactosamina⁹. Bondarenko et al¹⁰, mediante espectrometría de masa, han descrito variantes de las anteriores isoformas por pérdida de los últimos aminoácidos (Ala76, Val77, Ala78, y Ala79) y una nueva isoforma denominada C-III_x, debido a proteólisis por carboxipeptidasa A in vivo. También hallan otro espécimen que consistiría en una apo C-III₁ sin ácido siálico, pero debido muy probablemente a oxidación in vitro por los métodos analíticos empleados, a la que denominan C-III_{0,glyc}.

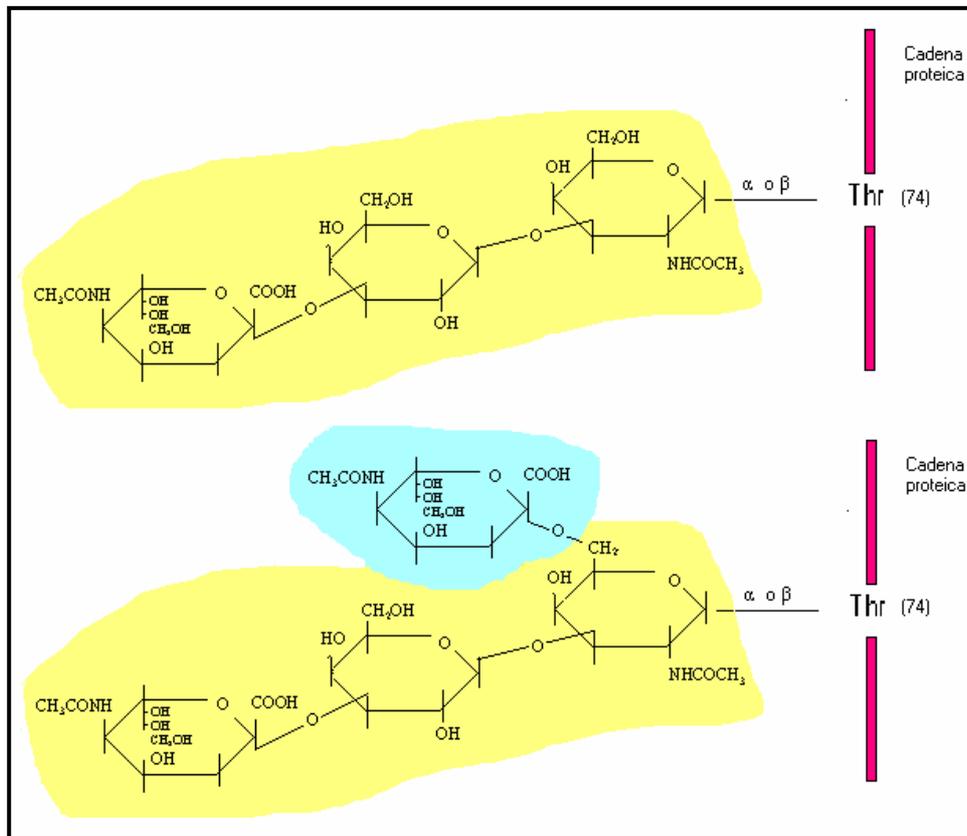


Fig. 4. Estructura propuesta para la cadena carbohidratada de la apo C-III. La imagen superior corresponde a la apo C-III₁, que contiene una molécula de ac. siálico. En la imagen inferior se representa la estructura de la apo C-III₂ a la que se le añade otra molécula más de ac. siálico (coloreada en azul). Tomado de Ito et al.⁹.

La apo C-III juega un papel fundamental en el metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos. Tiene un efecto opuesto a la apo C-II, es decir, inhibe la actividad de la lipoprotein lipasa (LPL) y la lipasa hepática, y también inhibe la captación hepática de los quilomicrones y VLDL mediada por la apo E. Por ambos motivos, se tiende a prolongar el tiempo de estancia y la concentración de las VLDL en plasma. Por el contrario, la ausencia de apo C-III se asocia a concentraciones muy reducidas de VLDL circulantes. Así, los niveles plasmáticos de apo C-III se correlacionan positivamente con los triglicéridos totales en plasma^{11, 12}.

La utilización de animales transgénicos que expresan el gen de la apo C-III humana ha permitido ampliar los conocimientos sobre el papel fisiológico de esta proteína¹³. Un

grupo de ratones transgénicos del gen de la apo C-III humana (ratones HuCIIIITg)^{14, 15} que presentaban una sobreproducción de apo C-III, desarrollaron una hipertrigliceridemia debida fundamentalmente al incremento del número de partículas de VLDL en la circulación. Además, estas partículas eran de mayor tamaño y tenían una composición alterada, con mayor cantidad de triglicéridos y apo C-III y menores cifras de apo E y apo C-II, en comparación con ratones control. Se comprobó que estas VLDL eran aclaradas mucho más lentamente debido a un mal reconocimiento por los receptores lipoproteicos. Aalto-Setälä et al¹⁶ comprueban que este hecho no se debe a problemas de incompatibilidad interespecie (hombre-ratón) de la apo C-III, y sugieren que la disminución de la captación tisular de VLDL podría deberse a la disminución de la apo E en las partículas VLDL de los ratones transgénicos, lo cual alteraría la captación de VLDL por los receptores de apo B a través del reconocimiento de apo E, o bien, a que el exceso de apo C-III evitaría los cambios conformacionales que se han de producir en la apo E para un correcto reconocimiento por su receptor. De esta forma, parece que existe una relación funcional entre apo C-III y apo E, probablemente debido a una competencia espacial en la superficie de la lipoproteína. Estos mismos autores añaden que las VLDL de los ratones HuCIIIITg tienen disminuida su fijación a heparina-Sepharose, y sugieren que el defecto podría estar en la unión de las VLDL a la matriz de proteoglucanos de heparán sulfato de la superficie endotelial donde está enclavada la LPL. La apo C-III, por tanto, jugaría un papel modulador en el aclaramiento de las VLDL por parte del receptor. Ebara et al¹⁷, utilizando ratones transgénicos para apo C-III humana pero no expresores de apo E (ratones CIII/E₀), encuentran una disminución de la unión entre VLDL y glucosaminoglucanos producida por la sobreexpresión de apo C-III que era independiente de apo E, y proponen que el mecanismo predominante de la hipertrigliceridemia inducida por la apo C-III se debe a una disminución de la lipólisis en la superficie celular. Estudios con ratones no productores de C-III^{18, 19} encuentran que el déficit de esta apoproteína conlleva un incremento del aclaramiento plasmático de triglicéridos independiente de apo E, demostrando así que la apo C-III es un inhibidor de la lipólisis de las partículas ricas en triglicéridos. Además, Jong et al¹⁸ hallan en estos ratones bajos niveles de colesterol-VLDL (c-VLDL) y un recambio rápido de partículas de oleato de colesterol, por lo que sugieren una nueva función de la apo C-III como regulador de la captación de ésteres de colesterol.

Por otro lado, estudios "in vitro"^{20, 21, 22} e "in vivo"^{23, 24} han demostrado que la apo C-III es capaz de inhibir a la LPL. Ginsberg et al²⁴ observan en dos hermanas con déficit de apo C-III y apo A-I debido a una traslocación genética, un rápido catabolismo de las VLDL asociado a una conversión aumentada de VLDL a IDL, y finalmente a LDL. Este rápido recambio de VLDL no se debía a la retirada por endocitosis de la partícula entera, sino a la hidrólisis del núcleo de la partícula y generación de nuevos productos más densos. Esta rápida conversión en LDL, junto con la reducción severa de HDL que presentaban, podría ser un factor que influyera en la arteriosclerosis precoz de estas dos pacientes.

Kinnunem et al²⁵ han demostrado como la apo C-III es capaz de inhibir de forma lineal "in vitro" la lipasa hepática. Así mismo, Albers et al²⁶ también han constatado como la apo C-III es capaz de ejercer "in vitro" un efecto inhibitorio sobre la LCAT.

Estudios comparativos con otras especies animales^{27, 28}, además de análisis de formas mutadas y trabajos con fragmentos peptídicos de la apoproteína C-III, han permitido establecer ciertas relaciones entre la estructura y la función de esta apoproteína. Así, se sabe que las secuencias evolutivamente más conservadas²⁹ son los aminoácidos 16-33 y 50-69, responsables de la formación de hélices anfipáticas que se suponen que juegan un papel importante en la inhibición de la LPL y en la unión a lípidos. El fragmento N-terminal de la apo C-III (aminoácidos 1-40) no tiene capacidad inhibitoria sobre la LPL, aunque para alcanzar el máximo efecto inhibitorio se necesita la secuencia completa de apo C-III (aminoácidos 1-79), quizás debido a la conformación espacial que adopta la molécula completa, aunque también se especula con que lo que habría es una unión a mayores puntos de la partícula de LPL^{30, 31}. Lins et al³² han estudiado recientemente las propiedades de interacción lipídica del dominio constituido por los aminoácidos 6-20 del fragmento N-terminal de la apo C-III concluyendo que, si bien la unión lipídica no sería el papel fisiológico de esta secuencia, su contenido en residuos hidrofóbicos es importante para lograr dicha unión. Otros estudios reflejan la importancia de la secuencia de aminoácidos en la configuración de la estructura secundaria y dominios de la proteína como elementos determinantes de la función de la apo C-III. Por ejemplo, Pullinger et al³³ hallan en un grupo de pacientes mejicanos con moderada hipertrigliceridemia una variante de C-III con

un residuo lisina en posición 38 en lugar del ácido glutámico, sugiriendo que esta carga positiva adicional sería la responsable de la alteración de la función de la C-III, provocando la elevación plasmática de triglicéridos. Liu et al³⁴ estudian in vitro otra variante de C-III, una sustitución de alanina en posición 23 por treonina, identificada en 3 indios del Yucatán; este cambio de aminoácido altera el reparto hidrofóbico/hidrofílico del péptido N-terminal y podría dificultar la unión a lípidos. Estos autores sugieren que, in vivo, esta deficiente afinidad lipídica conduciría a un catabolismo más rápido de la apo C-III libre en plasma, y a una peor competición con la apo E que aumentaría el aclaramiento plasmático de lipoproteínas ricas en triglicéridos, es decir, niveles plasmáticos de C-III y triglicéridos disminuidos, hechos observados en estos individuos. Von Eckardstein et al³⁵ resaltan la importancia del residuo 58 correspondiente a lisina en la fisiología de la apo C-III, al encontrar sustituido este aminoácido por glutamina en dos mujeres (madre e hija) que presentaban bajas concentraciones de C-III, triglicéridos ligeramente disminuidos y altas concentraciones de HDL y apo A-I; las partículas HDL eran de mayor tamaño y enriquecidas en apo E. Esta mutación supone la pérdida de la única carga positiva del sitio hidrofílico de la hélice alfa anfipática formada por los residuos 58-68. En otro trabajo, Liu et al³⁶ sugieren que los residuos hidrofóbicos fenilalanina 64 y triptófano 65 son cruciales para la fijación a lípidos, y que la inhibición de la LPL se debe a interacciones proteína-proteína.

Por otro lado, diversos autores^{30, 31, 37, 38} afirman que la cadena carbohidratada, que va unida al aminoácido treonina en posición 74, no es necesaria para el transporte intracelular ni para la secreción de la apoproteína, no afecta la integración de la C-III en las partículas lipoproteicas, y tampoco se requiere para la inhibición de la LPL. Sin embargo, Holdsworth et al³⁹, en pacientes con insuficiencia renal crónica e hipertrigliceridemia severa, aíslan un tipo de VLDL con un exceso de apo C-III₂ (57,5% respecto al 35,5% de los controles), encontrando que esta lipoproteína más sializada resultó ser un sustrato peor para la LPL de suero bovino, y sugiriendo un papel de la cadena de carbohidratos en la interacción con la LPL. También Mann et al⁴⁰ proponen una función para la cadena glucosídica; estos autores han caracterizado en cultivos de hepatocitos de rata un receptor estimulador de la lipólisis (LSR), al que atribuyen un papel fisiológico en la captación de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Establecen que el grado de sialización de la apo C-III

determina el nivel de inhibición que ejerce esta apoproteína en la unión de las VLDL a este receptor LSR, de manera que las isoformas menos sializadas (CIII₀, CIII₁) incrementan esta inhibición, dificultando el aclaramiento plasmático de las VLDL.

La producción de apo C-III está modulada por diversos factores. La dieta parece ejercer un papel clave en esta modulación. En estudios realizados en hámsters⁴¹ y monos *Cynomolgus*⁴² se ha observado como una dieta rica en grasa saturada aumenta las concentraciones de ARN mensajero (ARNm) de apo C-III, mientras que las dietas ricas en grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas descienden los niveles del mismo. Baroukh et al⁴³ han observado en ratones transgénicos del cluster A-I/C-III/A-IV que una dieta alta en colesterol incrementa la expresión intestinal de los tres genes del cluster y las concentraciones plasmáticas de dichas apoproteínas; también aumentó la expresión de los genes que codifican el receptor “scavenger” clase B tipo I (SR-B1) y las proteínas ABCA1 (transportador 1 del casete de unión al ATP), implicados en el eflujo de colesterol. Estos autores sugieren que el incremento del transporte reverso del colesterol constituye la base del mecanismo protector frente a la aterosclerosis observado en estos ratones en respuesta a una dieta aterogénica.

El consumo de una dieta rica en sacarosa no ha demostrado tener efecto sobre los niveles de ARNm de apo C-III en un estudio realizado en hepatocitos de rata⁴⁴. Sin embargo, recientemente, Ostos et al⁴⁵ han estudiado el efecto de la ingesta de fructosa en ratones transgénicos del cluster A-I/C-III/A-IV, encontrando que los niveles plasmáticos de estas tres apoproteínas estaban aumentados, comparados con ratones transgénicos alimentados con una dieta carente de fructosa.

Otro factor modulador es la vitamina A, la cual regula positivamente la expresión del gen de la apo C-III a nivel intestinal, pero no hepático, en ratas⁴⁶. También, Ribalta et al⁴⁷ hallan en pacientes con hiperlipidemia familiar combinada y portadores de determinadas variantes genéticas del cluster A-I/C-III/A-IV (en concreto, transición C1100-T en el exón 3 del gen de apo C-III, y sustitución G-75-A en la región promotora del gen de apo A-I) una asociación entre niveles plasmáticos elevados de apo A-I y apo C-III y altas concentraciones plasmáticas de vitamina A.

La insulina también juega un papel importante en la regulación de la producción de apo C-III. En ratones con diabetes tipo 1 y en cultivos de hepatocitos, Li et al⁴⁸ han demostrado que esta hormona regula a la baja la transcripción del gen de la apo C-III; esta regulación se produce al actuar la insulina sobre una zona de la región promotora de dicho gen, localizada entre - 490 y - 450 bases respecto del lugar de comienzo de la transcripción, denominada elemento respondedor a insulina (C3IRE o IRE). Además, se ha encontrado que la presencia de dos mutaciones en este IRE anula esta regulación^{49, 50, 51}. Por el contrario, Dallinga-Thie et al⁵² observan en células HepG2 que esta regulación a la baja producida por la insulina es independiente de la presencia de variaciones en el IRE; incluso, en células CaCo-2 encuentran una estimulación de la expresión del gen de apo C-III por parte de la insulina, también de forma independiente a la presencia de mutaciones en el IRE.

Las hormonas tiroideas parecen intervenir también en la transcripción de la apo C-III. En hepatocitos de rata⁵³, las hormonas tiroideas actúan sobre la expresión de C-III a tres niveles: en la transcripción, en la maduración del ARNm y en la estabilidad de dicho ARNm. En el hipertiroidismo agudo, existe un aumento inicial de la transcripción de la apo C-III que desaparece a las 24 horas. En el hipertiroidismo crónico, se produce una disminución de la transcripción de dicha apoproteína. En cambio, en el hipotiroidismo crónico aumenta la transcripción en un 178%, aunque no se traduce en un aumento significativo del total nuclear de ARNm. Esto se explicaría por alteraciones en la maduración del ARNm. Tada et al⁵⁴ encuentran una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas y los niveles plasmáticos de apo C-III en pacientes con disfunción tiroidea.

Diversos fármacos también influyen en la producción de C-III. Las estatinas son drogas hipolipidémicas que disminuyen el colesterol y los triglicéridos. Schoonjans et al⁵⁵ han encontrado en ratas tratadas con simvastatina un incremento de los niveles de ARNm de LPL en tejido adiposo y cardíaco, acompañado de un descenso de ARNm de apo C-III, así como de los niveles plasmáticos de C-III, lo que explicaría los efectos hipotriglicéridémicos de esta droga.

Los fibratos también disminuyen la expresión del gen de la apo C-III en hepatocitos humanos y de rata⁵⁶, por medio de su unión a los receptores nucleares hormonales PPAR- α (receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo alfa) que, además de disminuir las concentraciones de C-III, también aumentan la expresión genética de LPL, resultando una disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos^{57, 58}.

La hipertrigliceridemia es una complicación del tratamiento con retinoides. Vu-Dac et al⁵⁹ han encontrado una elevación de los niveles plasmáticos de C-III en varones tratados con isotretinoino, sin cambios en los niveles de apo E; en células HepG2 han demostrado que los retinoides estimulan la expresión genética de C-III a nivel transcripcional por medio del receptor retinoideo X (RXR), que induce un incremento de los niveles de ARNm de C-III y de la producción de esta proteína.

En la actualidad se está dedicando una especial atención al proceso de regulación de la transcripción de genes eucarióticos, proceso biológico complejo que involucra a un gran número de factores de transcripción y un extenso conjunto de proteínas que constituyen la maquinaria básica de la transcripción. Los factores de transcripción participan en los pasos finales de las vías de señal de transducción conduciendo a la activación o represión transcripcional de genes específicos. Las secuencias o elementos reguladores del promotor y del “enhancer” del gen de la apo C-III humana están localizados entre los nucleótidos – 792 a – 25, donde se han identificado 4 elementos reguladores proximales (denominados con las letras A-D) y 6 elementos distales (E-J)⁶⁰. Zannis et al⁶¹, en una amplia revisión, exponen los factores implicados en la regulación del gen de la apo C-III, la mayoría de los cuales son comunes para el cluster genético A-I/C-III/A-IV. Los factores de transcripción SP1 (proteína estimuladora 1) y HNF-4 (factor nuclear hepático 4) son esenciales para la actividad del “enhancer” y del promotor proximal del gen de C-III, actuando de forma sinérgica con otros receptores nucleares, como por ejemplo el factor USF (factor estimulador “upstream” o secuencia arriba)⁶². Citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) e IL-1 (interleukina 1) reprimen la actividad del promotor de apo C-III, mientras que TGF- β (factor estimulador transformante beta) la estimula. El factor TGF- β activa a las proteínas

transductoras intracelulares SMAD3/4 las cuales interactúan con el factor HNF-4 incrementando la actividad del promotor y del “enhancer” de C-III. Parece que otros factores activados por diferentes vías de señalización (NF-κB, Jun y otros) interactúan con el factor HNF-4 unido al “enhancer”, y de esta forma reprimen la actividad del promotor de C-III. Recientemente, Coste et al⁶³ han descrito dos receptores nucleares que también reprimen específicamente el gen de la apo C-III humana, denominados Rev-erba y RVR. La comprensión de este complejo proceso de transcripción puede permitir en el futuro aumentar o disminuir selectivamente la expresión de los genes de las apolipoproteínas y, así, reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Diversos estudios han analizado el papel de la apo C-III en el desarrollo de la cardiopatía isquémica. En el estudio ECTIM se demostró que la apo C-III juega un papel importante en la aterogénesis, asociándose niveles altos de apo C-III y de lipoproteínas que contienen apo B y C-III con la incidencia de infarto de miocardio⁶⁴. También, en el estudio CARE, la apo C-III presente en VLDL y LDL se comportó como uno de los marcadores más específicos de riesgo de enfermedad coronaria⁶⁵. Además, diversos trabajos que valoran angiográficamente la evolución de las lesiones coronarias tras tratamiento hipolipemiante, concluyen que la apo C-III es el predictor más importante de progresión de la enfermedad coronaria⁶⁶. Por otro lado, Tsuji et al⁶⁷ analizan diversos parámetros lipídicos en pacientes fallecidos por muerte cardíaca súbita, principalmente por afectación coronaria, y hallan que los niveles elevados de apo C-III plasmática indican la posibilidad de la estenosis coronaria como causa de la muerte cardíaca súbita.

Las complicaciones cardiovasculares y, particularmente la enfermedad coronaria, son las principales causas de morbilidad y mortalidad en sujetos diabéticos tipo 2. Gervaise et al⁶⁴ estudian las relaciones entre diversas variables lipídicas y la presencia de macroangiopatía y otros factores de riesgo en sujetos diabéticos no insulino-dependientes, concluyendo que la apo C-III era un marcador independiente de riesgo coronario en estos pacientes. En este sentido, diversos trabajos han observado también un aumento en las cifras de apo C-III en pacientes diabéticos tipo 2⁶⁸, y en pacientes diabéticos tipo 2 con cardiopatía isquémica demostrada en relación con diabéticos sin cardiopatía⁶⁹ y, en diabéticos con macroangiopatía en comparación con diabéticos sin macroangiopatía⁷⁰. Por

otro lado, niños diabéticos tipo 1 con mal control de su enfermedad⁷¹ presentaban un aumento en los niveles de apo C-III, lo que podría contribuir al incremento de riesgo de enfermedad coronaria que ocurre en este grupo de población. Sin embargo, Reaven et al⁷² no encuentran relación entre los niveles elevados de apo C-III con el desarrollo de resistencia a la insulina en ratones transgénicos de apo C-III humana. Tampoco Amaral et al⁷³ hallan diferencias significativas en los niveles de insulina basal y tras sobrecarga de glucosa entre este tipo de ratones transgénicos y ratones control.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica manifiestan con frecuencia trastornos lipídicos, entre ellos la elevación de los niveles plasmáticos de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Atger et al⁷⁴ describen en pacientes urémicos crónicos un cociente elevado apo C-III₂ /apo C-III₁. Moberly et al⁷⁵ han encontrado un aumento de la concentración plasmática de C-III en estos enfermos, tanto dializados como no dializados, respecto a sujetos control. Este hecho podría explicar el incremento de triglicéridos plasmáticos y de lipoproteínas ricas en triglicéridos observado en estos pacientes, por alteración del metabolismo de dichas partículas lipoproteicas.

El tratamiento a largo plazo con inhibidores de la proteasa en pacientes afectados de infección por VIH puede inducir hipertrigliceridemia y lipodistrofia. Bonnet et al⁷⁶ han estudiado a un grupo de pacientes bajo terapia antirretroviral que presentaban bajos niveles de glucosa, insulina elevada, moderada hipertrigliceridemia, bajos niveles de c-HDL y de apo A-I, e incremento de apo C-III y apo E especialmente asociadas a lipopartículas con apo B. Estos datos documentan la posible aterogenicidad del tratamiento con inhibidores de la proteasa, donde la apo C-III juega un papel fundamental en el desarrollo de la hipertrigliceridemia.

1.3.2. Otras apoproteínas.

- **Apoproteína A-I.**

Se sintetiza en el hígado y en el intestino, siendo el principal componente estructural de las HDL. Su peso molecular es de 28.300 Da, estando compuesta por 243 aminoácidos. Entre sus funciones se encuentra la de servir como cofactor de la LCAT, ser ligando de reconocimiento de la HDL por parte del receptor específico de membrana, y participar activamente en el transporte reverso del colesterol. Existe una correlación entre bajas concentraciones plasmáticas de apoproteína A-I y un aumento del riesgo de arteriosclerosis, comportándose la apo A-I como el factor de riesgo más fuerte de predicción de enfermedad coronaria^{77, 78}. Su concentración plasmática aproximada es de 130 mg/dL.

- **Apoproteína A-II.**

Se trata de una molécula de 17.000 Da, que en los seres humanos está formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas unidas por un puente disulfuro. Es la segunda proteína más abundante en las HDL, constituyendo el 20% de las mismas. Se sintetiza fundamentalmente en el hígado. Entre sus funciones se encuentra la inhibición de la actividad de la enzima LCAT y de la enzima PTEC, la activación de la lipasa hepática y la inhibición de la captación hepática de colesterol. La apo A-II altera por vías opuestas el metabolismo intermedio de las HDL y sus efectos aterogénicos son motivo de controversia⁷⁹. Su concentración plasmática aproximada es de 40 mg/dL.

- **Apoproteína A-IV.**

Es sintetizada fundamentalmente en el intestino como una preapoproteína de 396 aminoácidos, de los que 20 constituyen un péptido señal. Su peso molecular es de 45.000 Da. Forma parte de los quilomicrones y de las HDL. Se ha involucrado en la activación de la LCAT y la LPL, y en la modulación de la transferencia de ésteres de colesterol entre

HDL y LDL mediada por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC)^{80, 81}. Niveles plasmáticos bajos de apo A-IV guardan una leve correlación negativa con la severidad de lesiones coronarias, y también se ha encontrado una correlación positiva con los niveles plasmáticos de triglicéridos⁸². Su concentración media plasmática es de 40 mg/dL.

▪ **Apoproteína A-V.**

Estudios de regeneración de tejido hepático y análisis comparativos del genoma humano y de ratón han permitido el hallazgo de una nueva apolipoproteína, cuyo gen se localiza en el cromosoma 11, muy próximo al “cluster” AI/CIII/AIV, aproximadamente a 30 kb del extremo 3' del gen de la apo A-IV. Esta nueva secuencia contiene 4 exones que codifican una proteína de 366 aminoácidos, con ciertas similitudes con la apo A-IV. Por medio de técnicas inmunológicas se ha detectado su presencia en partículas VLDL y HDL. Estos paralelismos han dado lugar a que esta nueva proteína sea denominada apoproteína A-V^{83, 84}. A través de estudios con ratones transgénicos y ratones no expresores (“knockout”) del gen de la apo A-V se ha comprobado que esta apoproteína es un importante determinante de los niveles plasmáticos de triglicéridos, con unos efectos opuestos a los observados en los ratones “knockout” y transgénicos del gen de la apo C-III. Así, la ausencia de apo A-V incrementa los niveles de triglicéridos mientras que la sobreexpresión de dicha apoproteína los disminuye. Los niveles de colesterol no se ven alterados en los ratones “knockout”, mientras que la sobreexpresión de la apo A-V ofrece resultados ambiguos sobre dichos niveles⁸⁵. Se han detectado diversos polimorfismos en el gen de la apo A-V que se asocian a cambios en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos. La función exacta de esta apoproteína y los mecanismos a través de los cuales participa en el metabolismo lipídico están aún por definir^{85, 86}.

▪ **Apoproteína B-100.**

Es una apoproteína de 550.000 Da, con 4.536 aminoácidos. Se encuentra en las VLDL, IDL y LDL. Se sintetiza en el hígado. Es portadora de los determinantes de unión

de la LDL a su receptor específico. Cada partícula de LDL presenta una molécula de apo B-100. Su concentración plasmática es de 70-100 mg/dL^{87, 88}.

- **Apoproteína B-48.**

Su denominación proviene del hecho de que su peso molecular (264.000 Da) corresponde al 48% del de la apo B-100. Es generada desde el mismo gen y ARN mensajero de ésta, pero debido a una modificación postranscripcional producida por la inserción de un codón "stop" (UAA) en lugar del normal (CAA), sólo se sintetiza una proteína de 2.152 aminoácidos pertenecientes al extremo amino terminal de la apoproteína B-100. Su síntesis es intestinal. Es esencial para el ensamblaje y secreción de los quilomicrones, los cuales pueden tener una o más copias de apo B-48, al contrario de lo que ocurre con las partículas de LDL que sólo tienen una molécula de apo B-100. La apo B-48 no constituye un ligando para los receptores de LDL^{89, 90}. Su concentración plasmática es de 3-5 mg/dL.

- **Apoproteína C-I.**

La apoproteína C-I tiene un peso molecular de 6.600 Da. Está presente en las lipoproteínas ricas en triglicéridos, enlenteciendo el aclaramiento plasmático de éstas a través de diversos mecanismos. La apo C-I inhibe la unión lipoproteica con los receptores hepáticos de LDL, proteína relacionada con el receptor LDL y de VLDL. También es el principal inhibidor plasmático de la enzima PTEC, y parece que interfiere la captación de ácidos grasos. Se sintetiza principalmente en el hígado, y en menor medida en el intestino¹¹. Su concentración plasmática es de 7-8 mg/dL.

- **Apoproteína C-II.**

La apoproteína C-II consiste en una cadena de 79 aminoácidos, con un peso molecular de 8.900 Da. Su síntesis es hepática e intestinal. Es una apoproteína altamente transferible que actúa como activador de la LPL, facilitando la hidrólisis de las partículas lipoproteicas ricas en triglicéridos, quilomicrones y VLDL. La ausencia de apo C-II

conlleva una severa hipertrigliceridemia y se asocia con enfermedad vascular prematura^{30, 91}. Sus valores plasmáticos oscilan alrededor de 3-5 mg/dL.

- **Apoproteína D.**

Es una glucoproteína de síntesis fundamentalmente hepática con un peso molecular de 29.000 Da. Está formada por 169 aminoácidos. Se encuentra en pequeñas cantidades en las HDL. Es una apolipoproteína atípica cuyo papel funcional debe clarificarse. Probablemente sea un transportador para múltiples ligandos, y así se ha involucrado en el eflujo de colesterol desde los tejidos periféricos y en el transporte de ésteres de colesterol hacia el hígado para catabolizarse^{92, 93}. Su concentración plasmática es de 10 mg/dL, aproximadamente.

- **Apoproteína E.**

Esta apoproteína se sintetiza en su mayoría a nivel hepático, aunque alrededor del 1% es de origen intestinal. Se trata de una apoproteína de 34.000 Da de peso molecular y consta de 299 aminoácidos. Es muy transferible, encontrándose en todas las familias lipoproteicas salvo en la LDL. Actúa como ligando en la unión de residuos de quilomicrones con receptores de LDL. Es una proteína polimórfica con tres isoformas de interés, resultantes del cambio de un único aminoácido: la apo E-2, apo E-3 y apo E-4, las cuales exhiben diferencias en su carga neta, y diferencias también en cuanto a la afinidad por los receptores celulares⁹⁴. Por ejemplo, la mutación causada por la sustitución de arginina por cisteína en la posición 158 (apo E-2) inhabilita a la apo E para que interaccione con su receptor. Por otro lado, las HDL que contienen apo E enriquecidas en ésteres de colesterol son captadas por los receptores hepáticos, extrayendo colesterol de los tejidos periféricos para catabolizarlo en el hígado. Además, la apo E participa en la redistribución de colesterol dentro de los órganos o entre diferentes tejidos. Su concentración plasmática es de 5-6 mg/dL.

Actualmente, existe un renovado interés por la apo E debido a su implicación en procesos no relacionados directamente con el transporte lipídico, tales como la enfermedad de Alzheimer, alteraciones cognitivas y enfermedades infecciosas.

- **Apoproteína H.**

Es una glucoproteína de 50.000 Da de peso molecular, también denominada beta 2-glicoproteína I, cuya función en el metabolismo lipídico es poco conocida. Parece estar involucrada en el metabolismo de los triglicéridos, siendo un activador de la LPL. Su forma madura contiene una secuencia de 326 aminoácidos. Su concentración plasmática es de aproximadamente 20 mg/dL⁹⁵.

- **Apoproteína J.**

La apolipoproteína J o clusterina es una glucoproteína de 427 aminoácidos. Se asemeja a la apo E y es relativamente abundante en el cerebro, hígado, testículo y ovario. En el plasma se encuentra presente fundamentalmente en las HDL₃, y en escasa cantidad en las HDL₂. Entre sus funciones destaca la capacidad para inhibir la reacción citolítica de los componentes del complemento, lo que puede estar en relación con el efecto protector de dicha lipoproteína en el desarrollo de aterosclerosis⁹⁶.

1.4. ENZIMAS Y PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA LIPÍDICA.

1.4.1. Lipoprotein lipasa endotelial (LPL).

Esta enzima tiene como acción principal la hidrólisis de las moléculas de triglicéridos y fosfolípidos de los quilomicrones y VLDL. Se detecta fundamentalmente en tejido adiposo y músculo esquelético, aunque también existen otras fuentes menos importantes cuantitativamente pero significativas como, por ejemplo, los macrófagos y las células musculares lisas de las lesiones arterioscleróticas. El lugar fisiológico de la LPL es la superficie luminal del endotelio capilar, donde la enzima está anclada en las cadenas de

glucosaminoglicanos. Puede ser liberada al compartimento plasmático tras la administración de heparina, provocando una lipólisis rápida de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en el plasma.

Para que actúe la LPL es necesaria la presencia de su cofactor, la apo C-II. Por el contrario, la apo C-III tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la LPL.

La regulación de la síntesis y secreción de la LPL por las células musculares y adiposas es compleja, interviniendo factores nutricionales, hormonales, factores de crecimiento y productos del metabolismo lipídico. Por ejemplo, la insulina estimula la síntesis y secreción de LPL, mientras que los niveles bajos de insulina o la resistencia a la misma pueden conducir a un deterioro del aclaramiento de triglicéridos.

Se puede considerar que la LPL tiene dos efectos opuestos sobre la patogénesis de la aterosclerosis: por un lado una acción antiaterogénica de la LPL producida en el tejido adiposo y en el músculo esquelético, donde da lugar a una eficiente lipólisis; por otro, un efecto proaterogénico de la LPL producida en los macrófagos de las lesiones tempranas ateroscleróticas, donde contribuye a la formación de células espumosas⁹⁷.

1.4.2. Lecitin-colesterol-aciltransferasa (LCAT).

Es sintetizada en el hígado y es liberada a la circulación, donde se une a las partículas de HDL más pequeñas. Su actividad se ve potenciada por la apo A-I, apo A-IV y apo C-I, mientras que la apo D parece ejercer un efecto estabilizador sobre la enzima.

Su función consiste en catalizar la transferencia de un ácido graso desde la posición 2 de la fosfatidilcolina (lecitina) al colesterol, formándose una molécula de éster de colesterol y lisofosfatidilcolina. El éster de colesterol puede integrarse en el núcleo apolar de las HDL o puede ser transferido a otras lipoproteínas por medio de proteínas transferidoras. La LCAT contribuye al mantenimiento de un gradiente de concentración de colesterol entre las membranas celulares y las lipoproteínas aceptoras, de ahí su papel fundamental en el transporte reverso de colesterol. Por último, también desempeña un

papel en el catabolismo de las partículas ricas en triglicéridos, extrayendo de su superficie en cantidades equimoleculares la lecitina y el colesterol libre, con lo que los lípidos del interior son reducidos por la acción de las triglicérido-lipasas.

La deficiencia de LCAT se asocia, por todo lo dicho anteriormente, a un aumento de las concentraciones tisulares de colesterol libre y desarrollo precoz de arteriosclerosis, como se puede observar en los pacientes con déficit familiar de LCAT, que sufren alteraciones del sistema lipoproteico, anemia hemolítica e insuficiencia renal⁹⁸.

1.4.3. Lipasa hepática (LH).

La lipasa hepática (o triglicérido-lipasa hepática) es imprescindible para la conversión de IDL a LDL y la regulación de las concentraciones de subgrupos de HDL. Se localiza en el extremo luminal de las células endoteliales hepáticas, unida a los glucosaminoglucanos de la superficie celular. A diferencia de la LPL, no requiere de la apo C-II para su activación. La LH se une a la heparina con menor afinidad que la LPL.

Además de su función lipolítica, actúa como ligando mediador en las interacciones de las lipoproteínas con los receptores y/o proteoglucanos de la superficie celular, y estimula la captación hepática de los ésteres de colesterol-HDL (c-HDL)⁹⁹.

1.4.4. HMG CoA reductasa.

Esta enzima cataliza la conversión de beta-hidroxi-metilglutaril-CoA (HMG CoA) en ácido mevalónico, y su actividad se ve retrorregulada por el producto final de la vía, el colesterol, y también por algunos metabolitos como el 26-hidroxicolesterol. La síntesis de colesterol endógeno disminuye cuando se expone a las células a lipoproteínas tales como la LDL, que facilita el aporte de colesterol exógeno y por tanto efectúa una retrorregulación de la enzima, mientras que lipoproteínas como las HDL, que promueven la salida de colesterol, tienen un efecto opuesto. Esta enzima es inhibida por el grupo de fármacos de las estatinas, consiguiendo una disminución de los niveles plasmáticos de colesterol¹⁰⁰.

1.4.5. Proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC).

Su producción es fundamentalmente hepática, aunque también se expresa en intestino delgado, bazo y tejido adiposo. Recientemente se ha demostrado su síntesis en células espumosas de lesiones arterioscleróticas humanas¹⁰¹. Juega un papel fundamental en el transporte reverso del colesterol, facilitando la transferencia de ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos entre las diversas lipoproteínas plasmáticas. Así, la PTEC es la principal fuente de ésteres de colesterol en quilomicrones y VLDL, así como de triglicéridos en LDL y HDL. Además, esta enzima puede estar involucrada en la extracción de lípidos de las células (eflujo de colesterol)¹⁰¹.

El exceso de colesterol de los tejidos periféricos captado por las HDL y esterificado por la LCAT puede ser metabolizado por dos vías diferentes. En presencia de actividad PTEC, una cantidad importante de ésteres de colesterol es transferida desde las HDL a LDL grandes y a remanentes de VLDL, y finalmente son captados por el hígado a través de los receptores de LDL. Por otro lado, los ésteres de colesterol acumulados en las HDL son internalizados por los receptores hepáticos “scavenger” clase B tipo I (SR-BI).

1.5. RECEPTORES.

En los últimos años se han caracterizado nuevos receptores implicados en la captación de partículas lipoproteicas. Su nomenclatura puede variar según la fuente bibliográfica consultada, y aún se conoce poco acerca de sus funciones y su posible papel patológico en el hombre. El número de estos receptores, con nuevos ligandos y funciones, es muy probable que siga creciendo en el futuro.

1.5.1. Receptores de LDL.

Constituyen una familia de receptores con diversas funciones y amplia variedad de ligandos. No solamente participan en mecanismos de endocitosis de partículas lipoproteicas y otras sustancias sino que, además, intervienen en la regulación de la

fisiología celular al estar involucrados en sistemas de señales y respuestas celulares¹⁰². Destacaremos los siguientes:

- **Receptor de LDL:** es el primero y mejor conocido. Se trata de una glucoproteína de 839 aminoácidos, con 5 dominios funcionales, codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 19. El papel principal del receptor LDL consiste en proporcionar una fuente constante de colesterol en todo el organismo para la síntesis de membranas y aportar colesterol a determinados órganos que lo precisan como sustrato de sus productos metabólicos, de ahí que hígado, gónadas y suprarrenales posean un buen número de estos receptores. Los receptores de LDL también son capaces de captar IDL y una subfracción de HDL que contiene apo E. El colesterol libre intracelular regula por un mecanismo de retroalimentación negativa la síntesis del receptor LDL. De esta forma las células mantienen su homeostasis de colesterol y son protegidas contra el exceso de colesterol libre. El déficit de estos receptores es responsable de la hipercolesterolemia familiar¹⁰³.
- **Receptor de remanentes de quilomicrones (LRP1):** la proteína relacionada con el receptor de la LDL-1 es también conocida como el receptor de la apo E. Tiene una gran similitud con el receptor de LDL, y su ARN se ha identificado en muchos órganos, tales como hígado, pulmón y cerebro. Se trata de una molécula multifuncional con diversos ligandos; constituye una vía específica para el aclaramiento de los remanentes ricos en apo E¹⁰².
- **Proteína relacionada con el receptor de la LDL-2 (LRP2):** es también conocido con el nombre de megalin o glucoproteína 330. Tiene similitudes estructurales con el receptor de LDL. Entre sus ligandos se encuentran las partículas β -VLDL enriquecidas en apo E y la apo J¹⁰⁴.
- **Receptor de VLDL:** es un miembro de la familia de receptores LDL con múltiples y diversas funciones. El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 9, y se expresa abundantemente en corazón, músculo esquelético y

tejido adiposo, pero no en hígado. Entre sus ligandos se encuentran VLDL ricas en apo E, IDL y quilomicrones, y otros muchos más cuyo significado biológico aún se desconoce. El receptor VLDL regula la hidrólisis periférica de los triglicéridos-VLDL (Tg-VLDL) al suministrar ácidos grasos a las células musculares y adiposas¹⁰⁵.

- **Receptor de apo E2:** tiene una estructura similar a la de los receptores de LDL y VLDL. Se expresa principalmente en cerebro y placenta. Se ha sugerido que su ligando principal es la apo E presente en las HDL¹⁰⁶.

1.5.2. Receptor scavenger clase A (tipos I y II).

Estos receptores reconocen principalmente macromoléculas con una gran densidad de cargas negativas. Se han detectado en macrófagos, monocitos, células de Kupffer y células endoteliales. Reconoce a las partículas LDL modificadas tales como LDL acetilada y LDL oxidada, por lo que se les ha implicado en el proceso de formación de células espumosas de las placas de ateroma¹⁰⁷.

1.5.3. Receptor scavenger clase B.

Dentro de este grupo de receptores se encuentra el **receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI)**, considerado como un receptor de HDL, crucial en el metabolismo del colesterol-HDL. A diferencia del receptor de LDL, este receptor capta únicamente los lípidos de las HDL pero no los componentes proteicos. Su principal función es facilitar la transferencia selectiva de ésteres de colesterol, y quizás también de colesterol libre, desde las HDL al hígado y tejidos esteroideogénicos tales como las glándulas suprarrenales y las gónadas. Además, parece facilitar el eflujo de colesterol en el sentido inverso: desde las células hacia las partículas de HDL (transporte reverso de colesterol). También funciona como un receptor para LDL y otras lipoproteínas¹⁰⁸.

El **receptor CD36**, otro receptor scavenger clase B, se expresa en monocitos, plaquetas, pared arterial normal, lesión arteriosclerótica inicial y avanzada y adipocitos.

Este receptor puede contribuir al depósito patológico de colesterol en la pared arterial durante el proceso de aterogénesis y facilita la captación de ácidos grasos de cadena larga por el tejido muscular y adiposo¹⁰⁹.

También se ha descrito un nuevo receptor de HDL, denominado **cubilin**, expresado en diversos epitelios especializados y que previamente se conocía como receptor de la absorción de vitamina B₁₂ por el intestino. Este receptor está implicado en la endocitosis de la partícula entera de HDL y de apo A-I¹¹⁰.

1.6. METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.

1.6.1. LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS.

La principal función de estas lipoproteínas es el transporte de los triglicéridos, ricos en energía, desde el intestino y el hígado hacia los lugares de almacenamiento y utilización. Las dos clases principales de este grupo son los quilomicrones procedentes del intestino, que vehiculizan los triglicéridos de origen exógeno o dietético, y las VLDL que vehiculizan los triglicéridos producidos en el hígado a partir de la lipogénesis y esterificación de los ácidos grasos.

La composición y regulación del catabolismo de estas dos lipoproteínas presentan algunas características similares pero también muestran otras diferencias significativas. La proporción de triglicéridos es mucho mayor en los quilomicrones que en las VLDL y presentan diferencias importantes en su composición apoproteica. Ambas partículas siguen una vía catabólica similar, adquiriendo las mismas apoproteínas y sufriendo una lipólisis parcial. Otra característica diferente es la naturaleza apoproteica obligatoria presente en ambas lipoproteínas, la apo B. En la especie humana, y en otras especies animales, existen dos formas distintas de apo B. La apo B-48, denominada así debido a que su peso molecular es el 48% con relación a la apo B-100, es sintetizada en el intestino exclusivamente, y va a ir vehiculizada por los quilomicrones. Por el contrario, la apo B-100 es sintetizada en el hígado y no es transportada por los quilomicrones. El gen de la apo

B-100 está también presente en las células intestinales humanas, pero solamente la apo B-48 es procesada en el aparato de Golgi de dichas células.

1.6.1.1. Metabolismo de los quilomicrones.

La grasa de la dieta que ingerimos diariamente está constituida fundamentalmente por triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. En el duodeno es emulsionada por las sales biliares, y tras su digestión por las enzimas pancreáticas (lipasas, colesteroesterasas, fosfolipasas), es absorbida por los enterocitos. Dentro de estas células se produce la resíntesis de los lípidos para dar lugar a los quilomicrones nacientes. Estas partículas consisten esencialmente en un núcleo de triglicéridos y una cubierta de apoproteínas (una o más copias de apo B-48) y fosfolípidos. Cuando la partícula naciente llega al tamaño de 80-1.200 nm, adquiere nuevas apoproteínas (apo A-I, A-IV, glicosilación de la apo B-48), es decir, se produce una maduración del quilomicron. Posteriormente se descargan al espacio intercelular y difunden hacia los vasos linfáticos. Cuando llegan a la circulación sistémica, interactúan con las HDL e incorporan otras apoproteínas. Las HDL sirven de reservorios para las apoproteínas C y E, y las transfieren a los quilomicrones, de los cuales reciben a cambio apoproteínas A-I y A-IV. La apo E actúa como ligando y permite que el hígado elimine remanentes de quilomicrones.

Los quilomicrones tienen una vida media plasmática de unos 10 minutos, lo cual indica un metabolismo rápido, que se produce de manera bifásica. En primer lugar, los quilomicrones se unen a proteoglucanos de la superficie del endotelio, donde se localiza la LPL, la cual actúa sobre los triglicéridos de los quilomicrones. Los ácidos grasos no esterificados resultantes de la hidrólisis son captados por la albúmina y cruzan el endotelio hacia los adipocitos y miocitos. Los remanentes de quilomicrones (con un contenido 20-50% de triglicéridos iniciales) se desprenden de los proteoglucanos y son captados posteriormente por el hígado a través del receptor LRP, siendo endocitados y transferidos a los lisosomas para su degradación. La apo E es imprescindible para el reconocimiento, fijación y captación de los remanentes por este receptor hepático. El colesterol de los quilomicrones es captado por el hígado, ya que los tejidos periféricos no lo extraen, y pasan a incorporarse al “pool” hepático, donde sirve para sintetizar la bilis. La absorción de

las grasas dietéticas, principalmente triglicéridos, y el metabolismo de los quilomicrones regulan el metabolismo del resto de las lipoproteínas, incluso durante el período postabsortivo¹¹¹.

1.6.1.2. Metabolismo de las VLDL e IDL.

Las VLDL plasmáticas son de origen hepático y su función principal es el aporte de ácidos grasos al miocardio, músculo esquelético y médula ósea en los períodos postabsortivos. Tiene como principales apoproteínas a la apo B-100 (una sola molécula por partícula), apo E y apo C-II y C-III. El organismo regula la síntesis de VLDL según las necesidades y características del ciclo comida/ayuno/comida. Tres factores parecen ser los puntos de control de dicha síntesis: la concentración de triglicéridos en los hepatocitos, la disponibilidad de colesterol y la síntesis de apo B-100. Al ser secretadas, las VLDL intercambian apoproteínas con otras lipoproteínas; por ejemplo, con las HDL intercambian apo C-II, C-III, A-I y E. Las VLDL se unen a los proteoglicanos de la superficie endotelial, donde se encuentra la LPL, que degrada los triglicéridos de forma similar a como ocurre con los quilomicrones, para lo cual necesita la apo C-II como cofactor obligatorio (se ha estimado que se requieren 20 moléculas de apo C-II por cada partícula de VLDL para lograr una tasa máxima de hidrólisis¹¹²). La lipólisis de las VLDL hace que disminuya su contenido en triglicéridos y reduce el volumen de la partícula, transformándose en remanentes de VLDL o IDL, las cuales mantienen una molécula de apo B-100 y apo E y se enriquecen de forma relativa en ésteres de colesterol, colesterol no esterificado y fosfolípidos. Las IDL pueden seguir dos caminos en su catabolismo: aproximadamente el 50% son internalizadas por los hepatocitos por medio de receptores de remanentes, y el otro 50% se convierte en LDL por la acción de la lipoproteinlipasa en el endotelio extrahepático.

La apo C-III es un inhibidor de la LPL a lo largo de toda la cascada lipolítica, posiblemente porque bloquea la interacción de la LPL con la superficie de las VLDL. Una excesiva producción de apo C-III por el hígado induce hipertrigliceridemia. La síntesis de apo C-III es controlada, entre otros factores, por receptores nucleares denominados receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR- α)⁵⁸. La insulina activa

los PPAR- α y disminuye, por tanto, la producción de C-III, contribuyendo de esta manera a facilitar la cascada lipolítica intravascular. Otro lugar donde la insulina facilita la hidrólisis de los triglicéridos es en la producción de la LPL por los adipocitos y activando su translocación a los proteoglicanos de heparán en la superficie del endotelio. Esto explica que la resistencia insulínica y la diabetes tipo 2 sean las causas más comunes de la hipertrigliceridemia asociada con acumulación de VLDL e IDL¹¹³.

1.6.2. LIPOPROTEÍNAS RICAS EN COLESTEROL.

1.6.2.1. Metabolismo de las LDL.

La consecuencia del catabolismo de las VLDL y de las IDL es la formación de las LDL, que supone un cambio en la composición lipídica y la eliminación de apo E, apo C-II y apo C-III. Así, las LDL contienen una molécula de apo B-100 localizada en la superficie junto con fosfolípidos y colesterol no esterificado, y un núcleo hidrofóbico de ésteres de colesterol. Las LDL transportan en conjunto el 65% del colesterol circulante, liberándolo en las células para satisfacer sus requerimientos metabólicos y estructurales. La vida media en plasma es de aproximadamente 3 días y viene determinada fundamentalmente por la actividad de receptores específicos que reconocen no sólo la apo B-100, sino también la apo E. El principal órgano que capta LDL es el hígado por vía de receptores apo B/E, que cataboliza un 50-60% del colesterol-LDL (c-LDL). Otros órganos, tales como las glándulas suprarrenales, ovarios y testículos, también captan LDL para la síntesis de hormonas esteroideas. La captación tisular restante se lleva a cabo por mecanismos no específicos. La capacidad de procesamiento de LDL de estos tejidos se correlaciona con el nivel de expresión de los genes de los receptores apo B/E y con la cantidad de receptores por célula. El contenido intracelular de colesterol libre es el principal modulador de la síntesis de colesterol celular y de receptores de LDL. Las células que poseen estos receptores tienen la capacidad de mantener su contenido de colesterol dentro de un rango más o menos limitado, lo que les permite regular la entrada de colesterol y protegerse del exceso o falta de éste¹¹⁴.

Un aspecto importante, por su implicación en el desarrollo de la aterosclerosis, es la heterogeneidad de partículas LDL según su tamaño y densidad. Así, se describe el fenotipo A caracterizado por la presencia de partículas grandes de LDL, y que se asocia a niveles más altos de c-HDL y más bajos de VLDL. Por el contrario, el fenotipo B se caracteriza por partículas de LDL pequeñas y densas, que se acompaña frecuentemente de niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de HDL. El origen de estas partículas pequeñas y densas parece que se debe a una sobreproducción hepática de partículas VLDL de mayor tamaño. Estas VLDL de mayor tamaño, y las IDL derivadas, pasan más tiempo en plasma (por no ser internalizadas con facilidad) expuestas a la acción de la LPL dando lugar a LDL pequeñas, más densas y ricas en ésteres de colesterol (subclase o fenotipo B). Este tipo de partículas de LDL tipo B, comparadas con las partículas de LDL normales, tienen una estancia plasmática prolongada y son más susceptibles a la oxidación debido a una menor interacción con el receptor LDL, atraviesan la pared arterial con mayor facilidad y son retenidas enseguida. Además, estas partículas de LDL pequeñas y densas provocan disfunción endotelial y promueven la producción de factores procoagulantes en las células endoteliales. Todo ello le confiere un mayor riesgo aterogénico a este tipo de partículas LDL¹¹⁵.

1.6.2.2. Metabolismo de las HDL.

Las partículas de HDL son las más pequeñas de todas las lipoproteínas, con un diámetro de 75 a 100 Å. Constituyen un grupo heterogéneo de partículas tanto por su tamaño como por su contenido apoproteico. Son complejos macromoleculares compuestos por un 15-20% de colesterol, 25-30% de fosfolípidos, 5% de triglicéridos y 50% de proteínas. Las apoproteínas son principalmente la apo A-I (70%) y apo A-II (20%), siendo el resto pequeñas cantidades de apo A-IV, C-I, C-II, C-III, D y E.

Se describen, por lo menos, tres formas de HDL con significado funcional. La primera HDL es la segregada por el hígado, pobre en lípidos y con movilidad electroforética distinta al resto de las HDL que tienen movilidad α ; son las partículas pre β -HDL o nacientes. Tienen forma de discos fosfolipídicos bilamelares que contienen apoproteínas A-I, A-II y posiblemente E. Incorporan fácilmente colesterol no esterificado.

A medida que el colesterol libre de la periferia de la partícula se esterifica, se desplaza hacia el centro y es reemplazado por otra molécula de colesterol libre, por lo cual la partícula de HDL se transforma de disco en partículas esféricas denominadas HDL₃. El proceso es tan rápido, que hay pocas HDL discoidales circulantes. Todo el proceso de esterificación tiene lugar por acción de la lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT). Esta enzima se sintetiza en el hígado y su óptima activación requiere que interactúe con la apoproteína A-I, lo cual evidencia el importante papel funcional que esta última desempeña. La LCAT actúa sobre la fosfatidilcolina (lecitina) de la HDL discoidal, hidrolizando un ácido graso que lo une al colesterol libre para formar éster de colesterol.

El aumento del c-HDL se asocia con menor riesgo de enfermedad coronaria, estando la explicación en su participación en el transporte reverso de colesterol (desde los tejidos periféricos hacia el hígado, facilitando su excreción). El mecanismo consiste en la transferencia de colesterol no esterificado de la membrana celular a las HDL nacientes, quizás facilitada por receptores para la HDL. La LCAT media la esterificación de este colesterol libre, generando primero HDL₃ y después HDL_{2a}. Estas últimas transfieren ésteres de colesterol a las IDL, LDL y VLDL por medio de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC). En este intercambio lipídico, las HDL adquieren triglicéridos (HDL_{2b}), que son hidrolizados después por la lipasa hepática para regenerar HDL₃. Entonces ésta puede ser usada nuevamente, con lo cual el proceso se reanuda. Las lipoproteínas enriquecidas con ésteres de colesterol (VLDL, IDL y LDL) los devuelven al hígado mediante la unión con los receptores apropiados.

Las HDL están fuertemente relacionadas con el riesgo aterosclerótico. Los bajos niveles de c-HDL son un importante factor de riesgo cardiovascular y, la sobreexpresión de su principal apolipoproteína, la apo A-I, en modelos animales ha demostrado una marcada inhibición e incluso regresión del desarrollo de aterosclerosis. Los mecanismos por los que las HDL inhiben la aterosclerosis se explican por su participación en el transporte reverso del colesterol, aunque todavía no están totalmente esclarecidos¹¹⁶.

2. Hipertensión arterial y riesgo cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbimortalidad en los países desarrollados, siendo la lesión aterosclerótica el sustrato anatomopatológico común en la mayoría de ellas. Con los primeros estudios epidemiológicos prospectivos, como el de Framingham (paradigma de los estudios de seguimiento), se pone de manifiesto la existencia de una serie de condiciones o factores que se asocian a una mayor frecuencia de este grupo de enfermedades. Así, se establece el concepto de “factor de riesgo cardiovascular” como aquella condición relacionada con el riesgo de presentar alguna de las enfermedades cardiovasculares más frecuentes, es decir, signos biológicos, estilos de vida o hábitos adquiridos que son más prevalentes o predictores de eventos futuros en los individuos¹¹⁷. Este concepto no es sinónimo de factor etiológico; sólo indica que existe un riesgo, que puede ser evitable o susceptible de prevenirse, o inevitable, como la edad, el sexo o los antecedentes familiares sobre los que no se puede actuar. La Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología¹¹⁸ proponen una clasificación de los factores de riesgo en causales, condicionales y predisponentes, además de considerar el grado de desarrollo y extensión de la placa de ateroma como un factor de riesgo más (tabla 1). Se consideran factores de riesgo causales aquellos que se asocian de forma más fuerte a la enfermedad cardiovascular, con una alta prevalencia en la población, y sobre los que existe suficiente evidencia de jugar un papel causal independiente. Entre ellos se encuentra la hipertensión arterial, el tabaquismo, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y la edad avanzada. Los factores de riesgo condicionales son aquellos que se asocian a un mayor riesgo cardiovascular pero sin una evidencia definitiva de su papel causal. Los factores de riesgo predisponentes son elementos que ejercen su acción a través de factores de riesgo intermedios, causales o condicionales.

Tabla 1. Principales factores de riesgo cardiovascular. Tomado de Grundy et al¹¹⁸.

Factores de riesgo causales (mayores independientes)
Tabaco
Presión arterial elevada
Colesterol sérico total y colesterol-LDL elevados
Colesterol-HDL bajo
Diabetes mellitus
Edad avanzada
Factores de riesgo predisponentes
Obesidad
Obesidad abdominal
Inactividad física
Historia familiar de enfermedad coronaria prematura
Características étnicas
Factores psicosociales
Factores de riesgo condicionales
Triglicéridos séricos elevados
Partículas LDL pequeñas
Homocisteína sérica elevada
Lp(a) elevada
Factores protrombóticos (ej. fibrinógeno)
Marcadores de la inflamación (ej. proteína C-reactiva)

La hipertensión arterial (HTA), que podría definirse como una elevación crónica de la presión arterial sistólica y/o diastólica, es una enfermedad con una alta prevalencia y una importante repercusión sanitaria, económica y social. Constituye una de las enfermedades crónicas más frecuentes que afectan al hombre. Además, la HTA se asocia frecuentemente a alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, niveles disminuidos de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad, aumento de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad y obesidad, lo que magnifica su importancia como factor de riesgo cardiovascular. En el estudio Al Andalus

90 se informa de la existencia de hipercolesterolemia en el 31,4% de los hipertensos, diabetes mellitus en el 10,4% y obesidad en el 33%, cifras significativamente mayores que en los no hipertensos¹¹⁹. Cada uno de estos factores de riesgo es capaz de modificar de forma independiente la probabilidad de padecer enfermedad cardiovascular. Además, la interacción entre ellos no tiene un efecto sumativo, sino multiplicativo o exponencial. La elevada prevalencia de la hipertensión arterial y la frecuencia con que se encuentra asociada a otros factores le otorga una especial trascendencia como factor de riesgo cardiovascular, constituyéndose en uno de los principales problemas sanitarios en los países desarrollados.

La presión arterial es una variable de distribución continua y, por tanto, el límite a partir del cual se considera a una persona como hipertensa se establece por convenio basado en un criterio de riesgo poblacional. Así, se considera a una persona adulta hipertensa si presenta cifras de presión arterial sistólica (PAS) igual o superior a 140 mmHg y/o diastólica (PAD) igual o superior a 90 mmHg, o si toma medicación antihipertensiva^{120, 121}. En la tabla 2 se refleja la clasificación de la presión arterial en adultos mayores de 18 años, siguiendo los criterios de las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología¹²¹. Los valores de presión arterial presentan variaciones según la edad, el sexo, la raza y otros factores como, por ejemplo, el ejercicio físico, el estado anímico, el frío, la digestión o el momento del día en que se mida. Por ello, se recomienda practicar tres lecturas de la presión arterial en dos ocasiones como mínimo, separadas al menos por una semana, para poder establecer el diagnóstico de hipertensión arterial.

La causa de la elevación de la presión arterial se desconoce en la mayoría de los casos, denominándose HTA primaria, esencial o idiopática. La prevalencia de HTA de causa conocida (HTA secundaria) es inferior al 5-10%. Las causas más frecuentes de HTA secundaria se citan en la tabla 3. Generalmente se trata de una enfermedad que cursa de forma asintomática, al menos en los primeros estadios, fácil de detectar, habitualmente fácil de tratar y que puede tener consecuencias fatales si no se controla adecuadamente.

Tabla 2. Clasificación de la presión arterial según las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología¹²¹.

Categoría	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Óptima	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Normal alta	130-139	85-89
Hipertensión		
Grado 1 (ligera)	140-159	90-99
Grado 2 (moderada)	160-179	100-109
Grado 3 (severa)	> 180	> 110
<i>Sistólica aislada</i>	> 140	< 90

Tabla 3. Principales causas de HTA secundaria.

Renales:	Vasculorrenales, Parenquimatosas
Endocrinas:	Hiperfunción adrenocortical, Cushing, Feocromocitoma, etc.
Fármacos:	Anticonceptivos hormonales, Aminas simpaticomiméticas, etc.
Neurológicas:	Aumento de la presión intracraneal, Encefalitis, etc.
Coartación de aorta	
Embarazo	
Otras	

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en adultos, la tasa de prevalencia de hipertensión en países desarrollados se sitúa entre el 8 y el 20%. Esta variación podría explicarse por las diferentes condiciones en que se han llevado a cabo los estudios epidemiológicos y por las diferencias de criterio en el diagnóstico de los enfermos como hipertensos. El estudio INTERSALT ofreció datos en 52 poblaciones diferentes de 32 países, encontrando una prevalencia que osciló entre 0% en los indios Yanomamo de Brasil y un 33,5% en los negros de Jackson, Mississippi¹²². En España, según el reciente informe de la Sociedad Española de Arteriosclerosis¹²³, que resume los datos obtenidos en diversos estudios epidemiológicos en población adulta, la prevalencia de HTA (PAS \geq 140 mmHg o PAD \geq 90 mmHg, o en tratamiento antihipertensivo) se sitúa entre 30-50%. Banegas et al¹²⁴, en un trabajo publicado en 1993, encuentran unas cifras medias de presión arterial sistólica de 132,3 mmHg (133,4 y 131,6 en varones y mujeres respectivamente) y diastólica de 83,6 mmHg (84,5 y 83,1 en varones y mujeres respectivamente), con una prevalencia de HTA del 45% en población adulta de 35 a 64 años. Estas cifras de HTA aumentan con la edad, y son mayores en los varones que en las mujeres más jóvenes. En la población de 60 ó más años de edad, la cifra de HTA se eleva al 68%, con una enorme prevalencia de la HTA sistólica aislada, la forma más frecuente de HTA en los ancianos¹²³.

Diversos estudios prospectivos han hallado un ascenso del riesgo de mortalidad total y cardiovascular al ir aumentando los niveles de presión arterial, tanto diastólica como sistólica, siendo esta relación continua y gradual. No sólo la HTA, sino también los niveles inferiores de presión arterial se asocian a un incremento de la incidencia de enfermedad cardiovascular¹²⁵. Actualmente la presión arterial sistólica se considera un factor de riesgo con igual o mayor valor predictivo que la presión arterial diastólica, tal y como ha quedado demostrado en varios estudios prospectivos¹²⁶ y por los resultados obtenidos mediante el tratamiento de la hipertensión arterial sistólica aislada¹²⁷. Asimismo, el incremento de la presión de pulso (diferencia entre la presión arterial sistólica y diastólica) se asocia positivamente con complicaciones cardiovasculares y, dentro de los sujetos hipertensos, identifica un subgrupo con mayor riesgo de sufrir un infarto de miocardio¹²⁸. La presión de pulso es una medida de la distensibilidad arterial y se considera un buen factor de predicción de la mortalidad cardiovascular, sobre todo coronaria¹²⁹. Por otro lado, el tratamiento de la HTA se ha demostrado eficaz en el descenso del número de eventos

cardiovasculares, especialmente en la enfermedad cerebrovascular¹³⁰. La HTA aumenta la morbimortalidad vascular debido a los cambios funcionales y estructurales que provoca en la pared vascular, relacionados bien directamente con las cifras elevadas de presión arterial o bien indirectamente a través del desarrollo del proceso aterosclerótico, el cual está potenciado además por la asociación frecuente de la HTA con otros factores de riesgo. La HTA contribuye al aumento de la mortalidad general de una población fundamentalmente por el incremento del riesgo de padecer insuficiencia cardiaca congestiva, cardiopatía coronaria, accidente vasculocerebral (tanto hemorrágico como aterotrombótico), muerte súbita e insuficiencia renal.

La enfermedad cerebrovascular se relaciona estrechamente con la HTA. Las cifras de presión arterial, tanto sistólica (PAS) como diastólica (PAD), presentan una correlación positiva y continua con el riesgo de accidente vascular cerebral (AVC), algo más acusado para la hemorragia cerebral que para el infarto. Se ha demostrado que una disminución de 5 mmHg en la PAD de forma prolongada reduce un 35-40% el riesgo de AVC en adultos¹³¹. Las hemorragias cerebrales suponen el 10-15% de los ictus, encontrándose antecedentes de HTA en el 70-80% de estos casos¹³². Los infartos cerebrales representan el 85% de las enfermedades cerebrovasculares siendo la HTA, después de la edad, el predictor más común y potente de dicha patología; el 50-75% de los pacientes con infarto cerebral son hipertensos. Igual relación existe con los accidentes isquémicos transitorios; el 30-35% de los pacientes con isquemia cerebral transitoria tienen HTA, con un riesgo 16 veces superior de presentar un AVC. La hipertensión arterial también es un factor de riesgo para los infartos lacunares y la enfermedad de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical).

La enfermedad coronaria, por su mayor frecuencia absoluta, es la lesión orgánica relacionada con la HTA más frecuente. Es dos veces más frecuente en sujetos hipertensos comparados con normotensos, incrementándose con el aumento de la presión arterial, para ambos sexos y tanto para la presión arterial diastólica como sistólica. Afecta a todas las edades, aunque a mayor edad mayor incidencia. La presencia de presión arterial elevada ocurre en el 50% de las muertes coronarias, mientras que sólo un 25% es atribuible a la HTA. Teniendo en cuenta que sólo el 23% de los sujetos mayores de 35 años tienen una

presión arterial óptima ($< 120/80$ mmHg)¹²⁴, una gran parte de la población está en riesgo de sufrir un proceso coronario. Los progresos en el tratamiento antihipertensivo no han sido tan claros en la prevención de la coronariopatía. Ello podría explicarse por el hecho de que en el fenómeno arteriosclerótico intervienen múltiples factores (metabólicos, hemodinámicos, de coagulación, etc.), y es difícil evaluar los resultados del tratamiento antihipertensivo sin tener en cuenta los otros factores.

La HTA esencial puede ser causa y síntoma de afectación renal. La nefroangioesclerosis por hipertensión es, junto a la diabetes mellitus, una de las causas principales de insuficiencia renal terminal. En sujetos hipertensos de raza negra la insuficiencia renal aparece con una frecuencia 4 a 5 veces superior que en blancos¹³³.

La afectación vascular de la HTA también se puede manifestar en otros territorios vasculares. Así, los antecedentes de hipertensión se hallan en el 60% de los pacientes con aneurisma de la aorta abdominal, llegando a un 80% en los casos de aneurisma disecante. También se relaciona la HTA con la enfermedad vascular obstructiva periférica (claudicación intermitente) aunque su importancia como factor de riesgo en este proceso queda aminorada por el mayor valor predictivo del tabaco, lo que explicaría la escasa influencia del tratamiento antihipertensivo en esta patología.

El riesgo de enfermedad cardiovascular en pacientes hipertensos está claramente influenciado por otros factores:

a) Edad.

Las cifras de presión arterial sistólica y diastólica aumentan con la edad en ambos sexos, siendo mayor este incremento para la presión sistólica, lo que conlleva también un incremento de la presión de pulso. La HTA sistólica aislada es un hecho frecuente en los ancianos, lo que contribuye al aumento del riesgo global de enfermedad cardiovascular en este grupo etario. Más del 80% de las muertes por cardiopatía isquémica acontecen en sujetos de más de 65 años. Además, se ha comprobado que las lipoproteínas presentan un cambio en su metabolismo tras la maduración sexual, de tal forma que en las mujeres

existe una disminución del colesterol total y triglicéridos, y un aumento del c-HDL, mientras que en los varones ocurre a la inversa¹³⁴. En la menopausia se pierde dicho efecto beneficioso, lo que podría explicar el aumento de la mortalidad en las mujeres a partir de este período¹³⁵.

b) Sexo.

Los hombres presentan un mayor riesgo vascular que las mujeres, aunque esta diferencia disminuye con la edad, y es mayor para la cardiopatía coronaria que para el AVC. A partir de los 75 años, los riesgos de muerte por AVC y por cardiopatía coronaria son similares en hombres y mujeres. No obstante, el riesgo de morbimortalidad cardiovascular en ambos sexos es directamente proporcional a los niveles de presión arterial. El sexo masculino tiene niveles tensionales más elevados hasta los 50 años, momento en que las mujeres comienzan a presentar presiones arteriales superiores. El incremento de la HTA sistólica aislada es más pronunciado para las mujeres a partir de los 55 años, con una prevalencia del 30% en mujeres con más de 65 años. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que no hay diferencias de género en el control de la presión arterial y que ambos sexos se benefician del tratamiento de la HTA¹³⁶.

c) Raza.

La prevalencia de la HTA es más elevada en la raza negra, independientemente de la edad, aunque es mayor en edades más jóvenes, especialmente en las mujeres. Esta diferencia disminuye progresivamente al avanzar la edad¹³⁷.

d) Antecedentes familiares

Está demostrada una correlación de los niveles de presión arterial entre los miembros de una familia, lo que sugiere una “agrupación familiar de la hipertensión”. La herencia de la HTA no sigue las leyes mendelianas y parece ser un desorden poligénico y multifactorial en el que la expresión de diversos genes resulta modificada por factores ambientales. Entre los genes potencialmente candidatos se incluyen aquellos que afectan

varios componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el sistema calicreína-quinina y el sistema nervioso simpático. Las únicas excepciones de las que actualmente se posee documentación son algunas formas poco comunes de HTA, tales como las relacionadas con una sola mutación en la que interviene un gen quimérico llamado 11-beta-hidroxilasa/aldosterona sintetasa¹³⁸.

e) Obesidad.

La prevalencia de obesidad (índice de masa corporal o IMC ≥ 30 Kg/m²) en la población española de más de 20 años es del 12,9%. En conjunto, dicha prevalencia es algo mayor en mujeres que en varones, aunque la frecuencia de obesidad es superior en varones jóvenes que en mujeres jóvenes, pero a partir de los 45 años se hace más frecuente en las mujeres¹²³. Del estudio Al Andalus¹¹⁹ se desprende que la población andaluza presenta un moderado grado de sobrepeso con índice de Quetelet de $26,39 \pm 4,43$ para los hombres y $26,90 \pm 5,63$ para las mujeres, hallando que casi la cuarta parte (22,19%) es obesa; también se comprobó que existía una íntima correlación entre la tensión arterial y el IMC, de manera que a mayor IMC mayor nivel de tensión arterial, ya sea sistólica como diastólica. En ambos sexos, la prevalencia de obesidad aumenta con la edad. Además se observa una tendencia actual al alza de la obesidad en España, para ambos sexos y en todas las edades^{123, 139}

Se ha descrito un incremento continuo y gradual del riesgo relativo de mortalidad general conforme aumenta el IMC, más acentuado cuando el índice de masa corporal es superior a 30 Kg/m². La obesidad no sólo causa un aumento de la mortalidad cardiovascular, sino también de la morbilidad^{140, 141}. Por otro lado, la prevalencia de la obesidad es superior en la población hipertensa. Diversos estudios clínicos y epidemiológicos encuentran una fuerte asociación entre el índice de masa corporal y la incidencia de hipertensión. El riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares está aumentado en los obesos, relacionándose directamente con la distribución grasa de tipo androide o central. Se ha demostrado que una reducción del peso corporal conlleva una disminución de la presión arterial y modifica de manera favorable otros factores de riesgo¹⁴².

Es difícil establecer el papel de la obesidad, ya que está íntimamente relacionada con otras alteraciones metabólicas además de la HTA, tales como dislipemias (las alteraciones lipídicas más frecuentes son elevación de triglicéridos, disminución del c-HDL y partículas LDL pequeñas y densas) y trastornos del metabolismo hidrocarbonado (hiperinsulinemia, intolerancia a hidratos de carbono y diabetes mellitus tipo 2) que son determinantes a su vez de la enfermedad cardiovascular. También se ha demostrado que aumentan los niveles de apolipoproteína B¹⁴³.

Esta asociación de factores de riesgo cardiovasculares se intenta explicar por un posible mecanismo patogénico común: la resistencia a la insulina¹⁴⁴. Tanto estudios epidemiológicos como experimentales han evidenciado la relación entre obesidad y resistencia insulínica. Se ha demostrado una secreción aumentada de insulina y una disminución de la sensibilidad a la misma en sujetos obesos no diabéticos, en comparación con individuos controles. Además, existe una evolución natural en los sujetos obesos para desarrollar intolerancia a la glucosa y, posteriormente, una diabetes tipo 2. Así, la obesidad, hallada en el 60-90% de los pacientes con diabetes mellitus (DM) tipo 2, se considera un factor de riesgo fundamental para el desarrollo de diabetes, incluso podría jugar un papel causal en la aparición de DM tipo 2 en un grupo de individuos genéticamente predisuestos¹⁴⁵.

f) Hipertrofia ventricular izquierda.

La hipertrofia ventricular izquierda (HVI) es la respuesta del corazón a la sobrecarga crónica de presión, de volumen o de ambos factores. Su prevalencia e incidencia aumentan a medida que aumentan las cifras de presión arterial. Diversos estudios epidemiológicos han involucrado a la HVI como factor de riesgo para la aparición de enfermedad cardiovascular, como el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca congestiva y la muerte súbita. La regresión de la HVI tras tratamiento farmacológico puede reducir el riesgo cardiovascular que se asocia a este trastorno.

g) Diabetes mellitus. Resistencia insulínica.

La diabetes mellitus (DM) se asocia a un mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, siendo las complicaciones ateromatosas la principal causa de morbimortalidad en los diabéticos. La diabetes constituye un importante problema de salud pública en los países desarrollados; es la sexta causa de muerte en España. Aunque la morbilidad por diabetes en nuestro país está disminuyendo (probablemente por la mejora en la atención médica), la prevalencia de la enfermedad está aumentando, al igual que en la mayoría de los países europeos; este incremento es paralelo al aumento de la prevalencia de la obesidad¹²³. Diversos estudios realizados en España estiman en un 6-10% la prevalencia global de DM en población general¹²³; el estudio Al Andalus halló una prevalencia de diabetes del 6,5%, que ascendía al 14% en personas mayores de 60 años¹¹⁹. Aproximadamente 9 de cada 10 casos de diabetes son de tipo 2¹²³. La diabetes mellitus tipo 2 es el estadio final de un síndrome crónico y progresivo, representado por un desorden heterogéneo causado por la combinación de resistencia insulínica y descenso de la función de las células beta pancreáticas, causadas por alteraciones genéticas y adquiridas. El diagnóstico de DM tipo 2 se establece cuando las anomalías metabólicas de la resistencia a la insulina y la disfunción de las células beta causan elevación de la glucemia igual o mayor de 126 mg/dL en ayunas o de 200 mg/dL a los 120 minutos de una sobrecarga oral de 75 g de glucosa¹⁴⁶.

La insulina es una hormona con múltiples efectos en el organismo; además de su función reguladora del metabolismo de los principios inmediatos, también está implicada en el control de la función simpática, el transporte iónico a través de las membranas y la proliferación y diferenciación celular. Su principal función es estimular la captación de la glucosa por los tejidos periféricos para reducir la glucemia. Se ha observado que en la población general existen grandes variaciones en la efectividad de la insulina para promover esta captación de glucosa, es decir, en la “sensibilidad a la insulina”. Cuando existe una reducción significativa de la captación de la glucosa estimulada por la insulina (CGEI), se habla de “resistencia insulínica”. Ésta da lugar a un aumento de la secreción de insulina (hiperinsulinemia) como mecanismo compensador, que restablecerá la normogluceemia o, si es insuficiente, conducirá a un estado de intolerancia a los hidratos de

carbono o de diabetes mellitus no insulino dependiente (DM tipo 2). La resistencia a la acción hipoglucemiante de la insulina no significa que se produzca necesariamente una disminución de la sensibilidad a las otras acciones de esta hormona, es decir, la hiperinsulinemia compensadora puede actuar con un exceso de acción para el resto de los efectos de la insulina.

Ha sido ampliamente demostrado la relación entre resistencia insulínica y enfermedad cardiovascular. Se ha comprobado que aquellos sujetos sanos no obesos, no hipertensos, ni diabéticos, cuya insulinemia se muestra significativamente elevada, presentan una serie de factores de riesgo cardiovascular entre los que se incluyen elevaciones de la glucemia, colesterol total, c-LDL, triglicéridos, presión arterial sistólica y diastólica, y disminución de c-HDL respecto a un grupo control con valores normales de insulinemia¹⁴⁷. Deprés et al¹⁴⁸ también afirman que las concentraciones plasmáticas de insulina se asocian con un mayor riesgo cardiovascular. Por otro lado, varios estudios indican que niveles altos de glucemia basal (86-109 mg/dL), dentro del rango considerado normal, se asocian con un incremento de la mortalidad cardiovascular, siendo este riesgo mayor para las mujeres¹⁴⁹, y que la glucosa, en presencia de disfunción endotelial, eleva la presión sanguínea. Así, algunos autores recomiendan disminuir los niveles elevados de glucosa como parte de la terapia preventiva cardiovascular del hipertenso¹⁵⁰.

En 1988, Reaven¹⁵¹ acuñó el término “síndrome X” o “síndrome metabólico-hipertensivo” para la asociación de factores de riesgo cardiovascular secundarios a la presencia de resistencia a la insulina. Con posterioridad se han ido añadiendo nuevas anomalías a este síndrome, como la hiperuricemia, el factor inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), etc.¹⁵². Según el Tercer Informe del Comité de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP III)¹⁵³, se considera que un individuo padece el síndrome metabólico cuando presenta 3 ó más de los parámetros clínicos que aparecen reseñados en la tabla 4. Recientemente la IDF (Federación Internacional de Diabetes)¹⁵⁴ ha establecido nuevos criterios diagnósticos para identificar a una persona con síndrome metabólico (tabla 5).

Tabla 4. Definición de síndrome metabólico establecido por el ATP III¹⁵³.

El paciente debe presentar tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad central: perímetro de cintura > 102 cm en varones y > 88 cm en mujeres.
- Nivel de triglicéridos plasmáticos \geq 150 mg/dL.
- Nivel de colesterol-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres.
- Presión arterial sistólica \geq 130 mmHg o diastólica \geq 85 mmHg.
- Nivel de glucemia en ayunas \geq 110 mg/dL.

Tabla 5. Definición de síndrome metabólico establecido por la IDF (International Diabetes Federation)¹⁵⁴.

El paciente debe presentar:

- Obesidad central: circunferencia de cintura \geq 94 cm en varones y \geq 80 cm en mujeres europeas, con otros valores específicos para otros grupos étnicos.
- Y, al menos, dos de los siguientes factores:
 - Nivel de triglicéridos \geq 150 mg/dL.
 - Nivel de colesterol-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres.
 - Presión arterial sistólica \geq 130 mmHg o diastólica \geq 85 mmHg.
 - Nivel de glucemia en ayunas \geq 100 mg/dL o diagnóstico previo de diabetes mellitus tipo 2.

Diversos estudios han demostrado que la HTA *per se*, en ausencia de obesidad y/o diabetes mellitus, se asocia con resistencia a la insulina¹⁵⁰. En este sentido, se conoce que: las cifras de presión arterial están incrementadas tanto en los sujetos con intolerancia a los hidratos de carbono como en los diabéticos; la prevalencia de HTA es aproximadamente el doble en pacientes diabéticos que en sujetos sanos, incrementándose con la edad en la diabetes tipo 2¹⁵⁵; que las personas hipertensas presentan mayor predisposición a desarrollar diabetes que los normotensos; y que el 75% de las complicaciones cardiovasculares de los pacientes con DM pueden ser atribuidas a la HTA¹⁵⁶. En el estudio UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), la presión arterial sistólica era un predictor significativo de enfermedad cardiovascular en los pacientes con DM tipo 2, mayor que el control del metabolismo hidrocarbonado; el beneficio relativo de la reducción del riesgo cardiovascular en estos pacientes se le atribuye más a la reducción intensa de la presión arterial que al control estrecho de la glucemia¹⁵⁶.

Sin embargo, a pesar de las evidencias epidemiológicas, no se ha demostrado definitivamente que la resistencia a la insulina y el hiperinsulinismo causen HTA. La resistencia insulínica se acompaña generalmente de hiperinsulinemia y, así, los sujetos hipertensos deberían presentar cifras elevadas de insulina, con o sin hiperglucemia. Sin embargo, este hecho no ha sido confirmado por varios estudios: los niveles de insulina no se correlacionaban con los niveles de presión arterial; tampoco los niveles de glucemia basal se asociaron a las cifras de presión arterial¹⁵⁷. Una explicación sería una pobre estratificación de los sujetos participantes en los estudios, con la presencia de variables confundentes (edad avanzada, obesidad abdominal, sensibilidad a la sal, dislipemias y otras). No obstante, Espino-Montoro et al¹⁵⁸ demostraron que una dieta rica en grasa monoinsaturada administrada a sujetos jóvenes sanos produce una disminución de la insulinemia y de la PAS y PAD, existiendo una correlación significativa y directa entre los cambios de presión arterial e insulina en estos individuos.

Por otro lado, Lind et al¹⁵⁹ han comprobado que la sensibilidad a la insulina varía ampliamente entre la población hipertensa y normotensa, con grados similares de resistencia insulínica en ambos grupos, y que no todos los hipertensos presentan resistencia insulínica. Además, los sujetos hipertensos que presentaban resistencia insulínica tenían

niveles de presión arterial similares a los individuos hipertensos sin resistencia insulínica, sugiriendo que ésta no determina el nivel de presión arterial en los hipertensos.

También hay que resaltar que la intolerancia a hidratos de carbono y la diabetes tipo 2 presentan desórdenes lipídicos que incrementan el riesgo cardiovascular en estos sujetos. Estos trastornos del metabolismo lipídico son hipertrigliceridemia, disminución del c-HDL y partículas de LDL más propensas a la oxidación, es decir, más aterogénicas. Estas alteraciones se explicarían por la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina¹⁶⁰. En este sentido, Villar et al¹⁶¹ estudiaron las alteraciones lipídicas presentes en 87 pacientes hipertensos, observando dos perfiles lipídicos: uno ligado a la hiperinsulinemia y caracterizado por un aumento de triglicéridos y disminución de c-HDL, y otro sin relación con la hiperinsulinemia que se manifiesta por incremento del colesterol total y del c-LDL. Algunos investigadores creen que la presencia de altas concentraciones de triglicéridos circulantes podría conducir a resistencia insulínica^{162, 163}. El *pool* aumentado de partículas VLDL ricas en triglicéridos circulantes podría también incrementar las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma por saturación de los mecanismos periféricos de eliminación y, así, contribuir al establecimiento de un estado de resistencia insulínica debido a que los ácidos grasos compiten con la glucosa como fuente de energía¹⁶⁴. También, en el hígado, un incremento de ácidos grasos disponibles produce un aumento de la gluconeogénesis¹⁶⁵. Todo ello explica también la relación entre dislipemia y resistencia insulínica antes citada.

En definitiva, factores genéticos, ambientales y la asociación de otros factores de riesgo observada en estudios poblacionales (obesidad, sedentarismo, dislipemia, diabetes mellitus tipo 2) serían los principales determinantes de la relación descrita entre la resistencia insulínica y la hipertensión.

h) Dislipemias.

Las dislipemias constituyen actualmente un gran problema de salud pública, tanto por su trascendencia médica como por la económica y social. Las dislipemias son un importante factor de riesgo cardiovascular. El riesgo de aparición de complicaciones cardiovasculares mortales y no mortales es independiente, consistente, gradual y

directamente proporcional al nivel de colesterol total y c-LDL, e inversamente proporcional al nivel de c-HDL. El estudio MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) demostró la existencia de una relación continua y gradual (sin umbral para el comienzo de esa relación) entre la colesterolemia y la mortalidad total y por cardiopatía isquémica¹⁶⁶. Por otro lado, la reducción de la colesterolemia produce una disminución de la incidencia y mortalidad por cardiopatía isquémica y enfermedad cardiovascular en general, tanto en prevención primaria como en prevención secundaria¹⁶⁷. Actualmente se sabe que el c-LDL y el c-HDL son factores de riesgo cardiovascular independientes. Diferentes autores aconsejan la utilización de los índices aterogénicos (colesterol total/c-HDL y c-LDL/c-HDL) como mejor predictor del riesgo coronario¹⁶⁸. El aumento del colesterol se asocia fundamentalmente a una elevación de las LDL y el de triglicéridos a un incremento de las VLDL y descenso del c-HDL. Se ha observado que un colesterol total 23,2 mg/dL menor en varones de 40 años se asocia a un riesgo de coronariopatía un 54% inferior, y una reducción del riesgo del 20% en varones de 70 años¹³¹. El efecto del c-HDL en el riesgo de cardiopatía coronaria no parece depender de la edad; cada 1,2 mg/dL de aumento del c-HDL parece asociarse a una reducción de al menos un 3% en el riesgo de enfermedad coronaria¹⁶⁹. Diversos estudios han confirmado la relación de los triglicéridos plasmáticos y la enfermedad cardiovascular, indicando que los niveles plasmáticos elevados de triglicéridos también son un factor de riesgo cardiovascular independiente¹⁵³ aunque algunos autores se preguntan si su efecto es independiente o es más bien un marcador de la presencia de otros factores de riesgo lipídicos¹⁷⁰. También se ha establecido una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de diversas apolipoproteínas y el riesgo cardiovascular. Así, la presencia de niveles elevados de apo B, principal componente proteico de la partícula de LDL, se relaciona con un incremento de la cardiopatía isquémica, mientras que la apo A-I, proteína cuya mayor concentración se localiza en las partículas HDL, tendría efectos beneficiosos.

El National Cholesterol Education Program (NCEP)¹⁵³ clasifica el riesgo cardiovascular como límite alto con valores de colesterol total comprendidos entre 200-239 mg/dL y elevado si superan los 240 mg/dL; el c-LDL se encuentra en el límite alto si está entre 130-159 mg/dL y elevado si es mayor de 160 mg/dL; los niveles de c-HDL se consideran altos por encima de 60 mg/dl y bajos si son inferiores a 40 mg/dL; por último,

los triglicéridos son normales por debajo de 150 mg/dL, límite alto entre 150-199 mg/dL, alto entre 200-499 mg/dL y muy alto por encima de 500 mg/dL. También establece (sobre la premisa de que el c-VLDL se considera normal por debajo de 30 mg/dL) que en aquellas personas con los niveles plasmáticos de triglicéridos elevados, la cifra de colesterol no-HDL (colesterol total menos colesterol-HDL) puede fijarse en 30 mg/dL por encima de las cifras de c-LDL. De cualquier forma, la presencia o no de otros factores de riesgo asociados, y entre ellos la HTA, debe considerarse a la hora de fijar los valores límite deseables.

En España, Banegas et al¹²⁴, en 1990, encontraron que un 18% de la población de 35 a 64 años tenía una colesterolemia ≥ 250 mg/dL, y un 57,8% ≥ 200 mg/dL. La cifra media de colesterol total obtenida en este estudio fue de 211 mg/dL (210 mg/dL en varones y 212 mg/dL en mujeres). En el estudio DRECE II se obtuvieron unos valores medios para la población española de 35 a 64 años de edad de 221 mg/dL para el colesterol total (219 mg/dL en varones y 223 mg/dL en mujeres), de 53 mg/dL para el c-HDL (48 mg/dL en varones y 58 mg/dL en mujeres), de 141 mg/dL para el c-LDL (140 en varones y 142 mg/dL en mujeres) y de 135 mg/dL para los triglicéridos (155 y 116 mg/dL en varones y mujeres, respectivamente); los valores de apo A-I fueron de 139,3 mg/dL en varones y 154,6 en mujeres, y de apo B 122,4 mg/dL en varones y de 115,6 mg/dL en mujeres. La prevalencia de hipercolesterolemia (colesterol total > 200 mg/dL) fue 69,5%¹²³.

Son numerosas y evidentes las observaciones epidemiológicas que muestran una estrecha relación entre presión arterial y lípidos. La presión arterial, el colesterol total y los triglicéridos tienden a elevarse gradualmente con la edad hasta la quinta o sexta década de la vida, en que, especialmente en el varón, tienden a estabilizarse, e incluso descender en un claro fenómeno de regresión a la media al fallecer aquellos individuos con niveles más elevados de estos parámetros. También, otro hallazgo común en muchos estudios es la existencia de una prevalencia similar de HTA e hipercolesterolemia en la población adulta, además de su frecuente asociación en la clínica.

En diferentes estudios prospectivos la hipertensión arterial y la hipercolesterolemia han mostrado una relación causa-efecto en el desarrollo de complicaciones

cardiovasculares. Independientemente de factores confundentes como la edad, el sexo, el índice de masa corporal, el consumo de alcohol o el tratamiento antihipertensivo, se ha encontrado en la población hipertensa una tendencia a presentar niveles más elevados de colesterol total, triglicéridos y c-LDL y menores de c-HDL, en comparación con la población normotensa, así como una prevalencia significativamente mayor de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia^{171, 172, 173}. Diversos estudios han demostrado una relación lineal entre niveles de colesterol, triglicéridos e hipercolesterolemia con el grado de severidad de la HTA desde normotensión, HTA límite y ligera a moderada, indicativos de la estrecha relación existente entre ambos factores de riesgo¹⁷⁴. A la inversa, tras ajuste de variables confundentes, en poblaciones hipercolesterolémicas se observa una tendencia a presentar por décadas niveles superiores de presión arterial que la población normocolesterolémica, siendo la correlación más acentuada para la presión arterial sistólica que diastólica. Del mismo modo, la prevalencia de hipertensión arterial es significativamente más elevada en la población hipercolesterolémica¹⁷⁵. Por todo ello, parece evidente la existencia de una interrelación causal entre la presión arterial y los niveles lipídicos de un individuo, con la contribución de factores ambientales e intrínsecos que condicionarían el perfil tensional y lipídico del sujeto. Aranda et al¹⁷¹ proponen una serie de mecanismos etiopatogénicos que explicarían esta asociación (fig. 5). Además, diversos estudios epidemiológicos y experimentales demuestran que cuando se asocian la HTA y la hipercolesterolemia se produce un incremento exponencial del riesgo vascular, dando lugar a una mayor severidad de las lesiones ateroscleróticas y a una mayor rapidez en cuanto al desarrollo de las mismas.

El conocimiento de los fenotipos de dislipemias que acompañan a la HTA puede ser necesario para matizar las intervenciones terapéuticas en los pacientes hipertensos. Stiefel et al¹⁷⁶ hallan en un grupo de 158 pacientes hipertensos una alta prevalencia de dislipemias (un 69,6% de sujetos con algún tipo de dislipemia) y de presentación muy heterogénea, siendo el aumento aislado de la Lp(a) (19%) y la hipertrigliceridemia (15,2%) los fenotipos más frecuentes, y el menos la hiperapobetalipoproteinemia (6,9%); el 61,8% de las mujeres mostraban algún trastorno del metabolismo lipídico, porcentaje que aumentaba hasta el 75,6% en el caso de los varones. También Catalano et al¹⁷⁷ han estudiado los niveles plasmáticos de lípidos y apolipoproteínas en un grupo de 50 sujetos

hipertensos esenciales no tratados, encontrando niveles significativamente más elevados de triglicéridos, c-VLDL y apo E, y menores de apo A-I, apo A-II y apo C-II respecto al grupo control; sin embargo, no hallaron diferencias en los niveles de colesterol total, c-LDL, c-HDL, apo B y apo C-III.

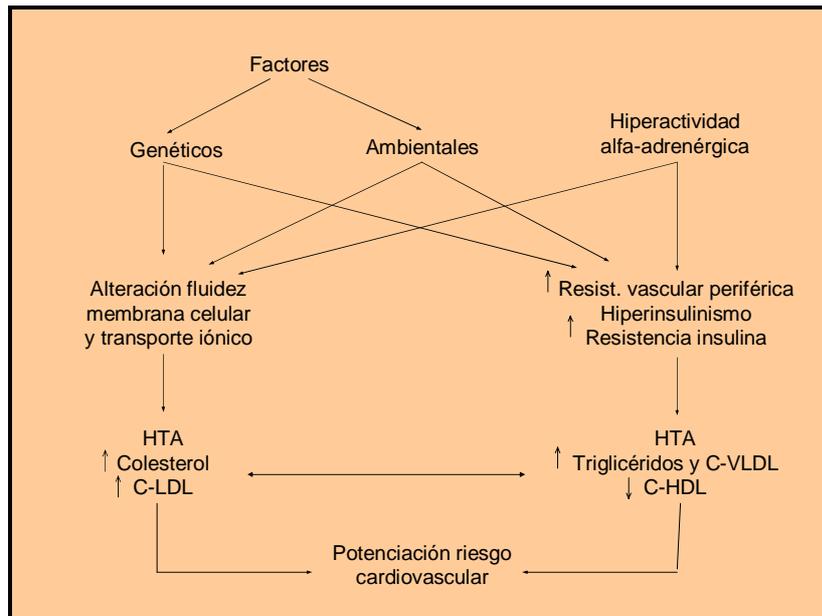


Fig. 5. Asociación etiopatogénica entre HTA y dislipemia. Tomado de Aranda et al¹⁷¹.

Estos factores de riesgo y otros marcadores nuevos de riesgo cardiovascular (parámetros de la elasticidad arterial, microalbuminuria, homocisteinemia, etc.)¹⁷⁸ deben valorarse conjuntamente para establecer una estratificación del riesgo del paciente hipertenso, con vistas a la consecución de un tratamiento individualizado en función de los hallazgos y el perfil de riesgo de cada sujeto.

En resumen, la HTA confiere un riesgo cardiovascular aumentado en los sujetos que la padecen. Esta relación está influida por otros factores y, por tanto, cualquier planteamiento de reducir la morbimortalidad cardiovascular pasa por el tratamiento integral de todos estos factores de riesgo.

3. Genética de la aterosclerosis.

La aterosclerosis se puede definir como una alteración entre el influjo y el eflujo de colesterol dentro de la pared arterial. En un principio, este proceso da lugar a una lesión proliferativa de la íntima o media de las arterias que, en sucesivas etapas, invade la luz de estos vasos originando finalmente un acúmulo de lípidos en la pared vascular, seguida de la formación de tejido fibroso (placa de ateroma). Para que estas placas de ateroma produzcan síntomas debe obstruirse más de la mitad de la luz del vaso y ello suele ocurrir sobre la quinta o sexta década de la vida en los varones y unos 10 años más tarde en las mujeres. La lesión aterosclerótica es el sustrato anatomopatológico de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares.

Es bien conocido que los individuos con antecedentes familiares de enfermedad coronaria prematura (< 50 años en varones y < 60 años en mujeres) poseen un mayor riesgo coronario, con independencia de otros factores de riesgo. Ello indica que existe un componente genético importante en la susceptibilidad individual a desarrollar aterosclerosis coronaria. La enfermedad cardiovascular es un desorden complejo multifactorial y poligénico, es decir, no existe un único gen responsable de la enfermedad sino que es el resultado de la interacción de varios genes o de genes y medio ambiente lo que va a producir un determinado fenotipo; incluso en ausencia de factores genéticos, la enfermedad cardiovascular puede manifestarse debido meramente a la presencia de factores ambientales negativos. Los factores genéticos incrementan la incidencia primaria de la enfermedad aterosclerótica, promueven la manifestación de la enfermedad a una edad más joven y, una vez el desorden es clínicamente aparente, pueden acelerar su progresión.

En los últimos años, gracias a los avances en biología molecular, se han realizado importantes descubrimientos de genes que parecen estar implicados en el proceso aterosclerótico, denominados “genes candidatos”, entre los que se encuentran los genes relacionados con el metabolismo lipídico, la cascada de la coagulación, el sistema

fibrinolítico, etc. (tabla 6). Muchos de estos genes son polimórficos, es decir, presentan variaciones en su secuencia de ADN, que si bien en la mayoría de los casos no tienen consecuencia biológica alguna, en ocasiones pueden modificar la función o concentración de la proteína que codifican. Si estas modificaciones aumentan el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, estaríamos ante unos marcadores genéticos de riesgo cardiovascular.

Tabla 6. Polimorfismos asociados con aterosclerosis.

<ol style="list-style-type: none">1. Polimorfismos relacionados con el metabolismo lipoproteico.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo del gen de la apolipoproteína A-I.- Polimorfismo del gen de la apolipoproteína A-IV.- Polimorfismo del gen de la apolipoproteína B.- Polimorfismo del gen de la apolipoproteína C-III.- Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E.- Polimorfismo del gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC).- Polimorfismo del gen de la lipoproteín lipasa (LPL).2. Polimorfismos relacionados con el sistema renina-angiotensina.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo inserción/delección de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA).3. Polimorfismos relacionados con el sistema de coagulación y de la fibrinólisis.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo HaeIII del gen de la cadena beta del fibrinógeno.- Polimorfismo PI del gen de la glucoproteína IIb/IIIa.- Polimorfismo 4G/5G del gen del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).4. Polimorfismo genético de la homocisteína.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo C667T del gen de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR).5. Polimorfismo genético del óxido nítrico.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo del gen de la sintasa del óxido nítrico endotelial.6. Polimorfismo genético de la paraoxonasa.<ul style="list-style-type: none">- Polimorfismo Q192R del gen de la paraoxonasa.

3.1. GENERALIDADES. POLIMORFISMOS.

El ADN genómico de una célula humana contiene aproximadamente 3×10^9 pares de bases (pb) repartidas en 23 pares de cromosomas. Este ADN contiene dos tipos de secuencias: codificantes y no codificantes. Las secuencias no codificantes no conducen a la síntesis de una molécula activa de ARN o a una proteína. Algunas de estas secuencias no codificantes desempeñan funciones estructurales en el ADN, de organización de la

cromatina dentro del núcleo o de regulación de la expresión génica. La mayor parte del ADN no codificante está formado por familias de secuencias repetitivas cuya función se desconoce. Las secuencias de ADN codificante dan lugar a moléculas de ARN mediante el proceso de transcripción, para lo cual es necesario la enzima ARN polimerasa que sintetiza la hebra de ARN utilizando como molde la secuencia de ADN. Este ARN transcrito puede ser una molécula que por sí misma desempeña una función, como por ejemplo el ARN de transferencia (ARN-t), o bien actúa como ARN mensajero (ARNm) para dar lugar a una proteína mediante el proceso de traducción (el término traducción se refiere al proceso completo que abarca el inicio de la síntesis proteica, la unión de los aminoácidos en el orden correcto, la terminación de la cadena, la liberación de la misma y, a menudo, las modificaciones que tienen lugar posteriormente sobre las cadenas recién sintetizadas).

La primera etapa del proceso de transcripción es la unión de la ARN polimerasa a la molécula del ADN. Dicha unión se produce en unos lugares determinados (puntos de inicio) llamados promotores, que son secuencias específicas de 20 a 200 bases, y que se sitúan en el extremo 5' del gen. Estas regiones promotoras contienen secuencias conocidas como cajas TATA, GC, CAAT, etc., a las que se unen proteínas, denominadas factores de transcripción, que facilitan o impiden que la ARN polimerasa inicie el proceso de transcripción. Además existen otras secuencias reguladoras, situadas en la zona 5' del promotor ("upstream" o secuencia arriba), que permiten o facilitan la unión de moléculas que regulan la transcripción del gen como, por ejemplo, los elementos respondedores a hormonas (HRE). Algunos genes también tienen secuencias intensificadoras o "enhancers" y/o inhibidoras, que pueden estar situadas a gran distancia "upstream" o "downstream" (secuencia abajo o zona 3') del gen, e incluso dentro del propio gen.

La posición de un gen en un cromosoma se denomina locus (en plural, loci). Cuando existe una asociación entre alelos de distintos loci que hace que las combinaciones alélicas observadas no se presenten con la frecuencia esperada de acuerdo con la regla del producto de probabilidades, se dice que dichos alelos se encuentran en desequilibrio de ligamiento o de unión.

La mayoría de los genes estructurales de los organismos eucariotas están organizados en regiones codificantes o exones interrumpidas por secuencias no codificantes o intrones. El ARN transcrito (ARN mensajero primario) contiene ambos tipos de secuencias y, mediante el proceso denominado de ajuste o “splicing” (corte y empalme), pierde los intrones para dar lugar al ARN mensajero maduro, que posteriormente se traducirá en una molécula de proteína en los ribosomas.

El genoma humano presenta frecuentes diferencias de secuencias entre individuos. Estas variaciones constituyen la base molecular de la diversidad genética entre individuos de la misma especie. La variación de la secuencia de nucleótidos es mayor en las partes no funcionales del genoma, y menor en las regiones codificantes. La existencia en una población de dos o más alelos para un mismo gen que se encuentran presentes con una frecuencia superior al 1% del total recibe el nombre de polimorfismo genético. Estos polimorfismos pueden ser detectados por las endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que se unen específicamente al ADN bicatenario y lo cortan en sitios concretos cuando reconocen una secuencia particular, denominada secuencia de reconocimiento. La especificidad de secuencia de las enzimas de restricción es un poderoso instrumento para la disección de genomas extensos. Cuando se digiere el genoma humano con una determinada enzima de restricción, se generan cientos de miles de fragmentos de tamaño variable, desde unos cuantos pares de bases a varios miles, dependiendo de la enzima utilizada. Gracias al empleo de múltiples enzimas de restricción para analizar un segmento determinado de ADN, es posible definir un mapa detallado de los puntos de ruptura de las endonucleasas para esta región de la molécula. Cuando existen diferencias en la secuencia del ADN, los fragmentos generados por las enzimas de restricción dan lugar a los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), los cuales se heredan según principios mendelianos. La digestión con enzimas de restricción, seguida de otras técnicas, permite identificar estos RFLP y utilizarlos como marcadores genéticos para zonas del genoma. Estos hallazgos genómicos pueden ser utilizados para seguir determinados alelos en familias y, estudiar la relación de un determinado genotipo con un

determinado fenotipo (con las limitaciones y dificultades de interpretación impuestas por las interacciones entre varios genes, y de los genes con factores ambientales)¹⁷⁹.

De esta forma, la identificación mediante técnicas de biología molecular de estas variaciones genéticas se convierte en un instrumento para reconocer a un grupo de personas con una mayor predisposición para desarrollar un evento cardiovascular y, así, valorar de forma precisa el riesgo individual, pudiéndose planificar intervenciones preventivas o terapéuticas dirigidas.

Por tanto, para que sea útil el manejo de los polimorfismos genéticos como marcadores de riesgo hay que¹⁸⁰:

1. Seleccionar aquellos polimorfismos de genes que codifiquen proteínas cuya modificación pueda tener relación directa con la presencia de enfermedad cardiovascular.
2. La asociación entre el polimorfismo y la enfermedad cardiovascular debe ser fuerte.
3. La prevalencia del polimorfismo debe ser lo suficientemente alta como para que merezca la pena la determinación en la población general.
4. Las variaciones del gen deben inducir cambios que se detecten de forma fácil tanto en la función como en los niveles de su correspondiente proteína.
5. Se tiene que apreciar diferencias en el fenotipo o en la clínica según la presencia de los diferentes genotipos.

La búsqueda de mutaciones en los genes relacionados con el metabolismo lipoproteico, factor determinante en el proceso aterosclerótico, ha dado como resultado el hallazgo de diversos polimorfismos en estos genes los cuales han sido asociados, con más o menos consistencia, con aumentos (en la mayor parte de los casos) o disminución del riesgo coronario.

3.2. POLIMORFISMOS DE LA APO C-III.

El gen de la apo C-III está localizado en el brazo largo del cromosoma 11¹⁸¹, a 2,6 kb del extremo 3' del gen de la apo A-I y a 6,5 kb del extremo 5' del gen de la apo A-IV¹⁸², constituyendo un agrupamiento de genes o "cluster" (cluster apo AI/CIII/AIV) (fig. 6). La similitud de la estructura de los genes de apo A-I, C-III y A-IV, es consistente con la idea de que estos genes evolucionaron desde un gen común a través de una serie de duplicaciones genéticas, deleciones y translocaciones cromosómicas. Los genes de las apo A-I y A-IV se leen en la misma dirección, mientras que el de la apo C-III se transcribe en dirección contraria a los anteriores⁶. El gen de la apo C-III contiene 3.133 pb, y posee 4 exones y tres intrones¹⁴. El primer y segundo exón codifican nucleótidos no transcribibles (el codón iniciación y el péptido señal), mientras que el tercer y cuarto exón codifican las secuencias predictoras de la estructura tridimensional de la apo C-III; más concretamente, el tercer exón codifica los aminoácidos 1-40 (fragmento N-terminal), y el cuarto los aminoácidos 41-79 (fragmento C-terminal)³¹.

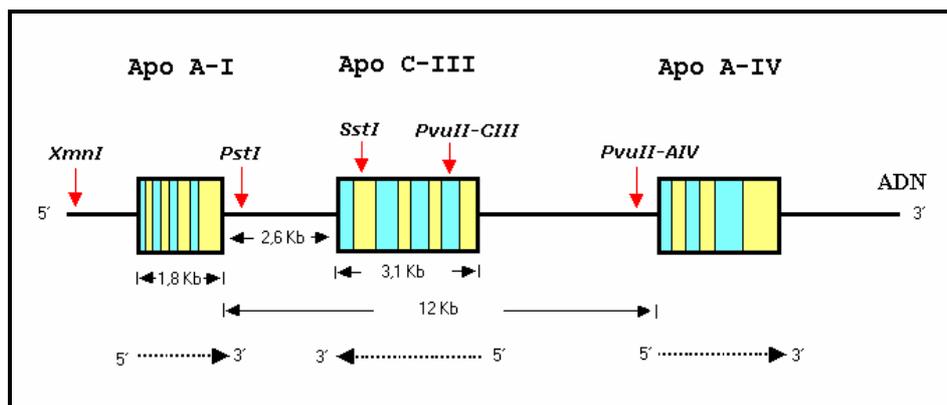


Fig. 6. Esquema del cluster apo AI-CIII-AIV. Las líneas punteadas indican la dirección de lectura del gen. Las bandas amarillas representan los exones; en azul los intrones. Con las flechas rojas están indicados los lugares de restricción de varios polimorfismos de las endonucleasas reseñadas. También aparecen las distancias aproximadas en kilobases (kb).

3.2.1. POLIMORFISMO Sst-I.

Existe un polimorfismo en el gen de la apo C-III detectado por la endonucleasa de restricción Sst-I ó Sac-I ¹⁸³. La secuencia de reconocimiento de esta enzima es GAGCTC ¹⁸⁴ (fig. 7). Este polimorfismo del gen de la apo C-III es debido a una transversión de C por G (C3238G) en la región 3' no codificadora del gen, en el exón 4, que no altera la secuencia primaria de esta apoproteína ¹⁸⁵. Mediante el empleo de la citada enzima pueden distinguirse dos alelos, S1 y S2, que dan lugar a tres posibles genotipos: homocigoto S1S1, heterocigoto S1S2 y homocigoto para el alelo raro S2S2. En la figura 8 se muestran los tamaños de los RFLP obtenidos tras la digestión del cluster AI/CIII por esta enzima. Dichos fragmentos, tras ser sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida y teñidos, permiten establecer el genotipo de un individuo según las bandas que se observen en dicho gel.

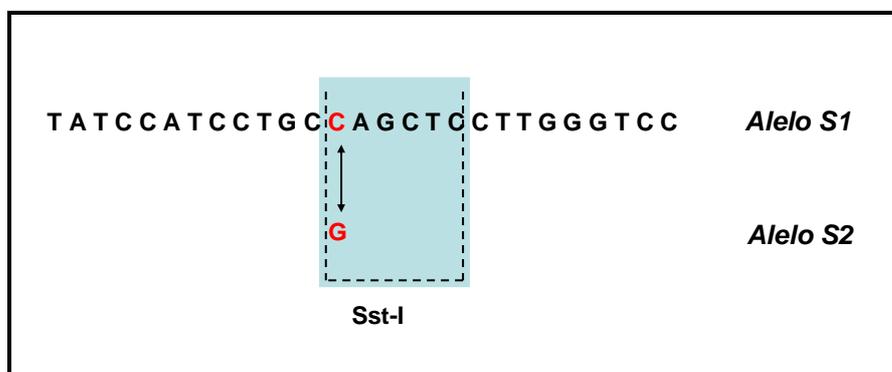


Fig. 7. Punto de restricción de la enzima Sst-I en la región 3' no codificante del gen de la apolipoproteína C-III. La presencia de guanina en lugar de citosina en la secuencia coloreada (entre las líneas discontinuas) configura la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa, dando lugar a la aparición del alelo raro S2. Tomado de Paul et al ²⁵⁵.

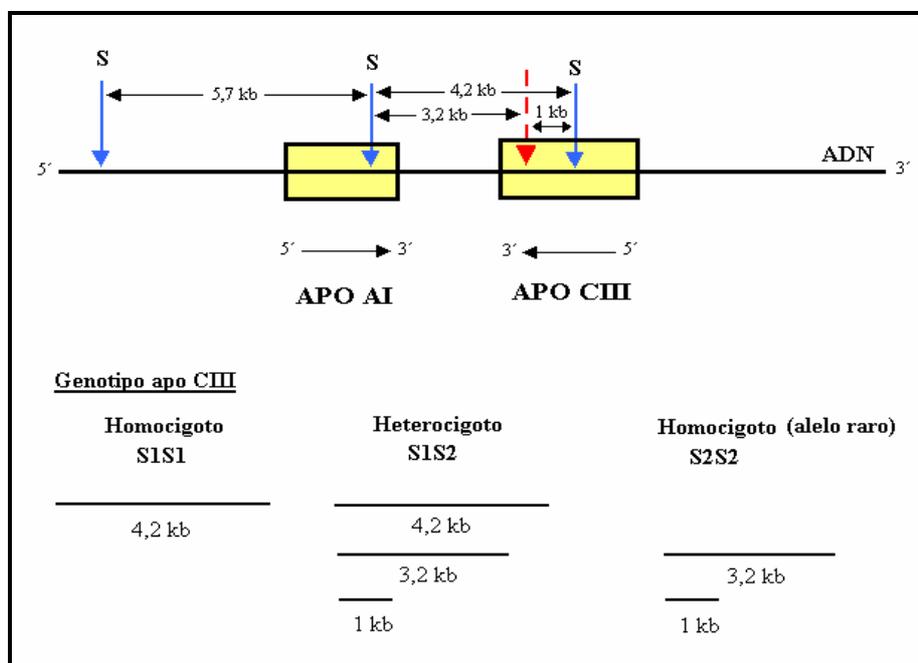


Fig. 8. Mapa de los genes de las apolipoproteínas AI y CIII con los lugares de corte de la endonucleasa de restricción Sst-I (flechas azules). La flecha roja indica el nuevo lugar de corte producido por la mutación C3238G en el extremo 3' del gen de la apo C-III, de forma que aparecen dos fragmentos de 3,2 y 1 Kb en lugar de un fragmento de 4,2 Kb. Modificado de Rees et al¹⁸⁹.

La frecuencia del alelo menor S2 varía entre los distintos grupos raciales. En la población caucásica oscila entre 0,01 y 0,21^{186, 187, 191, 193, 203, 228, 239, 254}, 0,11 en árabes¹⁹⁵, 0,27 en negros²⁵⁵, 0,25 en indios canadienses²⁰⁹, 0,19 en hindúes²⁰⁰ y 0,35 en japoneses¹⁹⁶. Esta gran variabilidad puede ser debida a diferentes motivos, como el escaso tamaño de la muestra de algunos estudios, las diferencias en los criterios de selección de la población, o lo que parece la razón más poderosa, el diferente origen étnico de las poblaciones estudiadas.

El alelo menor S2 se ha asociado clásicamente a mayores niveles de triglicéridos. Rees et al¹⁸⁸ mostraron que más del 40% de los individuos con hipertrigliceridemia de un estudio basado en población blanca de Londres poseía el alelo S2, comparado con menos

del 5% del grupo normolipémico. Estos mismos autores¹⁸⁹ confirman estos hallazgos en otro estudio posterior, en 74 caucasianos londinenses (13 mujeres y 61 varones) con hipertrigliceridemia con una frecuencia alélica S2 del 30% frente a ningún caso en el grupo control; curiosamente también hallan una alta frecuencia de este alelo en sujetos londinenses normolipémicos de diferentes orígenes raciales (65% en chinos, 38% en japoneses, 30% en africanos y 35,7% en hindúes) en los que no encuentran asociación con los niveles plasmáticos de triglicéridos (para cada grupo étnico el tamaño muestral era de 20-28 individuos). Aalto-Setälä et al¹⁹⁰, en población finlandesa adulta, encuentran el alelo S2 en el 62% de los sujetos hipertrigliceridémicos, mientras que sólo estaba presente en el 16% de la población sana. Tybjaerg-Hansen et al¹⁹¹ también comunican una frecuencia más elevada de este alelo en hipertrigliceridémicos daneses en comparación con normolipémicos (0,16 versus 0,09; $p < 0,05$).

Dammerman et al⁴⁹ en población norteamericana, observan una frecuencia en hipertrigliceridémicos de 0,36 frente a 0,08 en normolipémicos. Shoulders et al¹⁹² describen en un grupo de 503 niños italianos en edad escolar la asociación del alelo S2 con niveles elevados de triglicéridos. Hoffer et al¹⁹³, en caucasianos holandeses, encuentran una mayor frecuencia del alelo S2 entre sujetos con hipertrigliceridemia endógena en comparación con un grupo control. Waterworth et al¹⁹⁴ confirman la relación del polimorfismo Sst-I con la concentración plasmática de triglicéridos en una amplia cohorte de sujetos caucasianos sanos del estudio NPHSII (2.745 varones de edad comprendida entre 50 y 61 años), aunque esta asociación del alelo raro S2 con los niveles altos de triglicéridos parece estar afectada por el hábito del tabaquismo (los fumadores tenían mayores niveles de triglicéridos). Tas¹⁹⁵ comunica una fuerte asociación entre el alelo S2 e hipertrigliceridemia en árabes residentes en Kuwait al hallar que dicho alelo estaba presente en tan solo el 3% de los sujetos normotrigliceridémicos estudiados, mientras que aparecía con una frecuencia del 71% entre los individuos hipertrigliceridémicos; la relación del alelo S2 era más estrecha con los niveles de VLDL que con los niveles de triglicéridos plasmáticos totales y los individuos S1S2 mostraban una ligera quilomicronemia. Zeng et al¹⁹⁶ observan una frecuencia alélica S2 de 0,48 en pacientes japoneses hipertrigliceridémicos frente a un 0,25 en normolipémicos. Ko et al¹⁹⁷ hallan una asociación significativa de dicho alelo en pacientes chinos hipertrigliceridémicos frente a

un grupo control. También en población china, Zhu et al¹⁹⁸ comunican una mayor frecuencia del alelo S2 entre individuos hipertriglicéridémicos y una correlación con los niveles plasmáticos de triglicéridos (frecuencia del alelo S2 de 31,8% en 308 niños). Hong et al¹⁹⁹ hallan una mayor frecuencia alélica S2 en un grupo de 77 pacientes hipertriglicéridémicos coreanos (0,36) respecto al grupo de 92 controles (0,24). Chhabra et al²⁰⁰ estudian la relación del polimorfismo Sst-I y los niveles plasmáticos de triglicéridos en 139 varones hindúes (34 sujetos hipertriglicéridémicos y 105 normotriglicéridémicos) comunicando que el alelo S2 era casi 2 veces más prevalente en el grupo hipertriglicéridémico (0,485) que en el grupo control (0,258), calculando una “odds ratio” en los sujetos S1S2 de 2,43 y en los individuos S2S2 de 9,9 para desarrollar hipertriglicéridemia.

Dallongeville et al²⁰¹ estudian en una población del norte de Francia (590 hombres y 579 mujeres seleccionadas del proyecto MONICA) la influencia del género en los efectos de varios polimorfismos de la apo C-III; las mujeres portadoras del alelo raro S2 presentaban cifras más elevadas de triglicéridos y de apo B que aquellas homocigotas S1, hecho que no acontecía en los varones.

Paulweber et al²⁰², al comparar una población austríaca con enfermedad coronaria con individuos sanos, objetivan como el alelo S2 se asoció a niveles elevados de triglicéridos en los pacientes pero no en el grupo control. Ordovás et al²⁰³, también comparando un grupo de población con cardiopatía isquémica con otro control, observan mayores niveles de triglicéridos en los sujetos portadores del alelo S2 en ambos grupos, aunque las diferencias sólo llegaron a ser significativas en los sujetos controles.

Rigoli et al²⁰⁴ describen la asociación entre el genotipo S1S2 y niveles de triglicéridos, así como de colesterol total y apo B, en un grupo de sujetos italianos con diabetes mellitus tipo 2. También Marcais et al²⁰⁵ hallan en una muestra de diabéticos no insulino dependiente una mayor frecuencia del alelo S2 en el subgrupo de individuos hipertriglicéridémicos (50%) frente a un 15,5% en el subgrupo normolipémico. Sijbrands et al²⁰⁶ estudian en individuos homocigotos del alelo E2 del gen de la apo E la relación entre el polimorfismo Sst-I y la insulinemia, encontrando que el alelo S2 se relacionaba

con un incremento de Tg-VLDL en el subgrupo hiperinsulinémico, pero no en el subgrupo normoinsulinémico.

Couillard et al²⁰⁷ hallan una asociación entre el polimorfismo Sst-I e hipertrigliceridemia en un grupo de 122 varones con obesidad visceral. Además, los niveles elevados de triglicéridos en los sujetos S1S2 se asociaban con la presencia de partículas LDL pequeñas y densas, en comparación con los individuos S1S1. Por otro lado, no encuentran relación entre este polimorfismo y la respuesta al test de sobrecarga oral de glucosa en este grupo de pacientes.

Sin embargo, la asociación del alelo S2 con hipertrigliceridemia no ha sido confirmada por otros grupos. Shoulders et al¹⁸², en 156 caucasianos londinenses, encuentran cifras más elevadas de triglicéridos en los S2 tanto en varones como en mujeres, pero sin llegar a alcanzar significación estadística. Porkka et al²⁰⁸ estudian el polimorfismo Sst-I en 305 finlandeses y sólo encuentran una influencia de dicho polimorfismo sobre las variaciones en los niveles de colesterol total y c-LDL y sólo en varones, pero no sobre los triglicéridos. Cole et al²⁰⁹, en indios Dogrib canadienses, tampoco observan diferencias entre los diferentes genotipos. Similares resultados se han constatado en italianos²¹⁰, escoceses²¹¹ y en grupos de negros, chinos, coreanos y japoneses^{189, 212, 213, 214}.

Waterworth et al²¹⁵ comparan a 407 varones sanos del estudio EARSII, cuyos padres habían sufrido un infarto de miocardio antes de los 55 años, con un grupo control de 415 individuos. Tras una ingesta grasa los portadores del alelo S2 tenían mayores niveles de triglicéridos con un aclaramiento disminuido de los mismos, pero tras ajustar los niveles de triglicéridos en ayunas, se perdía la significación estadística. Estos autores sugieren que el efecto del alelo S2 sobre los triglicéridos postprandiales es el resultado de su asociación con otro polimorfismo de la apo C-III estudiado en este trabajo, en concreto, la variante T-2854G.

Russo et al²¹⁶ estudian el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en la población del estudio Framingham. Los niveles de triglicéridos eran más elevados en los sujetos S2, tanto varones como mujeres, pero sólo eran significativos en estas últimas.

Gutiérrez et al²¹⁷ estudian a 53 pacientes diabéticos no insulino dependientes con menos de 5 años de evolución y en tratamiento sólo con dieta frente a un grupo control de 86 personas sanas. No hallaron diferencias significativas en la distribución genotípica o alélica entre ambos grupos y tampoco se observó ninguna diferencia entre los parámetros metabólicos estudiados, entre ellos los triglicéridos.

El alelo S2 se ha relacionado también con niveles elevados de colesterol. En adolescentes finlandeses²¹⁸, el alelo S2 se asoció a cifras significativamente superiores de colesterol total y LDL en comparación con los S1, no existiendo diferencias en los niveles de HDL-C. Estos hallazgos no se reprodujeron en la población finlandesa adulta. La explicación podría ser un incremento en las VLDL que se convierten rápidamente en LDL. Esto ocurriría de forma más importante en los jóvenes que en los adultos por un mecanismo aún desconocido. Porkka et al²⁰⁸ refieren la asociación del polimorfismo Sst-I con los niveles plasmáticos de colesterol total y de c-LDL en varones, pero no en mujeres. Wick et al²¹⁹, en un estudio realizado en 700 sujetos de origen alemán, observan en pacientes con enfermedad coronaria cifras significativamente elevadas de colesterol total en los sujetos S2, en comparación con los S1, no repitiéndose estos resultados en el grupo control. Shoulders et al²²⁰ también comunican una asociación entre el alelo S2 con hipercolesterolemia primaria sin xantomas tendinosos. Este mismo autor²²¹ observa en la población inglesa hipercolesterolémica (excluida hipercolesterolemia familiar), una prevalencia del alelo S2 del 34%, mientras que en la normolipémica fue del 6,1%. Cuando los grupos con hiperlipemia IIB y IIA se dividieron según el genotipo de apo C-III, sólo en los sujetos con el tipo IIA los portadores del alelo S2 mostraron niveles más elevados de colesterol total. En población inglesa normolipémica¹⁸², los hombres S2 mostraron mayores niveles plasmáticos de apo B, no así las mujeres. Dallinga-Thie et al²²² han estudiado recientemente este polimorfismo de apo C-III en sujetos con hiperlipemia familiar combinada (HFC) y sus familiares. Observan como en los primeros, la presencia del alelo S2 se asoció a niveles más elevados de colesterol y triglicéridos plasmáticos,

aunque sin llegar a ser significativos. Sin embargo, en sus familiares, este alelo sí se asoció de forma estadísticamente significativa a cifras más elevadas de triglicéridos y apo C-III. Hayden et al²²³ también han comunicado una asociación de este alelo menor con hiperlipemia familiar combinada. Rigoli et al²⁰⁴, en pacientes diabéticos tipo 2, hallan que el genotipo S1S2 se asoció con incremento del colesterol total y de los niveles de apo B respecto a los sujetos S1S1. Russo et al²¹⁶ encuentran que, en los varones, el alelo S2 se asociaba con la disminución de los niveles del c-HDL y c-HDL₂ y la presencia de partículas de LDL de menor tamaño, mientras que en las mujeres el alelo S2 se asociaba a niveles más elevados de c-LDL y apo B, con un incremento de partículas LDL de tamaño intermedio. Couillard et al²⁰⁷ encuentran en varones con obesidad central una asociación del alelo S2 con el incremento de los niveles de c-VLDL y con la disminución de los niveles de c-LDL y c-HDL₃. López-Miranda et al¹⁸⁶ describen una asociación entre el alelo S2 y una disminución en los niveles de c-LDL en jóvenes sanos tras una dieta rica en grasa monoinsaturada. Sijbrands et al²⁰⁶, en sujetos homocigotos E2 hiperinsulinémicos, el alelo S2 se asoció con un aumento del c-VLDL y con disminución del c-HDL, aspecto que no ocurría en el subgrupo normoinsulinémico. También Tas¹⁹⁵ encuentra una disminución de partículas HDL y un incremento de VLDL en los portadores del alelo S2. Anderson et al²²⁴, en otro trabajo realizado en población blanca, encontraron que aquellos sujetos con niveles de c-HDL por debajo del percentil 5 tenían un aumento de la frecuencia del alelo S2 comparado con aquellos cuyas concentraciones de c-HDL estaban por encima del percentil 95. En este estudio, los pacientes con c-HDL bajo que presentaban el alelo menor tenían también cifras significativamente mayores de triglicéridos.

Por el contrario, la relación del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III con el incremento de los niveles de colesterol plasmático no ha sido confirmada por otros estudios. Zaman et al²²⁵, en japoneses, no encuentran asociación entre este polimorfismo y los niveles de colesterol total, c-HDL o el cociente colesterol total/c-HDL. Hubacek et al²²⁶ estudian a dos grupos de niños checos seleccionados de los extremos de la curva de distribución de los niveles de colesterol total plasmático de una muestra de 2.000 niños, 82 individuos con niveles altos de colesterol y 86 con niveles bajos, no encontrando diferencia significativa entre ambos grupos y el genotipo Sst-I de la apo C-III. Tampoco Chhabra et al²⁰⁰, en población hindú, observan relación entre el alelo S2 y los niveles de colesterol

total, c-LDL, c-HDL y cociente LDL/HDL. Olivieri et al²²⁷, en población italiana, coinciden en estos hallazgos, además de no encontrar asociación con los niveles de apo A-I y apo B.

La influencia de este polimorfismo en los niveles plasmáticos de apo C-III ha sido también objeto de estudio. Shoulders et al^{182, 192} observan mayores cifras de esta apoproteína en sujetos con el alelo S2 independientemente del sexo. Este hecho también ha sido confirmado en pacientes con aterosclerosis coronaria²²⁷. Paul-Hayase et al²²⁸ sólo observan diferencias significativas en los niveles de apo C-III en los sujetos homocigotos para el alelo S2, no así en los heterocigotos. Couillard et al²⁰⁷ hallan niveles más elevados de C-III en los sujetos S2, aunque sin alcanzar una significación estadística. Parece estar confirmado que esta mutación no produce cambios en la proporción de las isoformas de apo C-III¹⁸⁹.

Esterbauer et al²²⁹ estudian en biopsias hepáticas de 5 individuos obesos heterocigotos S1S2, si el alelo S2 está relacionado con el incremento de la expresión del ARN-m de la apo C-III *in vivo*, confirmando este hecho en 3 de los sujetos, ofreciendo así datos preliminares para suponer una diferencia específica según el alelo en la expresión del ARN-m *in vivo* y, sugiriendo que tal diferencia puede contribuir a la asociación descrita entre los polimorfismos de la C-III con la hipertrigliceridemia.

Se ha podido observar¹⁹¹ que la frecuencia del alelo S2 desciende en función de la edad en los sujetos no arterioscleróticos (0,15, 0,10 y 0,02 en sujetos con 48, 63 y 85 años respectivamente). Si este descenso es real, podría indicar que los sujetos S2, con el paso del tiempo, o bien pasan al grupo con arteriosclerosis, o bien fallecen.

La posible relación del alelo menor S2 con el desarrollo de cardiopatía isquémica ha sido objeto de estudio de numerosos investigadores. Ferns et al²³⁰ encuentran en supervivientes de un infarto agudo de miocardio una frecuencia de 0.12 para el alelo S2, mientras que en los sujetos sanos fue de 0,02 ($p < 0,02$). Este mismo autor, en otro estudio²³¹, observa una frecuencia del alelo S2 del 21% en pacientes con IAM frente al 4% en sujetos controles. Así mismo, en los normotrigliceridémicos con IAM fue del 17%, no

encontrando ningún S2 entre los normotrigliceridémicos controles. Ordovás et al²⁰³, al estudiar 202 pacientes con cardiopatía isquémica y 145 sujetos controles, encuentran una mayor frecuencia de cardiopatía isquémica en los portadores del alelo S2, aunque la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p = 0,06$). Sin embargo, al realizar un metaanálisis con los estudios publicados anteriormente en sujetos caucasianos, la frecuencia del alelo S2 en pacientes con cardiopatía isquémica fue de 0,11, mientras que en los controles 0,06 ($p < 0,001$). De Lorenzo et al^{232, 233} hallan en italianos que el alelo S2 estaba presente en el 16% de los pacientes con cardiopatía isquémica prematura (antes de los 55 años) comparado con el 6% de los controles ($p = 0,02$), aunque esta asociación desaparecía tras ajustar el hábito del tabaco. Por otro lado, estos mismos autores no encuentran significación estadística en el genotipo al comparar sujetos con enfermedad arterial periférica diagnosticada mediante eco-Doppler. Tas²³⁴ observa en árabes con infarto agudo de miocardio una frecuencia del alelo S2 de 0,25, mientras que en sujetos sanos seleccionados aleatoriamente fue de 0,11; entre los individuos con infarto, en los S2 había mayor proporción de fumadores y diabéticos, por lo que postula que este alelo S2, asociado con otros factores ambientales, favorecería la aparición de cardiopatía isquémica. Este mismo autor²³⁵, en diabéticos tipo 2, comunica una mayor prevalencia de enfermedad coronaria en los portadores del alelo S2 en comparación con los S1, aunque los primeros mostraban una edad más avanzada y presentaban una diabetes de más años de evolución. Además, el alelo S2 se asoció a cifras superiores de tensión arterial sistólica, mostrándose el genotipo, las cifras de c-HDL y el IMC como predictores independientes de las cifras de tensión arterial. Aunque no se determinaron los niveles de insulinemia, las cifras de HbA_{1C} fueron inferiores en los sujetos S2. También Rigoli et al²⁰⁴ han hallado una mayor frecuencia del alelo S2 en pacientes diabéticos tipo 2 con enfermedad coronaria.

Por el contrario, otras publicaciones no consideran la presencia del polimorfismo Sst-I como un factor de riesgo coronario. Shoulders et al²²¹ no observan diferencias en la frecuencia del alelo S2 en los sujetos hiperlipémicos ingleses con enfermedad arteriosclerótica prematura sintomática en comparación con hiperlipémicos aparentemente sanos. Kee et al²³⁶, comparando la frecuencia del polimorfismo Sst-I entre 614 pacientes varones con infarto agudo de miocardio y 764 controles, dentro del estudio ECTIM, no encuentran diferencias entre diversos parámetros lipídicos plasmáticos ni con la

supervivencia tras el infarto de miocardio. Russo et al²¹⁶, a pesar de las asociaciones descritas entre este polimorfismo y el metabolismo lipídico, no hallan un incremento significativo en el riesgo de enfermedad coronaria con el alelo S2 en su grupo de estudio. Olivieri et al²²⁷ estudian a 800 sujetos, de los cuales 549 padecían aterosclerosis coronaria documentada por angiografía, mientras que los 251 restantes presentaban una coronariografía normal, encontrando que el alelo S2 se asociaba a mayores niveles de triglicéridos y de apo C-III pero sin conferir un riesgo cardiovascular aumentado; también observan que el polimorfismo S1/S2 está en desequilibrio de ligamiento con la variante T-455C del IRE (“insulin response element”) del promotor del gen de la C-III, siendo esta última variante un factor independiente de riesgo coronario, lo que podría explicar las discrepancias de resultados con otros estudios, actuando la mutación -455C como el alelo “culpable” y el alelo S2 como la variante cosegregada “inocente”, entre otros posibles mecanismos. Gutiérrez et al²¹⁷, en pacientes con diabetes tipo 2, tampoco relaciona el alelo S2 como marcador de riesgo vascular. Similares resultados aparecen en otros estudios realizados en población finlandesa²³⁷, austríaca²⁰², japonesa²³⁸, francesa²³⁹, escocesa²¹¹ y alemana²¹⁹: no encuentran asociación entre el alelo S2 y cardiopatía isquémica.

Los resultados contradictorios de los estudios de asociación del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III con los distintos parámetros metabólicos son probablemente consecuencia del diferente origen étnico de las poblaciones, de los criterios de selección de los individuos incluidos en el estudio, del tamaño muestral o de variaciones debido a covariables tales como el sexo, o factores ambientales. De cualquier forma, parece estar fuera de duda la contribución de la variabilidad en el cluster de la apo A-I/C-III/A-IV al riesgo de padecer cardiopatía isquémica²⁴⁰.

3.2.2. OTROS POLIMORFISMOS DE LA APO C-III.

Además del polimorfismo Sst-I mencionado anteriormente, existen otras variantes genéticas de la apo C-III que describiremos a continuación.

- **Apolipoproteína C-III variante no glicosilada (THR74ALA)**: esta mutación fue demostrada por Maeda et al³⁷ en el plasma de un individuo perteneciente a una familia

en la que algunos de sus miembros presentaban cantidades inusualmente elevadas de apo C-III₀, carente de la cadena carbohidratada. Esto era debido a una sustitución de A a G en el codón del aminoácido normal en posición 74 (treonina) que es reemplazado por alanina (THR74ALA). Como resultado de esta mutación la apo C-III no puede ser glicosilada. Esta variante no daba lugar a síntoma clínico alguno ni alteraba el perfil lipídico en los sujetos afectados.

- **Apolipoproteína C-III (LYS58GLU)**: se trata de un cambio de lisina a glutámico en posición 58, debido a una transición de A a G en este codón³⁵. Esta mutación se identificó en dos mujeres (madre e hija) con hiperalfalipoproteinemia que presentaban bajos niveles plasmáticos de apo C-III y partículas HDL de gran tamaño.

- **Apolipoproteína C-III (GLN38LYS)**: esta variante descrita en un joven mejicano hipertrigliceridémico y sus familiares se debe a una sustitución de A por C en el codón 38, dando lugar a un cambio de glutamina por lisina en dicha posición. La variante de apo C-III estaba presente en las partículas VLDL en la misma proporción que la C-III normal, pero la cuantía total de C-III estaba aumentada un 34%. Estos sujetos tenían niveles elevados de triglicéridos, sin que otros parámetros lipídicos estuvieran alterados³³.

- **Apolipoproteína C-III (ALA23THR)**: recientemente se ha identificado esta variante en 3 indios de la península del Yucatán³⁴. Se debe a una transición de G a A en el exón 3 del gen de la apo C-III, resultando en un cambio de alanina a treonina en posición 23. Esta sustitución modifica el reparto hidrofílico-hidrofóbico de la hélice N-terminal y, por lo tanto, altera los mecanismos de unión a lípidos de la apoproteína. Estos individuos presentaban niveles reducidos de triglicéridos y de apo C-III. La explicación propuesta por los autores a este hecho es que la menor unión lipídica a esta C-III mutada podría conducir a un catabolismo más rápido de la apo C-III libre y, a una competición más pobre con la apo E, lo que aumentaría el aclaramiento de las partículas ricas en triglicéridos.

- **Delección completa del cluster genético A-I/C-III/A-IV**: hallada en una paciente con niveles muy bajos de HDL, apo A-I plasmática indetectable y enfermedad coronaria prematura²⁴¹.

- **Traslocación de los genes de apo C-III y A-I:** observada en dos hermanas con déficit de apo C-III y apo A-I debido a una traslocación de una región de 6,5 kb del gen de la apo C-III a una zona del gen de la apo A-I, resultando en la imposibilidad de producir ambas apolipoproteínas, y dando lugar a niveles reducidos de Tg-VLDL, colesterol total normal y casi ausencia de c-HDL²⁴.

- **Variantes C-482T y T-455C en el IRE:** en la zona promotora del gen de la apo CIII existe una secuencia sensible a la insulina, denominada “elemento de respuesta insulínica” o IRE, localizado en -490 a -449⁴⁸. Se sabe que la insulina regula a la baja la expresión genética de la apo C-III. La presencia de mutaciones en este IRE parece anular esta acción reguladora de la insulina, pudiendo resultar en una sobreexpresión de C-III y contribuir de esta manera al desarrollo de hipertrigliceridemia⁵¹. Estas variantes han sido objeto de diversos estudios, algunos con resultados contradictorios. Dallinga-Thie et al⁵², en estudios *in vitro* con células HepG2 y CaCo2, no detectan la influencia de estas mutaciones, concluyendo que *in vivo* la transcripción del gen de la C-III no depende sólo de la insulina sino que parece estar mediada por otros factores. Shoulders et al¹⁹² no hallan relación entre estas variantes y niveles plasmáticos de C-III ni triglicéridos. Pallaud et al²⁴² no encontraron asociación entre estos polimorfismos y el grosor de las capas media e íntima de la carótida en una cohorte del estudio Stanislas. Por el contrario, son varios los artículos en los que la presencia del alelo -482T se ha asociado con un incremento en los niveles de triglicéridos plasmáticos^{194, 226, 243, 244, 245, 246} y con mayores concentraciones de glucosa e insulina tras sobrecarga oral de glucosa²¹⁵, con diverso grado de influencia del sexo y grupo étnico de los individuos estudiados. Estos resultados apuntan los mecanismos para los efectos de estas variantes genéticas sobre el riesgo de aterosclerosis. Esterbauer et al²²⁹ ofrecen evidencias preliminares sobre una diferencia específica según el alelo en la expresión del ARN-m *in vivo* para la variante C-482T, sugiriendo que tal diferencia puede contribuir a la asociación descrita entre los polimorfismos de la C-III con la hipertrigliceridemia. Anisimov et al²⁴⁷ encuentra una alta frecuencia de la variante T-455C en un grupo de 137 ancianos (de 70 a 106 años), sin que existiera diferencia de frecuencia entre los sujetos sanos y los pacientes con isquemia cardíaca o HTA, sugiriendo que el alelo C se asocia con longevidad. Olivieri et al²²⁷ estudian la asociación de diversos

polimorfismos y el riesgo de enfermedad cardiovascular en 800 pacientes, concluyendo que sólo el alelo -455C se comportaba de forma significativa como un factor independiente de riesgo coronario.

Se ha demostrado que estas variantes del IRE de la zona promotora del gen de la apo C-III se asocia por desequilibrio con el polimorfismo Sst-I^{49, 51}, y, por tanto, el alelo S2 puede ser un determinante de la resistencia insulínica, la cual, entre otras consecuencias, puede ser responsable de la hipertrigliceridemia, como ya hemos comentado anteriormente. En este sentido, Salas et al²⁴⁸ y Castro et al²⁴⁹ han hallado en sujetos sanos que este polimorfismo condiciona la respuesta de la insulina tras la sobrecarga oral de glucosa cuando se consume una dieta rica en grasa saturada, presentando los individuos portadores del alelo raro S2 una menor sensibilidad a la acción periférica de la insulina.

- **Variante C1100T**: esta transición del codón 14 en el tercer exón del gen de la apo C-III, que no altera la secuencia de aminoácidos de la apoproteína, ha sido estudiada en pacientes con hiperlipemia familiar combinada, encontrándose una frecuencia del alelo raro T más alta en estos pacientes que en controles, asociándose con niveles plasmáticos más elevados de triglicéridos totales, tg-VLDL e IDL, c-VLDL e IDL, apo C-III y apo A-I^{47, 250, 251}. Este hecho ha sido confirmado por otros autores^{194, 252}. Pallaud et al²⁴² refieren una asociación de esta mutación con la variabilidad del grosor de la pared carotídea en varones. El polimorfismo C1100T ha sido también estudiado en sujetos incluidos en el STARS²⁵³, no encontrándose relación con enfermedad coronaria, aunque los homocigotos para el alelo T presentaron por término medio, menor regresión de la placa de ateroma.

- **Polimorfismo Pvu-II**: en el primer intrón del gen de la apo C-III existe una mutación puntual detectada por la endonucleasa Pvu-II²²⁸. Está localizada en el extremo 5' de dicho gen. La frecuencia del alelo raro V2 oscila en la población caucasiana entre 0,20 en belgas y estadounidenses^{203, 228}, 0,27 en niños italianos²⁵⁴ y 0,50 en austríacos²⁰². En hindúes es de 0,03 y en japoneses 0,01²⁵⁵. La presencia del alelo V2 (ausencia de corte por la enzima), se asoció a niveles superiores de apo B en el grupo control de un estudio que comparaba pacientes con cardiopatía isquémica e individuos sanos²⁰². En los primeros, la

frecuencia del alelo V2 fue superior (0,50 versus 0,41), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En una población sana, los portadores del alelo V2 mostraron niveles inferiores de apo C-III, colesterol, apo B y triglicéridos²²⁸. Este estudio no confirma el aumento de apo B hallado en los sujetos V2 por Paulweber et al en el estudio anterior²⁰². La causa puede ser la diferencia de edad en la población estudiada y el tamaño muestral. Las menores cifras de triglicéridos y colesterol podrían estar en relación con la menor inhibición de la LPL al existir niveles más bajos de apo C-III circulantes. Por otro lado, Monsalve et al²⁵⁶ observan en población inglesa con arteriopatía periférica, pero sin enfermedad coronaria sintomática, que el grupo con el genotipo V1V1 muestra una mayor variabilidad individual en las cifras de colesterol que los sujetos V1V2. Por último, Ordovás et al²⁰³ comunican una asociación por desequilibrio entre el alelo V2 con el alelo raro Xba-I del gen de la apo A-IV.

- **Otros polimorfismos SNP** (single nucleotide polymorphism): se han descrito otros polimorfismos en el cluster AI/CIII/AIV debido a cambios en un solo nucleótido, sin detectar en algunos de ellos ningún papel funcional. Así, en la zona promotora del gen de la apo C-III se han estudiado las variantes A-1180C, G-944A, G-935A, C-641A, G-630A y T-625delección, no hallándose ninguna asociación significativa con alteraciones lipídicas^{52, 192}. Masana et al²⁵⁷ sí hallan relación entre la variante C3175G del exón 4 del gen de la apo C-III con niveles plasmáticos más elevados de triglicéridos en pacientes con enfermedad coronaria. Esta misma variante se ha estudiado en una muestra de individuos chinos hipertrigliceridémicos²⁵⁸, hallándose con mayor frecuencia en el tercil superior de las distribuciones de la apo C-III, apo E y cociente triglicéridos/HDL. Pallaud et al²⁴² relacionan los polimorfismos T3206G, C3175G y C1100T del gen de la apo C-III con la variabilidad del grosor de las capas media e íntima de la pared carotídea en varones, aunque no en mujeres. Groenendijk et al²⁵⁹ han identificado en pacientes con hiperlipemia familiar combinada cuatro nuevos polimorfismos en la región intergénica AI-CIII (T3213C, A3235C, T3287C, A5132C), asociando los alelos menores con niveles plasmáticos elevados de colesterol y triglicéridos. En la región intergénica CIII-AIV también se ha identificado un polimorfismo (T-2854C) que no demostró relación con hipertrigliceridemia¹⁹⁴.

- **Asociación por desequilibrio con otros polimorfismos:** diversos estudios han revelado una asociación por desequilibrio entre diferentes polimorfismos del complejo A-I/C-III/A-IV²⁶⁰. En relación con el polimorfismo Sst-I, Paul-Hayase et al²²⁸ encuentran este tipo de asociación con el Xba-I del gen de la apo A-IV. Esta asociación ha sido también confirmada por Ordovás et al²⁰³. Más clara parece ser, sin embargo, la asociación por desequilibrio con el polimorfismo determinado por la enzima Msp-I en el gen de la apo A-I^{203, 211, 239, 259, 261}. Stocks et al²⁶¹ observan como el 70% de los sujetos con el genotipo S1S2 poseen también el M1M2. El alelo M2 se encuentra también con más frecuencia en sujetos hipertriglicéridémicos que en normolipémicos. Colectivamente en este estudio, los S2M2 representaron menos del 10% de los sujetos normales pero el 46% de los individuos con hipertriglicéridemia. En otro estudio²⁶² el haplotipo S2M2 se asoció a niveles altos de colesterol. Sin embargo, otros autores hallan desequilibrio de ligamiento entre estos polimorfismos pero sin encontrar asociación con alteraciones lipídicas^{225, 263}. En sujetos con hiperlipemia familiar combinada, Groenendijk et al²⁶⁴ estudian la relación entre los polimorfismos MspI y XmnI del gen de la apo A-I con el polimorfismo Sst-I, hallando que el alelo S2 era sinérgico en su efecto hiperlipémico con el haplotipo X2M2, y Dallinga-Thie et al²⁶⁵ encuentran que los haplotipos X1M1S2 y X2M2S1 eran los más frecuentes y se asociaban con mayores niveles de colesterol, triglicéridos y apo C-III. Hong et al¹⁹⁹ hallan en población coreana hipertriglicéridémica una mayor frecuencia del haplotipo X2S2, siendo los sujetos X2X2 y S2S2 los que presentaban las cifras de triglicéridos más elevadas. En una población alemana²¹⁹ se ha podido observar asociación por desequilibrio entre este genotipo de apo C-III y otro polimorfismo de apo A-I (Pst-I). Los sujetos S1S2/P1P2 mostraron mayores cifras de colesterol total que los S1S1/P1P2 ($p=0,02$), y valores más elevados de triglicéridos que los S1S1/P1P1 ($p=0,01$), S1S1/P1P2 ($p=0,02$) y S1S2/P1P1 ($p=0,03$). Dammerman et al⁴⁹ estudian en un paciente afecto de hiperlipemia tipo III con hipertriglicéridemia severa ($TG > 1.000$ mg/dl), cinco polimorfismos en la región promotora del gen de la apo C-III (C-641A, T-625delección, G-630A, C-482T y T-455C), denominando 1 al alelo previamente designado y 2 a su variante; estudiando posteriormente 78 sujetos normolipémicos y 79 pacientes con hipertriglicéridemia severa, estos mismos autores se centran en los polimorfismos T-625delección, C-482T y Sst-I, observando como el haplotipo 211 es más frecuente en los normolipémicos, y el 222 en los hipertriglicéridémicos. Surguchov et al²⁶⁶ confirman la fuerte asociación por desequilibrio

entre el polimorfismo Sst-I con estas 5 mutaciones localizadas en la región 5'; sin embargo, ninguna de ellas se asoció por separado con hipertrigliceridemia. Estos autores refieren que la asociación entre los haplotipos de C-III y la hipertrigliceridemia es sólo atribuible a los efectos del polimorfismo Sst-I. Monsalve et al²⁶⁷ no encuentran diferencias en la frecuencia de los alelos de los polimorfismos Pvu-II y Sst-I entre pacientes con enfermedad coronaria detectada angiográficamente y sujetos control. Por último, algunos autores^{252, 259} sugieren que la importancia de los haplotipos puede ser mayor que los efectos de un único genotipo.

En resumen, dentro del cluster AI/CIII/AIV, el polimorfismo Sst-I en la región 3' no traducida del gen de la apo C-III es la variante asociada de manera más consistente con el incremento de triglicéridos y el riesgo de enfermedad coronaria²⁶⁸. Hasta la fecha los mecanismos que subyacen bajo este efecto no se han identificado, y los haplotipos y variantes anteriormente comentadas no explican completamente el efecto del polimorfismo Sst-I.

En la búsqueda bibliográfica efectuada no hemos hallado ningún artículo que estudie el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en sujetos hipertensos.

3.3. POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON ATEROSCLEROSIS.

Además de los polimorfismos reseñados anteriormente de la apo C-III, en los últimos años se han descrito diversos marcadores genéticos que se asocian en mayor o menor grado con la presencia de enfermedad aterosclerótica (tabla IV), y que se comentan brevemente a continuación.

3.3.1. POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPOPROTEICO.

Las dislipemias son un factor de riesgo cardiovascular bien conocido. El estudio de los diferentes polimorfismos genéticos que codifican la síntesis de las lipoproteínas y enzimas involucradas en el metabolismo lipídico contribuye al análisis de los

determinantes genéticos de las dislipemias y su principal consecuencia, la aterosclerosis. Varias investigaciones han puesto de manifiesto que los niveles plasmáticos de apolipoproteínas (apo A-I, apo B-100) son un índice de enfermedad coronaria y mejores predictores de riesgo cardiovascular que el c-LDL o el c-HDL. Además de los polimorfismos de la apo C-III anteriormente reseñados, se han descrito variantes polimórficas en la mayor parte de los genes que codifican apolipoproteínas y enzimas lipídicas.

a) Polimorfismo del gen de la apolipoproteína A-I.

El gen de la apo A-I se localiza en el cromosoma 11, junto con los genes de la apo C-III y apo A-IV. Se han descrito cerca de veinte mutaciones en este locus, algunas de las cuales no parecen estar asociadas a un mayor riesgo de enfermedad coronaria prematura. Existe un polimorfismo reconocido por la endonucleasa Pst-I que se ha asociado con descenso en los niveles de c-HDL (hipoalfalipoproteinemia) y una mayor prevalencia de enfermedad coronaria²⁶⁹. Otra variante descrita es la mutación G/A en la zona promotora del gen de la apo A-I: varios estudios han demostrado que la presencia del alelo A, que aparece con una frecuencia del 15-20% en población general, se asocia con niveles elevados de c-HDL, pero sólo en sujetos no fumadores; también se ha comprobado que esta mutación puede estar implicada en la variabilidad individual de la respuesta de los lípidos plasmáticos a los cambios de la dieta²⁷⁰. Todo esto confirma la complejidad de la aterosclerosis y de los muchos factores determinantes.

b) Polimorfismo del gen de la apolipoproteína A-IV.

El gen de la apo A-IV se ha localizado en el cromosoma 11, junto a los genes de la apo C-III y A-I. Se han descrito aproximadamente unas 10 mutaciones pero la más interesante y frecuente es una sustitución de guanina por timina que resulta en una conversión de glutamina en posición 360 por histidina (apo A-IV Gln360His). La frecuencia del alelo mutado es del 8% en poblaciones caucásicas y ha sido asociada en algunos estudios con niveles elevados de HDL y con una respuesta disminuida en los niveles de c-LDL a cambios en la cantidad de grasa y colesterol de la dieta²⁷¹. Otros

investigadores han demostrado posteriormente que este efecto puede ser debido solamente a cambios en la cantidad de colesterol en la dieta²⁷².

c) Polimorfismo del gen de la apolipoproteína B.

Dos formas de apo B se encuentran en el plasma: la apo B-48 (de origen intestinal) y la apo B-100 (de origen hepático). Un solo gen, localizado en el brazo corto del cromosoma 2, codifica ambas formas de la proteína. La apo B-48 se genera por un nuevo mecanismo de edición del ARN y contiene aproximadamente el 48% del extremo aminoterminal de la apo B-100. La mayor parte de las mutaciones descritas en este gen se podrían clasificar de silenciosas (sin efecto bioquímico o clínico aparente) o protectoras (aumento de longevidad y riesgo reducido de enfermedad coronaria). Sólo una de ellas parece estar asociada de manera inequívoca con un aumento del riesgo coronario: la apo B-100 defectuosa (Arg3500Gln). Consiste en una sustitución de glutamina (CGG) por arginina (CAG) en el aminoácido 3500. Todos los portadores de esta mutación tienen una LDL que se une con menor afinidad al receptor y está asociada con aumento del colesterol total y c-LDL pero sin defecto del receptor LDL como ocurre en la hipercolesterolemia familiar. La frecuencia de esta variante parece ser de 1 por cada 700 individuos en ciertas poblaciones de Estados Unidos y Europa, siendo más frecuente en poblaciones de origen germánico²⁷³.

d) Polimorfismo del gen de la apolipoproteína E.

El gen de la apo E se ha localizado en el brazo largo del cromosoma 19 en la proximidad de los genes de la apo C-I y C-II. Se trata de un gen polimórfico con tres alelos codominantes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) que codifican las tres isoformas de la apo E dando lugar a seis posibles genotipos (E2/2, E2/3, E3/3, E3/4, E4/4, E2/4), siendo su frecuencia en nuestra población del 1,5, 11,5, 72,6, 13,0, 0,8 y 0,5%, respectivamente²⁷⁴ (fig. 9). Las tres isoformas difieren una de otra en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 112 y 158. La E2 tiene cisteínas en ambas posiciones, la E4 argininas en ambas y la E3 cisteína en el lugar 112 y arginina en el 158.

Tamaño	<i>Genotipo apo E</i>					
	2/2	2/3	3/3	3/4	2/4	4/4
91 pb						
83 pb						
72 pb						
48 pb						
Frecuencia (%)	1,5	11,5	72,6	13,0	0,8	0,5

Fig. 9. Perfil electroforético de la apo E. Determinación de los diferentes genotipos de la apo E mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La frecuencia expresada corresponde a la obtenida en población española²⁷⁴.

Diversos estudios han demostrado que los individuos con la isoforma E4 tienen concentraciones de colesterol total y c-LDL más altas que los portadores de la isoforma E3 y éstos, a su vez, mayores que los portadores de la isoforma E2. La presencia del fenotipo E4 se asocia con un incremento del riesgo de enfermedad coronaria, incluso después de ajustar para otros factores de riesgo, incluido el c-LDL. Esta isoforma ha sido también asociada con un aumento en la respuesta de los niveles de colesterol en LDL a cambios en la dieta, y con respuesta reducida al tratamiento con inhibidores de la HMGCoA reductasa (estatinas)²⁷⁵. Stiefel et al²⁷⁶ han publicado resultados similares en sujetos hipertensos: los portadores del alelo $\epsilon 2$ ó $\epsilon 4$ presentaban, respectivamente, mejor o peor perfil lipídico en plasma y menor o mayor resistencia a la insulina que aquellos con el alelo común $\epsilon 3$. Por último se ha demostrado que la apo E4 constituye un marcador de riesgo para el desarrollo de enfermedad de Alzheimer y otros tipos de demencia senil^{277, 278}.

Los defectos genéticos en la apo E son muy frecuentes, y posiblemente constituyen uno de los factores conocidos con mayor efecto sobre la variabilidad de concentraciones de lípidos y riesgo coronario en poblaciones.

e) Polimorfismo del gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (PTEC).

La PTEC es la encargada de intercambiar los ésteres de colesterol recogidos en los tejidos periféricos por las HDL por los triglicéridos presentes en las LDL o las VLDL, facilitando así la captación hepática de los primeros. El gen de esta enzima está localizado en el brazo largo del cromosoma 16. En aquellos sujetos con déficit de PTEC no se encuentra historia familiar de cardiopatía isquémica e incluso parece existir un aumento de longevidad. El patrón bioquímico se caracteriza, además del déficit en la transferencia de ésteres de colesterol, por niveles descendidos de c-LDL y triglicéridos e incremento del c-HDL. Las partículas de HDL son de mayor tamaño. Existe un polimorfismo detectado por la enzima TaqI que da lugar a dos alelos: B1 (presencia de corte por la enzima) y B2 (ausencia de corte). El genotipo B1B1 se asocia con niveles plasmáticos mayores de PTEC que los B1B2 y éstos, a su vez, con concentraciones mayores que los B2B2, mientras que los niveles de C-HDL siguen una distribución inversa, máxima en los portadores del B2B2 y mínima en los B1B1²⁷⁹. Esta asociación se manifiesta en sujetos no fumadores, pero no en fumadores.

f) Polimorfismo del gen de la lipoproteín lipasa (LPL).

La LPL tiene la función de hidrolizar los triglicéridos de los quilomicrones y VLDL convirtiéndolos en lo que denominamos partículas remanentes. Una menor actividad de la enzima da lugar a una elevación de los triglicéridos plasmáticos y a un descenso del c-HDL.

El gen de la LPL está localizado en el brazo corto del cromosoma 8. Más de 50 mutaciones se han descrito en el locus de la LPL relacionadas con dislipemias pero sólo 4 de ellas se han asociado con cardiopatía isquémica²⁸⁰. Una de ellas es la sustitución de una adenina por una guanina en el exón 6, dando lugar al cambio de una asparragina por una serina en el residuo 291 de la LPL (mutación Asn291Ser), que se asocia con un descenso aproximado de un 30% en la actividad LPL postheparina, y con niveles elevados de triglicéridos y disminuidos de c-HDL; este polimorfismo aumenta dos veces el riesgo de

cardiopatía isquémica en las mujeres²⁸¹. Las mismas alteraciones lipídicas están presentes en la mutación Asp9Asn, cambio de un ácido aspártico por una asparragina debido a la sustitución de una guanina por una adenina en la base 280 del gen; se ha asociado con una mayor progresión de las lesiones ateroscleróticas coronarias en sujetos con cardiopatía isquémica²⁸². Otro polimorfismo, identificado por la enzima HindIII, localizado en el intrón 8 del gen, se relaciona con hipertrigliceridemia y descenso del c-HDL junto a un incremento del c-LDL y apo B. Varios autores han demostrado que el riesgo de padecer infarto agudo de miocardio es significativamente superior en los individuos que poseen el alelo raro H+²⁸³. Existe un polimorfismo con un efecto protector sobre la cardiopatía isquémica, Ser447Stop, debido al cambio de una citosina por una guanina en el nucleósido 1595 del exón 9, convirtiendo el codón del aminoácido serina447 (TCA) en un codón (TGA) de terminación, dando lugar a una LPL truncada; se asocia a concentraciones plasmáticas disminuidas de colesterol total y triglicéridos, y elevadas de c-HDL, así como menor frecuencia de antecedentes familiares de cardiopatía isquémica²⁸⁴.

3.3.2. POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.

El sistema renina-angiotensina (SRA) tiene importantes implicaciones en la enfermedad coronaria. Se ha demostrado que el corazón expresa ARN mensajero de renina, angiotensinógeno y de enzima de conversión de la angiotensina (ECA) en el ventrículo izquierdo junto a angiotensina II (AII) localmente. La ECA desempeña un papel clave en el SRA y en la modulación del tono vascular, al convertir la bradicinina en cinina y angiotensina I en AII; este último péptido ejerce diversos efectos, incluyendo vasoconstricción, producción de aldosterona y aumento de la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas simpáticas. La AII también posee acciones hipertróficas, y posiblemente hiperplásicas, en las células musculares lisas vasculares relacionándose con la fibrosis miocárdica en experimentación animal y con el control directo de los sistemas fibrinolíticos mediante la inhibición del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y por tanto de la fibrinólisis fisiológica.

El gen que codifica la ECA está situado en el brazo largo del cromosoma 17. Presenta un polimorfismo inserción/delección en el intrón 16: tiene dos alelos principales, el D (delección) y el I (inserción), y ello se debe a la ausencia (D) o presencia (I) de una secuencia repetitiva de 287 pares de bases. Por tanto, habrá tres posibles genotipos: DD, ID e II, cuyas frecuencias en nuestra población son aproximadamente del 34, 45 y 21% respectivamente²⁸⁵. En general, los sujetos homocigotos para el alelo D tienen una mayor concentración plasmática de ECA, mayor actividad de ECA miocárdica y mayores concentraciones tisulares de AII que los homocigotos para el alelo I, mientras que los heterocigotos tienen concentraciones intermedias.

La presencia del alelo D se ha asociado con la presencia de infarto agudo de miocardio, una mayor trombogenicidad y con una mayor inestabilidad de la placa ateromatosa. También se asocia con un aumento del riesgo de padecer cardiopatía isquémica en jóvenes y en sujetos que no presentan los factores de riesgo clásicos. Así, el genotipo DD sería un marcador de riesgo cardiovascular particularmente para individuos de bajo riesgo²⁸⁶.

3.3.3. POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN Y DE LA FIBRINÓLISIS.

Los niveles de factores trombogénicos pueden influir en la aparición de eventos cardiovasculares. El estudio de estos polimorfismos genéticos probablemente tenga mayor interés en aquellos pacientes que ya tengan aterosclerosis coronaria o que hayan padecido un infarto agudo de miocardio debido a su mayor riesgo de reinfarto por trombosis.

a) Polimorfismo HaeIII del gen de la cadena β del fibrinógeno.

Hoy día, la hiperfibrinogenemia es considerada como un factor de riesgo de coronariopatía isquémica. Los niveles plasmáticos de fibrinógeno van a estar influenciados por distintos factores: edad, sexo, tabaquismo, HTA y obesidad. Aquellos pacientes con niveles elevados de fibrinógeno tienen una mayor incidencia de eventos coronarios.

La molécula de fibrinógeno consta de tres cadenas que están codificadas por tres genes diferentes localizados en el brazo largo del cromosoma 4. El polimorfismo HaeIII del gen de la cadena β del fibrinógeno es el de mayor interés. Consta de dos alelos según la presencia (-445G) o ausencia (-445A) de corte con la enzima de restricción HaeIII en la zona promotora del gen. Los sujetos homocigotos para el alelo 445A tienen valores de fibrinógeno plasmático mayores que los heterocigotos, especialmente en fumadores. En el estudio ECTIM se ha descrito la asociación entre este polimorfismo y la gravedad de la aterosclerosis coronaria, siendo los portadores del alelo 445A los que presentaban un mayor riesgo²⁸⁷.

b) Polimorfismo PI de la glucoproteína IIb/IIIa.

La glucoproteína IIb/IIIa, situada en la superficie de la plaqueta, desempeña un papel importante en la agregación plaquetaria al actuar como receptor del fibrinógeno. El polimorfismo PI se debe al cambio de citosina por timina en la posición 1565 del exón 2 del gen de esta glucoproteína, dando lugar a la sustitución de una leucina (alelo PI1) por una prolina (PI2). Varios estudios demuestran una asociación entre el alelo PI2 y la presencia de síndromes coronarios agudos, siendo esta relación más importante en sujetos menores de 60 años²⁸⁸.

c) Polimorfismo 4G/5G del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

El PAI-1 es el principal inhibidor de la fibrinólisis y por tanto un aumento de su concentración plasmática se acompaña de una baja actividad fibrinolítica y un mayor riesgo de desarrollar infarto agudo de miocardio y reinfarto. Con el descenso de la actividad fibrinolítica se asocia el incremento en los niveles de triglicéridos y la insulinoresistencia.

El polimorfismo genético 4G/5G del PAI-1 se debe a la presencia de cuatro (4G) o cinco (5G) guaninas en la base – 675 del promotor del gen. El alelo 4G, cuya prevalencia en la población es de un 25%, se asocia con mayores concentraciones plasmáticas de PAI-1 que los portadores del alelo 5G. Se ha descrito una asociación entre el genotipo 4G/4G

con antecedentes de cardiopatía isquémica, pero no con la presencia de estenosis coronaria, sugiriendo los autores de este estudio que dicho alelo sería un marcador de trombosis y no de aterosclerosis, y por lo tanto se necesitaría una placa de ateroma preexistente para que el efecto del genotipo 4G/4G se hiciera evidente²⁸⁹.

3.3.4. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA HOMOCISTEÍNA.

Se ha demostrado a nivel familiar que existe una alta prevalencia de niveles plasmáticos elevados de homocisteína en sujetos con cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular o arteriopatía periférica²⁹⁰. El papel específico de la homocisteinemia en el desarrollo de la enfermedad coronaria puede estar asociado con la inducción del crecimiento de las células del músculo liso y la inhibición del crecimiento de las células endoteliales de la pared vascular. La combinación de estos efectos contrapuestos puede explicar en parte la aterosclerosis inducida por la homocisteinemia. Otra posibilidad es que los niveles elevados de homocisteína puedan afectar a la oxidación de LDL, proceso que parece estar asociado con la iniciación de la aterosclerosis.

La enzima metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) cataliza el paso de 5-metilentetrahidrofolato hasta metionina. Una disminución en la actividad de esta enzima produce un incremento en la concentración plasmática de homocisteína. El gen de la MTHFR se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1. Un polimorfismo en este gen (C667T), que se debe a la sustitución de citosina por una timina en la base 667, da lugar a la conversión de una alanina (isoforma C) en una valina (isoforma T). El alelo T, que es el más común en la población, se correlaciona con aumento en los niveles plasmáticos de homocisteína como resultado de la reducción en la actividad MTHFR, así como a un incremento de forma significativa de cardiopatía isquémica prematura²⁹¹. Este aspecto no ha sido hallado por otros autores, lo que limita su utilidad como marcador de riesgo coronario²⁹².

3.3.5. POLIMORFISMO DEL GEN DE LA SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL.

La predisposición a disfunción endotelial puede estar mediada por un genotipo determinado de la sintasa de óxido nítrico endotelial. Se ha detectado, entre fumadores y no fumadores, un exceso de homocigotos del alelo raro ecNOS4a que coincide con lesiones coronarias más severas y mayores antecedentes de infarto agudo de miocardio. Existe significativamente un mayor riesgo para disfunción endotelial y sus consecuencias en aquellos pacientes fumadores que son homocigotos para ecNOS4a²⁹³.

3.3.6. POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA PARAOXONASA.

La paraoxonasa es una enzima asociada con las HDL que en estudios in vitro ha demostrado ser capaz de prevenir la oxidación de las LDL y de destruir lípidos biológicamente activos en las LDL moderadamente oxidadas. El gen de la paraoxonasa se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7.

El polimorfismo Q192R consta de 2 isoformas según tengan una glutamina (alelo A) o una arginina (alelo B) en el residuo 192. Los individuos con el alelo A tienen una menor actividad enzimática que los portadores del alelo B, aunque curiosamente las HDL aisladas del plasma de sujetos con la isoforma A protegen a las LDL de la oxidación de manera más efectiva que las HDL de los sujetos portadores de la isoforma B²⁹⁴. Diversos estudios ofrecen resultados contradictorios sobre la asociación de este polimorfismo con la cardiopatía isquémica, por lo que parece limitada la utilización de este polimorfismo como factor de riesgo coronario.

En definitiva, la principal utilidad del estudio de estos polimorfismos es poder valorar de una forma más precisa el riesgo individual y la realización de intervenciones terapéuticas dirigidas. De este modo, podemos reconocer a un subgrupo de pacientes con un mayor riesgo de sufrir un evento cardiovascular, lo que nos obligaría a intensificar en este subgrupo las medidas preventivas o terapéuticas sobre los factores de riesgo coronario.

Actualmente, la utilidad de los polimorfismos como marcadores de riesgo cardiovascular es limitada, debido a la escasez de polimorfismos clínicamente relevantes, junto con la insuficiente generalización de las técnicas de biología molecular para su determinación. Sin embargo, la continua publicación de nuevos estudios ayudará a seleccionar aquellos polimorfismos clínicamente relevantes y a su posterior generalización como prueba rutinaria en la determinación del riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular.

II

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Es una enfermedad multifactorial, plurimetabólica y poligénica que aumenta la morbilidad vascular a expensas de complicaciones puramente hipertensivas (directamente relacionadas con la elevación de la presión arterial), y de complicaciones vasculares ateroscleróticas consecuencia de una aceleración del proceso aterosclerótico en estos pacientes. Por otro lado, la HTA se asocia frecuentemente con las dislipemias, a causa de una serie de interrelaciones etiopatogénicas comunes entre ambos procesos, y sus efectos ateroscleróticos se potencian exponencialmente cuando ambos factores coexisten en un mismo individuo. Así, respecto a la población general, los pacientes hipertensos presentan un incremento de los niveles plasmáticos de colesterol total y triglicéridos, una disminución del colesterol-HDL y un mayor grado de resistencia insulínica.

La investigación llevada a cabo en las últimas décadas ha identificado un fuerte componente familiar en la patogénesis de la aterosclerosis, la cual es, en definitiva, el principal factor responsable del origen de la enfermedad cardiovascular. La aparición y evolución de este proceso inflamatorio crónico de la pared arterial en un sujeto viene determinada en parte por una “susceptibilidad” genética²⁹⁵, es decir, la existencia de un componente genético importante en la susceptibilidad individual a desarrollar aterosclerosis.

La genética ha experimentado un gran avance durante las dos últimas décadas debido al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular. Ello ha permitido el estudio de los genes que parecen estar implicados en el proceso aterosclerótico (“genes candidatos”). En este sentido, los genes implicados en el metabolismo lipídico son un factor determinante de la aterosclerosis (genes de apolipoproteínas, genes de enzimas implicadas en la síntesis de lípidos o en el metabolismo de las lipoproteínas, genes de receptores proteicos, genes de proteínas de transferencia de lípidos). El empleo de los polimorfismos del ADN es una herramienta de gran utilidad en el estudio de asociaciones con predisposición hereditaria en desórdenes poligénicos. Numerosas publicaciones han

demostrado, con mayor o menor consistencia, asociaciones entre variantes genéticas en estos genes con alteraciones en los niveles de lipoproteínas plasmáticas y riesgo de enfermedad coronaria prematura.

La apo C-III es un componente fundamental de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL), siendo su función principal la inhibición tanto de la hidrólisis de dichas partículas por parte de la LPL, como de su captación hepática mediada por apo E. Su gen se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 11, entre los genes de las apo A-I y A-IV. Se ha detectado un polimorfismo en la zona 3' del gen, reconocido por la enzima de restricción Sst-I, debido a un cambio de citosina por guanina (C3238G), resultando dos alelos: S1 y S2. La mayoría de los estudios consultados relacionan este polimorfismo con niveles elevados de triglicéridos plasmáticos y un mayor riesgo de enfermedad coronaria.

La coexistencia de dislipemia en un paciente hipertenso lo convierte en un individuo con un alto riesgo de enfermedad vascular. Por ello, es importante estudiar el perfil lipídico de los pacientes hipertensos. En este sentido, un mejor conocimiento de los factores genéticos implicados en el metabolismo lipídico podría identificar un subgrupo de hipertensos con un mayor riesgo cardiovascular. Así, identificar esta variabilidad genética podría mejorar tanto la predicción del riesgo aterogénico como el tratamiento de los individuos hipertensos.

Nuestro trabajo se centra en el estudio de la influencia genética del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III en pacientes con hipertensión arterial esencial. Varios estudios han demostrado que este polimorfismo está involucrado en el proceso aterosclerótico, de tal forma que aquellos sujetos que presentan el genotipo S1S2 tienen un mayor riesgo cardiovascular. Nuestra hipótesis plantea que si en los pacientes con HTA tienen un mayor riesgo cardiovascular, probablemente exista un incremento de dicho polimorfismo.

Basándose en lo expuesto, los objetivos del estudio son:

1. Calcular la frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en un grupo de pacientes hipertensos esenciales.
2. Determinar los niveles plasmáticos de lípidos en estos pacientes según el genotipo Sst-I del gen de la apo C-III.
3. Evaluar la posible asociación entre el alelo raro S2 y un perfil más aterogénico entre los pacientes hipertensos esenciales.
4. Determinar la influencia de este polimorfismo sobre el metabolismo hidrocarbonado en pacientes hipertensos esenciales.

Son varios los trabajos que han descrito la influencia del sexo de los individuos sobre los efectos de los polimorfismos. Por ello, como objetivo secundario, nos planteamos:

5. Estudiar el comportamiento de esta variante genética en los individuos hipertensos según el sexo.

III

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Se trata de un estudio descriptivo transversal, con un período de inclusión de 36 meses, desde enero de 2000 hasta diciembre de 2002, sobre un grupo de pacientes hipertensos esenciales de reciente diagnóstico procedentes de las consultas externas de la Unidad de Hipertensión y Lípidos del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

a) Tamaño muestral.

El cálculo del tamaño muestral se realizó considerando una frecuencia del alelo raro S2 en población caucasiana de 0,072, con una precisión de 0,05 y un nivel de confianza del 95% (Z_{α} igual a 1,96). Sobre la base de estos parámetros el tamaño muestral inicialmente estimado fue de 103 personas.

Los valores de las frecuencias alélicas del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III varían en los diversos estudios publicados sobre población general caucasiana. Para establecer dichos valores se han tomado como referencia el artículo de Ordovás et al²⁰³, que resume los resultados de las frecuencias del alelo S2 hallados en estudios previos sobre una muestra de 1.638 sujetos caucasicos sanos, y el trabajo de Russo et al²¹⁶, que estudió a un grupo numeroso de individuos extraído de la cohorte de Framingham (2.485 sujetos: 1.219 varones y 1.266 mujeres).

También consideramos el hecho de que los pacientes hipertensos esenciales participantes en nuestro estudio debían tener el genotipo 3/3 de la apo E y, por tanto, debíamos estimar el tamaño muestral considerando un “factor de corrección” para evitar la pérdida de sujetos que poseyeran un genotipo distinto de la apo E. Teniendo en cuenta que la frecuencia del genotipo E3/E3 en nuestro país es aproximadamente de 72,6%²⁷⁴, el tamaño final mínimo estimado de la muestra fue de 142 individuos.

b) Criterios de selección.

Los criterios de selección de los sujetos participantes en el estudio fueron: pacientes con hipertensión arterial esencial (presión arterial mayor o igual a 140/90 mmHg) de grado leve o moderado (se excluyeron los individuos con cifras de presión arterial iguales o superiores a 180/110 mmHg), de reciente comienzo, sin daños sobre órganos dianas, y que no estuvieran tomando ninguna medicación con efectos sobre la tensión arterial o el perfil lipídico (o bien con retirada del mismo al menos 1 mes antes del comienzo del estudio); sin antecedentes familiares de dislipemias primarias; no debían padecer diabetes mellitus ni mostrar evidencia de enfermedad crónica (p.ej.: hepática, renal, tiroidea o cardíaca); no tener antecedentes personales cardiovasculares; no ser fumador; ni bebedor importante, entendiendo como tal un consumo medio diario de más de 60 gramos de alcohol/día; con un peso estable al menos en las últimas 3 semanas; en el caso de las mujeres, no estar embarazadas; y, por último, poseer el genotipo de apo E 3/3 (tabla 7).

Tabla 7. Criterios de selección de los pacientes hipertensos.

Hipertensión arterial esencial (mayor o igual a 140/90 mmHg), de grado leve o moderado (menor a 180/110 mmHg) y de reciente comienzo.
Sin tratamiento hipotensor o hipolipemiente, o bien, con retirada del mismo al menos un mes antes del comienzo del estudio.
Sin antecedentes familiares de dislipemias primarias.
No diabéticos.
No fumadores, ni bebedores importantes (< 60 g alcohol/día)
Sin antecedentes personales de enfermedad cardiovascular.
No enfermedad crónica (hepática, tiroidea, renal, cardíaca).
Si son mujeres, no embarazadas.
Poseer el genotipo de la apo E 3/3.

Sujetos

Sin considerar el genotipo de la apo E, se captaron por muestreo consecutivo a 142 pacientes hipertensos esenciales que cumplían con el resto de los criterios de inclusión anteriormente mencionados. A todos los participantes se les determinó el genotipo del polimorfismo genético de la apo E por las implicaciones que tiene sobre el metabolismo lipoproteico^{275, 276}, como ya hemos comentado en la introducción. La distribución del polimorfismo de la apo E hallado en estos pacientes se recoge en la tabla 8. Entre todos los sujetos seleccionados cogimos aquellos que poseían el genotipo E3/E3. De esta forma, la muestra final quedó constituida por 104 pacientes hipertensos esenciales (73,2% del tamaño inicial), con una edad de $43,9 \pm 11,1$ años (media \pm desviación típica). De ellos, 59 eran varones con una edad de $41,7 \pm 10,7$ años, y 45 mujeres con una edad media de $46,8 \pm 10,9$ años.

Tabla 8. Distribución del polimorfismo genético de la apo E en la muestra inicial (n = 142) de pacientes hipertensos esenciales.

Genotipo apo E	2/2	2/3	3/3	3/4	2/4	4/4
Núm. de individuos (%)	1 (0,7%)	12 (8,5%)	104 (73,2%)	21 (14,8%)	2 (1,4%)	2 (1,4%)

Teniendo presente los criterios anteriores, a cada paciente se les realizó:

- Historia clínica detallada, haciendo hincapié en la recogida de datos sobre posibles antecedentes personales de enfermedad cardiovascular u otras (enfermedades renales, hepáticas, tiroideas, diabetes mellitus), hábitos tóxicos (tabaquismo, etilismo), y si eran mujeres, sobre la posibilidad de embarazo actual.

- Exploración física, con determinación de la presión arterial sistólica y diastólica y de medidas antropométricas.
- Determinaciones analíticas: tras ayuno de 12 horas, se le extrajo a cada paciente sangre de la vena antecubital en tubos Vacutainer, conteniendo etilendiaminotetraacético (EDTA, 1 mg/mL), para el estudio de los siguientes parámetros bioquímicos: niveles séricos de colesterol y triglicéridos totales y vehiculizados por las diferentes lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL), apo A-I, apo B y glucemia e insulinemia basales.
- Se calculó el cociente Tg-VLDL/c-HDL como un marcador indirecto de la actividad de la LPL y como indicador de la aterogenicidad del perfil lipídico^{296, 297, 298}.
- Se hallaron los índices aterogénicos CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL, c-LDL/apo B y apo A-I/apo B.
- También se calculó el índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) mediante la fórmula de Matthews³⁰⁵, como una determinación indirecta de la resistencia insulínica.
- Determinación de los genotipos de la apo E y apo C-III.

El grupo de pacientes fue dividido en dos subgrupos según el genotipo de apo C-III para la enzima de restricción Sst-I, subgrupo S1S1 y subgrupo S1S2 (ya que no se hallaron individuos homocigóticos para el alelo raro S2), y se estudió la influencia de este polimorfismo en el perfil lipídico y niveles de glucosa e insulina en plasma. Posteriormente se analizó el comportamiento de dichos genotipos en los varones y en las mujeres.

Este estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y por la Comisión de Investigación del Hospital de la Merced de Osuna (Sevilla). Todos los sujetos seleccionados dieron su consentimiento informado para la participación en el mismo.

Material

A continuación se relaciona el material técnico y los instrumentos utilizados en este estudio. La descripción de las disoluciones, geles, tinciones, enzimas y otros productos químicos empleados se detallan minuciosamente en el apartado de Métodos.

El material empleado en este estudio ha sido el siguiente:

- Agitador de tubos, marca Selecta, modelo Movil-tub, nº de serie 311789.
- Agitador de tubos Vortex, marca Heidolph, modelo Reax 2000, nº de serie 101-8965491.
- Agujas Vacutainer.
- Autoanalizador BM, marca Hitachi, modelo 704.
- Autoclave, marca Selecta, modelo Mediclave, nº de serie 0360805.
- Balanza de precisión, marca Gilbertim, modelo Europe 60, nº de serie 79661.
- Balanza de precisión, marca Gilbertim, modelo Europe 1000, nº de serie 79660.
- Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5415 C, nº de serie 72288.
- Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5416, nº de serie 01330.
- Centrífuga refrigerada, marca Heraeus, modelo Megafuge 1.0 R, nº de serie 37520.
- Congelador a – 40 °C, marca Rabider, nº de serie 2911-151704543.
- Congelador a – 80 °C, marca Heraeus, nº de serie 77710800.
- Cubetas de cuarzo de 10 mm, marca Hellman, tipo 104-QS, para lectura en espectrofotometría.
- Cubeta de electroforesis, marca Biorad, modelo Wide Minisub Cell GT.
- Cubeta de electroforesis vertical, marca Biorad, modelo Protean II xi Cell.
- Destilador de agua, marca Pobel, nº de serie 2470.
- Esfigmomanómetro de mercurio, marca Reister, modelo Nova Presameter.

- Espectrofotómetro, marca Beckman, modelo DU-640.
- Estufa, marca Selecta, modelo Multiplaces, nº de serie 311789.
- Frigorífico, marca Superser.
- Guantes de látex, marca Perry X-AM.
- Juego de pipetas automáticas, marca Biohit, modelos 50, 200 y 1000 µL.
- Juego de pipetas automáticas, marca Eppendorf, modelos 2.5, 10, 20, 100, 200 y 1.000 µL.
- Juego de pipetas automáticas, marca Labssystem, modelos 10, 100 y 1.000 µL.
- Lámpara ultravioleta, marca Spectra, nº de serie 964740.
- Máquina de hielo, marca Sagi.
- Material de vidrio (matraces, probetas, etc.), marca Shott-Duran.
- Microondas, marca Ignis, modelo AKL-530.
- Papel de parafina, marca Parafilm “M”.
- PCR, marca Techne, modelo Genius, nº de serie 77787-9.
- Ph-metro, marca Crison, modelo Micro PH 2001, nº de serie 6111.
- Picador de hielo, marca Difri.
- Pipetas tipo Pasteur estériles.
- Puntas de pipetas estériles, marca Movaco.
- Respiradores-mascarillas para polvo, marca 3M, modelo 8822.
- Rotor ultracentrífuga, marca Beckman, modelo SW 60.
- Tallímetro y peso, marca Sanimobel.
- Tubos de poliestireno cristal con tapones de polietileno estériles, de tamaño 16 x 100 y 13 x 75.
- Tubos para ultracentrifugación, marca Beckman, modelo Ultra-Clear.
- Tubos tipo eppendorf estériles.
- Tubos Vacutainer.
- Ultracentrífuga, marca Beckman, modelo Optima-LE 80K, serie COL 99B04.

Métodos

1. Medición de la tensión arterial.

El registro de la presión arterial se realizó con un esfigmomanómetro de mercurio, marca Reister, modelo Nova Presameter, con un manguito de 48 x 14,5 cm para no obesos (perímetro braquial entre 22 y 32 cm) y de 60 x 17 cm para obesos (perímetro braquial entre 32 y 42 cm), tras 5-10 minutos de reposo, sentado, en el brazo dominante, en una habitación tranquila, no habiendo realizado actividad física, comer o tomar cafeína al menos una hora antes de realizar la exploración, siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Internacional de la Hipertensión¹³¹ y el VII Joint National Committee¹²⁰. La tensión arterial se midió en tres ocasiones a intervalos de 1 minuto, desechando la primera y considerando como definitiva la media entre las dos restantes. Fueron registradas tanto la tensión arterial sistólica como la diastólica (desaparición del sonido o fase V de Korotoff) por la misma persona y con el mismo aparato.

2. Medidas antropométricas.

El peso y la talla se tomaron en una balanza de precisión y un tallímetro, quitándose los zapatos, prendas de abrigo y objetos personales y metálicos que portaran en los bolsillos. Con estas medidas antropométricas se calculó el índice de masa corporal (IMC) o de Quetelet, mediante la fórmula

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Talla}^2 (\text{m}^2)}$$

3. Técnicas de biología molecular.

El proceso de identificación de los polimorfismos genéticos de nuestro estudio se puede dividir en tres fases:

1. Aislamiento del ADN genómico a partir de una muestra sanguínea y, comprobación de la cantidad y calidad del material obtenido mediante espectrofotometría.
2. Amplificación de los genes de las apolipoproteínas E y C-III mediante la técnica de “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR), y comprobación por electroforesis en gel de agarosa.
3. Digestión por enzimas de restricción (endonucleasas), seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con sales de plata para la identificación de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

3.1. Aislamiento del ADN.

El procedimiento empleado para la obtención de ADN ha sido el método *salting-out*²⁹⁹, que se describe a continuación. Se realiza una extracción de 5 mL de sangre venosa empleando tubos Vacutainer, conteniendo EDTA (1 mg/mL) como anticoagulante. Posteriormente se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 10 min, a 4 °C (centrífuga Heraeus, modelo Megafuge 1.OR), para separar plasma, glóbulos blancos y hematíes. Se toma la capa de leucocitos (y restos de eritrocitos) y se deposita en un tubo de 16 x 100. Se añade a este tubo 10 mL de solución tamponada Montreal-Baltimore, mezclando de forma suave mediante inversión durante 1 minuto. Posteriormente se introduce el tubo en hielo por un período de 10 min. A continuación se centrifuga a 4.500 r.p.m., durante 20 min, a 4 °C (rotor Heraeus, modelo Megafuge 1.OR). Al extraer el tubo de la centrífuga, el “pellet” de núcleos debe ser visible (pequeña mota resultado de la acumulación de los núcleos). Tras desechar el sobrenadante, añadir al precipitado obtenido 2 mL de solución tamponada Nuclei Lysis, homogeneizando después la muestra. Una vez realizado dicho proceso, se añaden 0,2 mL de sodio duodecil sulfato al 10% (SDS) y 0,1 mL de solución Proteinasa K

(Sigma), agitando por inversión. Se incubaba a 42 °C durante al menos 4 horas, añadiéndole después 1 mL de NaCl 6M (cloruro sódico saturado), volviendo a mezclar por inversión. Seguidamente se centrifuga a 2.500 r.p.m. durante 15 min, a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se le añade etanol al 100% y, se mezcla por inversión varias veces hasta que precipite el ADN. El “pellet” de ADN obtenido se transfiere con una pipeta Pasteur estéril a un tubo al que se le añade etanol 70%, y se mezcla por inversión varias veces hasta precipitar de nuevo el ADN. Por último, se transfiere el ADN a un eppendorf (1,5 mL) que contiene 500 µl de solución tamponada 1xTE estéril. Para su conservación y almacenaje, el ADN aislado se guarda en un refrigerador a 4 °C. Todo el proceso de obtención se realiza bajo condiciones de esterilidad para evitar la introducción de contaminantes.

Para medir la pureza y cuantificar el ADN obtenido se empleó un espectrofotómetro Beckman DU-640, usando unas longitudes de onda de 260-280 Å con luz ultravioleta. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm (Hellman, tipo 104-QS). Los datos óptimos que se deben obtener para garantizar el genotipaje de las muestras son una concentración ≥ 5 µg/mL y una pureza entre 1,7-1,9 (medida en términos de relación de absorbancia 260/280 Å).

Las soluciones empleadas se prepararon de acuerdo con las siguientes composiciones:

1. Solución tamponada Montreal-Baltimore (para 500 mL), cuya función principal consiste en la hemólisis de los restos de hematíes que se quedan tras centrifugar las muestras:

- 54,77 g de sacarosa (Panreac, Barcelona, España).
- 6,057 g de Tris HCl 1 M (Sigma, St Louis, Mo, USA).
- 2,54 g de MgCl₂ 1 M (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 5 mL de Triton X-100 (Sigma).
- Agua destilada c.s.p. 500 mL, ajustando a pH 7,5.

2. Solución tamponada Nuclei-Lysis (para 500 mL), cuya principal función es la lisis de los núcleos de los leucocitos, que es de donde se obtiene el ADN:

- 250 mL de Tris HCl 20 mM (Sigma).

- 2 mL de EDTA 0,5 M (Panreac).
- 40 mL de NaCl 5 M (Panreac).
- Agua destilada c.s.p. 500 mL, ajustando pH 8,2.

3. Proteinasa K (para 10 muestras):

- 10 mg de proteinasa K (Sigma).
- 100 µl de EDTA 0,5M (Panreac).
- Agua destilada c.s.p. 1.000 µl.

4. Cloruro sódico 6 M (para 200 mL):

- 70,2 g de NaCl (Panreac).
- Agua destilada c.s.p. 200 mL.

5. Solución tamponada TE (para 500 mL):

- 0,606 g de Tris HCl (Sigma).
- 1 mL de EDTA (Panreac).
- Agua destilada c.s.p. 500 mL, ajustando a pH 8.

3.2.Genotipo de apo C-III.

Para el polimorfismo de la apo C-III se realizó una amplificación mediante PCR de un fragmento de 428 pb del gen de la apo C-III usando 250 ng de ADN genómico, 0,2 µmol de nucleótidos, 2,5 U de Taq polimerasa (Promega) y 1 µmol/l de cada oligonucleótido cebador (CIII-1, 5'-GGTGACCGATGGCTTCAGTT-3' y CIII-2, 5'-CAGAAGGTGGATAGAGCGCT-3') en un volumen final de 50 µl. El ADN fue desnaturalizado a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante un minuto, *annealing* a 55 °C durante 2 minutos, y extensión a 72 °C durante 1,5 minutos, en el aparato de PCR marca Techne, modelo Genius.

Para comprobar que tuvo lugar la amplificación, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% a 100 V durante 30 min. En cada pocillo de gel se

vertieron 10 μ l de ADN amplificado y 2 μ l de colorante BGL, utilizándose como patrón el marcador X174 ADN/Hae-III (Promega).

El proceso de digestión se realizó con 20 μ l de los productos de amplificación añadiendo 10 unidades de la enzima de restricción Sst-I (GIBCO BRL) en un volumen total de 35 μ l.

El ADN fue separado por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 8% a 150 V durante 2 horas. En cada pocillo del gel se vertieron 7 μ l del ADN digerido, 20 μ l de solución tampón 1xTE y 7 μ l de colorante BGL. La estimación del tamaño de los fragmentos obtenidos se hizo por comparación con el marcador X174 ADN/Hae-III (Promega).

La preparación de los productos empleados se realizó según la siguiente fórmula:

1. Gel de agarosa:

- 2 g de agarosa (Merck).
- 100 mL de una solución de 1xTAE más bromuro de etidio. Para 1 litro se emplea 20 mL de 50xTAE y 50 μ l de bromuro de etidio (Panreac), añadiendo agua destilada hasta completar 1 litro.

2. Solución tamponada 50xTAE (para 1 litro):

- 242 g de Trizma (Panreac).
- 57,1 mL de acético glacial (Panreac).
- 100 mL de EDTA 0,5 M (Panreac).
- Agua destilada c.s.p. 1 litro.

3. Gel de poliacrilamida:

- 13,3 mL de poliacrilamida al 30%. Para 100 mL se emplean 29 g de acrilamida (Merck) y 1 g de bisacrilamida (Merck), añadiendo agua destilada hasta completar 100 mL.

- 5 mL de la solución tamponada 10xTris-borato-EDTA (TBE). Para 1 litro se emplean 108 g de Tris base (Merck), 40 mL de EDTA 0,5 M (Panreac) y 55 g de ácido bórico (Merck), añadiendo agua destilada hasta completar 1.000 mL.
- 0,4 mL de amonium persulfato al 10% (Merck).
- 35 µl de Temed (tetrametiletilenodiamino) (Merck).
- Agua destilada hasta completar 50 mL.

4. Solución tampón 1xTE:

- 1 mL de EDTA 0,5M (Panreac).
- 0,606 g de Tris HCl [Tris(hidroximetil)aminometano] (Sigma).
- Agua destilada hasta completar 500 mL, ajustando a pH 8.

5. Colorante BGL:

- 25 mg de Bromophenol blue (Sigma).
- 25 mg de Xileno cyanole FF (Sigma).
- 3 mL de Glicerol (Panreac).
- Agua destilada hasta completar 10 mL.

Las bandas obtenidas se visualizaron mediante tinción con sales de plata (fig. 10). Para ello, el gel de poliacrilamida se sumergía por dos veces en una cubeta con una solución de etanol-acético durante 3 minutos. Posteriormente se introducía dicho gel en nitrato de plata al 0,1% durante 10 minutos, y se sometía después a tres lavados con agua destilada. A continuación se sumergía 20 minutos en solución de desarrollo de la tinción y posteriormente en solución de carbonato sódico durante 15 minutos. Los reactivos empleados se preparaban según las siguientes fórmulas:

1. Solución de etanol-acético:

- Etanol 10%: 200 mL (Merck).
- Acético 5%: 100 mL (Panreac).
- Agua destilada hasta completar 2.000 mL.

2. Solución de nitrato de plata:

- Nitrato de plata: 0,3 g (Panreac).
- Agua destilada hasta completar 300 mL.

3. Solución de desarrollo de la tinción:

- NaOH: 4,5 g (Panreac).
- NaBH₄: 30 mg (Panreac).
- Formaldehído: 1,2 mL (Panreac).
- Agua destilada hasta completar 300 mL.

4. Solución de carbonato sódico:

- NaCO₃: 2,25 g (Panreac).
- Agua destilada hasta completar 400 mL.

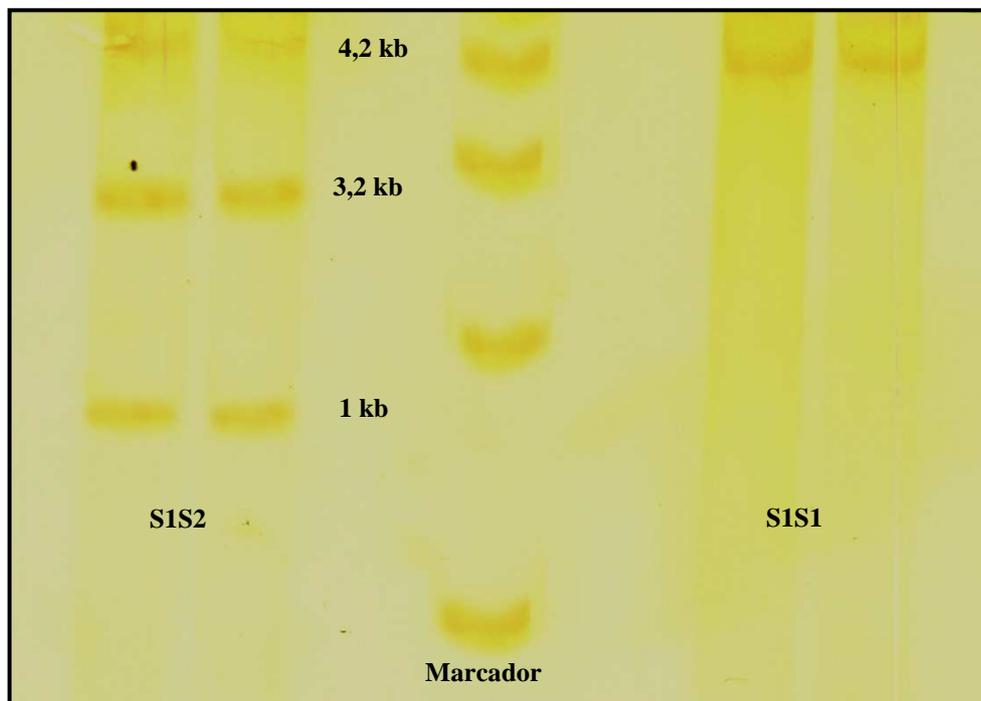


Fig. 10. Gel del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III.

3.3. Genotipo de apo E.

Para determinar el genotipo de apo E se realizó la amplificación mediante PCR de una región del ADN de 266 pb del cuarto exón del gen de la apo E³⁰⁰. Se emplearon 0,5 µg de ADN genómico, 1,5 mmol/l de Cl₂Mg, 1 µmol/l de cada oligonucleótido cebador (E1, 5'-GAACAAGTACCCCGGTGGCGGAG-3' y E2, 5'-TCGCGGGCCCCGGCCTGGT-ACACTGCCA-3'), 2,5 U de Taq polimerasa (Promega), 200 µmol/l de nucleótidos y dimetilsulfóxido al 10% (Merck) en un volumen final de 50 µl. El ADN se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización (96 °C, 1 minuto), *annealing* (63 °C, 1,5 minutos) y extensión (72 °C, 2 min). Se extrajeron 20 µl de producto de la PCR, que fueron digeridos con 10 unidades de la enzima de restricción HHA-I (Promega) en un volumen total de 35 µl.

Los productos obtenidos fueron también sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción con sales de plata, siguiendo el mismo proceso que para la apo C-III.

4. Determinaciones analíticas.

Tras 12 horas de ayuno, se extrajeron 5 cc de sangre venosa. Se emplearon tubos Vacutainer conteniendo EDTA (1 mg/mL) para evitar la oxidación de las lipoproteínas y como anticoagulante. Dentro de la primera hora postextracción, se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación (2.500 r.p.m., 4 °C, 15 min). Posteriormente, para evitar las variaciones interensayo, todas las muestras fueron guardadas alicuotadas en un congelador a - 80 °C. Se determinaron las concentraciones de colesterol total, triglicéridos, lipoproteínas, apoproteína A-I, apoproteína B y glucemia e insulinemia basales.

4.1. Determinación de colesterol y triglicéridos.

Las determinaciones de colesterol y triglicéridos se realizaron mediante métodos enzimáticos estándares^{301, 302} en un autoanalizador BM Hitachi, modelo 704, utilizando

reactivos de la casa comercial Boehringer-Mannheim (Alemania). Los controles de calidad utilizados fueron Precinorm L, Precinorm U y Precipath U, todos ellos de la misma casa comercial.

4.2. Determinación de lipoproteínas.

Se realizó mediante el método de ultracentrifugación en gradiente de densidad, que permite la separación de las diversas lipoproteínas en un único proceso de ultracentrifugación. Aunque existen diversos métodos, en este estudio se ha empleado el descrito por Terpstra et al³⁰³. Consiste en colocar en el fondo de un tubo de ultracentrífuga de policarbonato para rotor SW-60 (Beckman) un volumen de plasma de 1 mL llevado a una densidad superior a la de las lipoproteínas. Para ello, al plasma se le añaden 385 mg de KBr (Panreac) y 25 mg de sacarosa (Panreac), mezclando bien y centrifugando posteriormente a baja velocidad (2.000 r.p.m.) durante 5 minutos para eliminar las burbujas de aire. Con una pipeta de cristal se superponen 1 mL de solución de densidad 1,210 g/mL y 2 mL de agua destilada.

Posteriormente se colocan los tubos en sus contenedores y se equilibran por pares. Se ultracentrifugan durante 22 horas a 4 °C y 45.000 r.p.m., creándose así un gradiente continuo sobre el que se desplazan las diferentes lipoproteínas, que se sitúan en aquella zona del mismo de densidad equivalente. Una vez finalizada la ultracentrifugación se recogen tantas fases como bandas de coloración existen, y se anota el volumen de cada una. Generalmente se obtienen 0,4-0,6 mL de la parte superior del tubo, que corresponde a las VLDL e IDL. A continuación se encuentran las LDL (aproximadamente 1-1,5 mL), y debajo las HDL (1,2-1,6 mL). Finalmente, en el fondo se encuentra el LPDS (suero deficitario en lipoproteínas). Al final del estudio se determinó el contenido de colesterol y triglicéridos de cada fracción lipoproteica en un autoanalizador BM Hitachi. Con los valores obtenidos se calculan las concentraciones en cada fracción teniendo en cuenta los factores de dilución.

La solución de densidad 1,210 g/mL se obtiene mezclando, para 200 mL, 67,52 g de KBr y agua destilada hasta completar dicho volumen, ajustando a pH 7,4. El control de

la densidad se realiza pesando en una balanza de precisión un matraz aforado de 25 mL de capacidad, vacío y lleno de la solución cuya densidad se quiera determinar, ajustando ésta en caso de variación mediante la adición de NaCl o agua destilada según el caso.

4.3. Determinación de apoproteínas.

La cuantificación de las apoproteínas A-I y apo B se hizo por inmunturbidimetría³⁰⁴ en el autoanalizador BM Hitachi con reactivos de la casa Boehringer-Mannheim.

4.4. Glucemia e insulinemia.

La glucosa se determinó mediante el test enzimático GOD-PAP de Boehringer-Mannheim. La cuantificación de insulina plasmática fue realizada mediante RIA usando un kit comercial (¹²⁵I Insulin Coatria of BioMerieux, Francia). El coeficiente de variación interensayo para la insulina fue del 5,6%.

El índice HOMA se calculó mediante la fórmula de Matthews³⁰⁵ como un marcador indirecto de la resistencia insulínica³⁰⁶.

$$\text{Índice HOMA} = \frac{\text{Insulinemia basal (U/mL)} \times \text{glucemia basal (mmol/L)}}{22,5}$$

Siguiendo el criterio de Ascaso et al³⁰⁷, se consideró un valor del índice HOMA igual o superior a 3,8 como una sensibilidad a la acción periférica de la insulina alterada, es decir, como resistencia insulínica.

5. Análisis estadístico.

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de todas las variables. Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de las variables y, dividir las en aquellas que presentaban una distribución normal de aquellas otras que no lo hacían. Las que presentaron una distribución gaussiana se describieron como la media \pm la desviación típica, y las que mostraron una distribución no normal se describieron como la mediana con los percentiles 25 y 75 (Md [P₂₅-P₇₅]).

Para el cálculo de la significación estadística se empleó la prueba de la Chi-cuadrado de Pearson en la comparación de porcentajes o variables categóricas y la t-Student en la comparación de las medias para variables cuantitativas. Se utilizó la prueba exacta de Fischer o de la U de Mann-Whitney respectivamente en las variables que no siguieron una distribución normal.

Para estudiar la correlación entre dos variables de tipo cuantitativo se utilizaron la prueba de Pearson para variables con una distribución normal y la Rho de Spearman para variables con distribución no normal.

En todas las pruebas de contraste de hipótesis se rechazó la hipótesis nula para valores de “*p*” inferiores a 0,05. Para el análisis estratificado se empleó el método de Mantel-Haenszel.

Para el estudio estadístico de los datos genéticos y la determinación de los efectos de las variantes alélicas del gen de la apolipoproteína C-III se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las variables cuantitativas con distribución normal, y la prueba de Kruskal-Wallis para variables cuantitativas con distribución no normal. Se consideraron significativos cuando los valores de “*p*” fueron menores a 0,05. Cuando se observaron diferencias significativas se empleó el test de Tukey en comparación post-hoc para identificar las diferencias existentes entre cada grupo.

Todos los análisis y cálculos estadísticos fueron realizados con el programa informático SPSS, versión 10.0.

6. Método de búsqueda bibliográfica.

La búsqueda y revisión del material bibliográfico fueron realizadas a través del sistema de información MEDLINE del Servicio de Biblioteca del Hospital de la Merced de Osuna (Sevilla) y del sistema PUBMED a través de Internet, usando en ambos casos palabras o encabezados MESH (Medical Subjects Headings) del THESAURUS. La revisión bibliográfica quedó actualizada hasta diciembre de 2005.

7. Recursos financieros.

Esta tesis ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), concedido por el Ministerio de Sanidad y Consumo, número del proyecto 98/1128.

IV

RESULTADOS

1. Distribución de variables.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las distintas variables de nuestro estudio presentaban o no una distribución de tipo normal. En las siguientes tablas 9 y 10 aparecen anotadas las variables que siguieron una distribución normal y aquellas con una distribución no normal.

Tabla 9. Variables con distribución normal.

Variables	Media	Desviación típica	Mínimo	Máximo
Edad (años)	43,9	11,1	23	68
Peso (Kg)	76,5	11,2	46,6	108
Talla (cm)	162,8	7,3	146	180
IMC (Kg/m ²)	29,1	5,3	22,8	40,7
PAS (mmHg)	149,6	10,1	120	178
PAD (mmHg)	93,3	5,3	68	107
Colesterol total (mg/dL)	220,9	49,2	129	358
Colesterol-VLDL (mg/dL)	23,7	19	1	73
Colesterol LDL (mg/dL)	137,4	44,9	55	254
Colesterol HDL (mg/dL)	50,4	16,1	26	99
Colesterol no HDL (mg/dL)	175,3	87,9	67	292
Apo A-I (mg/dL)	128,1	24,3	68	189
Apo B (mg/dL)	107,5	29,7	38	185
Cociente CT/c-HDL	4,72	1,82	2,08	10,34
Cociente c-LDL/c-HDL	3,34	1,48	0,90	7,50
Cociente c-LDL/apo B	1,4	0,3	0,6	2,8
Cociente apo A-I/apo B	1,3	0,44	0,60	2,73
Glucemia basal (mg/dL)	97,9	16,1	43	124
Insulinemia basal (μU/mL)	13,6	5,3	2	30
Índice HOMA	3,3	1,6	0,35	8,07

IMC = índice de masa corporal; PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; CT = colesterol total; c-HDL = colesterol-HDL; c-LDL = colesterol-LDL.

Tabla 10. Variables con distribución no normal.

Variables	Mediana	Percentiles		Mínimo	Máximo
		P ₂₅	P ₇₅		
Triglicéridos totales (mg/dL)	135,5	78,3	202,8	36	520
Triglicéridos-VLDL (mg/dL)	84,5	39,3	143,5	8	383
Triglicéridos LDL (mg/dL)	32,5	20,3	45,8	2	114
Triglicéridos HDL (mg/dL)	17,5	12	23	1	61
Cociente Tg-VLDL/c-HDL	1,5	0,7	3,5	0,13	13,21

Tg-VLDL = triglicéridos-VLDL; c-HDL = colesterol-HDL.

2. Características generales del grupo de pacientes hipertensos esenciales.

Las características clínicas de los individuos hipertensos esenciales (edad, sexo, peso, talla, índice de masa corporal, presión arterial sistólica y presión arterial diastólica) se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Características generales de los pacientes hipertensos esenciales en función del sexo.

	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	TOTAL (n = 104)
Edad (años)	41,7 ± 10,7	46,8 ± 10,9 *	43,9 ± 11,1
Peso (Kg)	81,7 ± 12,1	69,7 ± 10,6 **	76,5 ± 11,2
Talla (cm)	167,4 ± 8,8	156,8 ± 6,2 **	162,8 ± 7,3
IMC (Kg/m ²)	29,4 ± 3,9	28,7 ± 6,8	29,1 ± 5,3
PAS (mmHg)	146,6 ± 12,8	153,5 ± 16,9 *	149,6 ± 10,1
PAD (mmHg)	93,4 ± 7,5	92,9 ± 9,1	93,3 ± 5,3

IMC= índice de masa corporal; PAS= presión arterial sistólica; PAD= presión arterial diastólica. * p < 0,05; ** p < 0,01.

Tal y como se ha comentado en el apartado de Sujetos, Material y Métodos, finalmente se incluyeron en el trabajo un total de 104 pacientes hipertensos esenciales, con una edad media de 43,9 ± 11,1 años, de los cuales 59 eran varones (56,7%) y 45 mujeres

(43,3%). Las mujeres tenían una edad media aproximadamente cinco años superior a la de los varones ($46,8 \pm 10,9$ versus $41,7 \pm 10,7$ años, respectivamente, $p < 0,05$).

El índice de masa corporal (IMC) o de Quetelet ofreció una media de $29,1 \pm 5,3$ Kg/m², valor muy próximo al límite que se considera como obesidad (≥ 30 Kg/m²). Si bien las mujeres presentaban un peso inferior a los hombres, también eran de menor estatura y por ello no observamos diferencias significativas en cuanto al IMC entre ambos sexos.

En este grupo de pacientes hipertensos esenciales de reciente diagnóstico y sin tratamiento antihipertensivo previo, las cifras medias de presión arterial fueron de $149,6 \pm 10,1$ mmHg para la PAS y de $93,3 \pm 5,3$ mmHg para la PAD. Si bien no hubo diferencia significativa en cuanto a las cifras de presión arterial diastólica entre ambos sexos, la presión arterial sistólica sí fue más alta en las mujeres ($153,5 \pm 16,9$ frente a $146,6 \pm 12,8$ mmHg, $p < 0,05$).

3. Influencia del sexo sobre las variables lipídicas estudiadas en los pacientes hipertensos esenciales.

Previo al análisis de la influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III, se estudió los valores de las distintas variables lipídicas en función del sexo, en el subgrupo de mujeres y de hombres de la muestra.

3.1. Colesterol.

Cuando comparamos los valores plasmáticos medios de colesterol total y sus fracciones lipoproteicas, observamos como las mujeres muestran significativamente niveles más elevados de c-HDL ($58 \pm 17,7$ frente a $44,4 \pm 13,9$ mg/dL, $p < 0,001$), mientras que los hombres presentan unas cifras medias superiores de colesterol no HDL ($186,1 \pm 52,9$ frente a $158,5 \pm 53,2$ mg/dL, $p < 0,05$) (fig.11). No se apreciaron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados (colesterol total, c-VLDL y c-LDL), como se recogen en la tabla 12.

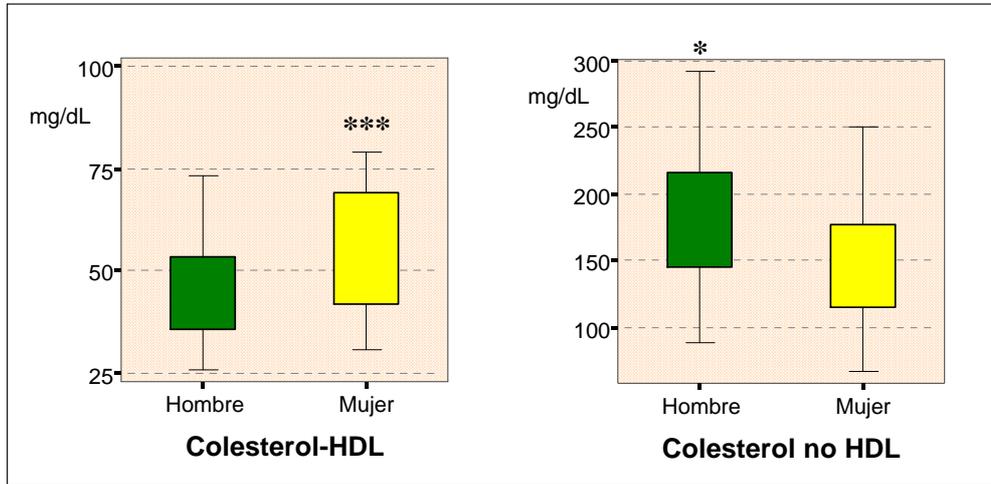


Fig. 11. Niveles plasmáticos medios de colesterol-HDL y colesterol no HDL en el grupo de pacientes hipertensos esenciales según el sexo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Tabla 12. Niveles plasmáticos medios de colesterol total y fracciones lipoproteicas en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

Variables	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	p
Colesterol total (mg/dL)	224,9 ± 52,1	216 ± 49,5	ns
Colesterol VLDL (mg/dL)	26,6 ± 17,6	20,3 ± 18,6	ns
Colesterol LDL (mg/dL)	144,6 ± 45,9	127,7 ± 42,2	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	44,4 ± 13,9	58 ± 17,7	< 0,001
Colesterol no HDL (mg/dL)	186,1 ± 52,9	158,5 ± 53,2	< 0,05

ns = diferencias no significativas.

3.2. Triglicéridos.

Los valores de los triglicéridos y sus fracciones lipoproteicas aparecen recogidos en la tabla 13. Los hombres presentaban cifras significativamente superiores respecto de las mujeres en cuanto a triglicéridos totales ($180,4 \pm 108,9$ frente a $125,3 \pm 88,8$ mg/dL, $p < 0,01$) y de Tg-VLDL (127 ± 83 frente a $80,8 \pm 86,7$ mg/dL, $p < 0,01$). Este incremento en los niveles de triglicéridos totales en los varones se debe principalmente a la fracción de triglicéridos vehiculizada por las partículas VLDL (fig.12).

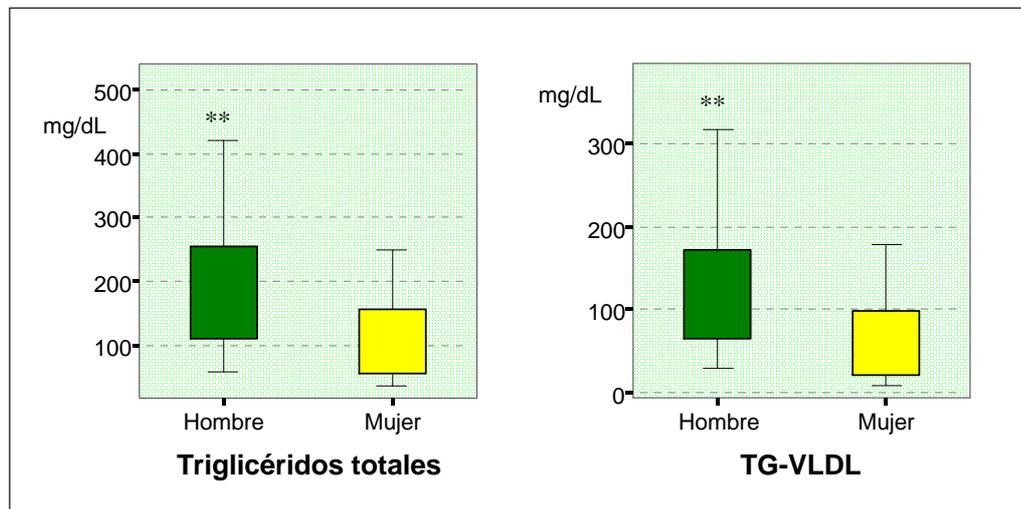


Fig. 12. Niveles plasmáticos medios de triglicéridos totales y vehiculizados por las VLDL en el grupo de pacientes hipertensos esenciales según el sexo. TG = triglicéridos. ** $p < 0,01$.

Tabla 13. Niveles plasmáticos medios de triglicéridos totales y fracciones lipoproteicas, y cociente Tg-VLDL/c-HDL en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

Variables	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	p
Triglicéridos totales (mg/dL)	180,4 ± 108,9	125,3 ± 88,8	< 0,01
Triglicéridos VLDL (mg/dL)	127 ± 83	80,8 ± 86,7	< 0,01
Triglicéridos LDL (mg/dL)	38,9 ± 21,8	31,9 ± 18,8	ns
Triglicéridos HDL (mg/dL)	18,9 ± 9,3	17,9 ± 8,1	ns
Cociente Tg-VLDL/c-HDL	3,34 ± 2,69	1,67 ± 1,09	< 0,001

ns = diferencias no significativas.

Para valorar de forma indirecta la actividad de la LPL se calculó el cociente Tg-VLDL/c-HDL, el cual presentó un valor significativamente mayor en los hombres respecto a las mujeres ($3,34 \pm 2,69$ frente a $1,67 \pm 1,09$, $p < 0,001$), lo que indica que los varones tienen una menor actividad de la LPL y justifica el mayor incremento de los triglicéridos observado en los varones (fig.13).

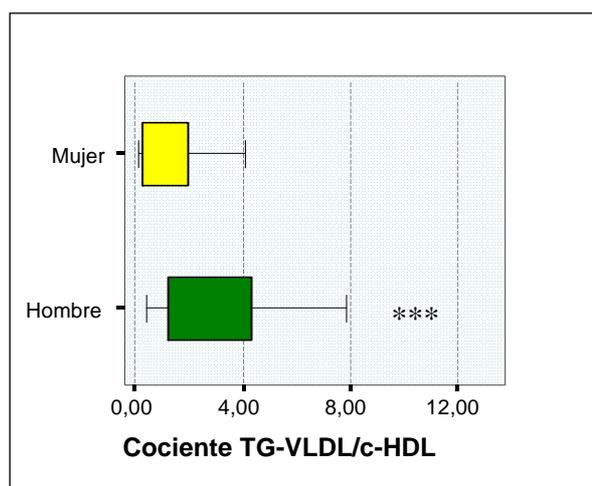


Fig. 13. Valor medio del cociente Tg-VLDL/c-HDL en el grupo de pacientes hipertensos esenciales en función del sexo. TG = triglicéridos; c-HDL = colesterol-HDL. *** $p < 0,001$.

3.3. Apolipoproteínas A-I y B.

Los niveles de apo A-I se hallaron significativamente más elevados en las mujeres ($138,1 \pm 21,5$ versus $120,4 \pm 23,7$ mg/dL, $p < 0,01$), lo que lógicamente concuerda con las cifras más elevadas de colesterol-HDL encontradas en el subgrupo femenino, ya que la apo A-I es la apolipoproteína más frecuente de las partículas HDL. Por otro lado, los niveles de apo B eran más altos en los varones ($112,7 \pm 30,1$ frente a $100,8 \pm 31,4$ mg/dL, $p < 0,05$) (tabla 14, fig.14), lo cual también se corresponde con la tendencia a un incremento en el c-LDL, que eran más elevados en los hombres.

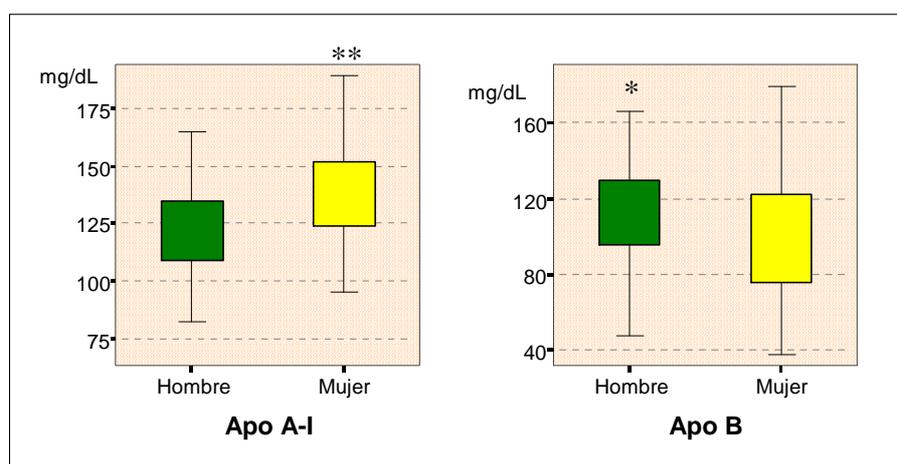


Fig. 14. Niveles plasmáticos medios de apo A-I y apo B en el grupo de pacientes hipertensos esenciales en función del sexo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabla 14. Niveles plasmáticos medios de apo A-I y apo B en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

Variables	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	p
Apo A-I (mg/dL)	$120,4 \pm 23,7$	$138,1 \pm 21,5$	$< 0,01$
Apo B (mg/dL)	$112,7 \pm 30,1$	$100,8 \pm 31,4$	$< 0,05$

3.4. Índices aterogénicos.

De los diversos índices aterogénicos que se calcularon, los hombres presentaron valores significativamente superiores en los cocientes colesterol total/c-HDL ($5,3 \pm 1,8$ frente a $4,0 \pm 1,6$, $p < 0,001$) y cociente c-LDL/c-HDL ($3,8 \pm 1,5$ versus $2,6 \pm 1,1$, $p < 0,001$). Las mujeres, en cambio, tenían un cociente apo A-I/apo B más elevado que los varones ($1,5 \pm 0,5$ frente a $1,1 \pm 0,4$, $p < 0,001$).

Si tenemos en cuenta que los valores normales del cociente colesterol total/c-HDL son inferiores a 5, y los del cociente c-LDL/c-HDL inferiores a 3,5, encontramos que nuestros pacientes varones presentaban unos índices aterogénicos elevados, además del menor cociente apo A-I/apo B, y por lo tanto, mayor riesgo ateroesclerótico. Por el contrario, el cociente c-LDL/apo B no presentó diferencia significativa, a pesar de que se relaciona con la presencia de partículas LDL más pequeñas y densas y, por tanto, más aterogénicas (tabla 15). Estos datos están representados en la figura 15.

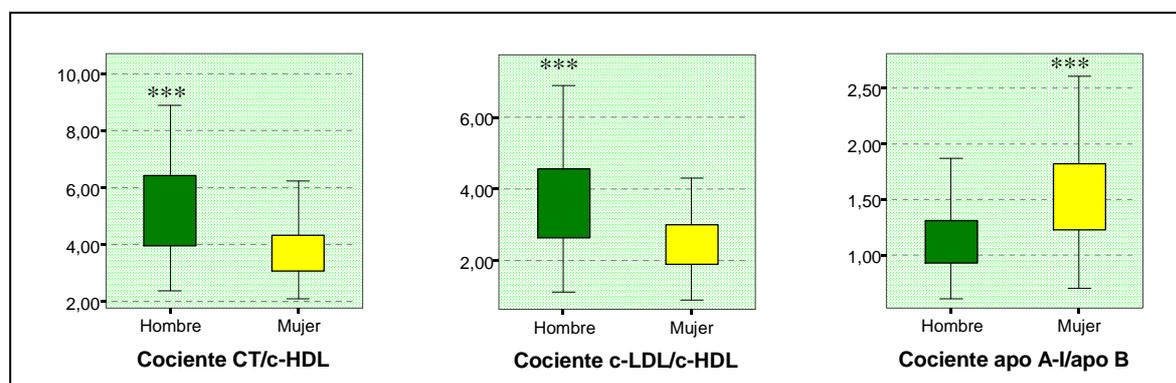


Fig. 15. Valores medios de índices aterogénicos en el grupo de pacientes hipertensos esenciales en función del sexo. CT = colesterol total; c-LDL= colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL. *** $p < 0,001$.

Tabla 15. Cocientes o índices aterogénicos en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

Variables	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	p
CT / c-HDL	5,3 ± 1,8	4,0 ± 1,6	< 0,001
c-LDL / c-HDL	3,8 ± 1,5	2,6 ± 1,1	< 0,001
c-LDL / Apo B	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,4	ns
Apo A-I / Apo B	1,1 ± 0,4	1,5 ± 0,5	< 0,001

CT = colesterol total; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL; ns = diferencias no significativas.

4. Influencia del sexo sobre el metabolismo hidrocarbonado en los pacientes hipertensos esenciales.

Las variables bioquímicas del metabolismo hidrocarbonado estudiadas fueron las cifras basales de glucosa e insulina y el índice HOMA como indicador de la resistencia a la insulina. No se hallaron diferencias entre ambos sexos en ninguna de las variables estudiadas. Estos datos están recogidos en la tabla 16.

Tabla 16. Valores plasmáticos medios de glucosa e insulina basales y del índice HOMA en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

Variables	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	p
Glucemia basal (mg/dL)	99,3 ± 17,5	94,8 ± 14,9	ns
Insulinemia basal (μU/mL)	14,3 ± 5,4	12,4 ± 5,9	ns
Índice HOMA	3,5 ± 1,6	2,9 ± 1,6	ns

ns = diferencias no significativas.

5. Frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III.

La determinación del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III permite distinguir dos alelos, denominados S1 y S2, que dan lugar a tres genotipos: S1S1, S1S2 y S2S2.

Del total de los 104 individuos hipertensos esenciales aparecieron 86 sujetos S1S1 (82,7%) y 18 sujetos S1S2 (17,3%), como se representa en la figura 16. No se identificó a ningún sujeto con el genotipo homocigótico S2S2. La frecuencia relativa de los alelos S1 y S2 fue del 0,913 y 0,087, respectivamente (tabla 17).

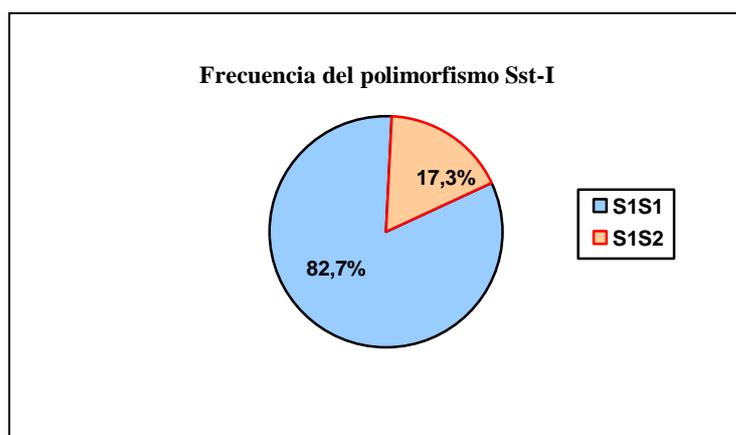


Fig. 16. Frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III en el grupo de pacientes hipertensos esenciales (n = 104 individuos).

Entre los hombres había 48 sujetos homocigóticos S1S1 (81,4%) y 11 individuos heterocigóticos S1S2 (18,6%). En el caso de las mujeres, 38 resultaron ser homocigóticas S1S1 (84,4%) y 7 eran heterocigóticas S1S2 (15,6%). No hubo diferencias significativas en cuanto a la distribución del polimorfismo genético Sst-I del gen de la apo C-III y el sexo, tal y como se muestra en la tabla 17 y figura 17.

Tabla 17. Frecuencias de los genotipos del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III en función del sexo.

GENOTIPO APO C-III	HOMBRES (n = 59)	MUJERES (n = 45)	TOTAL (n = 104)	P
S1S1	48	38	86	ns
S1S2	11	7	18	ns
FRECUENCIAS ALÉLICAS				
Alelo S1	0,913			
Alelo S2	0,087			

ns = diferencias no significativas.

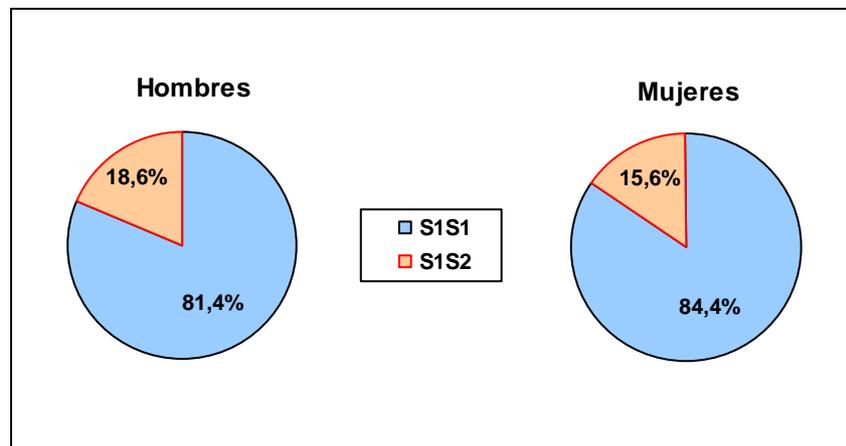


Fig. 17. Frecuencia del genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III en los subgrupos de hombres y mujeres.

6. Características clínicas de los pacientes hipertensos esenciales según el genotipo de la apo C-III.

Cuando se analizó la influencia del polimorfismo Sst-I del locus genético de la apolipoproteína C-III sobre las diferentes características clínicas incluidas en nuestro estudio, tales como edad, sexo, peso, talla, IMC, presión arterial sistólica y presión arterial diastólica, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos con los genotipos S1S1 y S1S2, como se muestra en la tabla 18.

Si estratificamos las características generales anteriormente comentadas en función del sexo tampoco observamos diferencias significativas de dichas variables según el genotipo, tal y como se expresa en las tablas 19 y 20.

Tabla 18. Características clínicas del grupo de pacientes hipertensos esenciales según el genotipo de la apo C-III.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS			
Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	p
Edad (años)	43,7 ± 11,1	44,6 ± 11,1	ns
Sexo (M/F)	48 / 38	11 / 7	ns
Peso (Kg)	76,4 ± 10,1	77,9 ± 8,2	ns
Talla (cm)	162,7 ± 7,3	163,3 ± 6,2	ns
IMC (Kg/m ²)	28,9 ± 5,4	29,9 ± 4,9	ns
PAS (mmHg)	149,8 ± 15,1	148,7 ± 15,1	ns
PAD (mmHg)	93,4 ± 8,2	92,0 ± 8,1	ns

M = masculino; F = femenino; IMC = índice de masa corporal; PAS= presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; ns = diferencias no significativas.

Tabla 19. Características clínicas del grupo de varones hipertensos esenciales según el genotipo de la apo C-III.

HOMBRES			
Variables	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	p
Edad (años)	41,55 ± 11,1	42,6 ± 9,4	ns
Peso (Kg)	81,3 ± 10,4	82,8 ± 13,4	ns
Talla (cm)	167,5 ± 8,8	166,2 ± 7,6	ns
IMC (Kg/m²)	29,0 ± 3,6	31,0 ± 4,9	ns
PAS (mmHg)	146,9 ± 12,8	145,2 ± 13,1	ns
PAD (mmHg)	93,2 ± 7,7	94,0 ± 6,9	ns

IMC = índice de masa corporal; PAS= presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; ns = diferencias no significativas.

Tabla 20. Características clínicas del grupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo de la apo C-III.

MUJERES			
Variables	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
Edad (años)	46,6 ± 10,6	47,7 ± 13,4	ns
Peso (Kg)	69,5 ± 10,8	70,1 ± 9,8	ns
Talla (cm)	156,0 ± 6,5	157,2 ± 5,9	ns
IMC (Kg/m²)	28,7 ± 7,1	28,3 ± 4,9	ns
PAS (mmHg)	153,3 ± 17,1	154,4 ± 17,1	ns
PAD (mmHg)	93,6 ± 9,0	88,8 ± 9,4	ns

IMC = índice de masa corporal; PAS= presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; ns = diferencias no significativas.

7. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico en los pacientes hipertensos esenciales.

La muestra de los pacientes hipertensos esenciales se dividió en dos subgrupos, homocigótico S1S1 y heterocigótico S1S2, según el genotipo de la apoproteína C-III para estudiar la influencia del alelo raro S2 sobre el perfil lipídico de estos sujetos. Se midieron las concentraciones plasmáticas de los lípidos totales y sus fracciones lipoproteicas, de las apolipoproteínas A-I y B, y se calcularon los cocientes aterogénicos como indicadores de riesgo cardiovascular.

7.1. Colesterol.

El grupo de los pacientes hipertensos esenciales que poseían el genotipo S1S2 comparados con los homocigotos del alelo S1 presentó niveles plasmáticos de colesterol total significativamente más elevados ($250,6 \pm 55,6$ frente a $214,8 \pm 47,9$ mg/dL, $p < 0,01$). Cuando se analizaron las diferentes fracciones lipoproteicas observamos que el incremento del colesterol total se debió fundamentalmente al aumento de aproximadamente el doble del colesterol vehiculizado por las VLDL ($42,3 \pm 23,4$ versus $20,0 \pm 14,4$ mg/dL, $p < 0,001$), así como al incremento del colesterol-LDL ($154 \pm 48,8$ frente a $133,7 \pm 44,2$ mg/dL, $p < 0,01$). Al no observar variaciones en el colesterol-HDL entre ambos grupos ($46,8 \pm 13,6$ versus $51,2 \pm 16,6$ mg/dL), el colesterol no-HDL, definido como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol-HDL, estaba aumentado en los individuos con el genotipo S1S2 ($218,3 \pm 52,6$ frente a $166 \pm 50,5$ mg/dL, $p < 0,001$). Estos resultados aparecen reseñados en la tabla 21 y representados gráficamente en la figura 18.

Tabla 21. Valores plasmáticos medios de colesterol total y fracciones lipoproteicas en los pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apo C-III.

Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	Total (n = 104)	p
Colesterol total (mg/dL)	214,8 ± 47,9	250,6 ± 55,6	220,9 ± 49,2	< 0,01
Colesterol VLDL (mg/dL)	20,0 ± 14,4	42,3 ± 23,4	23,9 ± 15,9	< 0,001
Colesterol LDL (mg/dL)	133,7 ± 44,2	154,0 ± 48,8	137,4 ± 44,9	< 0,01
Colesterol HDL (mg/dL)	51,2 ± 16,6	46,8 ± 13,6	50,4 ± 16,1	ns
Colesterol no HDL (mg/dL)	166 ± 50,5	218,3 ± 52,6	175,3 ± 87,9	< 0,001

ns = diferencias no significativas.

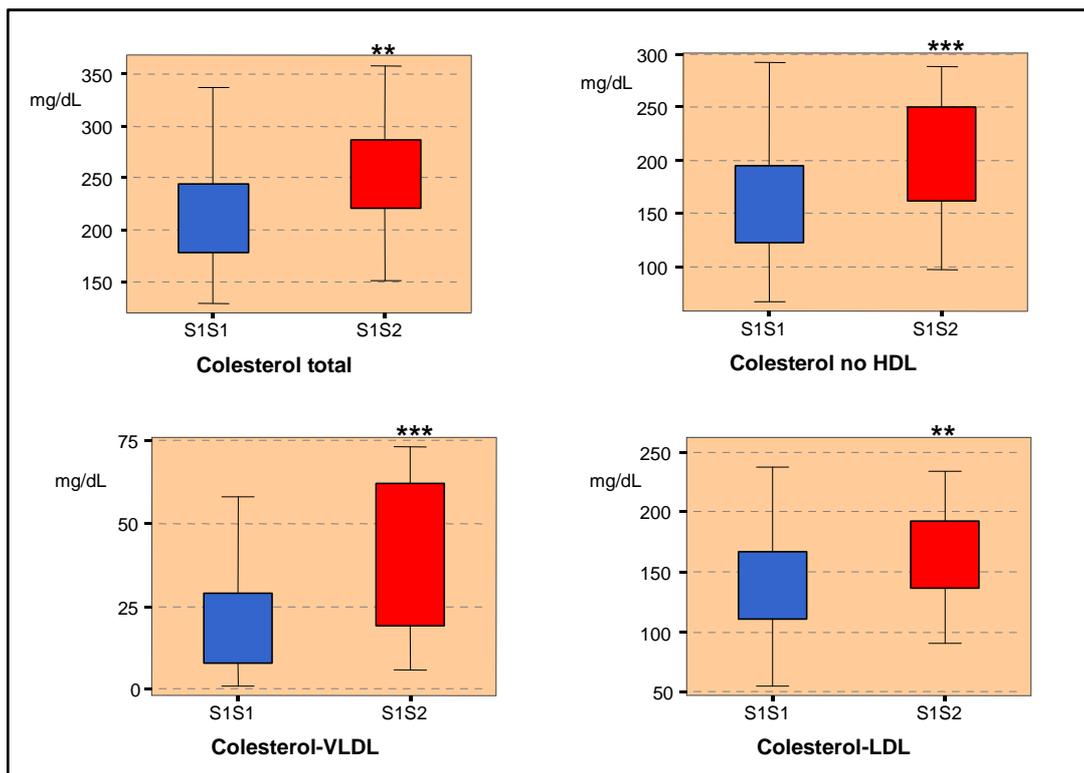


Fig. 18. Niveles plasmáticos medios de colesterol total y fracciones lipoproteicas en el grupo de pacientes hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

7.2. Triglicéridos.

La concentración plasmática de triglicéridos totales fue significativamente más alta también en los sujetos heterocigóticos S1S2 ($255,9 \pm 114,6$ versus $135,8 \pm 89,1$ mg/dL, $p < 0,001$). En el análisis de las correspondientes fracciones lipoproteicas se observa el importante incremento de los triglicéridos vehiculizados por las VLDL ($183,0 \pm 93,6$ frente a $92,3 \pm 78,5$ mg/dL, $p < 0,001$), por las partículas LDL ($53,6 \pm 27,3$ versus $32,5 \pm 17,4$ mg/dL, $p < 0,001$) y por las HDL ($24,4 \pm 6,5$ frente a $17,5 \pm 8,7$ mg/dL, $p < 0,01$). Estos datos se resumen en la tabla 22 y figura 19.

Tabla 22. Valores plasmáticos medios de triglicéridos totales y fracciones lipoproteicas, y cociente Tg-VLDL/c-HDL en los pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apo C-III.

Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	Total (n = 104)	p
Triglicéridos totales (mg/dL)	$135,8 \pm 89,1$	$255,9 \pm 114,6$	$156,6 \pm 93,5$	$< 0,001$
Triglicéridos VLDL (mg/dL)	$92,3 \pm 78,5$	$183,0 \pm 93,6$	$107,9 \pm 81,1$	$< 0,001$
Triglicéridos LDL (mg/dL)	$32,5 \pm 17,4$	$53,6 \pm 27,3$	$36,2 \pm 19,1$	$< 0,001$
Triglicéridos HDL (mg/dL)	$17,5 \pm 8,7$	$24,4 \pm 6,5$	$18,7 \pm 8,3$	$< 0,01$
Cociente Tg-VLDL / c-HDL	$2,26 \pm 2,36$	$4,46 \pm 2,56$	$2,64 \pm 2,39$	$< 0,01$

Tg-VLDL = triglicéridos-VLDL; c-HDL = colesterol -HDL; ns = diferencias no significativas.

El cociente Tg-VLDL/c-HDL resultó significativamente más elevado en los individuos S1S2 ($3,9 [2,13 - 7,02]$ frente a $1,28 [0,61 - 3,12]$, $p < 0,01$), reflejando una menor actividad de la LPL (fig.20).

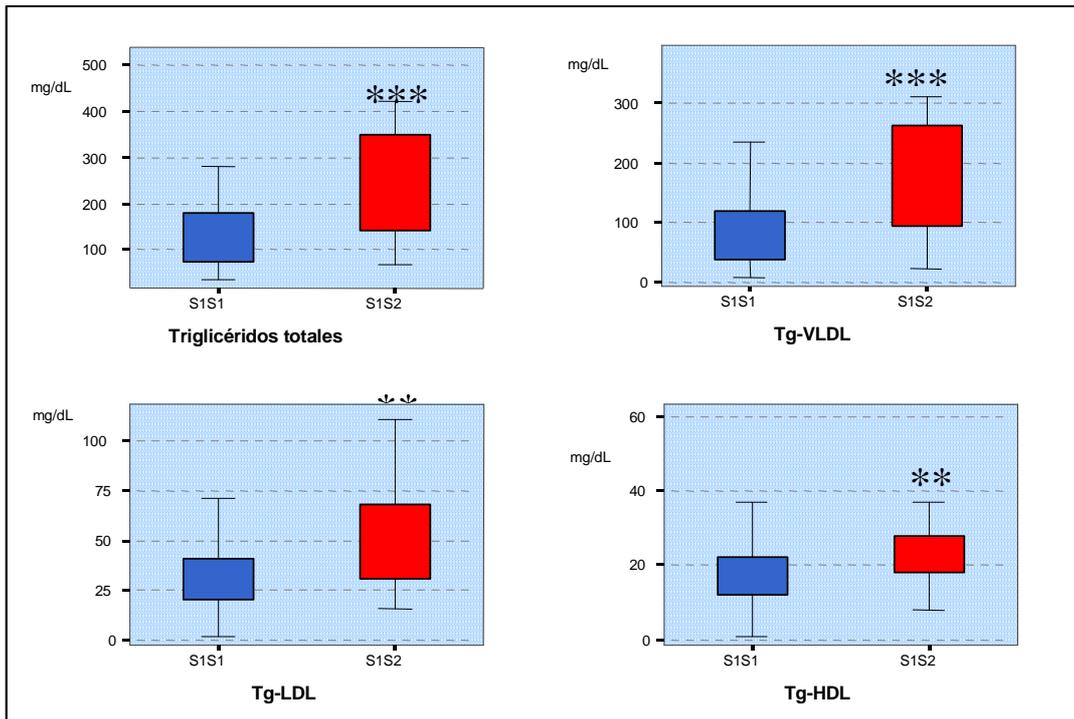


Fig. 19. Niveles plasmáticos medios de triglicéridos totales y fracciones lipoproteicas en el grupo de pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. Tg = triglicéridos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

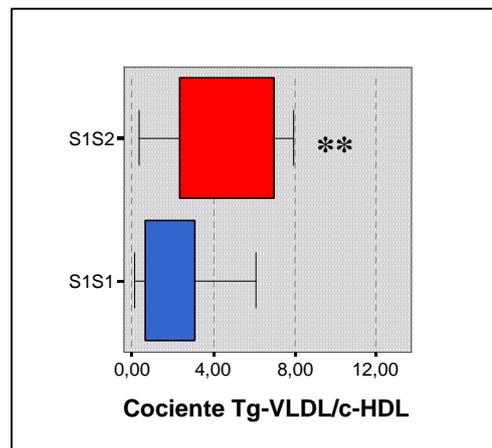


Fig. 20. Valor medio del cociente Tg-VLDL/c-HDL en el grupo de pacientes hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. Tg = triglicéridos; c-HDL = colesterol-HDL. ** $p < 0,01$.

7.3. Apoproteínas A-I y B.

Los niveles plasmáticos de la apoproteína B fueron más elevados en los sujetos S1S2 que en los sujetos S1S1 ($128,7 \pm 34,8$ frente a $103,1 \pm 28,6$ mg/dL, $p < 0,01$). Sin embargo, en los niveles de apo A-I no se observó diferencia entre los individuos heterocigotos y los homocigotos ($133,8 \pm 25,5$ versus $126,9 \pm 24,1$ mg/dL) (tabla 23, fig.21).

Tabla 23. Valores plasmáticos medios de apo A-I y apo B en los pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apo C-III.

Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	Total (n = 104)	p
Apo A-I (mg/dL)	$126,9 \pm 24,1$	$133,8 \pm 25,5$	$128,1 \pm 24,3$	ns
Apo B (mg/dL)	$103,1 \pm 28,6$	$128,7 \pm 34,8$	$107,5 \pm 29,7$	$< 0,01$

ns = diferencias no significativas.

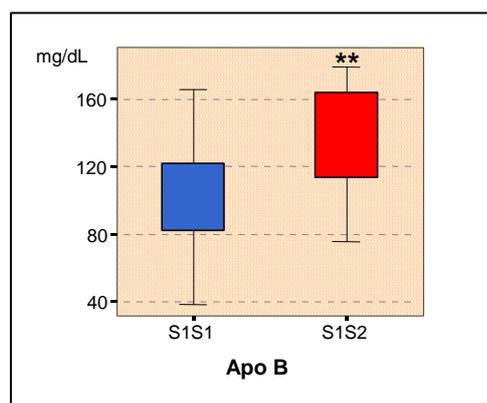


Fig. 21. Niveles plasmáticos medios de apo B en el grupo de pacientes hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. ** $p < 0,01$.

7.4. Índices aterogénicos.

Los individuos S1S2 presentaban niveles estadísticamente más altos de los cocientes colesterol total/c-HDL ($5,86 \pm 1,94$ frente a $4,48 \pm 1,71$, $p < 0,05$), y c-LDL/c-HDL ($4,1 \pm 1,5$ versus $3,18 \pm 1,45$, $p < 0,05$), y valores significativamente más bajos del cociente apo A-I/apo B ($1,05 \pm 0,23$ frente a $1,35 \pm 0,46$, $p < 0,001$), es decir, con un perfil más aterogénico. Sin embargo no hubo diferencia en el cociente c-LDL/apo B entre ambos grupos, lo cual nos indica que no cambió el tamaño de las partículas LDL. Estos datos aparecen recogidos en la tabla 24 y representados en la figura 22.

Tabla 24. Valores medios de cocientes aterogénicos en pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III.

Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	Total (n = 104)	p
CT / c-HDL	$4,48 \pm 1,71$	$5,86 \pm 1,94$	$4,72 \pm 1,82$	$< 0,05$
c-LDL / c-HDL	$3,18 \pm 1,45$	$4,1 \pm 1,5$	$3,34 \pm 1,48$	$< 0,05$
c-LDL / Apo B	$1,37 \pm 0,3$	$1,23 \pm 0,22$	$1,34 \pm 0,29$	ns
Apo A-I / Apo B	$1,35 \pm 0,46$	$1,05 \pm 0,23$	$1,30 \pm 0,44$	$< 0,001$

CT = colesterol total; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL; ns = diferencias no significativas.

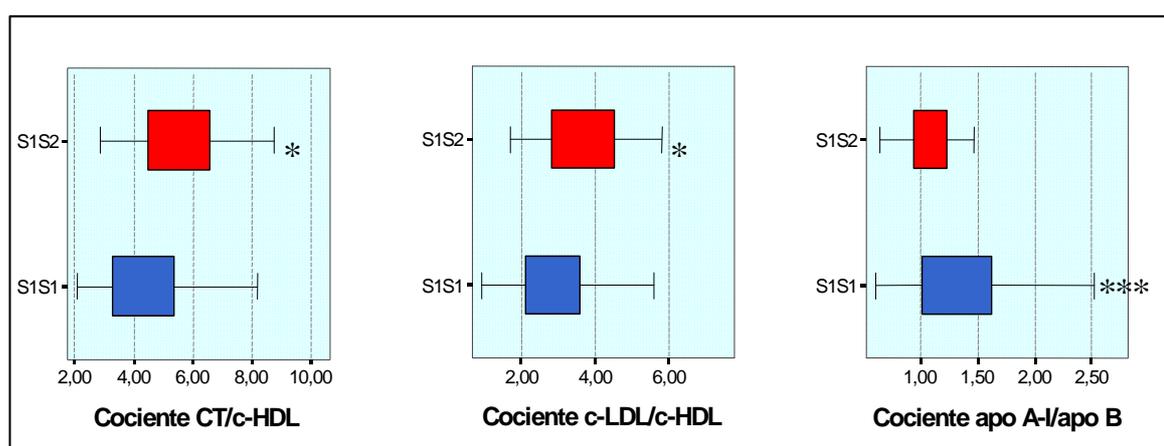


Fig. 22. Cocientes o índices aterogénicos en los pacientes hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. CT = colesterol total; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

8. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo hidrocarbonado en los pacientes hipertensos esenciales.

Para estudiar la influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III sobre el metabolismo hidrocarbonado en pacientes con hipertensión arterial esencial, se midieron los niveles plasmáticos de glucosa e insulina basales y se calculó el índice HOMA como indicador de la resistencia a la insulina. Los valores obtenidos aparecen reseñados en la tabla 25.

Se encontraron diferencias significativas en las cifras basales, obteniéndose cifras superiores en los sujetos S1S2 ($105,5 \pm 14,9$ frente a $96,3 \pm 16,3$ mg/dL para la glucemia basal, y $16,0 \pm 4,5$ frente a $13,1 \pm 5,5$ mg/dL para la insulinemia basal, con $p < 0,05$ en ambos casos). También el índice HOMA ofreció una diferencia significativa entre los individuos S1S1 y los heterocigóticos S1S2, con valores de $3,1 \pm 1,6$ y $4,2 \pm 1,8$, respectivamente ($p < 0,05$), es decir, los sujetos S1S2 presentaban resistencia insulínica, ya que tenían un índice HOMA superior a 3,8 (fig. 23 y 24).

Tabla 25. Valores plasmáticos medios de glucosa e insulina basales y del índice HOMA en pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III.

Variables	S1S1 (n = 86)	S1S2 (n = 18)	Total (n = 104)	p
Glucemia basal (mg/dL)	$96,3 \pm 16,3$	$105,5 \pm 14,9$	$97,9 \pm 16,1$	$< 0,05$
Insulinemia basal (μ U/mL)	$13,1 \pm 5,5$	$16,0 \pm 4,5$	$13,6 \pm 5,3$	$< 0,05$
Índice HOMA	$3,1 \pm 1,6$	$4,2 \pm 1,8$	$3,3 \pm 1,6$	$< 0,05$

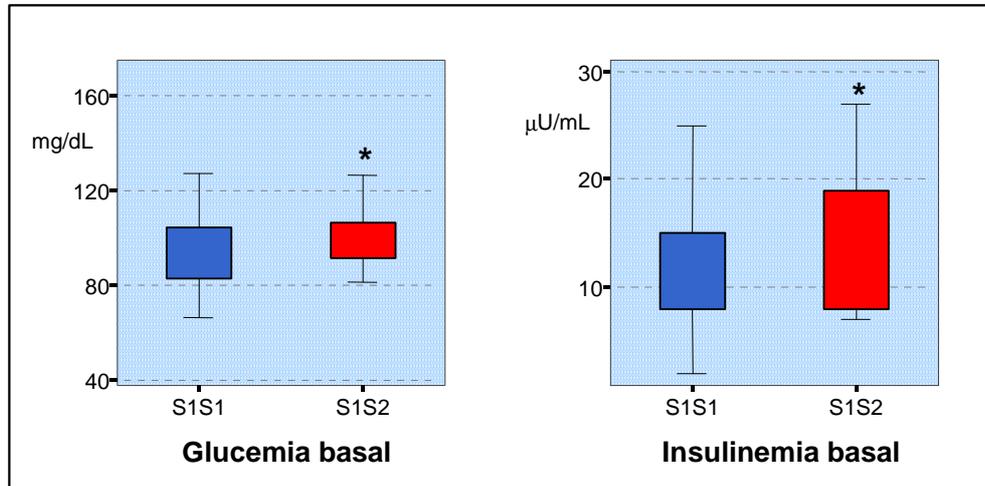


Fig. 23. Niveles plasmáticos medios de glucosa (mg/dL) e insulina ($\mu\text{U/mL}$) basales en pacientes hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. * $p < 0,05$.

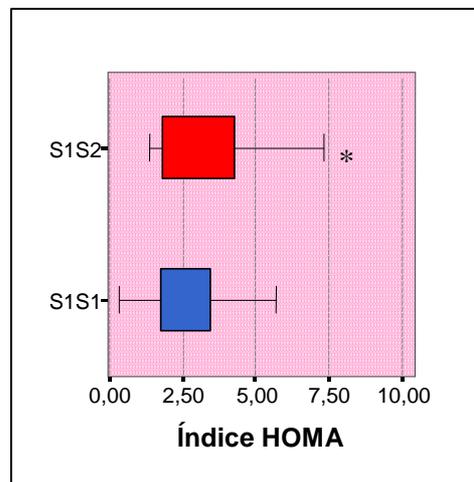


Fig. 24. Valores medios del índice HOMA en sujetos hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I del gen de la apo C-III. * $p < 0,05$.

9. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en el subgrupo de varones hipertensos esenciales.

En el subgrupo de 59 varones hipertensos esenciales se hallaron 48 individuos homocigotos para el alelo S1 (81,4%) y 11 heterocigotos S1S2 (18,6%). A continuación se exponen los resultados obtenidos en los hombres en función del genotipo Sst-I en las distintas variables analizadas.

9.1. Colesterol.

Los sujetos con el genotipo S1S2 presentaron un aumento significativo tan solo en los niveles de colesterol-VLDL ($36,1 \pm 22,5$ frente a $24,2 \pm 15,5$ mg/dL, con $p < 0,05$). En el resto de los valores lipoproteicos referentes al colesterol no se halla ninguna diferencia entre los individuos S1S1 y los heterocigotos S1S2 (tabla 26).

Tabla 26. Valores plasmáticos medios de colesterol total y fracciones lipoproteicas en los varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I.

HOMBRES	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	p
Colesterol total (mg/dL)	$221,2 \pm 48,8$	$240,7 \pm 64,4$	ns
Colesterol VLDL (mg/dL)	$24,2 \pm 15,5$	$36,1 \pm 22,5$	$< 0,05$
Colesterol LDL (mg/dL)	$131,2 \pm 45,5$	$150,5 \pm 48,9$	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	$44,1 \pm 14,3$	$45,6 \pm 12,4$	ns
Colesterol no HDL (mg/dL)	$160,4 \pm 49,8$	$189,4 \pm 61,6$	ns

ns = diferencias no significativas.

9.2. Triglicéridos.

Los valores de triglicéridos totales aparecen incrementados de manera significativa en los hombres S1S2 ($241,1 \pm 126,1$ frente a $166,6 \pm 101$ mg/dL, con $p < 0,05$), al igual que las cifras de las diferentes fracciones lipoproteicas: triglicéridos-VLDL ($166,9 \pm 101,7$ versus $117,3 \pm 76$, $p < 0,05$), triglicéridos-LDL ($46,8 \pm 26,6$ frente a $36,9 \pm 20,3$ mg/dL, $p < 0,05$) y triglicéridos-HDL ($24,9 \pm 6,7$ frente a $17,5 \pm 9,3$ mg/dL, $p < 0,05$) (fig. 25). Sin embargo, los valores del cociente Tg-VLDL/c-HDL no fueron diferentes entre los varones S1S1 y los heterocigóticos S1S2. Estos datos aparecen reseñados en la tabla 27.

Tabla 27. Valores plasmáticos medios de triglicéridos totales y fracciones lipoproteicas, y cociente Tg-VLDL/c-HDL en los varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I.

HOMBRES	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	P
Triglicéridos totales (mg/dL)	$166,6 \pm 101$	$241,1 \pm 126,1$	$< 0,05$
Triglicéridos VLDL (mg/dL)	$117,3 \pm 76$	$166,9 \pm 101,7$	$< 0,05$
Triglicéridos LDL (mg/dL)	$36,9 \pm 20,3$	$46,8 \pm 26,6$	$< 0,05$
Triglicéridos HDL (mg/dL)	$17,5 \pm 9,3$	$24,9 \pm 6,7$	$< 0,05$
Cociente Tg-VLDL / c-HDL	$3,16 \pm 2,67$	$4,09 \pm 2,78$	ns

Tg-VLDL = triglicéridos VLDL; c-HDL = colesterol HDL; ns = diferencias no significativas.

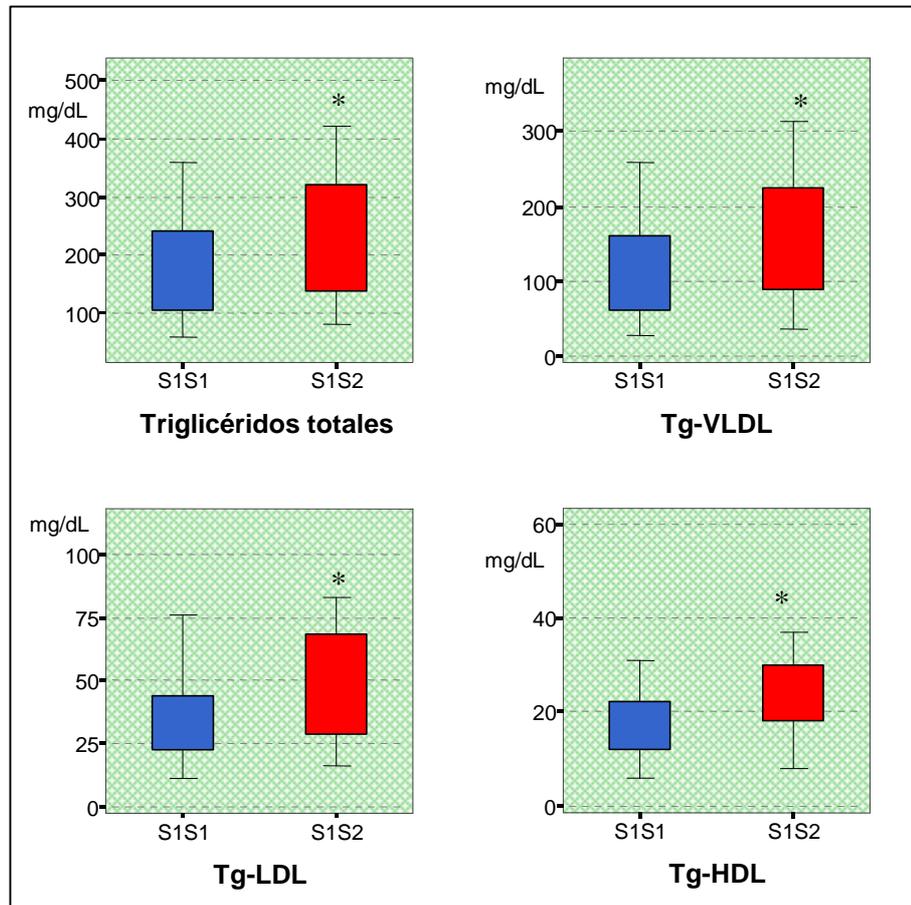


Fig. 25. Niveles plasmáticos medios de triglicéridos y fracciones lipoproteicas en el subgrupo de varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. Tg = triglicéridos. * $p < 0,05$.

9.3. Apoproteínas A-I y B.

Cuando se analizaron los valores plasmáticos medios de las apolipoproteínas A-I y B en el subgrupo de los hombres en función del genotipo Sst-I, se observó que no existía diferencia entre los individuos S1S1 y S1S2 (tabla 28).

Tabla 28. Valores plasmáticos medios de apo A-I y apo B en los varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I.

HOMBRES	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	p
Apo A-I (mg/dL)	119,3 ± 24,1	124,9 ± 22,5	ns
Apo B (mg/dL)	111,2 ± 29,8	119 ± 32,1	ns

ns = diferencias no significativas.

9.4. Índices aterogénicos.

Tampoco se aprecian diferencias en los valores obtenidos en el cálculo de los diferentes cocientes indicadores de riesgo cardiovascular, si bien las cifras de los cocientes colesterol total /c-HDL y c-LDL/c-HDL de los individuos S1S2 están elevadas, dentro del rango considerado con riesgo aterogénico. Estos datos aparecen expresados en la tabla 29.

Tabla 29. Valores medios de cocientes aterogénicos en los varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I.

HOMBRES	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	p
CT / c-HDL	5,21 ± 1,8	5,68 ± 2,03	ns
c-LDL / c-HDL	3,2 ± 1,5	3,9 ± 1,7	ns
c-LDL / Apo B	1,24 ± 0,24	1,3 ± 0,15	ns
Apo A-I / apo B	1,16 ± 0,39	1,06 ± 0,23	ns

CT = colesterol total; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL; ns = diferencias no significativas.

9.5. Metabolismo hidrocarbonado.

De igual manera, las variables referentes al metabolismo hidrocarbonado no ofrecieron diferencias significativas entre los sujetos heterocigóticos S1S2 y homocigóticos S1S1, tal y como se expresa en la tabla 30. Tampoco los valores del índice HOMA difieren entre los varones S1S1 y los heterocigóticos S1S2.

Tabla 30. Valores plasmáticos medios de glucosa e insulina basales y del índice HOMA en los varones hipertensos esenciales, según el genotipo Sst-I.

HOMBRES	S1S1 (n = 48)	S1S2 (n = 11)	p
Glucemia basal (mg/dL)	99,4 ± 18,7	102,7 ± 10,7	ns
Insulinemia basal (μU/mL)	14,2 ± 5,4	15,5 ± 5,7	ns
Índice HOMA	3,5 ± 1,7	3,9 ± 1,5	ns

ns = diferencias no significativas.

10. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales.

Si bien en el subgrupo de los varones, los sujetos S1S2 presentaban cifras más altas en tan solo tres de las variables analizadas (colesterol-VLDL, triglicéridos totales y triglicéridos-HDL), es destacable que en el subgrupo de las mujeres, con una muestra incluso más pequeña, la influencia del genotipo S1S2 se manifiesta con una mayor significación estadística en la mayoría de las variables estudiadas.

10.1. Colesterol.

Así, en cuanto al colesterol y sus fracciones lipoproteicas, las mujeres heterocigotas tenían cifras más elevadas de colesterol total ($266,1 \pm 37,1$ frente a $206,8 \pm 46$ mg/dL, con $p < 0,01$), colesterol-LDL ($160,5 \pm 52,5$ versus $122,6 \pm 38,7$ mg/dL, $p < 0,05$), colesterol-VLDL ($53,5 \pm 22,3$ frente a $15 \pm 11,3$ mg/dL, con $p < 0,001$) y colesterol no HDL ($231,6 \pm 33,3$ versus $144,5 \pm 44,1$ mg/dL, $p < 0,001$). No hubo diferencias en las cifras de colesterol-HDL (tabla 31, fig. 26).

Tabla 31. Valores plasmáticos medios de colesterol total y fracciones lipoproteicas en las mujeres hipertensas esenciales, según el genotipo Sst-I.

MUJERES	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
Colesterol total (mg/dL)	206,8 ± 46	266,1 ± 37,1	< 0,01
Colesterol VLDL (mg/dL)	15 ± 11,3	53,5 ± 22,3	< 0,001
Colesterol LDL (mg/dL)	122,6 ± 38,7	160,5 ± 52,5	< 0,05
Colesterol HDL (mg/dL)	59,4 ± 15,3	49 ± 16,5	ns
Colesterol no HDL (mg/dL)	144,5 ± 44,1	231,6 ± 33,3	< 0,001

ns = diferencias no significativas.

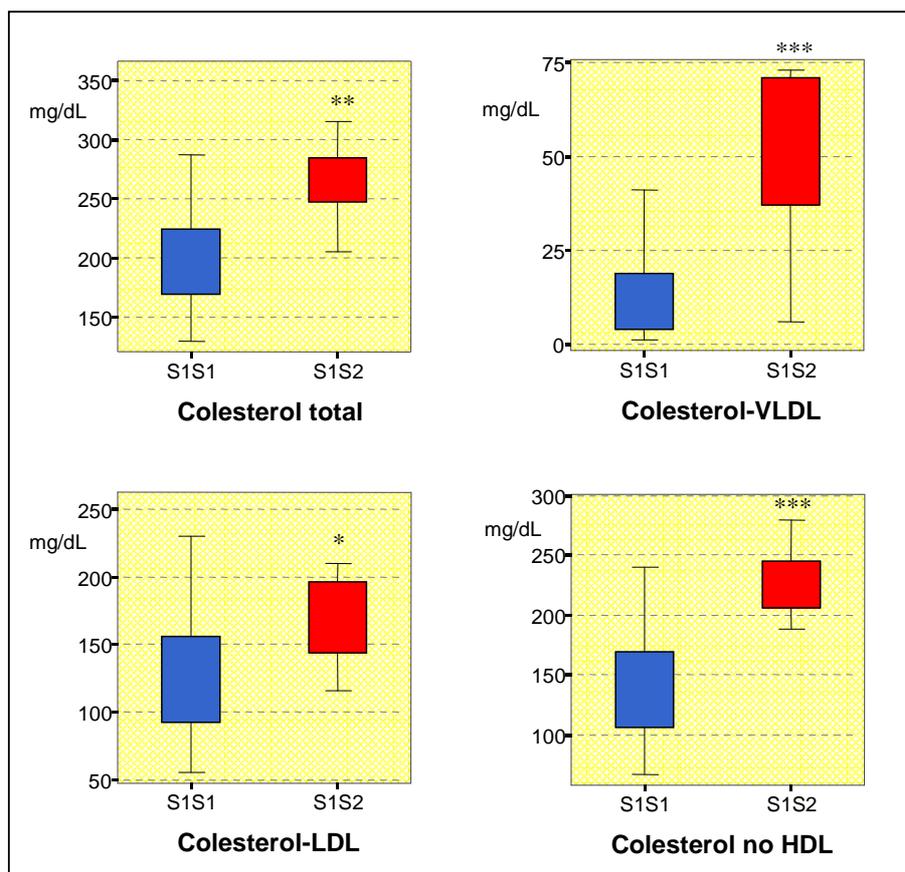


Fig. 26. Niveles plasmáticos medios de colesterol y fracciones lipoproteicas en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

10.2. Triglicéridos.

En cuanto a los niveles plasmáticos de triglicéridos y su distribución lipoproteica, existe una marcada diferencia entre ambos genotipos, con cifras más elevadas en las mujeres con el genotipo S1S2 (tabla 32). Los triglicéridos totales ($279,2 \pm 98,4$ frente a $96,8 \pm 49,8$ mg/dL, $p < 0,001$) están incrementados especialmente debido a la fracción vehiculizada por las partículas VLDL ($218,4 \pm 68,4$ versus $62,8 \pm 71,6$ mg/dL, con $p < 0,001$), aunque también están aumentados los niveles de triglicéridos-HDL ($24 \pm 6,9$ frente a $17,2 \pm 7,9$ mg/dL, $p < 0,05$) y de triglicéridos-LDL ($68,4 \pm 24,8$ versus $27,2 \pm 11,4$ mg/dL, con $p < 0,001$). Estos datos están representados en la figura 27.

Las mujeres S1S2 presentaron un valor significativamente más elevado del cociente Tg-VLDL/c-HDL ($5,28 \pm 2,01$ frente a $1,19 \pm 1,32$, con $p < 0,001$) (tabla 32, fig.28), reflejando una menor actividad de la LPL.

Tabla 32. Valores plasmáticos medios de triglicéridos totales y fracciones lipoproteicas, y cociente Tg-VLDL/c-HDL en las mujeres hipertensas esenciales, según el genotipo Sst-I.

MUJERES	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
Triglicéridos totales (mg/dL)	$96,8 \pm 49,8$	$279,2 \pm 98,4$	$< 0,001$
Triglicéridos VLDL (mg/dL)	$62,8 \pm 71,6$	$218,4 \pm 68,4$	$< 0,001$
Triglicéridos LDL (mg/dL)	$27,2 \pm 11,4$	$68,4 \pm 24,8$	$< 0,001$
Triglicéridos HDL (mg/dL)	$17,2 \pm 7,9$	$24 \pm 6,9$	$< 0,05$
Cociente Tg-VLDL / c-HDL	$1,19 \pm 1,32$	$5,28 \pm 2,01$	$< 0,001$

Tg-VLDL = triglicéridos-VLDL; c-HDL = colesterol-HDL; ns = diferencias no significativas.

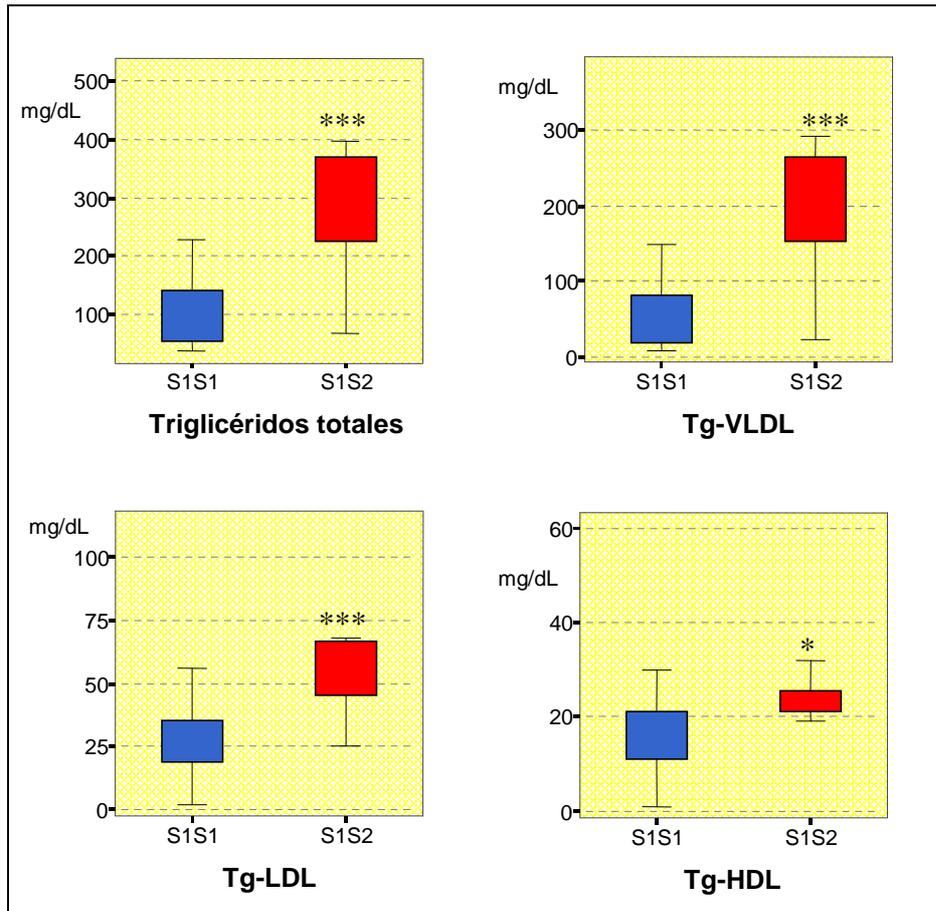


Fig. 27. Niveles plasmáticos medios de triglicéridos y fracciones lipoproteicas en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. Tg = triglicéridos.* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

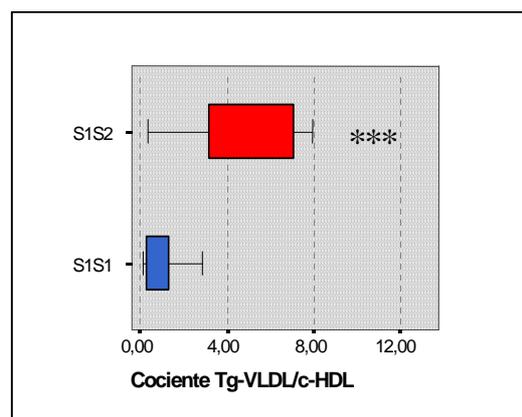


Fig. 28. Valor medio del cociente Tg-VLDL/c-HDL en mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. Tg = triglicéridos; c-HDL = colesterol-HDL. *** $p < 0,001$.

10.3. Apoproteínas A-I y B.

Los niveles de apoproteína B fueron significativamente más elevados en las mujeres S1S2 ($93,4 \pm 24$ frente a $146,6 \pm 34,9$ mg/dL, $p < 0,001$). No hubo diferencias en los niveles de apoproteína A-I entre ambos genotipos (tabla 33, fig.29).

Tabla 33. Valores plasmáticos medios de apo A-I y apo B en las mujeres hipertensas esenciales, según el genotipo Sst-I.

MUJERES	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
Apo A-I (mg/dL)	$136,2 \pm 20,8$	$150,1 \pm 23,9$	ns
Apo B (mg/dL)	$93,4 \pm 24$	$146,6 \pm 34,9$	$< 0,001$

ns = diferencias no significativas.

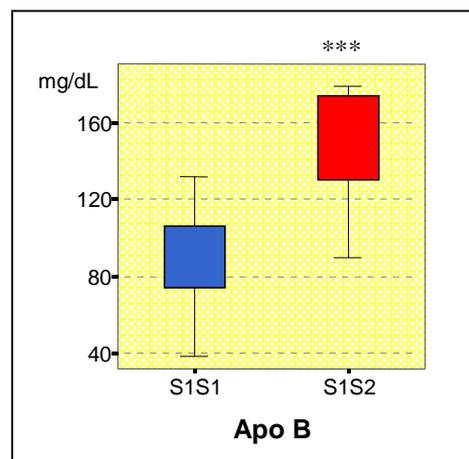


Fig. 29. Niveles plasmáticos medios de apo B en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. *** $p < 0,001$.

10.4. Índices aterogénicos.

Entre los índices aterogénicos calculados presentaban valores significativamente más altos en las pacientes S1S2 el cociente colesterol total/C-HDL ($6,3 \pm 1,9$ frente a $3,66 \pm 1,18$, $p < 0,01$) y el cociente c-LDL/c-HDL ($3,7 \pm 1,1$ versus $2,3 \pm 0,9$, con $p < 0,01$), mientras que el cociente apo A-I/apo B era significativamente más elevado en las mujeres S1S1 ($1,6 \pm 0,48$ frente a $1,03 \pm 0,3$, $p < 0,001$). El cociente c-LDL/apo B no mostró diferencias entre ambos genotipos. Estos valores están recogidos en la tabla 34 y representados gráficamente en la figura 30.

Tabla 34. Valores medios de cocientes aterogénicos en las mujeres hipertensas esenciales, según el genotipo Sst-I.

MUJERES	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
CT /c-HDL	$3,66 \pm 1,18$	$6,3 \pm 1,9$	$< 0,01$
c-LDL / c-HDL	$2,3 \pm 0,9$	$3,7 \pm 1,1$	$< 0,01$
c-LDL / Apo B	$1,4 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,3$	ns
Apo A-I / apo B	$1,6 \pm 0,4$	$1,03 \pm 0,3$	$< 0,001$

CT = colesterol total; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL; ns = diferencias no significativas.

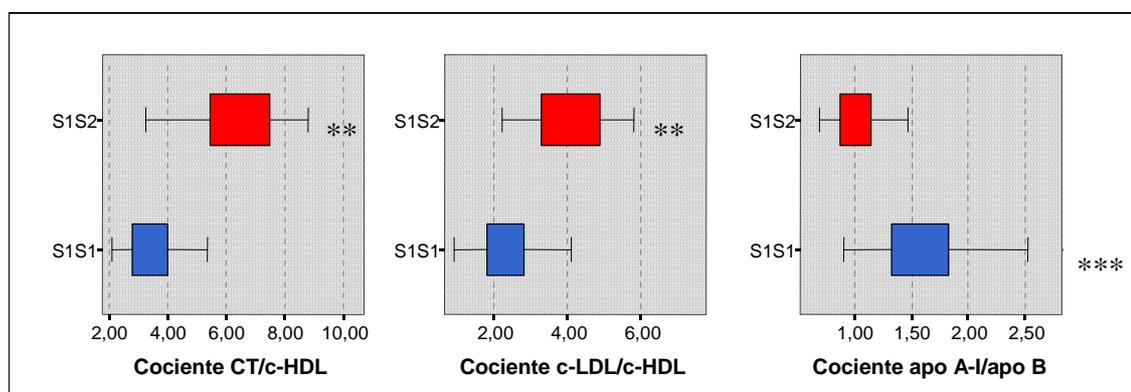


Fig. 30. Valores medios de cocientes aterogénicos en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. ** $p < 0,01$.

10.5. Metabolismo hidrocarbonado.

Los niveles basales de glucosa e insulina también aparecen aumentados de forma significativa en las mujeres heterocigotas S1S2 ($92 \pm 11,1$ frente a $110,6 \pm 10,3$ mg/dL para la glucemia, con $p < 0,01$, y $11,5 \pm 5,4$ frente a $16,5 \pm 5,1$ mg/dL para la insulinemia, con $p < 0,05$). También el índice HOMA es significativamente mayor en las mujeres S1S2 ($4,5 \pm 1,8$ frente a $2,6 \pm 1,3$, $p < 0,001$), lo que indica que presentan una mayor resistencia a la insulina (tablas 35, figuras 31 y 32).

Tabla 35. Valores plasmáticos medios de glucosa e insulina basales y del índice HOMA en las mujeres hipertensas esenciales, según el genotipo Sst-I.

MUJERES	S1S1 (n = 38)	S1S2 (n = 7)	p
Glucemia basal (mg/dL)	$92 \pm 11,1$	$110,6 \pm 10,3$	$< 0,01$
Insulinemia basal (μ U/mL)	$11,5 \pm 5,4$	$16,5 \pm 5,1$	$< 0,05$
Índice HOMA	$2,6 \pm 1,3$	$4,5 \pm 1,8$	$< 0,001$

ns = diferencias no significativas.

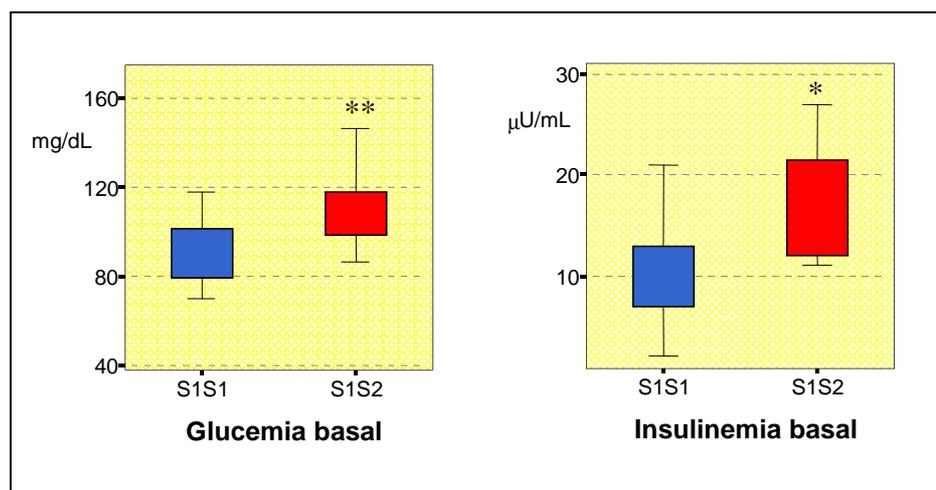


Fig. 31. Niveles plasmáticos medios de glucosa (mg/dL) e insulina (μ U/mL) basales en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. ** $p < 0,01$.

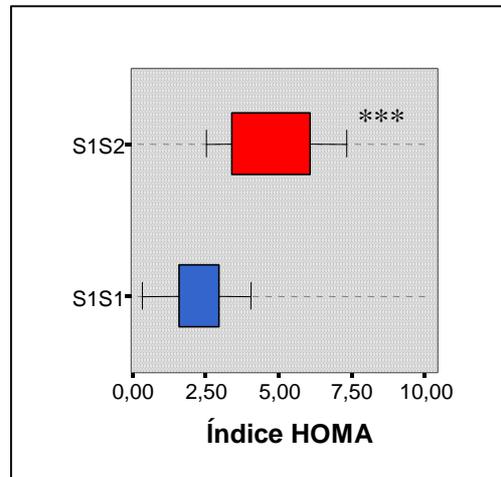


Fig. 32. Valores medios del índice HOMA en mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I del gen de la apolipoproteína C-III. *** $p < 0,001$.

11. Relación entre el metabolismo lipídico e hidrocarbonado.

En este apartado se analizó las correlaciones entre el índice HOMA y los diferentes parámetros lipídicos y aterogénicos estudiados en nuestra muestra de pacientes hipertensos esenciales y, la posible asociación entre la resistencia insulínica y la glucosa basal alterada con el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en función del sexo.

11.1. Correlación entre el índice HOMA y lípidos.

Al estudiar, en la muestra total de los pacientes hipertensos esenciales, la relación entre las variables lipídicas y del metabolismo hidrocarbonado, observamos que el índice HOMA, como marcador de resistencia insulínica, se correlacionaba con diversas variables lipídicas, tal y como queda reflejado en la tabla 36.

Tabla 36. Coeficientes de correlación Rho de Spearman entre el índice HOMA y variables lipoproteicas en pacientes hipertensos esenciales, según el sexo.

	Total (n = 104)	Hombres (n = 59)	Mujeres (n = 45)
c-VLDL	0,30 **	ns	0,46 **
c-HDL	- 0,25 **	ns	- 0,39 **
Triglicéridos totales	0,35 ***	ns	0,57 ***
Tg-VLDL/c-HDL	0,35 ***	ns	0,56 ***
CT/c-HDL	0,30 **	ns	0,49 **
c-LDL/c-HDL	0,26 **	ns	0,43 **
Apo B	0,23 *	ns	0,38 **
Apo A-I/Apo B	- 0,27 **	ns	- 0,43 **

CT = colesterol total; c-VLDL = colesterol-VLDL; c-LDL = colesterol-LDL; c-HDL = colesterol-HDL; Tg-VLDL = triglicéridos-VLDL; apo = apoproteína.
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns = diferencia no significativa.

Debemos destacar que, cuando se analiza estas asociaciones en los individuos hipertensos según el sexo, en el subgrupo de los varones no existe correlación significativa entre el índice HOMA y cualquiera de los parámetros lipídicos estudiados. Sin embargo, son las mujeres las que sí mantienen una asociación significativa entre el índice HOMA y el metabolismo lipídico, como se puede comprobar en la tabla anterior, incrementándose los valores absolutos de los coeficientes de correlación de Spearman. Es decir, las correlaciones en nuestros pacientes hipertensos esenciales aparecen a causa del subgrupo de las mujeres. Por ello, al considerar el conjunto de la muestra (n= 104) y englobar también al subgrupo de varones, observamos como los coeficientes de Spearman tienen valores absolutos inferiores.

En el subgrupo de las mujeres, podemos hablar de un grado bueno de correlación entre el índice HOMA y los triglicéridos totales (coeficiente de correlación de Spearman = 0,57, p < 0,001) y con el cociente Tg-VLDL/c-HDL (coeficiente de Spearman = 0,56, p < 0,001), ambos de signo positivo, es decir, cuanto mayor era el índice HOMA mayores eran los niveles plasmáticos de los triglicéridos totales y del cociente Tg-VLDL/c-HDL. En la

figura 33 aparece representado el diagrama de dispersión de los valores del índice HOMA y de los triglicéridos plasmáticos totales en las mujeres hipertensas.

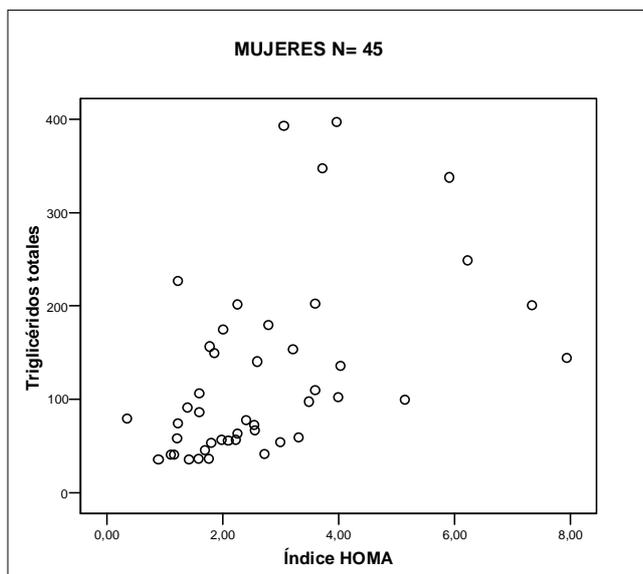


Fig. 33. Diagrama de dispersión entre el índice HOMA y los triglicéridos totales (expresados en mg/dL) en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales (n = 45). Coeficiente de correlación de Spearman = 0,57, $p < 001$.

El análisis de estas asociaciones según el genotipo Sst-I supone la estratificación en subgrupos de tamaños muy reducidos, lo que no permite sacar conclusiones biológicamente válidas sobre dichas correlaciones.

11.2. Asociación entre resistencia insulínica y glucosa basal alterada con el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III, en función del sexo.

Como anteriormente hemos mencionado, el índice HOMA es un indicador de resistencia insulínica (RI). Se considera que un individuo tiene una sensibilidad a la insulina dentro de la normalidad si su índice HOMA es inferior a 3,8, y con resistencia insulínica si dicho índice es igual o superior a 3,8³⁰⁷. Si clasificamos a los sujetos de

nuestro estudio en dos grupos según este criterio, podemos estudiar si el genotipo Sst-I se relaciona o no con la presencia de resistencia a la insulina. Al realizar la prueba de la χ^2 y el test exacto de Fisher sobre el total de los pacientes hipertensos esenciales de nuestro estudio, no se aprecia relación entre el genotipo Sst-I y la presencia de RI. Tampoco existe dicha relación en el subgrupo de los varones: de los 48 hombres S1S1, 14 tenían RI (29,2%); y de los 11 heterocigóticos S1S2, 2 individuos presentaban RI (18,2%) (fig. 34).

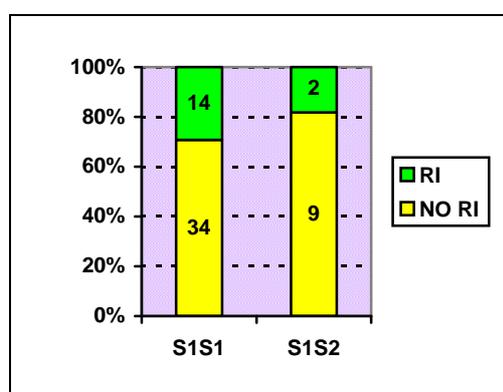


Fig. 34. Frecuencia de resistencia insulínica (RI) en los varones hipertensos esenciales. No existe diferencia significativa entre ambos subgrupos.

Sin embargo, en el subgrupo de las mujeres sí encontramos una asociación entre el genotipo Sst-I y la presencia de RI ($p < 0,01$): hallamos 4 mujeres con RI entre las 38 homocigóticas S1S1 (10,5%), y otras 4 mujeres con RI entre las 7 heterocigóticas S1S2 (57,1%). Es decir, el hecho de poseer un alelo u otro del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III se asocia con la presencia de RI en las mujeres. La razón de prevalencia calculada para esta asociación es de 11,3 (con un intervalo de confianza al 95% de 1,84 – 70), es decir, las mujeres hipertensas esenciales con el genotipo heterocigótico S1S2 tienen 11,3 veces más probabilidad de desarrollar RI que aquellas con el genotipo S1S1. Estos datos aparecen representados en las figuras 35.

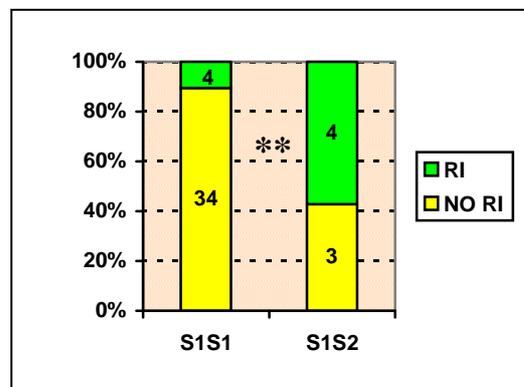


Fig. 35. Frecuencia de la resistencia insulínica (RI) en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I. ** $p < 0,01$.

De igual forma, se puede analizar la relación del polimorfismo Sst-I con la presencia de glucosa basal alterada (GBA). Este parámetro es un indicador de la intolerancia a los hidratos de carbono, y se considera normal si la cifra de glucemia basal es inferior a 100 mg/dL y alterada si su valor se encuentra dentro del intervalo 100 – 125 mg/dL¹⁴⁶. Como ocurría con el índice HOMA, tan solo en las mujeres se halla una asociación entre el genotipo Sst-I y la presencia de GBA ($p < 0,04$), con una razón de prevalencia de 8,75 (con un intervalo de confianza al 95% de 1,3 – 58,8), es decir, las mujeres con el alelo raro S2 tienen una probabilidad de 8,75 veces más que las mujeres homocigóticas S1 de presentar GBA. De las 38 mujeres S1S1, 3 (7,9%) presentaban GBA; también 3 mujeres tenían GBA de entre las 7 pacientes S1S2 (42,9%). En el caso de los hombres, de los 48 individuos homocigóticos S1S1, 6 presentaban GBA (12,5%), mientras que de los 11 heterocigóticos un solo sujeto tenía GBA (9,1%). Estos datos están representados en las figuras 36 y 37.

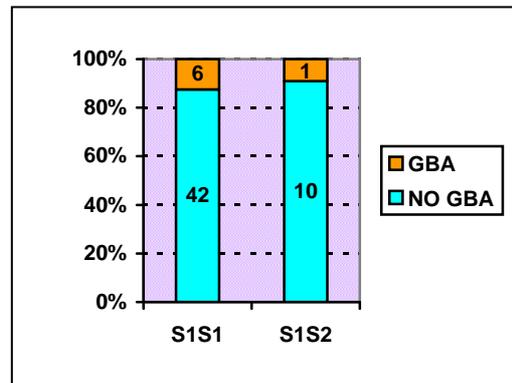


Fig. 36. Frecuencia de glucosa basal alterada (GBA) en el subgrupo de varones hipertensos esenciales según el genotipo Sst-I. No existe diferencia significativa entre ambos subgrupos.

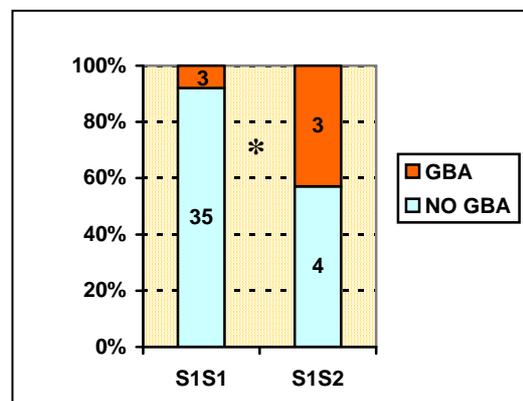


Fig. 37. Frecuencia de glucosa basal alterada (GBA) en el subgrupo de mujeres hipertensas esenciales según el genotipo Sst-I. * $p < 0,04$.

V

DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbimortalidad en los países industrializados, y entre sus principales factores de riesgo destaca la HTA por su alta prevalencia y su importante repercusión sanitaria, económica y social.

La HTA aumenta la morbimortalidad vascular debido a los cambios morfofuncionales que se producen en la pared vascular, relacionados bien directamente con las cifras elevadas de presión arterial o bien indirectamente a través del desarrollo del proceso aterosclerótico (base anatomopatológica común en la mayoría de las enfermedades vasculares). Todo ello está además potenciado por la frecuente asociación de la HTA con otros factores de riesgo, tales como alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, niveles disminuidos de c-HDL, aumento de c-LDL y obesidad. También hay que tener en cuenta que la interacción entre estos factores de riesgo no tiene un efecto sumativo, sino multiplicativo o exponencial, lo que otorga a la HTA una especial trascendencia como factor de riesgo cardiovascular.

La enfermedad cardiovascular es un desorden poligénico y multifactorial, es decir, es el resultado de la interacción de varios genes entre sí o de genes y factores ambientales que acaban produciendo una determinada manifestación fenotípica de la enfermedad. Entre estos “genes candidatos” se encuentran aquellos relacionados con el metabolismo lipídico, y dentro de estos, los genes que codifican a las proteínas constituyentes de las lipoproteínas. El conocimiento de la implicación de estos genes en el desarrollo del proceso aterosclerótico, de sus mutaciones y de las repercusiones clínicas de éstas, puede ayudar a establecer unos marcadores genéticos de riesgo cardiovascular.

La apolipoproteína C-III es una glicoproteína de 79 aminoácidos, sintetizada fundamentalmente en el hígado y, en menor medida en el intestino, que forma parte de la estructura de las VLDL y de las HDL. Juega un papel importante en el metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos, con un efecto opuesto a la apo C-II, es decir, inhibe la actividad de la LPL y la lipasa hepática, y también inhibe la captación hepática de los quilomicrones y VLDL mediada por la apo E. Por ambos motivos, se tiende a prolongar el

tiempo de estancia y la concentración de las VLDL en plasma. La ausencia de apo C-III se asocia a concentraciones muy reducidas de VLDL circulantes. De esta manera, los niveles plasmáticos de apo C-III se correlacionan positivamente con los triglicéridos totales en plasma.

Existe un polimorfismo en la región 3' no codificadora del gen de la apo C-III, reconocido por la endonucleasa Sst-I¹⁸³, distinguiéndose dos alelos, S1 y S2, y que dan lugar a tres posibles genotipos: S1S1, S1S2 y S2S2. Varios autores¹⁸⁸⁻²²⁴ han establecido una asociación del alelo raro S2 con mayores niveles de triglicéridos y un mayor riesgo de coronariopatía en diversos grupos de población (adultos sanos, niños en edad escolar, pacientes afectos de diabetes tipo 1 y 2, cardiopatía isquémica y dislipemias), pero hasta ahora no se había analizado este polimorfismo en sujetos hipertensos, siendo nuestro trabajo el primer estudio que ha valorado las relaciones del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III con el metabolismo lipoproteico y la resistencia insulínica en pacientes hipertensos esenciales.

1. Selección de los pacientes.

Los sujetos participantes en el estudio fueron seleccionados de las consultas externas de la Unidad de Hipertensión y Lípidos del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Inicialmente, sin considerar el genotipo de la apo E, fueron captados 142 pacientes hipertensos esenciales de reciente comienzo que cumplieran el resto de los criterios de inclusión establecidos en nuestro estudio. Entre estos criterios se estableció que los pacientes hipertensos esenciales debían poseer el genotipo 3/3 de la apo E (genotipo más frecuente en población general). Esto es así debido a la conocida influencia que ejerce sobre el perfil lipídico el tipo de alelos que posea el individuo en el gen de la apolipoproteína E. Se ha publicado que los sujetos hipertensos portadores de los alelos $\epsilon 2$ ó $\epsilon 4$ tienen, respectivamente, mejor o peor perfil lipídico y menor o mayor resistencia insulínica que aquellos con el alelo común $\epsilon 3$ ²⁷⁶. Por ello, para poder analizar la influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico sin la influencia de estas variantes de la apo E, fueron excluidos

todos aquellos sujetos que no poseían el genotipo E3/E3. Tras realizar el análisis del genotipo de la apo E, la muestra de pacientes quedó establecida en 104 pacientes hipertensos esenciales (73,2% del tamaño muestral inicial).

2. Características clínicas de los pacientes hipertensos esenciales.

Entre las características generales de la muestra debemos comentar la diferencia existente en la edad entre los hombres y las mujeres, siendo la edad media de éstas próxima a la menopausia ($46,8 \pm 10,9$ años). Es conocido el papel “protector” de los estrógenos en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares en las mujeres¹³⁵, asociándose a niveles más bajos de c-LDL, niveles más altos de c-HDL y una menor incidencia de cardiopatía isquémica. El déficit estrogénico causado por la menopausia constituye un factor de riesgo en sí mismo de enfermedad cardiovascular, independiente de otros factores de riesgo, que puede estar enmascarando o influyendo en los resultados obtenidos en nuestro estudio. En nuestra muestra 33 mujeres eran premenopáusicas, de las cuales 28 poseían el genotipo S1S1 y 5 el genotipo S1S2; de las 12 mujeres postmenopáusicas, 10 poseían el genotipo S1S1 y 2 el genotipo S1S2. Al comparar las variables analizadas en ambos grupos (premenopáusicas versus postmenopáusicas) no se halló diferencia significativa en ninguna variable entre ambos subgrupos, por lo que concluimos que la edad de las mujeres en este caso no actuó como variable confundente a la hora de interpretar los resultados.

Por otro lado, existen diferencias en la talla y el peso entre los varones y las mujeres, siendo éstas de menor peso y talla, como suele ser habitual en la población general. Sin embargo, no existe diferencia en el IMC entre ambos sexos ya que las mujeres eran más bajas pero también con menor peso que los hombres. También debemos comentar que nuestros pacientes hipertensos esenciales presentaban un sobrepeso grado II (preobesidad)³⁰⁸, con un IMC medio de $29,4 \pm 5,3$ Kg/m² ($29,4 \pm 3,9$ Kg/m² en varones y $28,7 \pm 6,8$ Kg/m² en mujeres). La obesidad es un factor de riesgo cardiovascular, si bien es difícil establecer su papel etiopatogénico ya que está íntimamente relacionada con otros factores de riesgo cardiovascular (dislipemias, HTA, trastornos del metabolismo

hidrocarbonado)¹⁴⁰. Este sobrepeso podría estar influyendo en los resultados obtenidos y alterar el perfil lipídico de los individuos independientemente del genotipo. Para comprobar este hecho se comparó el peso de los sujetos S1S1 y los heterocigóticos S1S2 y dentro de cada subgrupo según el sexo, hallándose que no existen diferencias significativas en el peso en cada uno de estos subgrupos, es decir, que todos están dentro del mismo grado de sobrepeso y, por tanto, de existir una influencia de la masa corporal sobre las variables estudiadas, esta variable está actuando de igual forma en todos los individuos, independientemente del sexo o del genotipo que tengan. Por otro lado, el sobrepeso hallado en estos pacientes es acorde con los datos recogidos en el estudio Al-Andalus 90¹¹⁹, donde se analiza la prevalencia de diversos factores de riesgo cardiovascular en población andaluza, a la que pertenece nuestra muestra de pacientes. En dicha publicación, el promedio de IMC en población general para sujetos con una edad similar a los de nuestro estudio es de $26,88 \pm 6,10 \text{ Kg/m}^2$ en varones y de $27,82 \pm 5,10 \text{ Kg/m}^2$ en mujeres. Estas cifras se ven incrementadas en población hipertensa, con un valor medio de IMC de $29,62 \pm 4,6 \text{ Kg/m}^2$ en individuos hipertensos no tratados, y de $28,96 \pm 4,22 \text{ Kg/m}^2$ en hipertensos tratados.

También se observa que la PAS es significativamente superior en las mujeres respecto a los hombres, quizás debido a la mayor edad media de las primeras, hecho que se observa en la población general: a mayor edad mayores niveles de presión arterial^{123, 134, 136}. Esta diferencia en la PAS no se observa cuando se comparan los genotipos.

3. Influencia del sexo sobre las variables bioquímicas estudiadas.

Es conocido que, independientemente de factores confundentes como la edad, el sexo, el IMC, el consumo de tabaco y alcohol, o el tratamiento antihipertensivo, los sujetos hipertensos tienen una tendencia a presentar niveles más elevados de colesterol total, c-LDL y triglicéridos y menores de c-HDL que la población normotensa¹⁷³, confiriéndoles un perfil lipídico de mayor riesgo aterogénico. En el presente trabajo, los niveles plasmáticos medios de colesterol total, c-LDL, c-HDL, triglicéridos totales, así como los cocientes CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL, apo A-I/apo B y Tg-VLDL/c-HDL obtenidos en

nuestros pacientes hipertensos esenciales son similares a los publicados por otros autores^{119, 161, 171, 177, 309}.

Para los parámetros lipídicos estudiados se aprecian diferencias por el sexo. Salvo para los valores de c-HDL, apo A-I y cociente apo A-I/apo B, los hombres presentaron niveles superiores en el resto de las variables lipídicas respecto a las mujeres. Esta influencia del sexo ha sido descrita igualmente en población general española menor de 60 años¹²³. Dallongeville et al²⁰¹ también encuentran resultados similares en una muestra de 1.195 individuos: los varones tenían cifras significativamente superiores de c-LDL, triglicéridos, apo B y apo C-III, mientras que las mujeres presentaban valores superiores de c-HDL y apo A-I. Russo et al²¹⁶, en 1.219 varones y 1.266 mujeres, hallan cifras significativamente superiores de c-LDL, triglicéridos, apo B y cociente CT/c-HDL en los hombres, y niveles más elevados de c-HDL y apo A-I en las mujeres. Debemos comentar que las cifras de apo A-I y apo B difieren ligeramente de las aportadas por otros autores en población hipertensa^{161, 177}, aunque se obtienen resultados similares en los valores del cociente apo A-I/apo B. La razón quizás sea la diferente técnica analítica utilizada para medir estas apoproteínas (inmunodifusión radial en Villar et al¹⁶¹ y Catalano et al¹⁷⁷; inmunoturbidimetría por autoanalizador en nuestro trabajo).

Respecto a las variables del metabolismo hidrocarbonado, las cifras de glucemia e insulinemia basales son acordes con el criterio de inclusión en nuestro estudio de ser pacientes hipertensos no diabéticos. En este sentido, no se ha demostrado que los sujetos hipertensos tengan cifras de glucemia superiores a los normotensos, aunque sí suelen presentar hiperglucemias postprandiales y niveles aumentados de glucosa e insulina plasmáticas tras sobrecarga oral de glucosa¹⁵². Pedro-Botet et al³⁰⁹ estudiaron la insulinemia en ayunas en 30 varones hipertensos esenciales no afectados de diabetes mellitus, encontrando unas cifras de glucemia e insulinemia basales de $89,2 \pm 9,9$ mg/dL y de $13,6 \pm 6,1$ μ U/mL, respectivamente. Los valores de insulinemia hallados en nuestro estudio son similares a estos, si bien, nuestras cifras de glucemia basal son ligeramente superiores ($97,9 \pm 16,1$ mg/dL), más próximas al valor medio de glucemia basal hallado en población hipertensa no tratada del estudio Al-Andalus¹¹⁹ ($104,76 \pm 45,85$ mg/dL). Por otro lado, en nuestro trabajo, la glucemia basal fue menor en las mujeres, hecho publicado

por otros autores y que parece estar relacionado con una mayor sensibilidad a la acción de la insulina en el sexo femenino^{149, 201}. A este respecto, también Russo et al²¹⁶ encuentran cifras de glucemia e insulinemia basales menores en las mujeres respecto a los varones.

Todo lo expuesto refleja lo que acontece en población general, donde las mujeres presentan un riesgo aterogénico medido por el perfil lipídico menor a los varones. En el subgrupo de hombres de nuestro trabajo, aun teniendo cifras medias de lípidos plasmáticos dentro del rango normal (pero en los límites altos), se ve una clara tendencia a un mayor riesgo aterogénico, manifestado por un incremento de los cocientes aterogénicos (índice CT/c-HDL con una media de $5,3 \pm 1,8$; cociente c-LDL/c-HDL con una media igual a $3,8 \pm 1,5$; y cociente apo A-I/ apo B con una media de $1,1 \pm 0,4$), respondiendo al patrón propio de los hipertensos.

4. Frecuencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III.

Existen grandes diferencias en las frecuencias alélicas del gen de la apo C-III entre los diferentes trabajos publicados, probablemente debido a la discrepancia en los criterios de selección de los sujetos participantes y tamaños muestrales de los estudios, o lo que parece la razón más poderosa, al origen étnico de los individuos seleccionados. En nuestra muestra de pacientes hipertensos esenciales, la frecuencia del alelo S2 fue 0,087, similar a las descritas previamente en población caucasiana^{186, 191, 193, 203, 228, 239, 254}, donde oscila entre 0,01 y 0,21. Uno de los trabajos con mayor tamaño muestral es el de Russo et al²¹⁶, donde analizan a 2.485 individuos de la cohorte de Framingham (1.219 hombres y 1.266 mujeres) hallando una frecuencia del alelo S2 de 0,085 en varones y 0,087 en mujeres, no habiendo diferencia significativa entre ambos sexos. En un estudio realizado sobre 1.029 individuos (449 hombres y 580 mujeres) de la costa mediterránea española, con características étnicas propias de nuestros pacientes, Corella et al¹⁸⁷ encuentran una frecuencia alélica S2 del 0,07, también sin que existiera diferencia en la distribución alélica entre los sexos, tal y como así sucede en nuestro trabajo.

Por otro lado, se ha descrito este polimorfismo con una distribución de frecuencias que responde al equilibrio de Hardy-Weinberg²⁴⁰, de manera que lo lógico hubiera sido encontrar en nuestro estudio algún individuo homocigótico para el alelo raro S2. Las razones que pudieran explicar la ausencia de sujetos S2S2 en nuestro trabajo creemos que son la baja frecuencia con que se ha descrito la presencia de individuos homocigóticos S2 (frecuencia genotípica de 0-0,01)^{182, 193, 203, 228} y el tamaño de nuestra muestra. Otros autores tampoco encontraron sujetos homocigóticos S2S2, por ejemplo, Hoffer et al¹⁹³ en una muestra de 209 caucasianos alemanes, Couillard et al²⁰⁷ en 122 varones con obesidad visceral, u Olivieri et al²²⁷ en 800 italianos de ambos sexos.

5. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico en pacientes hipertensos esenciales.

Diversos autores han asociado el alelo S2 con altas concentraciones de triglicéridos¹⁸⁸⁻²⁰⁷ y de colesterol total^{204, 208, 218-221}, presión arterial elevada²³⁵, e incremento del riesgo de enfermedad coronaria^{203, 230-235}. Igualmente, la coronariopatía ha demostrado ser más prevalente en personas diabéticas tipo 2 con este alelo²³⁵. La asociación del alelo S2 con hipertrigliceridemia encontrada en la mayoría de la población blanca no ha sido hallada por otros autores²⁰⁸⁻²¹¹, ni en sujetos de países orientales²¹²⁻²¹⁴. Las razones de estas discrepancias no son bien conocidas, pero sugieren fuertemente una interacción gen-ambiente que tendría un impacto sobre los efectos de este polimorfismo dependiendo del origen étnico-geográfico de la población estudiada.

Nuestros resultados indican que, independientemente del IMC y de la presión arterial, los sujetos hipertensos esenciales portadores del genotipo S1S2 tienen un peor perfil lipídico, con un incremento significativo de las cifras de colesterol total, c-VLDL, c-LDL, triglicéridos y todas sus subfracciones, y apolipoproteína B, así como valores claramente patológicos de los índices aterogénicos calculados. En este sentido, los portadores del alelo raro S2 son individuos con un mayor riesgo cardiovascular. Los niveles de c-HDL de los individuos heterocigóticos indican una tendencia más aterogénica que los individuos S1S1, aunque el análisis estadístico no demostró una diferencia

significativa ($51,2 \pm 16,6$ mg/dL en los S1S1 frente a $46,8 \pm 13,6$ mg/dL en los S1S2). Tampoco hay diferencia en los valores del cociente c-LDL/apo B, aunque se observa una tendencia a presentar partículas LDL más densas en los sujetos portadores del alelo raro S2 ($1,37 \pm 0,3$ en los homocigóticos S1 frente a $1,23 \pm 0,22$ en los heterocigóticos). Además, los individuos S1S2 presentaban cifras más elevadas del cociente Tg-VLDL/c-HDL, relacionado con los niveles más elevados de triglicéridos y reflejando un metabolismo alterado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y una menor actividad de la LPL²⁹⁷. Gaziano et al²⁹⁷ consideran que esta ratio refleja el riesgo de enfermedad coronaria, y el valor más alto de dicho cociente en nuestros pacientes S2 confirma el mayor riesgo aterogénico hallado por el perfil lipídico.

La sobreexpresión de apo C-III es el efecto principal del alelo S2^{15, 182, 227}. Debido a que parece que la apo C-III juega un papel regulador en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, inhibiendo la actividad de la LPL^{24, 31} y la captación hepática mediada por el receptor de la apo E^{15, 16}, creemos que las diferencias en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, en relación con el efecto de esta mutación sobre la concentración de apo C-III, puede explicar los efectos observados en los pacientes hipertensos. Esterbauer et al²²⁹ establecieron diferencias alélicas en la expresión del ARN-m de la apo C-III en hígado humano (el ARN-m codificado por el alelo S2 era más abundante) y sugirieron que tales diferencias podrían contribuir a las asociaciones del polimorfismo del gen de la apo C-III con la hipertrigliceridemia.

Nosotros creemos, ya que en nuestro estudio no medimos los niveles de apo C-III, que las diferencias en el perfil lipídico entre ambos genotipos se deben a cambios en la actividad enzimática y sobre todo de la LPL. De forma indirecta hemos observado como el cociente Tg-VLDL/c-HDL estaba aumentado en los sujetos que tenían el genotipo S1S2, sugiriendo una reducción de la actividad LPL en relación con la insulinoresistencia.

6. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III sobre el metabolismo hidrocarbonado en pacientes hipertensos esenciales.

Respecto al metabolismo hidrocarbonado debemos comentar que, aunque los valores basales de glucemia e insulinemia de nuestros pacientes están dentro de los límites normales, ya que los participantes en el estudio debían ser no diabéticos, los sujetos S1S2 tenían estos valores significativamente más elevados que los homocigóticos S1. Además, el índice HOMA, que refleja el grado de resistencia insulínica, aparece aumentado en los sujetos S2 con un valor medio de $4,2 \pm 1,8$, por encima del valor de 3,8, considerado normal³⁰⁷, es decir, nuestros pacientes hipertensos esenciales con el genotipo S1S2 presentaban una menor sensibilidad a la insulina. Este hecho también ha sido confirmado por otros autores^{248, 249} en varones jóvenes sanos, en los cuales, tras someterlos a una dieta rica en grasa saturada, comprobaron que los portadores del alelo S2 tenían una sensibilidad reducida a la acción periférica de la insulina. La razón de esta asociación entre el alelo S2 y la resistencia insulínica en nuestro estudio es independiente de la presión arterial y del IMC, ya que estas variables fueron similares en sujetos con los genotipos S1S1 y S1S2. A este respecto, ha sido previamente sugerido que los sujetos con el alelo S2 tienen una actividad más baja de LPL y una captación menos eficiente de VLDL por el hígado^{15, 24}. El incremento del índice Tg-VLDL/c-HDL en sujetos con el genotipo S1S2 (también hallado en nuestros pacientes) sugiere una reducción en la actividad LPL²⁹⁶, en relación con la resistencia insulínica, como anteriormente hemos comentado.

Algunos investigadores piensan que la presencia de altas concentraciones de triglicéridos circulantes podría conducir a resistencia insulínica^{162, 163}. El *pool* aumentado de partículas VLDL ricas en triglicéridos circulantes podría también incrementar las concentraciones de ácidos grasos libres en plasma por saturación de los mecanismos periféricos de eliminación y, así, contribuir al establecimiento de un estado de resistencia insulínica debido a que los ácidos grasos compiten con la glucosa como fuente de energía¹⁶⁴. También, en el hígado, un incremento de ácidos grasos disponibles produce un aumento de la gluconeogénesis¹⁶⁵.

Por otro lado, la insulina inhibe la secreción hepática de VLDL de forma indirecta a través de su acción antilipolítica sobre el tejido adiposo (inhibición de la lipasa hormonosensible y estimulación de la reesterificación), al mismo tiempo que estimula la actividad periférica de la LPL, permitiendo un aclaramiento rápido de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de la circulación. Sin embargo, niveles aumentados de insulina plasmática de manera crónica (hiperinsulinemia) producen una estimulación de la síntesis hepática de VLDL que, a la larga, induciría una resistencia insulínica en el tejido muscular (por competición entre los ácidos grasos y la glucosa como sustrato energético). De esta forma, se completaría un círculo vicioso con potencial aterogénico que podría conducir al desarrollo del síndrome metabólico^{162, 310}. Por ello, un estado de resistencia a la insulina se asocia a hipertrigliceridemia. En esta situación, las lipoproteínas ricas en triglicéridos intercambian los lípidos de sus núcleos con las HDL, proceso facilitado por la PTEC, dando como resultado un enriquecimiento de triglicéridos de las partículas HDL. Estas partículas serían catabolizadas más rápidamente que las HDL nativas, explicando los niveles más bajos de c-HDL propio de los estados de hipertrigliceridemia y resistencia insulínica³¹¹. Todo ello explica la relación entre dislipemia y resistencia insulínica antes citada.

Li et al⁴⁸ han demostrado que la insulina regula a la baja la transcripción del gen de la apo C-III al actuar sobre una zona de la región promotora de dicho gen, denominada elemento respondedor a insulina (IRE). Por otro lado, se han hallado dos mutaciones en este IRE⁴⁹⁻⁵¹ que conlleva a la ausencia de esta regulación, resultando en un incremento en la concentración plasmática de apo C-III^{50, 51}. Además, se ha encontrado que el alelo S2 está en desequilibrio de ligamiento con estas dos variantes localizadas en la región promotora del gen de la apo C-III⁴⁹. Este mecanismo podría explicar ampliamente las concentraciones más altas de triglicéridos registradas en estos estudios en los portadores del alelo S2, debido a que la sobreexpresión de apo C-III podría resultar en una inhibición aumentada de la LPL, y una captación hepática reducida de remanentes de quilomicrones y VLDL mediada por apo E. Por las razones anteriormente expuestas, la presencia de altas concentraciones de triglicéridos circulantes podría conducir a la resistencia insulínica^{162, 163}. Nosotros creemos que la asociación del alelo S2 con la hipertrigliceridemia podría ser debida a la existencia de un elemento respondedor a la insulina defectivo en la región del

promotor de la apo C-III, no pudiéndose llevar a cabo la regulación a la baja por la insulina con la consiguiente sobreexpresión del gen de la apo C-III, como demostró Li et al⁵⁰. A este respecto, también es posible que modificaciones en la producción de apo C-III en respuesta a cambios en la concentración de insulina pudiera haber tenido un efecto en los resultados observados en este estudio.

Por otro lado, el proceso de regulación de la transcripción del gen de la apo C-III implica una compleja maquinaria de factores de transcripción y elementos reguladores⁶¹ cuyo conocimiento aún es limitado. Los avances en la comprensión de este complejo proceso puede permitir en el futuro saber el papel que desempeña el polimorfismo Sst-I en la expresión del gen de la apolipoproteína C-III.

7. Influencia del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en pacientes hipertensos esenciales según el sexo.

No obstante, el hallazgo más destacable de nuestro trabajo fue la fuerte influencia del sexo en los efectos del polimorfismo Sst-I sobre los lípidos plasmáticos y la resistencia insulínica en los sujetos hipertensos esenciales. En los hombres, el genotipo S1S2 sólo presentó diferencias significativas en el colesterol-VLDL y en los triglicéridos y sus subfracciones lipoproteicas. En el resto de las variables, el alelo S2 presentaba una tendencia a un peor perfil lipídico pero sin tener diferencias significativas con los sujetos S1S1; los índices aterogénicos (CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL, apo A-I/apo B) eran ligeramente patológicos pero sin haber diferencias entre los S1 y los S2. Respecto al metabolismo hidrocarbonado, no existen diferencias en los valores de glucemia e insulinemia basales entre los varones homocigóticos S1 y los S1S2; el índice HOMA de los heterocigóticos está en el límite de la resistencia insulínica, aunque sin ser diferente de los S1S1. En la mayoría de los trabajos publicados^{194, 200, 201, 215}, el alelo S2 tan solo se asocia con mayores niveles de triglicéridos plasmáticos en el sexo masculino, si bien otros autores han hallado diferencias significativas en otras variables lipídicas y lipoproteicas respecto a los varones S1S1. Así, Couillard et al²⁰⁷ asocian el alelo raro S2 con mayores niveles de triglicéridos y c-VLDL y menores de c-LDL y c-HDL. Shoulders et al¹⁸²

encuentran que los hombres S2 tenían cifras superiores de colesterol total, apo C-III y apo B. Porkka et al²⁰⁸ hallan una asociación del polimorfismo Sst-I con mayores niveles de colesterol total y c-LDL. Russo et al²¹⁶ asocian el alelo S2 con niveles disminuidos de c-HDL, valores de insulinemia basal aumentados y menor diámetro de las partículas LDL. Sin embargo, Kee et al²³⁶, en una muestra de 614 hombres, no hallaron asociación del alelo S2 con ninguna variable lipídica.

Por el contrario, en las mujeres el alelo S2 se mostró con una gran influencia sobre los parámetros estudiados. Así, existen diferencias significativas en los triglicéridos y colesterol vehiculizados por todas las fracciones lipoproteicas (con las excepciones del c-HDL y de la apo A-I), así como en los cocientes Tg-VLDL/c-HDL, CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL y apo A-I/apo B. Además, los valores fueron claramente patológicos en el colesterol total, c-VLDL y colesterol-no HDL, así como en los triglicéridos, apo B y los índices aterogénicos.

En cuanto a las variables del metabolismo hidrocarbonado, existen diferencias significativas en la glucemia e insulinemia basales entre las mujeres S1 y las S2, con valores superiores en las heterocigóticas. Además, el índice HOMA es superior y claramente patológico en las mujeres S2, indicando una relación entre el alelo raro y la resistencia insulínica.

Nuestros resultados concuerdan con lo publicado por otros autores. Dallongeville et al²⁰¹, en una población del norte de Francia (590 hombres y 579 mujeres seleccionados del proyecto MONICA), demostraron la influencia del género sobre los efectos de varios polimorfismos del gen de la apo C-III, encontrando que las mujeres portadoras del alelo S2 presentaban niveles más elevados de triglicéridos y de apo B que aquellas con el genotipo S1S1, hecho que no acontecía en los varones. Russo et al²¹⁶ hallan niveles más elevados de triglicéridos en los sujetos S2, tanto hombres como mujeres, pero sólo en éstas eran significativos; en este subgrupo femenino, el alelo S2 también se asoció con niveles superiores de colesterol total, c-LDL y apo B. Por el contrario, en población inglesa sin dislipemia, Shoulders et al¹⁸² observan niveles más elevados de colesterol total y apo C-III, y mayores niveles de triglicéridos pero sin alcanzar la significación estadística, en las

mujeres S2. También Kessling et al²⁴⁰ observaron un efecto más pequeño del genotipo S1S2 sobre los lípidos plasmáticos en hombres que en mujeres. Sin embargo, estos autores no estudiaron la distribución alélica de la apo E en sus individuos. Nosotros pensamos que una posible explicación a la controversia entre los diferentes autores sobre el efecto del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en las mujeres puede ser precisamente el hecho de no considerar a otros genes con mutaciones con una clara influencia sobre el perfil lipídico, como es el caso del gen de la apo E. A este respecto, se ha publicado que el alelo $\epsilon 4$ influye fuertemente en los lípidos plasmáticos y la resistencia insulínica en hipertensión²⁷⁶. Ahora hemos descrito diferencias de género mucho más marcadas cuando incluimos sólo sujetos con el genotipo común apo E3/E3, indicando así que el efecto observado de la mutación S1S2 no está influenciado por la distribución alélica de la apo E. Por otra parte, cuando se compara con sujetos S1S1, los niveles de glucosa e insulina basales fueron significativamente mayores en las mujeres con el genotipo S1S2, pero esta diferencia no existió en hombres. Esto parece sostener que el peor perfil lipoproteico plasmático observado en mujeres con la mutación S1S2 está influido, al menos en parte, por una mayor prevalencia de resistencia insulínica en mujeres con la mutación. La relación entre la hiperinsulinemia y el alelo raro S2 también ha sido establecida por Sijbrands et al²⁰⁶ en individuos homocigotos del alelo 2 del gen de la apo E, donde hallaron que el alelo S2 se relacionaba con un incremento de triglicéridos transportados por las VLDL en el subgrupo con hiperinsulinemia, pero no en el subgrupo con los niveles plasmáticos de insulina normales.

El análisis de las correlaciones entre el índice HOMA y las variables lipídicas estudiadas en nuestro trabajo confirma la asociación entre resistencia insulínica y dislipemia previamente comentadas. Así, el índice HOMA se correlacionaba positivamente con el c-VLDL, triglicéridos totales, cocientes Tg-VLDL/c-HDL, CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL y apo B, y de forma negativa con el c-HDL y el cociente apo A-I/apo B. Cuando se analiza estas correlaciones en nuestro grupo de pacientes hipertensos esenciales en función del sexo, apreciamos como es el subgrupo de mujeres el responsable de estas asociaciones. En los varones, sólo los individuos S1S2 tienen una correlación significativa entre el índice HOMA y el cociente Tg-VLDL/c-HDL, no existiendo una asociación significativa con ninguna otra variable lipídica. En cambio, en las mujeres se alcanza un grado de

correlación bueno o moderado entre el índice HOMA y las variables lipídicas anteriormente señaladas. En el caso de las mujeres heterocigóticas S1S2 no se obtiene significación estadística en ningún coeficiente de correlación estudiado. Creemos que esto es debido al pequeño tamaño muestral de este subgrupo ($n = 7$).

Sin embargo, debemos destacar el papel que el alelo raro S2 demostró en el grupo de mujeres hipertensas esenciales con relación a la resistencia insulínica y a la glucosa basal alterada (GBA). De tal manera que aquellas pacientes con el genotipo S1S2 tenían 8,75 veces más probabilidad de presentar GBA y, 11,3 veces más probabilidad de presentar resistencia insulínica (medida por el índice HOMA) que aquellas con el genotipo S1S1. Este hecho no ocurría en los varones, lo que evidencia nuevamente la influencia del sexo sobre los efectos del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III.

Las razones precisas de las asociaciones del alelo raro S2 con las distintas variables analizadas en función del sexo no están claras. Una posible explicación es que las hormonas sexuales ejerzan una influencia sobre la tasa de producción o el catabolismo de las apolipoproteínas y las lipoproteínas y sobre el potencial papel de la apo C-III sobre el metabolismo lipoproteico en relación con el polimorfismo Sst-I. En este sentido, la LPL es una enzima determinante para la reserva intracelular de triglicéridos y su acción está influenciada por las hormonas sexuales, de tal forma que tanto los estrógenos como la progesterona estimulan a esta enzima¹³⁹. El probable déficit estrogénico de nuestras pacientes al tener una edad próxima a la menopausia podría condicionar en parte los resultados a través de la inhibición de la LPL, así como el posible incremento en los niveles de apo C-III (factor inhibidor de la LPL) secundario a la presencia del alelo S2 documentado por diversos autores^{182, 192, 207, 227, 228}. Todo ello concuerda con el menor cociente Tg-VLDL/c-HDL hallado en las mujeres S1S2 de nuestro trabajo.

En relación con nuestros datos que revelan un mayor efecto deletéreo del alelo raro S2 en las mujeres hipertensas respecto a los varones, debemos tener en cuenta algunas consideraciones sobre el sexo femenino. Según el informe SEA 2003¹²³ las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en el conjunto de la población española, con un porcentaje mayor en mujeres (55%) que en hombres (45%). Además, las

enfermedades del aparato circulatorio son responsables del 41% de la mortalidad por cualquier causa en las mujeres, mientras que en los varones sólo representan el 31%. Por otro lado, los factores de riesgo cardiovascular en la mujer presentan determinadas peculiaridades^{123, 312}: el abandono del consumo de tabaco está descendiendo de forma más lenta en las mujeres que en los varones, o incluso aumentando el hábito en las mujeres jóvenes; la prevalencia de la obesidad está creciendo y casi un 25% de las mujeres manifiestan no realizar actividad física regular; aproximadamente un 52% de las mujeres mayores de 45 años son hipertensas; casi el 40% de las mujeres de más de 55 años presentan niveles elevados de colesterol; el impacto relativo de la diabetes es mayor en la mujer que en el varón (con un incremento de 3-7 veces el riesgo de complicaciones cardiovasculares comparado con 2-3 veces en el hombre); los niveles bajos de c-HDL tienen un valor predictivo mayor en las mujeres mayores de 65 años que en los hombres de la misma edad; y en relación con los niveles de c-HDL, los triglicéridos pueden ser un factor de riesgo importante en la mujer. Además, los trastornos hormonales propios de la menopausia, ya sea espontánea o secundaria a cirugía o quimioterapia, condicionan un factor de riesgo en sí mismo de enfermedad cardiovascular. Por todo lo expuesto y, considerando los resultados de nuestro trabajo, pensamos que las mujeres hipertensas esenciales con el genotipo S1S2 del gen de la apo C-III constituyen un grupo con un mayor riesgo para desarrollar complicaciones cardiovasculares, y que requerirían de una especial atención a la hora del tratamiento y prevención de estas patologías.

En resumen, nuestros datos en un grupo de sujetos hipertensos esenciales, de reciente diagnóstico y no tratados, no diabéticos, portadores del genotipo E3/E3, claramente muestran que los sujetos con la mutación S1S2 del gen de la apo C-III tienen un peor perfil de lípidos plasmáticos y glucosa e insulina basales más altas que los sujetos sin la mutación. Estas diferencias son mucho más marcadas en el grupo femenino que en el masculino y no parecen estar influidas por la presión arterial ni por el IMC. La realización de estudios prospectivos ayudarían a aclarar si las mujeres con la mutación S1S2 tienen mayor riesgo vascular que los hombres con la misma mutación.

VI

CONCLUSIONES

1. La frecuencia del alelo S2 del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en nuestra muestra de pacientes hipertensos esenciales es de 0,087.
2. El polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III no modula los niveles de presión arterial sistólica ni diastólica en los pacientes hipertensos esenciales de reciente diagnóstico.
3. Los individuos con el genotipo S1S2 presentan cifras significativamente superiores de colesterol total, c-VLDL, c-LDL, triglicéridos totales y todas sus subfracciones lipoproteicas y apo B, así como valores más altos de los cocientes aterogénicos CT/c-HDL, c-LDL/c-HDL, y Tg-VLDL/c-HDL, e inferiores del cociente apo A-I/apo B.
4. Por primera vez en la literatura médica demostramos que los niveles plasmáticos de lípidos en los pacientes hipertensos esenciales que poseen el genotipo S1S2 reflejan un peor perfil lipídico y/o aterogénico, independientemente del IMC y de la presión arterial, que en los sujetos S1S1.
5. Respecto al metabolismo hidrocarbonado, los sujetos hipertensos esenciales con el genotipo S1S2 presentan cifras significativamente superiores de glucemia e insulinemia basal que los homocigóticos S1, así como un mayor índice HOMA, indicador de resistencia insulínica.
6. Hemos hallado una marcada influencia del sexo sobre el comportamiento del polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III en los pacientes hipertensos esenciales, confiriendo a las mujeres un mayor riesgo aterogénico que a los hombres, en función de un peor perfil lipídico y una sensibilidad a la insulina alterada.
7. En el subgrupo de varones no encontramos relación entre el polimorfismo Sst-I del gen de la apo C-III y la presencia de resistencia insulínica o de glucosa basal alterada.
8. Las mujeres hipertensas esenciales que poseen el genotipo S1S2 tienen 11,3 veces más probabilidad de presentar resistencia insulínica y 8,75 veces más probabilidad de padecer glucosa basal alterada que aquellas con el genotipo S1S1.

VII

ABREVIATURAS

A	Adenina
ABCA1	Transportador 1 del casete de unión al ATP
ACAT	Acil-colesterol aciltransferasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AII	Angiotensina II
Ala	Alanina
apo	Apolipoproteína
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARN-m	ARN mensajero
ARN-t	ARN de transferencia
Asn	Asparragina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosintrifosfato
AVC	Accidente vascular cerebral
C	Citosina
C3IRE	Elemento respondedor a la insulina del promotor del gen de la apo C-III
CGEI	Captación de glucosa estimulada por insulina
c-HDL	Colesterol-HDL
c-LDL	Colesterol-LDL
CT	Colesterol total
c-VLDL	Colesterol-VLDL
DM	Diabetes mellitus
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Etilendiaminotetraacético
G	Guanina
GBA	Glucosa basal alterada
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFC	Hiperlipemia familiar combinada
HFN-4	Factor nuclear hepático-4
His	Histidina
HMC-CoA	β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A
HOMA	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
HRE	Elemento respondedor a insulina

HTA	Hipertensión arterial
HuCHITg	(ratones) transgénicos del gen de la apo C-III humana
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
IAM	Infarto agudo de miocardio
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de masa corporal
IRE	Elemento respondedor a insulina
kb	Kilobases
LCAT	Lecitin colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Lipasa hepática
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPDS	Suero deficitario en lipoproteínas
LPL	Lipoprotein lipasa
LRP	Proteína relacionada con el receptor de LDL
LSR	Receptor estimulador de la lipólisis
Lys	Lisina
Md	Mediana
MTHFR	Metiltetrahidrofolato reductasa
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P ₂₅	Percentil 25
P ₇₅	Percentil 75
PAD	Presión arterial diastólica
PAI-1	Factor inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAS	Presión arterial sistólica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR- α	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas tipo α
PTEC	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RI	Resistencia a la insulina
RXR	Receptor retinoideo X
SDS	Sodio duodecil sulfato
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SP1	Proteína estimuladora 1
SRA	Sistema renina-angiotensina

SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> clase B tipo 1
T	Timina
Tg	Triglicéridos
TGF- β	Factor estimulador transformante- β
Tg-HDL	Triglicéridos-HDL
Tg-LDL	Triglicéridos-LDL
Tg-VLDL	Triglicéridos-VLDL
Thr	Treonina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
U	Uracilo
USF	Factor estimulador <i>upstream</i> o secuencia arriba
Val	Valina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

VIII

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. *Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest 1995; 34: 1345-1353.
- ² Luc G, Bard JM, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, et al. *Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease : the PRIME Study*. Atherosclerosis 2002; 163: 377-384.
- ³ Shulman RS, Herbert PN, Fredrickson DS, Wehrly K, Brewer HB Jr. *Isolation and alignment of the tryptic peptides of alanine apolipoprotein, an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins*. J Biol Chem 1974; 249: 4969-4974.
- ⁴ Brewer HB Jr, Shulman R, Herbert P, Ronan R, Wehrly K. *The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apo C-III), an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins*. J Biol Chem 1974; 249: 4975-4984.
- ⁵ Levy-Wilson B, Appleby V, Protter A, Auperin D, Seilhamer JJ. *Isolation and DNA sequence of full-length cDNA for human preapolipoprotein C-III*. DNA 1984; 3: 359-364.
- ⁶ Karathanasis SK. *Apolipoprotein multigene family. Tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and A-IV genes*. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 6374-6378.
- ⁷ Harake B, Caines P, Thibert RJ, Cheung R. *A simple micromethod for rapid assesment of the distribution of apolipoprotein C isoforms in Very-Low-Density Lipoprotein*. Clin Biochem 1991; 24: 255-260.
- ⁸ Jabs HU, Assmann G. *Characterization of an apolipoprotein C-III mutant by high-performance liquid chromatography and time-of-flight secondary ion mass spectrometry*. J Chromatogr 1987; 414: 323-333.
- ⁹ Ito Y, Breslow JL, Chait BT. *Apolipoprotein C-III₀ lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure*. J Lipid Res 1989; 30: 1781-1787.
- ¹⁰ Bondarenko PV, Cockrill SL, Watkins LK, Cruzado ID, Macfarlane RD. *Mass spectral study of polymorphism of the apolipoproteins of very low density lipoprotein*. J Lipid Res 1999; 40: 543-555.
- ¹¹ Shachter NS. *Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism*. Curr Opin Lipidol 2001; 12: 297-304.
- ¹² Fang DZ, Liu BW. *Apolipoprotein C-III can specifically bind to hepatic plasma membranes*. Mol Cell Biochem 2000; 207: 57-64.
- ¹³ Jong MC, Havekes LM. *Insights into apolipoprotein C metabolism from transgenic and gene-targed mice*. Int J Tissue React 2000; 22: 59-66.
- ¹⁴ Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. *Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice*. Science 1990; 249: 790-793.
- ¹⁵ Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. *Mechanism of hipertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) C-III transgenic mice: diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate asociated with increased apo C-III and reduced apo E on the particles*. J Clin Invest 1992; 90: 1889-1900.
- ¹⁶ Aalto-Setälä K, Weinstock PH, Bisgaier CL, Wu L, Smith JD, Breslow JL. *Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apo C-III transgenic mice*. J Lipid Res 1996; 37: 1802-1811.

- ¹⁷ Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Shachter NS. *Chylomicronemia due to apolipoprotein C-III overexpression in apolipoprotein E-null mice*. J Clin Invest 1997; 99: 2672-2681.
- ¹⁸ Jong MC, Rensen PC, Dahlmans VE, van der Boom H, van Berkel TJ, Havekes LM. *Apolipoprotein C-III deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apo E knockout mice*. J Lipid Res 2001; 42: 1578-1585.
- ¹⁹ Hirano T, Takahashi T, Saito S, Tajima H, Ebara T, Adachi M. *Apoprotein C-III deficiency markedly stimulates triglyceride secretion in vivo: comparison with apoprotein E*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 281: E665-669.
- ²⁰ Brown V, Baginsky ML. *Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein*. Biochem Biophys Res Comm 1972; 46: 375-382.
- ²¹ Quarfordt SH, Michalopoulos G, Schirmer B. *The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat*. J Biol Chem 1982; 257: 14642-14647.
- ²² Catapano AL. *Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein C-II is modulated by the COOH terminal region of apolipoprotein C-III*. Chem Phys Lipids 1987; 45: 39-47.
- ²³ Forte TM, Nichols AV, Krauss RM, Norum RA. *Familial apolipoprotein A-I and apolipoprotein C-III deficiency. Subclass distribution, composition, and morphology of lipoproteins in a disorder associated with premature atherosclerosis*. J Clin Invest 1984; 74: 1601-1613.
- ²⁴ Ginsberg H, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, et al. *Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins C-III and A-I. Evidence that apolipoprotein C-III inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo*. J Clin Invest 1986; 78: 1287-1295.
- ²⁵ Kinnunem PK, Enholm C. *Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase*. FEBS Lett 1976; 65: 354-357.
- ²⁶ Albers JJ, Lin J, Roberts GP. *Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin cholesterol acyltransferase*. Artery 1979; 5: 61-69.
- ²⁷ Januzzi JL, Azrolan N, O'Connell A, Aalto-Setälä K, Breslow JL. *Characterization of the mouse apolipoprotein ApoA-1/ApoC-3 gene locus: genomic, mRNA, and protein sequences with comparisons to other species*. Genomics 1992; 14: 1081-1088.
- ²⁸ Osada J, Pocovi M, Nicolosi RJ, Schaefer EJ, Ordoñas JM. *Nucleotide sequences of the Macaca fascicularis apolipoprotein C-III and A-IV genes*. Biochim Biophys Acta 1993; 1172: 335-339.
- ²⁹ Yin Y, Olivercrona G. *Apolipoprotein C-III from guinea pig (Cavia porcellus) is shorter and less homologous than apolipoprotein C-III from other mammals*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 1999; 124: 157-161.
- ³⁰ Lambert DA, Smith LC, Pownall H, Sparrow JT, Nicolas JP, Gotto AM Jr. *Hydrolysis of phospholipids by purified milk lipoprotein lipase. Effect of apoprotein C-II, C-III, A and E, and synthetic fragments*. Clin Chim Acta 2000; 291: 19-33.
- ³¹ McConathy WJ, Gesquiere JC, Bass H, Tartar A, Fruchart JC, Wang CS. *Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III*. J Lipid Res 1992; 33: 995-1003.
- ³² Lins L, Flore C, Chapelle L, Talmud PJ, Thomas A, Brasseur R. *Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of the human apolipoprotein C-III*. Protein Eng 2002; 15: 513-520.
- ³³ Pullinger CR, Malloy MJ, Shahidi AK, Ghassemzadeh M, Duchateau P, Villagomez J, et al. *A novel apolipoprotein C-III variant, apoC-III(Gln38 → Lys), associated with moderate hypertriglyceridemia in a large kindred of Mexican origin*. J Lipid Res 1997; 38: 1833-1840.

- ³⁴ Liu H, Labeur C, Xu CF, Ferrell R, Lins L, Brasseur R, et al. *Characterization of the lipid-binding properties and lipoprotein lipase inhibition of a novel apolipoprotein C-III variant Ala23Thr*. J Lipid Res 2000; 41: 1760-1771.
- ³⁵ Von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. *Apolipoprotein C-III(Lys58 → Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia*. J Clin Invest 1991; 87: 1724-1731.
- ³⁶ Liu H, Talmud PJ, Lins L, Brasseur R, Olivecrona G, Peelman F, et al. *Characterization of recombinant wild type and site-directed mutations of apolipoprotein C-III: lipid binding, displacement of apoE, and inhibition of lipoprotein lipase*. Biochemistry 2000; 39: 9201-9212.
- ³⁷ Maeda H, Hashimoto RK, Ogura T, Hiraga S, Uzawa H. *Molecular cloning of a human apoC-III variant: Thr 74 → Ala 74 mutation prevents O-glycosylation*. J Lipid Res 1987; 28: 1405-1409.
- ³⁸ Roghani A, Zannis VI. *Mutagenesis of the glycosylation site of human ApoC-III. O-linked glycosylation is not required for ApoC-III secretion and lipid binding*. J Biol Chem 1988; 263: 17925-17932.
- ³⁹ Holdsworth G, Stocks J, Dodson P, Galton DJ. *An abnormal triglyceride-rich lipoprotein containing excess sialylated apolipoprotein C-III*. J Clin Invest 1982; 69: 932-939.
- ⁴⁰ Mann CJ, Troussard AA, Yen FT, Hannouche N, Najib J, Fruchart JC, et al. *Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor*. J Biol Chem 1997; 272: 31348-31354.
- ⁴¹ Ahn YS, Smith D, Osada J, Li Z, Schaefer EJ, Ordovás JM. *Dietary fat saturation affects apolipoprotein gene expression and high density lipoprotein size distribution in Golden Syrian hamsters*. J Nutr 1994; 124: 2147-2155.
- ⁴² Brousseau ME, Ordovás JM, Osada J, Fasulo J, Robins SJ, Nicolosi RJ, et al. *Dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are comparable in their effects on hepatic apolipoprotein-mRNA abundance and liver lipid concentrations when substituted for saturated fatty acids in Cynomolgus monkeys*. J Nutr 1995; 125: 425-436.
- ⁴³ Baroukh N, Ostos MA, Vergnes L, Recalde D, Staels B, Fruchart J, et al. *Expression of human apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in mice reduces atherogenesis in response to a high fat-high cholesterol diet*. FEBS Lett 2001; 502: 16-20.
- ⁴⁴ Radosavljevic M, Lin-Lee Y, Soyak SM, Strobl W, Seelos C, Gotto AM, et al. *Effect of sucrose diet on expression of apolipoprotein genes A-I, C-III and A-IV in rat liver*. Atherosclerosis 1992; 95: 147-156.
- ⁴⁵ Ostos MA, Recalde D, Baroukh N, Callejo A, Rouis M, Castro G, et al. *Fructose intake increases hyperlipidemia and modifies apolipoprotein expression in apolipoprotein AI-CIII-AIV transgenic mice*. J Nutr 2002; 132: 918-923.
- ⁴⁶ Nagasaki A, Kikuchi T, Kurata K, Masushige S, Hasegawa T, Kato S. *Vitamin A regulates the expression of apolipoprotein A-I and C-III genes in the rat*. Biochem Biophys Res Comm 1994; 205: 1510-1517.
- ⁴⁷ Ribalta J, Girona J, Vallve JC, La Ville AE, Heras M, Masana L. *Vitamin A is linked to the expression of the AI-CIII-AIV gene cluster in familial combined hyperlipidemia*. J Lipid Res 1999; 40: 426-431.
- ⁴⁸ Li WW, Leff T. *Regulation of apolipoprotein C-III gene transcription by insulin: characterization of an insulin response element in the C-III promoter*. Circulation 1994; 90: I-401.
- ⁴⁹ Dammerman MM, Sandkuijl LA, Halaas J, Chung W, Breslow JL. *An apolipoprotein C-III haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 4562-4566.

- ⁵⁰ Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Halaas JL, Breslow JL, et al. *A common variant of the apo C-III promoter associated with hypertriglyceridemia is defective in its transcriptional response to insulin.* *Circulation* 1994; 90: I-401.
- ⁵¹ Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T. *Common genetic variation in the promoter of the human apo C-III gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia.* *J Clin Invest* 1995; 96: 2601-2605.
- ⁵² Dallinga-Thie GM, Groennendijk M, Blom RN, De Bruin TW, De Kant E. *Genetic heterogeneity in the apolipoprotein C-III promoter and effects of insulin.* *J Lipid Res* 2001; 42: 1450-1456.
- ⁵³ Lin-Lee Y, Strobl W, Soyal SM, Radosavljevic M, Song M, Gotto AM Jr, et al. *Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III genes in rat liver.* *J Lipid Res* 1993; 34: 249-259.
- ⁵⁴ Tada H, Irie Y, Yagoro A, Ohya H, Hayashi S, Fushimi R, et al. *Serum concentration of apolipoproteins in patients with thyroid dysfunction.* *Thyroidology* 1994; 6: 93-97.
- ⁵⁵ Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Fruchart JC, Tailleux A, Fievet C, Auwerx J. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors reduce serum triglyceride levels through modulation of apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase.* *FEBS Lett* 1999; 452: 160-164.
- ⁵⁶ Andersson Y, Majd Z, Lefebvre AM, Martin G, Sechkin AV, Kosykh V, et al. *Developmental and pharmacological regulation of apolipoprotein C-II gene expression. Comparison with apo C-I and apo C-III gene regulation.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 115-121.
- ⁵⁷ Neve BP, Fruchart JC, Staels B. *Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis.* *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1245-1250.
- ⁵⁸ Fruchart JC, Staels B, Duriez P. *PPARs, metabolic disease and atherosclerosis.* *Pharmacol Res* 2001; 44: 345-352.
- ⁵⁹ Vu-Dac N, Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Kosykh V, Kooistra T, et al. *Retinoids increase human apo C-III expression at the transcriptional level via the retinoid X receptor. Contribution to the hypertriglyceridemic action of retinoids.* *J Clin Invest* 1998; 102: 625-632.
- ⁶⁰ Ogami K, Hadzopoulou-Cladars M, Cladars C, Zannis VI. *Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human apoC-III gene.* *J Biol Chem* 1990; 265: 9808-9815.
- ⁶¹ Zannis VI, Kan HY, Kritis A, Zanni E, Kardassis D. *Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes.* *Front Biosci* 2001; 6: D456-504.
- ⁶² Pastier D, Lacorte JM, Chambaz J, Cardot P, Ribeiro A. *Two initiator-like elements are required for the combined activation of the human apolipoprotein C-III promoter by upstream stimulatory factor and hepatic nuclear factor-4.* *J Biol Chem* 2002; 277: 15199-15206.
- ⁶³ Coste H, Rodríguez JC. *Orphan nuclear hormone receptor Rev-erbalpha regulates the human apolipoprotein C-III promoter.* *J Biol Chem* 2002; 277: 27120-27129.
- ⁶⁴ Gervaise N, Garrigue MA, Lasfargues G, Lecomte P. *Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes.* *Diabetologia* 2000; 43: 703-708.
- ⁶⁵ Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, et al. *VLDL, apolipoproteins B, C-III, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial.* *Circulation* 2000; 102: 1886-1896.
- ⁶⁶ Thompson GR. *Angiographic evidence for the role of triglyceride-rich lipoproteins in progression of coronary artery disease.* *Eur Heart J* 1998; 19(Suppl H): H31-36.

- ⁶⁷ Tsuji A, Ikeda N, Nakamura T. *Plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins and sudden cardiac death*. Int J Legal Med 1999; 112: 151-154.
- ⁶⁸ Florez H, Mendez AJ, Jones L, Goldberg RB. *Gender differences and diabetic status in the relationship of blood apolipoprotein C-III, free fatty acids and triglycerides in subjects at risk for glucose intolerance*. Invest Clin 1999; 40: 51-66.
- ⁶⁹ Barbagallo CM, Averna MR, Amato S, Marino G, Labisi M, Rao AC, et al. *Apolipoprotein profile in type II diabetic patients with and without coronary heart disease*. Acta Diabetol Lat 1990; 27: 371-377.
- ⁷⁰ Ikeda T, Ohtani I, Fujiyama K, Hoshino T, Tanaka Y, Tekeuchi T, Mashiba M. *Apolipoprotein levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus with clinical macroangiopathy*. Diabete Metab 1991; 17: 373-378.
- ⁷¹ Al Muhtaseb N, Al Yousuf AR, Bajaj JS. *Apolipoprotein A-I, A-II, B, C-II and C-III in children with insulin-dependent diabetes mellitus*. Pediatrics 1992; 89: 936-941.
- ⁷² Reaven GM, Mondon CE, Chen I, Breslow JL. *Hypertriglyceridemic mice transgenic for the human apolipoprotein C-III gene are neither insulin resistant nor hyperinsulinemic*. J Lipid Res 1994; 35: 820-824.
- ⁷³ Amaral ME, Oliveira HC, Carneiro EM, Delghingaro-Augusto V, Vieira EC, Berti JA, et al. *Plasma glucose regulation and insulin secretion in hypertriglyceridemic mice*. Horm Metab Res 2002; 34: 21-26.
- ⁷⁴ Atger V, Duval F, Frommherz K, Druke T, Lacour B. *Anomalies in composition of uremic lipoproteins isolated by gradient ultracentrifugation: relative enrichment of HDL in apolipoprotein C-III at the expense of apolipoprotein A-I*. Atherosclerosis 1988; 74: 75-83.
- ⁷⁵ Moberly JB, Attman PO, Samuelsson O, Johansson AC, Knight-Gibson C, Alaupovic P. *Apolipoprotein C-III, hypertriglyceridemia and triglyceride-rich lipoproteins in uremia*. Miner Electrolyte Metab 1999; 25: 258-262.
- ⁷⁶ Bonnet E, Ruidavets JB, Tuech J, Ferrieres J, Collet X, Fauvel J, et al. *Apolipoprotein C-III and E-containing lipoparticles are markedly increased in HIV-infected patients treated with protease inhibitors: association with the development of lipodystrophy*. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 296-302.
- ⁷⁷ Frank PG, Marcel YL. *Apolipoprotein A-I: structure-function relationships*. J Lipid Res 2000; 41: 853-872.
- ⁷⁸ Luc G, Bard JM, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Arveiler D, et al. *Value of HDL cholesterol, apolipoprotein A-I, lipoprotein A-I, and lipoprotein A-I/A-II in prediction of coronary heart disease: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: 1155-1161.
- ⁷⁹ Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Clavey V. *Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis*. Atherosclerosis 2002; 164: 1-13.
- ⁸⁰ Karathanasis SK, Yunis I, Zannis VI. *Structure, evolution and tissue-specific synthesis of human apolipoprotein A-IV*. Biochemistry 1986; 25: 3962-3970.
- ⁸¹ Duverger N, Tremp G, Caillaud J, Emmanuel F, Castro G, Fruchart JC, et al. *Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV*. Science 1996; 273: 966-968.
- ⁸² Warner MM, Guo J, Zhao Y. *The relationship between plasma apolipoprotein A-IV levels and coronary heart disease*. Chin Med J (Engl) 2001; 114: 275-279.
- ⁸³ Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. *An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing*. Science 2001; 294: 169-173.

- ⁸⁴ Van der Vliet HN, Groenink M, Leegwater A, Levels J, Reitsma P, Boers W, et al. *Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration*. *J Biol Chem* 2001; 276: 44512-44520.
- ⁸⁵ Sêda O, Sêdova L. *New apolipoprotein A-V: comparative genomics meets metabolism*. *Physiol Res* 2003; 52: 141-146.
- ⁸⁶ Pennacchio LA, Rubin EM. *Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 529.
- ⁸⁷ Knott TJ, Pease RJ, Powell LM, Wallis SC, Rall SC Jr, Innerarity TL, et al. *Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B*. *Nature* 1986; 323: 734-738.
- ⁸⁸ Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. *Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins*. *J Lipid Res* 2001; 42: 1346-1367.
- ⁸⁹ Davidson NO, Shelness GS. *Apolipoprotein B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation*. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 169-193.
- ⁹⁰ Anant S, Davidson NO. *Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing*. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 159-165.
- ⁹¹ Jackson C, Bruns G, Breslow JL. *Isolation and sequence of a human apolipoprotein C-II cDNA clone and its use to isolate and map to human chromosome 19 the gene for apolipoprotein C-II*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2945-2949.
- ⁹² Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. *Apolipoprotein D*. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1428: 185-198.
- ⁹³ Yang CY, Gu ZW, Blanco-Vaca F, Gaskell SJ, Yang M, Massey JB, et al. *Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links*. *Biochemistry* 1994; 33: 12451-12455.
- ⁹⁴ Mahley RW, Rall SC Jr. *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1: 507-537.
- ⁹⁵ Mehdi H, Nunn M, Steel DM, Whitehead AS, Perez M, Walker L, et al. *Nucleotide sequence and expression of the human gene encoding apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I)*. *Gene* 1991; 108: 293-298.
- ⁹⁶ Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, et al. *Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin)*. *Biochem J* 1999; 344: 375-383.
- ⁹⁷ Mead JR, Ramji DP. *The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis*. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 261-269.
- ⁹⁸ Santamarina-Fojo S, Lambert G, Hoeg JM, Brewer HB. *Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 267-275.
- ⁹⁹ Thuren T. *Hepatic lipase and HDL metabolism*. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 277-283.
- ¹⁰⁰ Istvan ES. *Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. *Am Heart J* 2002; 144 (6 Suppl): S27-32.
- ¹⁰¹ Zhang Z, Yamashita S, Hirano K, Nakagawa-Toyama Y, Matsuyama A, Nishida M, et al. *Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport*. *Atherosclerosis* 2001; 159: 67-75.

- ¹⁰² Strickland DK, Goniás SL, Argraves WS. *Diverse roles for the LDL receptor family*. Trends Endocrinol Metab 2002; 13: 66-74.
- ¹⁰³ Ordovás JM. *Genética de las hiperlipemias*. En: Carmena R, Ordovás JM (eds.). Hiperlipemias. Barcelona: Doyma, 1999; 47-49.
- ¹⁰⁴ Kounnas MZ, Loukinova EB, Stefansson S, Harmony JA, Brewer BH, Strickland DK, et al. *Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin*. J Biol Chem 1995; 270: 13070-13075.
- ¹⁰⁵ Tacke PJ, Hofker MH, Havekes LM, Willems van Dijk K. *Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism*. Curr Opin Lipidol 2001; 12: 275-279.
- ¹⁰⁶ Kim DH, Magoori K, Inoue TR, Mao CC, Kim HJ, Suzuki H, et al. *Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene*. J Biol Chem 1997; 272: 8498-8504.
- ¹⁰⁷ Platt N, Haworth R, Darley L, Gordon S. *The many roles of the class A macrophage scavenger receptor*. Int Rev Cytol 2002; 212: 1-40.
- ¹⁰⁸ Miyazaki A, Nakayama H, Horiuchi S. *Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products*. Trends Cardiovasc Med 2002; 12: 258-262.
- ¹⁰⁹ Ibrahimi A, Aburrad NA. *Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002; 5: 139-145.
- ¹¹⁰ Moestrup SK, Kozyraki R. *Cubilin, a high-density lipoprotein receptor*. Curr Opin Lipidol 2000; 11: 133-140.
- ¹¹¹ Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A. *Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors*. Biochim Biophys Acta 1996; 1300: 151-170.
- ¹¹² Jackson RL, Tajima S, Yamamura T, Yokohama S, Yamamoto A. *Comparison of apolipoprotein C-II deficient triacylglycerol-rich lipoproteins and trioleoylglycerol/phosphatidylcholine-stabilized particles as substrates for lipoprotein lipase*. Biochim Biophys Acta 1986; 875: 211-219.
- ¹¹³ Gibbons GF, Brown AM, Wiggins D, Pease R. *The roles of insulin and fatty acids in the regulation of hepatic very-low-density lipoprotein assembly*. J R Soc Med 2002; 95: 23-32.
- ¹¹⁴ Tulenko TN, Sumner AE. *The physiology of lipoproteins*. J Nucl Cardiol 2002; 9: 638-649.
- ¹¹⁵ Kwiterovich PO. *Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity*. Am J Cardiol 2002; 90(8A): 30-47.
- ¹¹⁶ Rader DJ. *High-density lipoproteins and atherosclerosis*. Am J Cardiol 2002; 90(8A): 62-70.
- ¹¹⁷ Pose A. *¿Qué significa factor de riesgo cardiovascular?* Med Clin (Barc) 1993; 101: 58-59.
- ¹¹⁸ Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. *Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology*. Circulation 1999; 100: 1481-1492.
- ¹¹⁹ Aranda P, Villar J (coord.). *Estudio epidemiológico andaluz sobre factores de riesgo cardiovascular. Estudio Al Andalus 90*. Sevilla: Consejería de Salud-Junta de Andalucía, 1993.
- ¹²⁰ Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC VII)*. JAMA 2003; 289: 2560-2571.

- ¹²¹ European Society of Hypertension – European Society of Cardiology Guidelines Committee. *2003 European Society of Hypertension – European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension*. J Hypertens 2003; 21: 1011-1053.
- ¹²² INTERSALT Cooperative Research Group. *INTERSALT: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hours urinary sodium and potassium excretion*. BMJ 1988; 297: 319-328.
- ¹²³ Villar F, Banegas JR, de Mata Donado J, Rodríguez F. *Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2003*. Madrid: Sociedad Española de Arteriosclerosis. 2003: 52-63.
- ¹²⁴ Banegas JR, Villar F, Pérez C, Jiménez R, Gil E, Muñoz J, et al. *Estudio epidemiológico de los factores de riesgo cardiovascular en la población española de 35 a 64 años*. Rev San Hig Púb 1993; 67: 419-445.
- ¹²⁵ MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, et al. *Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias*. Lancet 1990; 335: 765-774.
- ¹²⁶ Neaton JD, Wentworth D. *Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease*. Arch Intern Med 1992; 152: 56-64.
- ¹²⁷ SHEP Cooperative Research Group. *Prevention of stroke by antihypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension. Final results of the systolic hypertension in the elderly program (SHEP)*. JAMA 1991; 265: 3255-3264.
- ¹²⁸ Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Alderman MH. *Relation of pulse pressure and blood pressure reduction to the incidence of myocardial infarction*. Hypertension 1994; 23: 395-401.
- ¹²⁹ Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetière P, Guize L. *Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population*. Hypertension 1997; 30: 1410-1415.
- ¹³⁰ Collins R, MacMahon S. *Blood pressure, antihypertensive drug treatment and the risks of stroke and coronary heart disease*. Br Med Bull 1994; 50: 272-298.
- ¹³¹ World Health Organization – International Society of Hypertension. *Recomendaciones de 1999 para el tratamiento de la hipertensión*. Barcelona: Medical Trends, 1999; 3-9.
- ¹³² Franch O. *Lesiones cerebrales de la hipertensión arterial*. En: Rodicio JL, Romero JC, Ruilope M. Tratado de Hipertensión. 2ª ed. Madrid: Fundación para el Estudio de las Enfermedades Cardiovasculares. 1993; 315-319.
- ¹³³ Ferder L, Juncos LI. *El riñón en la hipertensión arterial esencial*. En: Rodicio JL, Romero JC, Ruilope M. Tratado de Hipertensión. 2ª ed. Madrid: Fundación para el Estudio de las Enfermedades Cardiovasculares. 1993; 327.
- ¹³⁴ Jover E. *Factores de riesgo cardiovascular en la infancia y adolescencia*. En: De Oya M, Garcés C (eds.). Enfermedades cardiovasculares. Nutrición, genética y epidemiología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid: Doyma. 2000; 7-28.
- ¹³⁵ Grupos de Trabajo en Hipertensión. *Hipertensión y riesgo cardiovascular en la mujer*. Madrid: Sociedad Española de Hipertensión – Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión. 2000: 3-13.
- ¹³⁶ Roeters JE, Tineke H, Willem D, van der Wall EE. *Risk factors for coronary heart disease: implications of gender*. Cardiovas Res 2002; 53: 538-549.
- ¹³⁷ Lane D, Beevers DG, Lip GY. *Ethnic differences in blood pressure and the prevalence of hypertension in England*. J Hum Hypertens 2002; 16: 267-273.

- ¹³⁸ Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. *A chimaeric 11-beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension*. *Nature* 1992; 355: 262-265.
- ¹³⁹ Pavón de Paz I, Alameda C, Olivas J, Monereo S. *La obesidad en diferentes épocas de la vida*. En: Moreno B, Monereo S, Alvarez J (eds.). *La obesidad en el tercer milenio*. Madrid: Médica Panamericana. 2005; 132-135.
- ¹⁴⁰ Sowers JR. *Obesity as a cardiovascular risk factor*. *Am J Med* 2003; 115: 37-41.
- ¹⁴¹ Sjostrom LV. *Morbidity of severely obese subjects*. *Am J Clin Nutr* 1992; 55 (2 Suppl): 508-515.
- ¹⁴² Schotte DE, Stunkard AJ. *The effects of weight reduction on blood pressure in 301 obese patients*. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1701-1704.
- ¹⁴³ Després JP. *Dyslipidaemia and obesity*. *Bailliere Clin Endoc* 1994; 8: 629-660.
- ¹⁴⁴ González O, García-Robles R. *Resistencia a la insulina, obesidad y riesgo cardiovascular*. En: Aranda P, Coca A, Palma JL, Plaza L (eds.). *Cuadernos Latinoamericanos de Hipertensión*. Madrid: Doyma. 1999; vol III: 115-127.
- ¹⁴⁵ Golay A, Felber JP. *Evolution from obesity to diabetes*. *Diabete Metab* 1994; 20: 3-14.
- ¹⁴⁶ Grupo para el Estudio de la Diabetes en Atención Primaria (Gedaps), Sociedad Española de Cardiología (SEC), Sociedad Española de Diabetes (SED), Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Documento de Consenso elaborado a propuesta de la SED. Gomis R (coord.). *Documento 2005 de consenso entre varias sociedades científicas sobre pautas de manejo del paciente diabético tipo 2 en España*. *Av Diabetol* 2005; 21: 193-238.
- ¹⁴⁷ Zavaroni I, Bonora E, Pagliara M, Dall'Aglio E, Luchetti L, Buonanno G, et al. *Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance*. *N Engl J Med* 1989; 321: 616-618.
- ¹⁴⁸ Després JP, Lamarche B, Mauriège P, Cantin B, Aduéñáis GR, Moorjani S, et al. *Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease*. *N Engl J Med* 1996; 334: 952-957.
- ¹⁴⁹ Scheidt-Nave C, Barret-Connor E, Wingard DL, Cohn BA, Edelstein SL. *Sex differences in fasting glycemia as a risk factor for ischemic heart disease death*. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 565-576.
- ¹⁵⁰ Cubeddu LX, Hoffmann IS. *Insulin resistance and upper-normal glucose levels in hypertension: a review*. *J Hum Hypertens* 2002; 16 (Suppl 1): S52-S55.
- ¹⁵¹ Reaven GM. *Role of insulin resistance in human disease*. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
- ¹⁵² Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. *Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (Syndrome X)*. *Diabetes* 1992; 41: 715-722.
- ¹⁵³ 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.
- ¹⁵⁴ International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome* [artículo en línea]. Disponible en www.idf.org/webdata/docs/Metac_syndrome_def.pdf.
- ¹⁵⁵ The National High Blood Pressure Education Program Working Group. *National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on Hypertension in Diabetes*. *Hypertension* 1994; 23: 145-155.

- ¹⁵⁶ Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. *Diabetes, hypertension and cardiovascular disease. An update.* Hypertension 2001; 37: 1053.
- ¹⁵⁷ Muller DC, Elahi D, Pratley RE, Tobin JD, Andres R. *An epidemiological test of the hyperinsulinemia-hypertension hypothesis.* J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 544-548.
- ¹⁵⁸ Espino-Montoro A, López-Miranda J, Castro P, et al. *Monounsaturated fatty acid enriched diets lower plasma insulin levels and blood pressure in healthy young men.* Nutr Metab Cardiovasc Dis 1996; 6: 147-154.
- ¹⁵⁹ Lind L, Berne C, Lithell H. *Prevalence of insulin resistance in hypertension.* J Hypertens 2000; 35: 451-456.
- ¹⁶⁰ DeFronzo RA, Ferrannini E. *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease.* Diabetes Care 1991; 14: 173-194.
- ¹⁶¹ Villar J, Muñoz O, Stiefel P, Miranda M, Jiménez L, Montilla C, et al. *Influencias de la hiperinsulinemia en el perfil lipídico de los pacientes hipertensos.* Med Clin (Barc) 1994; 103: 241-245.
- ¹⁶² Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, Baur LA. *High fat diet induced insulin resistance. Lessons and implications from animal studies.* Ann N Y Acad Sci 1993; 683: 82-90.
- ¹⁶³ Steiner G. *Altering triglyceride concentrations changes insulin-glucose relationships in hypertriglyceridemic patients.* Diabetes Care 1991; 14: 1077-1081.
- ¹⁶⁴ Randle PJ, Garland PB, Hales EA, Newsholme EA. *The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of the diabetes mellitus.* Lancet 1963; 1: 785-789.
- ¹⁶⁵ Bjontorp P. *Fatty acids, hyperinsulinemia, and insulin resistance: wich comes first.* Curr Opin Lipidol 1994; 5: 166-174.
- ¹⁶⁶ Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Multiple Risk Factor Intervention Trial. Risk factor changes and mortality results.* JAMA 1982; 248: 1465-1477.
- ¹⁶⁷ Plaza I, Villar F, Mata P, Pérez F, Maíquez A, Casasnovas JA, et al. *Control de la colesterolemia en España, 2000. Un instrumento para la prevención cardiovascular.* Rev Esp Cardiol 2000; 53: 815-837.
- ¹⁶⁸ Assmann G, Cullen P, Schulte H. *The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years.* Eur Heart J 1998; 19: 2-11.
- ¹⁶⁹ Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies.* Circulation 1989; 79: 8-15.
- ¹⁷⁰ Rubiés-Prat J, Pedro-Botet J. *Hipertrigliceridemia como factor de riesgo cardiovascular. ¿Fin de la controversia?* Med Clin (Barc) 2003; 120: 303-307.
- ¹⁷¹ Aranda P, Aranda J, Carmona J, Núñez D. *Relaciones entre colesterol y presión arterial en el estudio Málaga-86. ¿Algo más que una asociación casual?* Rev Clin Esp 1990; 187: 13-17.
- ¹⁷² Aranda P, Aranda FJ, López de Novales E. *Hipertensión arterial e hipercolesterolemia: interrelaciones clínico-terapéuticas.* J Hypertens (Ed. Esp.) 1994; 1: 207-210.
- ¹⁷³ Grupos de Trabajo en Hipertensión Arterial. *Hipertensión arterial y dislipemias.* Madrid: Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial. 1992: 10-15.
- ¹⁷⁴ Cía P. *Dislipemias e hipertensión arterial: asociación o coincidencia.* Med Clin (Barc) 2000; 115: 58-59.

- ¹⁷⁵ Working Group on Management of Patients with Hypertension and High Blood Cholesterol. *National Education Programs Working Group Report on the Management of Patients with Hypertension and High Blood Cholesterol*. Ann Intern Med 1991; 114: 224 – 237.
- ¹⁷⁶ Stiefel P, Montilla C, García-Morillo S, Pamies E, Miranda ML, Villar J. *Prevalencia de dislipemia y de sus distintos fenotipos en la hipertensión arterial esencial de comienzo reciente*. Med Clin (Barc) 2000; 115: 52-54.
- ¹⁷⁷ Catalano M, Aronica A, Carzaniga G, Seregni R, Libretti A. *Serum lipids and apolipoproteins in patients with essential hypertension*. Atherosclerosis 1991; 87: 17-22.
- ¹⁷⁸ Soria F, Valdés M. *Nuevos marcadores de riesgo en hipertensión arterial*. An Med Interna (Madrid) 2001; 18: 31-40.
- ¹⁷⁹ Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Biología celular y molecular*. Barcelona: Omega. 1993; 219-226.
- ¹⁸⁰ Espino A, López-Chozas JM. *Genética y cardiopatía isquémica*. En: Narbona Reina (ed.). Trabajos de investigación. Sevilla: Kronos. 2000; 465-494.
- ¹⁸¹ Bruns G, Karathanasis SK, Breslow JL. *Human apolipoprotein AI-CIII gene complex is located on chromosome 11*. Arteriosclerosis 1984; 4: 97-102.
- ¹⁸² Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, Gilligan M, Gambert P, Ball MJ. *Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII*. Atherosclerosis 1991; 87: 239-247.
- ¹⁸³ Karathanasis SK, Zannis VI, Breslow JL. *Isolation and characterization of cDNA clones corresponding to two different human apo C-III alleles*. J Lipid Res 1985; 26: 451-456.
- ¹⁸⁴ Goff SP, Rambach A. *SstI: a restriction endonuclease from Streptomyces sp. stanford*. Gene 1978; 3 (4): 347-352.
- ¹⁸⁵ Humphries SE. *DNA polymorphisms of the apolipoprotein genes. Their use in the investigation of the genetic component of hyperlipidaemia and atherosclerosis*. Atherosclerosis 1988; 72: 89-108.
- ¹⁸⁶ López-Miranda J, Jansen S, Ordovás JM, Salas J, Marín C, Castro P et al. *Influence of the Sst-I polymorphism at the apolipoprotein C-III gene locus on the plasma low-density-lipoprotein-cholesterol response to dietary monounsaturated fat*. Am J Clin Nutr 1997; 66: 97-103.
- ¹⁸⁷ Corella D, Guillén M, Sáiz C, Portolés O, Sabater A, Folch J et al. *Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus*. J Lipid Res 2002; 43: 416-427.
- ¹⁸⁸ Rees A, Shoulders C, Stocks J, Galton D, Baralle F. *DNA polymorphism adjacent to the human apolipoprotein A-I gene relationship to hypertriglyceridemia*. Lancet 1983; I: 444-446.
- ¹⁸⁹ Rees A, Stocks J, Sharpe R, Vella A, Shoulders C, Katz J, et al. *Deoxyribonucleic acid polymorphism in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster*. J Clin Invest 1985; 76: 1090-1095.
- ¹⁹⁰ Aalto-Setälä K, Kontula K, Sane T, Nieminen M, Nikkilä E. *DNA polymorphism of apolipoprotein A-I/C-III and insulin genes in familial hypertriglyceridemia and coronary heart disease*. Atherosclerosis 1987; 66: 145-152.
- ¹⁹¹ Tybjaer-Hansen A, Nordestgaard B, Verdes L, Faergeman O, Humphries SE. *Genetic markers in the apo AI-CIII-AIV gene cluster for combined hyperlipidemia, hypertriglyceridemia, and predisposition to atherosclerosis*. Atherosclerosis 1993; 100: 157-159.

- ¹⁹² Shoulders CC, Grantham TT, North JD, Gaspardone A, Tomai F, de Fazio A, Gioffre PA, Cox NJ. *Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein C-III gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children.* Hum Genet 1996; 98(5): 557-566.
- ¹⁹³ Hoffer MJ, Sijbrands EJ, De Man FH, Havekes LM, Smelt AH, Frants RR. *Increased risk for endogenous hypertriglyceridaemia is associated with apolipoprotein C3 haplotype specified by the SstI polymorphism.* Eur J Clin Invest 1998; 28(10): 807-812.
- ¹⁹⁴ Waterworth DM, Talmud PJ, Bujac SR, Fisher RM, Millar GJ, Humphries SE. *Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2663-2669.
- ¹⁹⁵ Tas S. *Strong association of a single nucleotide substitution in the 3' untranslated region of the apolipoprotein C-III gene with common hypertriglyceridemia in Arabs.* Clin Chem 1989; 35: 256-259.
- ¹⁹⁶ Zeng Q, Dammerman M, Takada Y, Matsunaga A, Breslow JL, Sasaki J. *An apolipoprotein C-III marker associated with hypertriglyceridemia in Caucasians also confers increased risk in a west Japanese population.* Hum Genet 1995; 95: 371-375.
- ¹⁹⁷ Ko YL, Ko YS, Wu SM, Teng MS, Chen FR, Hsu TS, et al. *Interaction between obesity and genetic polymorphisms in the apolipoprotein C-III gene and lipoprotein lipase gene on the risk of hypertriglyceridemia in Chinese.* Hum Genet 1997; 100: 327-333.
- ¹⁹⁸ Zhu W, Feng N, Wang Y. *Variation of gene at the apolipoprotein C-III locus with the changes of serum lipid profile in school-aged children.* Wei Sheng Yan Jiu 2002; 31: 241-243 (abst.).
- ¹⁹⁹ Hong SH, Park WH, Lee CC, Song JH, Kim JQ. *Association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV cluster gene and hypertriglyceridemic subjects.* Clin Chem 1997; 43: 13-17.
- ²⁰⁰ Chhabra S, Narang R, Krishnan LR, Vasisht S, Agarwal DP, Srivastava LM, et al. *Apolipoprotein C3 SstI polymorphism and triglyceride levels in Asian Indians.* BMC Genetics 2002; 3: 9.
- ²⁰¹ Dallongeville J, Meirhaeghe A, Cottel D, Fruchart JC, Amouyel P, Helbecque N. *Gender related association between genetic variations of apo C-III gene and lipid and lipoprotein variables in northern France.* Atherosclerosis 2000; 150: 149-157.
- ²⁰² Paulweber B, Friedl W, Krempler F, Humphries SE, Sandhofer F. *Genetic variation in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster and coronary heart disease.* Atherosclerosis 1988; 73: 125-133.
- ²⁰³ Ordovás JM, Civeira F, Genest J, Craig S, Robbins AH, Meade T, et al. *Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III and A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease.* Atherosclerosis 1991; 87: 75-86.
- ²⁰⁴ Rigoli L, Raimondo G, Di Benedetto A, Romano G, Porcellini A, Campo S, et al. *Apolipoprotein AI-CIII-AIV genetic polymorphisms and coronary heart disease in type 2 diabetes mellitus.* Acta Diabetol 1995; 32: 251-256.
- ²⁰⁵ Marçais C, Bernard S, Merlin M, Uhlmann M, Mestre B, Rochet-Mingret L, et al. *Severe hypertriglyceridaemia in Type II diabetes: involvement of apo C-III Sst-I polymorphism, LPL mutations and apo E3 deficiency.* Diabetologia 2000; 43: 1346-1352.
- ²⁰⁶ Sijbrands EJ, Hoffer MJ, Meinders AE, Havekes LM, Frants RR, Smelt AH, et al. *Severe hyperlipidemia in apolipoprotein E2 homozygotes due to a combined effect of hyperinsulinemia and an Sst-I polymorphism.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2722-2729.
- ²⁰⁷ Couillard C, Vohl MC, Engert JC, Lemieux I, Houde A, Alméras N, et al. *Effect of apo C-III gene polymorphisms on the lipoprotein-lipid profile of viscerally obese men.* J Lipid Res 2003; 44: 986-993.

- ²⁰⁸ Porkka KV, Taimela S, Kontula K, Lehtimäki T, Aalto-Setälä K, Akerblom HK, et al. *Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo AI/CIII and apo E loci on serum lipids: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study*. Clin Genet 1994; 45: 113-121.
- ²⁰⁹ Cole SA, Szathmary E, Ferrell RE. *Gene and gene-product variation in the apolipoprotein AI/CIII/AIV cluster in the Dogrib Indians of the Northwest Territories*. Am J Hum Genet 1989; 44: 835-843.
- ²¹⁰ Sidoli A, Guidici G, Soria M, Vergani C. *Restriction-fragment-length polymorphisms in the AI/CIII gene complex occurring in a family with hypoalphalipoproteinemia*. Atherosclerosis 1985; 62: 81-87.
- ²¹¹ Morris SW, Price WH. *DNA sequence polymorphisms in the apolipoprotein A-I/C-III gene cluster*. Lancet 1985; II: 1127-1128.
- ²¹² Rees A, Stocks J, Paul H, Ochuchi Y, Galton D. *Haplotypes identified by DNA polymorphisms at the apolipoprotein A-I and C-III loci and hypertriglyceridemia: a study in the Japanese population*. Hum Genet 1986; 72: 168-171.
- ²¹³ Song J, Park JW, Kim JQ. *Linkage disequilibrium of the AI-CIII-AIV gene cluster and their relationship to plasma triglyceride, apolipoprotein AI and CIII levels in Koreans*. Mol Cells 1998; 8: 12-18.
- ²¹⁴ Liu R, Bai H, Liu Y, Huang M, Liu B. *Apolipoprotein CIII gene Sst-I polymorphism in patients with endogenous hypertriglyceridemia in Chinese population*. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 2001; 32: 175-178 (abst.).
- ²¹⁵ Waterworth DM, Ribalta J, Nicaud V, Dallongeville J, Humphries SE, Talmud P. *ApoCIII gene variants modulate postprandial response to both glucosa and fat tolerance tests*. Circulation 1999; 99: 1872-1877.
- ²¹⁶ Russo GT, Meigs JB, Cupples LA, Demissie S, Otrou JD, Wilson PW, et al. *Association of the Sst-I polymorphism at the APOC3 gene locus with variations in lipid levels, lipoprotein subclass profiles and coronary heart disease risk: the Framingham offspring study*. Atherosclerosis 2001; 158: 173-181.
- ²¹⁷ Gutiérrez C, Vendrell J, Broch M, Pastor R, Llor C, Simón I, et al. *Polimorfismos de los genes de las apolipoproteínas AI-CIII, B y CII en pacientes con diabetes mellitus no insulinodependiente*. Asociación con hiperlipemia. Med Clin (Barc) 1996; 107: 561-565.
- ²¹⁸ Aalto-Setälä K, Viikari J, Akerblom Hk, Kusela V, Kontula K. *DNA polymorphisms of the apolipoprotein B and A-I/C-III genes are associated with variations of serum low density lipoprotein cholesterol levels in childhood*. J Lipid Res 1991; 32: 1477-1487.
- ²¹⁹ Wick U, Uit E, Engel W. *Restriction fragment length polymorphisms at the apoprotein genes AI, CIII and B-100 and in the 5' flanking region of the insulin gene as possible markers of coronary heart disease*. Clin Genet 1995; 47: 184-190.
- ²²⁰ Shoulders CC, Ball MJ, Mann JL, Baralle FE. *Genetic marker in apolipoprotein A-I/C-III gene complex associated with hypercholesterolaemia*. Lancet 1986; II: 1286.
- ²²¹ Shoulders CC, Ball MJ, Baralle FE. *Variation in the A-I/C-III/A-IV gene complex: its association with hyperlipidemia*. Atherosclerosis 1989; 80: 111-118.
- ²²² Dallinga-Thie GM, Bu XD, Trip M, Rotter JI, Lusic AJ, Bruin TW. *Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III*. J Lipid Res 1996; 37: 136-147.
- ²²³ Hayden MR, Kirk H, Clark C, Frohlich J, Rabkin S, McLeod R, et al. *DNA polymorphisms in and around the apo A-I/C-III genes and genetic hyperlipidemias*. Am J Hum Genet 1987; 40: 421-430.
- ²²⁴ Anderson RA, Wallace RB. *Apoprotein A-I linked genetic polymorphisms associated with high density lipoprotein levels*. Clin Res 1985; 33: 15.

- ²²⁵ Zaman MM, Ikemoto S, Yoshiite N, Date C, Yokohama T, Tanaka H. *Association of apolipoprotein genetic polymorphisms with plasma cholesterol in a Japanese rural population. The Shibata Study.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3495-3504.
- ²²⁶ Hubacek JA, Pistulkova H, Skodova Z, Lanska V, Poledne R. *Polymorphisms in genes for cholesterol ester transfer protein, apolipoprotein C-III and lipoprotein lipase in children with high and low cholesterol levels.* *Cas Lek Cesk* 2001; 140: 79-81.
- ²²⁷ Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, et al. *ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease.* *J Lipid Res* 2002; 43: 1450-1457.
- ²²⁸ Paul-Hayase H, Rosseneu M, Robinson D, Van Bervliet JP, Deslypere JP, Humphries SE. *Polymorphisms in the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster: detection of genetic variation determining plasma apo AI, apo CIII and apo AIV concentrations.* *Hum Genet* 1992; 88: 439-446.
- ²²⁹ Esterbauer H, Hell E, Krempler F, Patsch W. *Allele-specific differences in apolipoprotein C-III mRNA expression in human liver.* *Clin Chem* 1999; 45: 331-339.
- ²³⁰ Ferns GA, Galton DJ. *Haplotypes of the human apoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in coronary atherosclerosis.* *Hum Genet* 1986; 73: 245-249.
- ²³¹ Ferns GA, Ritchie C, Stocks J, Galton DJ. *Genetic polymorphisms of apolipoprotein C-III and insulin in survivors of myocardial infarction.* *Lancet* 1985; II: 300-304.
- ²³² De Lorenzo F, Rubba P, Monticelli A, Coccozza S. *Coronary heart disease, echo-Doppler evidence of peripheral arterial disease and polymorphism of apolipoprotein B gene and apo AI/CIII cluster.* *Angiology* 1993; 44: 785-790.
- ²³³ De Lorenzo F, Monticelli A, Coccozza S, De Simone B, Rubba P. *Extracoronary atherosclerosis and genetic variants of apolipoprotein AI-CIII cluster in myocardial infarction survivors from southern Italy.* *Clin Investig* 1994; 72: 435-441.
- ²³⁴ Tas S. *Genetic predisposition to coronary heart disease and gene for apolipoprotein C-III.* *Lancet* 1991; 337: 113-114.
- ²³⁵ Tas S, Abdella N. *Blood pressure, coronary artery disease, and glycaemic control in type 2 diabetes mellitus: relation to apolipoprotein C-III gene polymorphism.* *Lancet* 1994; 343: 1194-1195.
- ²³⁶ Kee F, Amouyel P, Fumaron F, Arveiler D, Cambou JP, Evans A, et al. *Lack of association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV gene cluster and myocardial infarction in a sample of European male: ECTIM study.* *Atherosclerosis* 1999; 145: 187-195.
- ²³⁷ Miettinen HE, Korpela K, Hämäläinen L, Kontula K. *Polymorphisms of the apolipoprotein and angiotensin converting enzyme genes in young North Karelian patients with coronary heart disease.* *Hum Genet* 1994; 94: 189-192.
- ²³⁸ Bai H, Saku K, Liu R, Imamura M, Arakawa K. *Association between coronary heart disease and the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV complex in a Japanese population.* *Hum Genet* 1995; 95: 102-104.
- ²³⁹ Benlian P, Boileau C, Loux N, Pastier D, Masliah J, Coulon M, et al. *Extended haplotypes and linkage disequilibrium between 11 markers at the apo AI-C3-A4 gene cluster on chromosome 11.* *Am J Hum Genet* 1991; 48: 903-910.
- ²⁴⁰ Kessling A, Ouellette S, Bouffard O, Chamberland A, Bétard C, Selinger E, et al. *Patterns of association between genetic variability in apolipoprotein (apo) B, apo AI-CIII-AIV, and cholesterol ester transfer protein gene regions and quantitative variation in lipid and lipoprotein traits: influence of gender and exogenous hormones.* *Am J Hum Genet* 1991; 50: 92-106.

- ²⁴¹ Ordovás JM, Cassidy DK, Civeira F, Bisgaier CL, Schaefer EJ. *Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11*. J Biol Chem 1989; 264: 16339-16342.
- ²⁴² Pallaud C, Sass C, Zannad F, Siest G, Visvikis S. *APOC3, PTEC, fibrinogen, and MTHFR are genetic determinants of carotid intima-media thickness in healthy men (the Stanislas cohort)*. Clin Genet 2001; 59: 316-324.
- ²⁴³ Hegele RA, Connely PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B. *Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2753-2758.
- ²⁴⁴ Waterworth DM, Talmud PJ, Humphries SE, Wicks PD, Sagnella GA, Strazzullo P, et al. *Variable effects of the APOC3-482C>T variant on insulin, glucose and triglyceride concentrations in different ethnic groups*. Diabetologia 2001; 44: 245-248.
- ²⁴⁵ Dallongeville J, Meirhaeghe A, Cotel D, Fruchart JC, Amouyel P, Helbecque N. *Polymorphisms in the insulin response element of APOC-III gene promoter influence the correlation between insulin and triglycerides or triglyceride-rich lipoproteins in humans*. Int J Obes Relat Metab Disord 2001; 25: 1012-1017.
- ²⁴⁶ Talmud PJ, Berglund L, Hawe EM, Waterworth DM, Isasi CR, Deckelbaum RE, et al. *Age-related effects of genetic variation on lipid levels: The Columbia University BioMarkers Study*. Pediatrics 2001; 108: E50.
- ²⁴⁷ Anisimov SV, Volkova MV, Lenskaya LV, Khavinson VK, Solovieva DV, Schwartz EI. *Age-associated accumulation of the apolipoprotein C-III gene T-455C polymorphism C allele in a Russian population*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001; 56: B27-32.
- ²⁴⁸ Salas J, Jansen S, López-Miranda J, Ordovás JM, Castro P, Marín C et al. *The Sst-I polymorphism of the apolipoprotein C-III gene determines the insulin response to an oral-glucose-tolerance test after consumption of a diet rich in saturated fats*. Am J Clin Nutr 1998; 68: 396-401.
- ²⁴⁹ Castro P, López J, Velasco JM, Jiménez JA, Ordovás JM, Pérez F. *El alelo S2 del gen de la apo C-III, identificado por la enzima de restricción Sst-I, se asocia a una menor sensibilidad a la acción de la insulina en varones jóvenes sanos*. En: Oya M, Garcés C (eds.). Enfermedades cardiovasculares. Nutrición, genética y epidemiología. Madrid: Doyma. 2000; 303-314.
- ²⁵⁰ Peacock RE, Temple A, Gudnason V, Rosseneu M, Humphries SE. *Variation at the lipoprotein lipase and apolipoprotein AI-CIII gene loci are associated with fasting lipid and lipoprotein traits in a population sample from Iceland: interaction between genotype, gender, and smoking status*. Genet Epidemiol 1997; 14:265-282.
- ²⁵¹ Ribalta J, La Ville AE, Vallve JC, Humphries S, Turner PR, Masana L. *A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia*. J Lipid Res 1997; 38: 1061-1069.
- ²⁵² Groenendijk M, Cantor RM, De Bruin TW, Dallinga-Thie GM. *New genetic variants in the apo A-I and apo C-III genes and familial combined hyperlipidemia*. J Lipid Res 2001; 42: 188-194.
- ²⁵³ Peacock RE, Watts GF, Mandalia S, Brunt J, Lewis B, Humphries SE. *Associations between genotypes of the apolipoprotein E, B, AI-CIII-AIV and lipoprotein lipase genes and coronary artery disease in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study*. Nutr Metab Cardiovasc Dis 1994; 4: 128-136.
- ²⁵⁴ Xu CF, Nanjee MN, Savill J, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, et al. *Variation at the apolipoprotein (apo) AI-CIII-AIV gene cluster and apo B loci is associated with lipoprotein and apolipoprotein levels in Italian children*. Am J Hum Genet 1990; 47: 429-439.
- ²⁵⁵ Paul H, Galton D, Stocks J. *DNA polymorphic patterns and haplotype arrangements of the apo A-I, apo C-III, apo A-IV gene cluster in different ethnic groups*. Hum Genet 1987; 75: 264-268.

- ²⁵⁶ Monsalve MV, Robinson D, Woolcock NE, Powell JT, Greenhalgh RM, Humphries SE. *Within-individual variation in serum cholesterol levels: association with DNA polymorphisms at the apolipoprotein B and AI-CIII-AIV loci in patients with peripheral arterial disease.* Clin Genet 1991; 39: 260-273.
- ²⁵⁷ Masana L, Febrer G, Cabaña J, Baroni Mg, Marz W, Hoffmann MM, et al. *Common genetic variants that relate to disorders of lipid transport in Spanish subjects with premature coronary artery disease.* Clin Sci (Lond) 2001; 100: 183-190.
- ²⁵⁸ Zhang Q, Liu Y, Liu BW, Fan P, Cabaña J, Galton DJ. *Common genetic variants of lipoprotein lipase and apolipoproteins AI-CIII that relate to coronary artery disease: a study in Chinese and European subjects.* Mol Genet Metab 1998; 64: 177-183.
- ²⁵⁹ Groenendijk M, Cantor RM, Funke H, Dallinga-Thie GM. *Two newly identified SNPs in the apo AI-CIII intergenic region are strongly associated with familial combined hyperlipidaemia.* Eur J Clin Invest 2001; 31: 852-859.
- ²⁶⁰ Antonarakis SE, Oettgen P, Chakravarti A, Halloran SL, Hudson RR, Feisee L, et al. *DNA polymorphism haplotypes of the human apolipoprotein APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster.* Hum Genet 1988; 80: 265-273.
- ²⁶¹ Stocks J, Paul H, Galton D. *Haplotypes identified by DNA restriction-fragment-length polymorphisms in the AI-CIII-AIV gene region and hypertriglyceridemia.* Am J Hum Genet 1987; 41: 106-118.
- ²⁶² Marasco O, Melina F, Mele E, Quaresima B, Zingone A, Focarelli E, et al. *Linkage disequilibrium of three polymorphic RFLP markers in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster on chromosome 11.* Hum Genet 1993; 91: 169-174.
- ²⁶³ Buzza M, Fripp Y, Mitchell RJ. *Apolipoprotein AI and CIII gene polymorphisms and their association with lipid levels in Italian, Greek and Anglo-Irish populations of Australia.* Ann Hum Biol 2001; 28: 481-490.
- ²⁶⁴ Groenendijk M, Cantor RM, Blom NH, Rotter JI, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. *Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apo C-III promoter region in familial combined hyperlipidemia.* J Lipid Res 1999; 40: 1036-1044.
- ²⁶⁵ Dallinga-Thie GM, Trip M, Rotter JI, Cantor RM, Bu X, Lusic AJ, de Bruin T. *Complex genetic contribution of the apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes.* J Clin Invest 1997; 99: 953-961.
- ²⁶⁶ Surguchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. *Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 941-947.
- ²⁶⁷ Monsalve MV, Young R, Wiseman SA, Dhamu S, Powell JT, Greenhalgh RM, Humphries SE. *Study of DNA polymorphisms of the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in patients with peripheral arterial disease.* Clin Sci 1989; 76: 221-228.
- ²⁶⁸ Talmud PJ, Humphries SE. *Apolipoprotein C-III gene variation and dyslipidaemia.* Curr Opin Lipidol 1997; 8: 154-158.
- ²⁶⁹ Ordovás JM, Schaefer EJ, Salem D, Ward RH, Glueck CJ, Vergani C, et al. *Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoalphalipoproteinemia.* N Engl J Med 1986; 314: 671-677.
- ²⁷⁰ López-Miranda J, Ordovás JM, Espino A, Marin C, Salas J, López-Segura F, et al. *Influence of mutation in human apolipoprotein A-I gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat.* Lancet 1994; 343: 1246-1249.

- ²⁷¹ Mata P, Ordovás JM, López-Miranda J, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT, et al. *Apo A-IV phenotype affects diet-induced plasma LDL cholesterol lowering*. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 884-891.
- ²⁷² McCombs RJ, Marcadis DE, Ellis J, Weinberg RB. *Attenuated hypercholesterolemic response to a high-cholesterol diet in subjects heterozygous for the apolipoprotein A-IV-2 allele*. *N Engl J Med* 1994; 331: 706-710.
- ²⁷³ Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. *Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 587-591.
- ²⁷⁴ Muros M, Rodríguez-Ferrer C. *Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4*. *Atherosclerosis* 1996; 121: 13-21.
- ²⁷⁵ Ordovás JM, López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Rodríguez CR, Park J, Cole T, et al. *Effect of apolipoprotein E and A-IV phenotypes on the low density lipoprotein response to HMG-CoA reductase inhibitor therapy*. *Atherosclerosis* 1995; 113: 157-166.
- ²⁷⁶ Stiefel P, Montilla C, Muñoz-Grijalbo O, García-Lozano R, Alonso A, Miranda ML et al. *Apolipoprotein E gene polymorphism is related metabolic abnormalities, but does not influence erythrocyte membrane lipid composition or sodium-lithium countertransport activity in essential hypertension*. *Metabolims* 2001; 50: 157-160.
- ²⁷⁷ Liddell M, Williams J, Bayer A, Kaiser F, Owen M. *Conformation of association between the e4 allele of apolipoprotein E and Alzheimer's disease*. *J Med Genet* 1994; 31: 197-200.
- ²⁷⁸ Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A et al. *Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: the Framingham study*. *Neurology* 1996; 46: 673-677.
- ²⁷⁹ Kuivenhoven JA, De Knijff P, Boer JMA, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC et al. *Heterogeneity at the CETP locus: influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 560-568.
- ²⁸⁰ Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. *Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis*. *Atherosclerosis* 1997; 135: 145-159.
- ²⁸¹ Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. *A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease*. *J Clin Invest* 1997; 99: 1606-1613.
- ²⁸² Jukema JW, van Boven AJ, Groenemeijer B, Zwinderman AH, Reiber JH, Bruschke AV, et al. *The Asp9Asn mutation in the lipoprotein lipase gene is associated with increased progression of coronary atherosclerosis*. *Circulation* 1996; 94: 1913-1918.
- ²⁸³ Jemaa R, Fumeron F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Arveiler D, et al. *Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study*. *J Lipid Res* 1995; 36: 2141-2146.
- ²⁸⁴ Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ, for the EARS. *Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides. The European Atherosclerosis Research Study (EARS)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 526-534.
- ²⁸⁵ Espinosa JS, Rueda E, Muñoz E, Montiel A, Martínez S, Diéguez JL, et al. *Asociación entre el polimorfismo inserción/delección del gen codificador de la enzima conversiva de la angiotensina e infarto de miocardio en pacientes jóvenes*. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 488-491.

- ²⁸⁶ Iwai N, Tamaki S, Ohmichi N, Kinoshita M. *The II genotype of the angiotensin-converting enzyme gene delays the onset of acute coronary syndromes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1730-1733.
- ²⁸⁷ Green F, Hamsten A, Blombäck M, Humphries S. *The role of beta-fibrinogen genotype in determining plasma fibrinogen levels in young survivors of myocardial infarction and healthy controls from Sweden*. *Thromb Haemost* 1993; 70: 915-920.
- ²⁸⁸ Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. *Association of the platelet P1a polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen B β 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease*. *Circulation* 1997; 96: 1424-1431.
- ²⁸⁹ Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. *Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 33-37.
- ²⁹⁰ Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, et al. *Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis*. *N Engl J Med* 1995; 332: 286-291.
- ²⁹¹ Morita H, Taguchi J, Kurihara H, Kitaoka M, Kaneda H, Kurihara Y, et al. *Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease*. *Circulation* 1997; 95: 2032-2036.
- ²⁹² Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J. *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians*. *Circulation* 1996; 94: 2410-2416.
- ²⁹³ Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. *A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene*. *Nat Med* 1996; 2: 41-45.
- ²⁹⁴ Humbert R, Adler DA, Distenfeld CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. *The molecular basis of the human serum paraoxonase polymorphism*. *Nature Genet* 1993; 3: 73-76.
- ²⁹⁵ Ordovás JM. *La genética de la aterosclerosis*. Barcelona: Doyma. 1997; 7-10.
- ²⁹⁶ Brunzell JD, Porte D, Bierman E. *Abnormal lipoprotein-lipase mediated plasma triglyceride removal in untreated diabetes mellitus associated with hypertriglyceridemia*. *Metabolism* 1979; 28: 901-907.
- ²⁹⁷ Gaziano JM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. *Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction*. *Circulation* 1997; 96: 2520-2525.
- ²⁹⁸ Dobiášová M. *Atherogenic index of plasma [Log(triglycerides/HDL-cholesterol)]: theoretical and practical implications*. *Clin Chem* 2004; 50: 1113-1115.
- ²⁹⁹ Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. *A simple salting out procedure for extracting DNA nucleated cells*. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- ³⁰⁰ Hixson JE, Vernier DT. *Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI*. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
- ³⁰¹ Allain CC, Poon LS, Chan C. *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. *Clin Chem* 1974; 20: 470-474.
- ³⁰² Fossati P, Principe L. *Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide*. *Clin Chem* 1982; 28: 2077-2082.

- ³⁰³ Terpstra AH, Woodward CJ, Sánchez-Muniz FJ. *Improves techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum.* Anal Biochem 1981; 111: 149-157.
- ³⁰⁴ Riepponen P, Marniemi J, Rautaoja T. *Immunoturbidimetric determination of apolipoprotein A-I y B in serum.* Scand J Clin Lab Invest 1987; 47: 739-744.
- ³⁰⁵ Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Teacher DF, Turner RC. *Homeostasis model assessment: insulin resistance and B cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man.* Diabetologia 1985; 28: 412-419.
- ³⁰⁶ Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB et al. *Homeostasis model assesment closely mirrors the glucose clamp technique in the assesment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance aand insulin sensitivity.* Diabetes Care 2000; 23: 57-63.
- ³⁰⁷ Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. *Cuantificación de insulinoresistencia con los valores de insulina basal e índice HOMA en una población no diabética.* Med Clin (Barc) 2001; 117: 530-533.
- ³⁰⁸ Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). *Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica.* Med Clin (Barc) 2000; 115: 587-597.
- ³⁰⁹ Pedro-Botet J, Márquez MA, Martín S, Sentí M, Molina L, Goday A et al. *Perfil lipoproteico e insulinemia en ayunas en la hipertensión arterial esencial.* Clin Invest Arteriosclerosis 1996; 8: 103-108.
- ³¹⁰ Zammit VA, Waterman IJ, Topping D, McKay G. *Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance.* J Nutr 2001; 131: 2074-2077.
- ³¹¹ Rashid S, Uffelman KD, Lewis GF. *The mechanism of HDL lowering in hypertriglyceridemic, insulin-resistant states.* J Diabetes Complications 2002; 16: 24-28.
- ³¹² Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, Berra K, Chandra-Strobos N, Fabunmi RP et al. *Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24: 29-50.