UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener título de:

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

ADOLFO MUÑOZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ÓSCAR A. PÉREZ MÉNDEZ

ASESOR INTERNO: M. en C. RAÚL DÁVILA DELGADO

ASESOR EXTERNO: M. en C. PAOLA P. PEÑA DE LA SANCHA

SINODALES:

MTRA. DIANA RIVERA BAHENA

MTRA. LILIANA KARINA VALENCIA ESTAÑON

DRA. DOLORES AZUCENA SALAZAR PIÑA

DRA. CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA

DR. JONATHAN ROMÁN VALDEZ-CAMACHO

CUERNAVACA, MORELOS NOVIEMBRE, 2020

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” bajo la dirección del Dr. Óscar A. Pérez Méndez y de la codirección de la M.C. Paola P. Peña de la Sancha.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, a los profesores quienes participaron de manera activa en mi desarrollo profesional, en especial a Raúl Dávila y Alma Venosa quienes fueron la base por mi interés en la investigación y Nutrición.

Al Dr. Óscar Pérez que me permitió formar parte del laboratorio de metabolismo de lípidos y me brindo la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, con el apoyo y colaboración de buenas amistades que hice durante mi estancia en el Instituto Nacional de Cardiología a la Dra. Eli, la Mtra. Vicky, Diego y Alan O. que me acompañaron durante este trayecto y me apoyaron en lo necesario.

A Paola Peña, a quien admiro por su gran habilidad de compartir el conocimiento y enseñanzas, además de ser mi apoyo y estar a mi lado en todo momento. Nunca podré agradecer lo suficiente todo lo que ha hecho por mí, siempre me aconsejaste y me mostraste el mejor camino a seguir, y especial a su familia quienes estuvieron pendientes de nosotros y nos impulsaron a alcanzar nuestras metas.

Al Dr. Enrique Gavaldón y la Mtra. Mónica Sánchez a quienes aprecio por impulsarme a superarme cada día, ya que de una u otra forma han estado acompañándome a lograr mis objetivos.

A mis amigas con quienes compartí una gran experiencia durante mi formación profesional Harumy Ogury, Janeth Ramírez y Gabi Nava que siempre creyeron en mi y de quienes aprendí que sin importar cuanto tiempo tomé, todo se puede si de verdad se quiere.

A Gerardo Barcenas y Alan Vázquez H. con quienes he aprendido a construir bases sólidas en la amistad, desde compartir malos momentos hasta edificar los más felices recuerdos que han marcado nuestro paso por la universidad, agradezco a cada uno por el tiempo compartido y aprecio el detalle de colaborar en objetivos que poco a poco se han ido convirtiendo en grandes logros en común.

A mis familiares quienes han sido testigo de los grandes retos a los que me he enfrentado y fueron ellos los que me apoyaron en los momentos más cruciales de mi carrera profesional, en especial mi mamá y papá que gracias a su dedicación, esfuerzo y enseñanza he logrado sobresalir y cumplir mis objetivos, verdaderamente me siento muy orgulloso de formar parte de su familia y tener hermanos maravillosos con quien siempre contar Silvia, José, Janet y Saúl, muchas gracias por su apoyo incondicional son un verdadero ejemplo a seguir.

RESUMEN

La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) constituye la principal causa de muerte a nivel mundial y se caracteriza por la presencia de hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia. La suplementación con ácidos grasos omega 3 (n-3), se asocia con una menor incidencia de eventos cardiovasculares e induce cambios en la composición y distribución de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*); que podrían relacionarse con modificaciones en su función endotelial. En el presente trabajo se propuso caracterizar el efecto de la suplementación de n-3 sobre la distribución y contenido lipídico de las subclases de HDL de pacientes con hipertrigliceridemia y evaluar si dichos cambios se relacionan con modificaciones en la función endotelial de estas lipoproteínas.

Se realizó un ensayo clínico cruzado aleatorizado, controlado con placebo en 18 pacientes con hipertrigliceridemia. Los sujetos fueron asignados a 2 grupos (n=9). El primero inició con suplementación de n-3 por un periodo de 5 semanas, y el otro grupo inició con placebo, para el posterior cruce de tratamientos. Se evaluó el perfil de lípidos plasmáticos, el contenido lipídico y de ácidos grasos de HDL. La composición y distribución de las subclases, se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida. La función endotelial mediada por HDL, se evaluó de forma *in vitro*, utilizando anillos de aorta rata Wistar*,* donde el tejido fue incubado en una cámara de órgano aislado utilizando las HDL aisladas de los pacientes.

Los resultados indican que, al menos en nuestra muestra de pacientes con hipertrigliceridemia, los n-3 inducen cambios significativos en la composición lipídica de HDL y que estos ácidos grasos se incorporan a estas partículas. Sin embargo, no se observaron modificaciones en la función endotelial *in vitro* de las HDL, en los ensayos con anillos de aorta, lo que sugiere que el mecanismo benéfico de los n-3 sobre la función endotelial es independiente de HDL.

ABSTRACT

Coronary Artery Disease (CAD) is the leading cause of death worldwide and is characterized by the presence of hypoalphalipoproteinemia and hypertriglyceridemia. Supplementation with omega 3 (n-3) fatty acids is associated with a lower incidence of cardiovascular events and induces changes in the composition and distribution of High Density Lipoproteins (HDL, High Density Lipoprotein); which could be related to modifications on its endothelial function. In the present work, it was proposed to characterize the effect of n-3 supplementation on the distribution and lipid content of HDL subclasses in patients with hypertriglyceridemia and to evaluate whether these changes are related to modifications in the endothelial function of these lipoproteins.

A randomized, placebo-controlled crossover clinical trial was conducted in 18 patients with hypertriglyceridaemia. Subjects were assigned to 2 groups (n = 9). The first started with n-3 supplementation for a period of 5 weeks, and the other group started with placebo, for the subsequent crossover of treatments. The plasma lipid profile and the lipid and fatty acid content of HDL were evaluated. The composition and distribution of the subclasses was determined by polyacrylamide gel electrophoresis. HDL-mediated endothelial function was evaluated in vitro, using Wistar rat aortic rings, where the tissue was incubated in an isolated organ chamber using HDL isolated from patients.

The results indicate that, at least in our sample of patients with hypertriglyceridemia, n-3 induce significant changes in the lipid composition of HDL and that these fatty acids are incorporated into these particles. However, no modifications were observed in the in vitro endothelial function of HDL in the aortic ring assays, suggesting that the beneficial mechanism of n-3 on endothelial function is independent of HDL.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Lipoproteínas	3
2.2 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	4
2.2.1 Clasificación de HDL	5
2.2.2 Función de las HDL	6
2.2.3 Transporte reverso de colesterol (TRC)	7
2.2.4 Propiedades benéficas para la función endotelial de las HDL	9
2.3. Disfunción endotelial (DE)	10
2.4. Formación de la lesión aterosclerótica	11
2.5. Factores de riesgo cardiovascular	12
2.6. Dislipidemias	14
2.6.1 Hipertrigliceridemia	14
2.6.2 Epidemiologia de la hipertrigliceridemia	16
2.7. Ácidos grasos poliinsaturados	17
2.7.1 Ácidos grasos Omega-3	18
2.7.2 Omega-3 y enfermedad cardiovascular	22
2.7.3 Omega-3 y efectos sobre las HDL	24
3. Justificación	27
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29
6. Metodología de investigación	30
6.1 Diseño de estudio	30
6.2 Toma de muestra sanguínea	32
6.3 Evaluación nutricional e historia clínica	33
6.4 Procesamiento de muestra y técnicas utilizadas	33
6.4.1 Determinación de la concentración de lípidos y glucosa	34
6.4.2 Ultracetrifugación secuencial (US)	35
6.4.3 Ensayo función endotelial en cámara de órgano aislado	35
6.4.4 Electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas	36
6.5 Consideraciones éticas	37
6.6 Análisis estadístico	38
7. Resultados	39
7.1 Características de la población, adherencia a la dieta y determinación de parámetros antropométricos y bioquímicos	39
7.2 Composición de proteína en subclases de HDL	43
7.3 Perfil de lípidos de las HDL totales	44
7.3.1 Composición lipídica de subclases de HDL	45
7.4 Perfil de ácidos grasos omega-3 (EPA/DHA) en HDL	50
7.5 Determinación de la función endotelial mediada por HDL en cámara de órgano aislado	51
8. Discusión	52
9. Conclusión	62
10. Perspectivas	63
11. Anexos	64
12. Bibliografía	74

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Composición de lipoproteínas……..... 4
Tabla 2. Índice de cintura cadera……..... 13
Tabla 3. Valores de referencia de lípidos plasmáticos……..... 14
Tabla 4. Clasificación de triglicéridos séricos……..…..... 15
Tabla 5. Efectos metabólicos de los eicosanoides……..…..... 21
Tabla 6. Características antropométricas de la población durante la intervención……. 42
Tabla 7. Modificaciones en el perfil de lípidos y glucosa durante la intervención……. 43
Tabla 8. Porcentaje de proteína total en las subclases de HDL de los pacientes en la intervención con omega-3 y placebo……..…. 43

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Clasificación de las lipoproteínas de acuerdo a su densidad..... 3
Figura 2. Estructura de lipoproteínas de alta densidad……..... 5
Figura 3. Clasificación de HDL de acuerdo a su tamaño…..... 6
Figura 4. Transporte reverso de colesterol……..... 8
Figura 5. Formación de la placa aterosclerótica..... 12
Figura 6. Metabolismo y bioconversión de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6..... 20
Figura 7. Diagrama de intervención de estudio……..... 31
Figura 8. Diagrama de flujo del estudio……..…..... 34
Figura 9. Migración de HDL en PAGE y análisis densitométrico……. 37
Figura 10. Diagrama de flujo de la selección de pacientes en el estudio…… 39
Figura 11. Análisis de recordatorio de 24 h……. 40
Figura 12. Análisis del consumo de ácidos grasos…… 41
Figura 13. Modificaciones en la composición lipídica de HDL Pre y Post-tratamiento……... 44
Figura 14. Distribución de colesterol en subclases de HDL……..... 45
Figura 15. Distribución de fosfolípidos en subclases de HDL…….. 46
Figura 16. Distribución de triglicéridos en subclases de HDL…….. 47
Figura 17. Cociente de concentración (mg/dL) de c-HDL/PLP-HDL en subclases de HDL..... 48
Figura 18. Cociente de concentración (mg/dL) de TGL-HDL/PLP-HDL en subclases de HDL…….. 49
Figura 19. Porcentaje de EPA en HDL…… 50
Figura 20. Porcentaje de DHA en HDL…… 50
Figura 21. Ajuste de densidad de plasma…….. 68
Figura 22. Incubación de anillos de aorta de rata Wistar en HDL…… 69

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ác.	Ácido
AA	Ácido Araquidónico
ABCA-1	Transportador de Membrana Dependiente de ATP Clase A, Tipo 1
AG	Ácidos Grasos
AGMI	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AL	Ácido Linoléico
ALA	Ácido Alfa-linolénico
Apo	Apolipoproteína
CE	Células Endoteliales
CETP	Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol
CL	Colesterol Libre
CT	Colesterol Total
c-HDL	Colesterol de Lipoproteínas de Alta Densidad
c-LDL	Colesterol de Lipoproteínas de Baja Densidad
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DM	Diabetes Mellitus
DE	Disfunción Endotelial
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
GISSI	*Gruppo Italiano per lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardico*

HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
HTA	Hipertensión Arterial
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intracelular-1
ICC	Índice cintura cadera
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
JELIS	*Japan Eicosapentaenoic Acid Lipid Intervention Study*
LCAT	Lecitina Colesterol Acilo-transferasa
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LDLox	Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidadas
n-3	Omega 3
n-6	Omega 6
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONSe	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
PPARs	Receptores Activados de Proliferadores Peroxisomales
PLP	Fosfolípidos
PON-1	Paraoxonasa-1
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
SM	Síndrome Metabólico
SRB-1	Receptor Scavenger Clase B Tipo I
TGL	Triglicéridos
TRC	Transporte Reverso de Colesterol
VCAM-1	Moléculas de Adhesión de Células Vasculares 1
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son un grupo de patologías caracterizadas por su larga duración y evolución lenta, que constituyen el 70% de las defunciones anuales a nivel global[1]. Dentro de las ECNT se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV), que son la primera causa de muerte en el mundo[1]. La enfermedad arterial coronaria (EAC), es una ECNT que se caracteriza por estrechamiento y pérdida de elasticidad de las arterias coronarias a consecuencia de alteraciones en la función endotelial, asociadas con el desequilibrio en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, que propician el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica[2].

Distintos mecanismos y condiciones fisiológicas predisponen al desarrollo de ateroesclerosis, una de ellas es la hipertrigliceridemia[3], que es una condición caracterizada por concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TGL) >150 mg/dL y que constituye un factor independiente de riesgo cardiovascular[3]. La hipertrigliceridemia induce cambios en la composición y función de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en ingles *High Density Lipoprotein*), las cuales poseen funciones antitrombóticas, antioxidantes, antiinflamatorias y protectoras del endotelio, por lo que se consideran como partículas ateroprotectoras[4, 5, 6 y 7].

Un factor relacionado con menor incidencia de ECV es el consumo de ácidos grasos omega 3 (n-3)[8]. Se ha demostrado que los n-3 modifican el perfil lipídico, principalmente disminuyendo la concentración plasmática de triglicéridos[9, 10 y 11]. También, se ha reportado que inducen cambios en la distribución de subclases de HDL[12, 13, 14 y 15].

Sin embargo, en la actualidad existe poca evidencia sobre el efecto de los n-3 sobre estas lipoproteínas, y si pudieran estar relacionados con modificaciones en su función.

Las HDL tienen una relación muy estrecha con la función vascular al modular diversas funciones del endotelio; promueven la síntesis de óxido nítrico (NO)[16, 17], lo protegen ante el estrés oxidativo e inhiben la expresión de moléculas implicadas en la progresión de la placa aterosclerótica, previenen la apoptosis de las células endoteliales y permiten mantener un estado antitrombótico, profibrinolítico y antioxidante[16, 18]. De igual manera, en la actualidad no existe una caracterización de los efectos de n-3 sobre la función endotelial de las HDL y de las posibles modificaciones en sus subclases[19].

Por lo anterior, es preciso implementar ensayos clínicos y bioquímicos que permitan conocer los efectos de los ácidos grasos n-3 sobre las HDL, la distribución de sus subclases y función endotelial en condiciones como la hipertrigliceridemia, como proponemos en el presente trabajo de investigación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares que se encargan del transporte de lípidos en el plasma sanguíneo, constituidas por una fracción lipídica conformada por colesterol, TGL y fosfolípidos (PLP), y una fracción proteica integrada por diferentes apolipoproteínas (Apo´s), que confieren estabilidad a su estructura[20].

Las lipoproteínas se clasifican en 5 tipos de acuerdo con su densidad de flotación como se muestra en la **Figura 1**.

Quilomicrón
Tamaño: **>**70 nm
Densidad: **>** 0.94 mg/mL

Lipoproteína de muy baja densidad
(***VLDL***, *Very Low Density Lipoproteins*)
Tamaño: 30 a 70 nm
Densidad: 1.006 - 1.019 mg/mL

Lipoproteína de Densidad Intermedia
(***IDL,*** *Intermediate Density Lipoproteins*)
Tamaño: 20 a 30 nm
Densidad: 1.019 - 1.063 mg/mL

Lipoproteína de baja densidad
(***LDL,*** *Low density Lipoproteins)*
Tamaño: 18 a 25 nm
Densidad: 1.063 - 1.120 mg/mL

Lipoproteína de alta densidad
(***HDL,*** *High Density Lipoproteins*)
Tamaño: 7.5 a 12.5 nm
Densidad: 1.020 – 1.210 mg/mL

Figura 1. Clasificación de lipoproteínas de acuerdo con su densidad
Las lipoproteínas de menor densidad son los quilomicrones seguido en forma ascendente por las VLDL, IDL, LDL y las HDL. Las HDL poseen mayor densidad y menor tamaño en comparación con las otras lipoproteínas. (Modificado de Barquera y Campos 2009)

Es importante resaltar que las lipoproteínas difieren en su composición lipídica y proteica, como se muestra en la **Tabla 1**. Los quilomicrones, VLDL, IDL y LDL, poseen un mayor contenido de TGL, en comparación con las HDL[21].

Tabla 1. Composición de lipoproteínas

Lipoproteína	Proteína	Colesterol	Triglicéridos	Fosfolípidos	Apo
Quilomicrón	1 – 2%	1 – 3%	90 – 95%	3 – 6%	A I, AII, B-48, C I, CII, CIII Y E
VLDL	6 – 10%	4- 8%	45 – 65%	15 – 20%	B-100, C I, C II, C III, Y E
IDL	20%	38%	35%	30%	B-100, C III, Y E
LDL	18 – 22%	50%	4 – 8%	18 – 24%	B-100
HDL	45 – 55%	20 – 25%	2 – 7%	26 – 32%	A I, A II, CI, C II, CIII, D y E

Las lipoproteínas difieren en su contenido de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos, así como en la fracción proteica. Poseen apolipoproteínas específicas; la Apo-B caracteriza a las VLDL, IDL y LDL, mientras que las HDL se caracterizan por contener Apo-AI. (Modificado de Barquera y Campos, 2009).

2.2 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL, son lipoproteínas que se encuentran constituidas en su núcleo por ésteres de colesterol y TGL, y en su corteza por colesterol libre (CL) y PLP[22]. Están conformadas por distintas Apo´s (**Tabla 1** y **Figura 2**) que en conjunto confieren estabilidad fisicoquímica a las HDL. La Apo-AI, es característica de estas partículas y constituye el 70% del contenido proteico, seguida de Apo-AII con un 20%, y otras Apo´s (Apo-IV, Apo-C y Apo-E) en menor proporción[16].

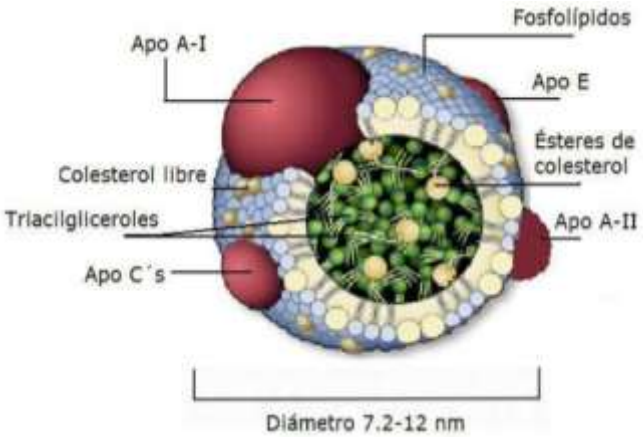

Figura 2. Estructura de las lipoproteínas de alta densidad
Las HDL están constituidas por una fracción de lípidos anfipáticos como fosfolípidos y colesterol libre los cuales se encuentran en su superficie, mientras que las apolipoproteínas como Apo-AI y Apo-AII les confieren estabilidad estructural, y en el núcleo se encuentran lípidos como triglicéridos y ésteres de colesterol[23]. (Modificado de Toledo et al, 2010)

2.2.1 Clasificación de las HDL

Las HDL son un conjunto de lipoproteínas altamente heterogéneas como producto del recambio de colesterol y otros lípidos con tejidos periféricos. En consecuencia, poseen tamaño, composición y propiedades fisicoquímicas distintas. Se pueden clasificar por su densidad de flotación en dos subfracciones[24]:

- **HDL-2**: densidad de flotación entre 1.063 y 1.12 g/mL.
- **HDL-3**: densidad de flotación entre 1.12 y 1.21 g/mL.

Por otra parte, la clasificación de acuerdo con su tamaño es determinado por su diámetro hidrodinámico y se pueden distinguir cinco subclases; HDL-2b, HDL-2a, HDL-3a, HDL-3b, HDL-3c[25], como se muestra en la **Figura 3**.

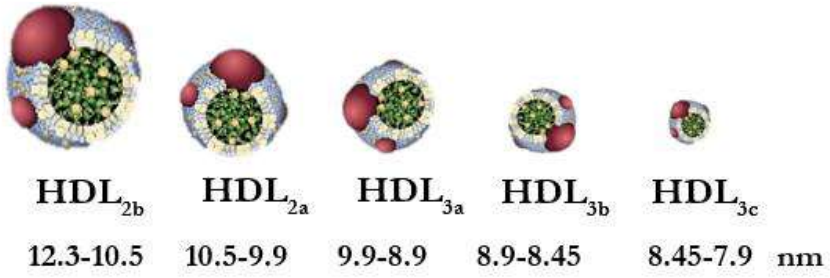

Figura 3. Clasificación de HDL de acuerdo con su tamaño
Se presenta la clasificación de HDL de acuerdo con su radio hidrodinámico. Las HDL-2 son las partículas de mayor tamaño, mientras que las HDL-3 son las más pequeñas. (Modificado de Toledo et al, 2010)

2.2.2 Función de HDL

Debido a sus funciones cardioprotectoras, el colesterol-HDL (c-HDL) se considera como un factor protector, ya que una concentración >40 mg/dL se relaciona de manera inversa con la incidencia de eventos cardiovasculares[26, 27].

Además, las HDL poseen propiedades antioxidantes, antitrombóticas y antiinflamatorias que contribuyen a su potencial antiaterogénico[26,27]. Las propiedades antiinflamatorias de las HDL se deben a que inhiben la expresión de moléculas de adhesión vascular como la E-selectina, la Molécula de Adhesión Intracelular 1 (ICAM-1) y de la Molécula de Adhesión Celular Vascular 1 (VCAM-1), las cuales, promueven la progresión de la placa aterosclerótica[16]. Por otra parte, las propiedades antioxidantes de las HDL se asocian a la enzima Paraoxonasa-1 (PON-1), que evita la peroxidación lipídica de las LDL neutralizando los lípidos peroxidados, transformándolos en compuestos biológicamente inocuos[28, 29].

No obstante, la evidencia no es concluyente, ya que algunos individuos con concentraciones de c-HDL <40 mg/dL, no presentan un mayor riesgo cardiovascular[30]. La mutación Apo A-I Milano, se caracteriza por presentar concentraciones bajas de c-HDL, sin embargo, los individuos poseen mayor

longevidad y menor incidencia de eventos cardiovasculares[31]. Por el contrario, sujetos con mutaciones en el gen que codifica para la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP, por sus siglas en inglés *Cholesteryl Ester Transfer Protein)*, muestran mayor incidencia de eventos coronarios a pesar de presentar concentraciones elevadas de c-HDL (>80 mg/dL)[31].

Actualmente se reconoce que la elevación plasmática de c-HDL, por medio de terapia farmacológica, no ejerce una disminución del riesgo cardiovascular, debido a que las HDL constituyen un grupo de moléculas de mayor complejidad. Su metabolismo y función, además de la composición y distribución de sus subclases, son resultado de un continuo proceso de remodelación durante el intercambio de distintos compuestos lipídicos con otras lipoproteínas y tejidos periféricos[22], donde interactúan con enzimas, proteínas y receptores celulares que modifican su estructura y actividad biológica[27].

2.2.3 Transporte reverso de colesterol (TRC)

El TRC es definido como el retorno de colesterol de las células periféricas hacia el hígado (**Figura 4**), en donde una parte es reciclada para estructurar membranas celulares, para la síntesis de hormonas esteroideas y otra destinada a la formación de bilis[26,32]. El TRC tiene como finalidad impedir la acumulación de colesterol en los tejidos, y evitar la progresión de la placa aterosclerótica[33]. Además, en presencia de hipertrigliceridemia, se ha observado un aumento en el contenido de TGL en las partículas HDL y disminución en la concentración plasmática de c-HDL, así como menor capacidad cardioprotectora[34, 35, 36 y 37].

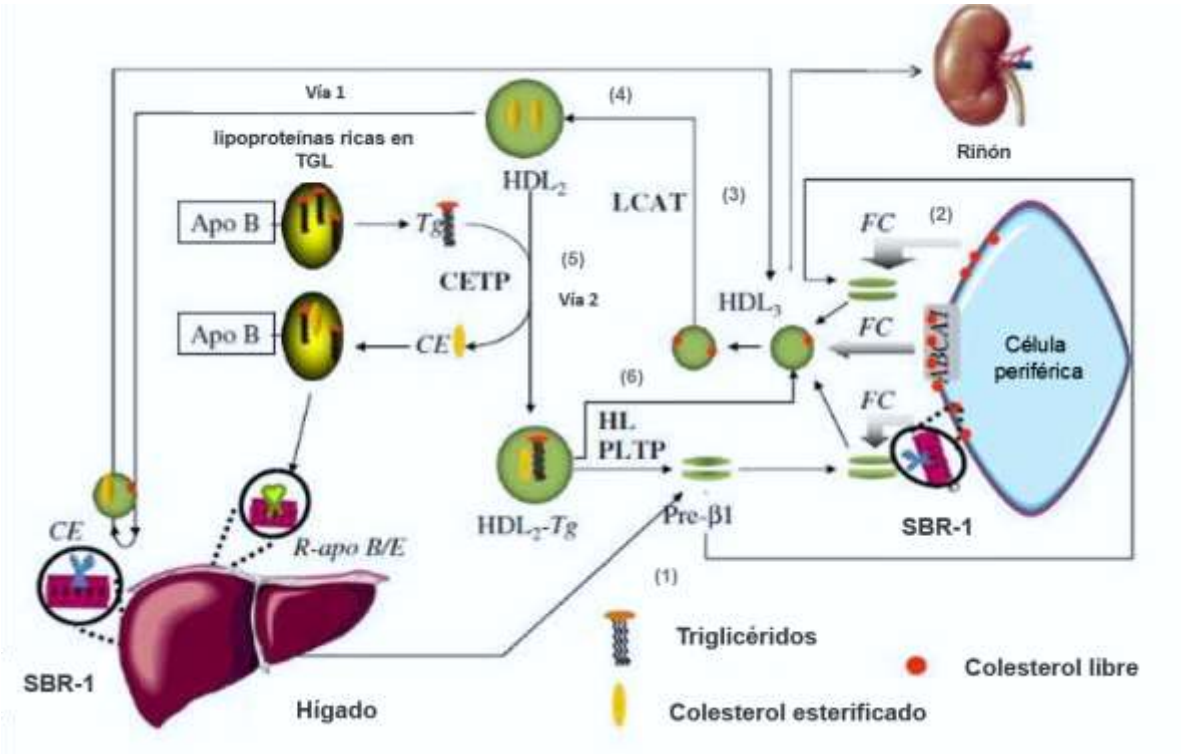

Figura 4. Transporte reverso de colesterol

Tras su síntesis intestinal y hepática, las HDL nacientes denominadas Pre-β1, pobres en lípidos y con estructura discoidal, son liberadas a la circulación por los hepatocitos (1), donde por acción de la proteína de membrana ATP-casete de unión A1 (por sus siglas en ingles ABCA-1, *ATP-Binding Cassette A1*) adquieren colesterol libre y fosfolípidos de los tejidos periféricos (2), convirtiéndolas en partículas HDL-3. El colesterol posteriormente es esterificado por la enzima Lecitin Colesterol Acil-Transferasa (LCAT) (3), lo que provoca que las HDL-3 aumenten de tamaño, transformándolas en HDL-2 esféricas (4). Posteriormente las HDL-2 pueden continuar el ciclo por dos *vías*. En el caso de la *vía* 1, el colesterol esterificado de las HDL-2 es reducido por los hepatocitos por el receptor de barrido clase B (por sus siglas en ingles SRB-1, *Scavenger Receptor B Type* 1), las lipoproteínas remanentes de este proceso son HDL-3, las cuales tienen capacidad de reiniciar el ciclo, mientras que los remantes que contienen Apo B son catabolizados principalmente en el hígado por los receptores Apo B/E. Por otra parte, en la *vía* 2 por acción de la CETP, las HDL-2 transfieren colesterol esterificado a lipoproteínas que contienen Apo-B (quilomicrones, VLDL y LDL) e intercambian triglicéridos (5). Los triglicéridos captados por las HDL-2, son hidrolizados por la lipasa hepática, que en conjunto con la Proteína de Transferencia de Fosfolípidos (PLTP) generan una HDL-3 y una partícula Pre-β1, que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol (6). Las partículas que contienen Apo-AI, son metabolizadas en el hígado por medio del receptor Apo B/E o a través del riñón[32, 33] (Modificado de Pérez-Méndez, 2000)

2.2.4 Propiedades endoteliales de las HDL

El endotelio vascular se constituye por una monocapa de células que recubren la pared interna de vasos y capilares. Mediante mecanismos específicos, regula el flujo sanguíneo, permeabilidad y tono vascular a través del Óxido Nítrico (NO); un potente vasodilatador sintetizado por Óxido Nítrico Sintetasa Endotelial (ONSe)[38].

El NO a su vez, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, impide la proliferación de células musculares lisas y la expresión de E-selectina y VCAM-1[39, 40], además, mantiene un estado antitrombótico, profibrinolítico y antioxidante[18].

En este contexto, las HDL inhiben la apoptosis de células endoteliales (CE) mediante la regulación de vías en las que participa apoA-1[28]. Además, las HDL favorecen la estabilidad de la ONSe, inducen la cascada de señalización para su fosforilación y aumentan su tiempo medio de vida y abundancia[17, 41 y 42]. También interactúan con receptores de señalización como ABCA1, presentes en células endoteliales, los cuales, se ha propuesto que pudieran asociarse a la internalización de HDL en estas células, aunque este mecanismo aún no es bien conocido[17, 43]. Estudios previos de nuestro grupo, en el Instituto Nacional de Cardiología, demostraron que las células endoteliales en cultivo internalizan a las HDL. Durante este proceso, las HDL depositan colesterol y esfingomielina en las células endoteliales[43]. Esta entrega de lípidos por parte de las HDL a las células en cultivo da como resultado una reducción de la expresión de ICAM-1 que depende de la esfingomielina. Además, la internalización de las HDL induce la activación de la fosforilación de la ONSe, en un proceso que depende solo de la presencia de colesterol en la partícula[43].

Estos resultados sugieren que las HDL regulan la función endotelial en un proceso que depende de la composición lipídica de la lipoproteína[43].

Cabe destacar que bajo ciertas condiciones las HDL sufren alteraciones en su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y endotelial, principalmente en sujetos con diabetes mellitus (DM), hipertrigliceridemia o con defectos en el metabolismo de lipoproteínas. Además, se ha observado que las HDL de pacientes con enfermedad coronaria exhiben propiedades proinflamatorias cuando son expuestas a CE induciendo disfunción endotelial y el desarrollo de ECV[4, 5, 44 y 45].

La disfunción endotelial se ha identificado como un factor común en las ECV y metabólicas, en especial con la EAC, por lo que actualmente se considera como un factor predictor de eventos clínicos al constituir una de las primeras etapas de la formación de la placa ateroesclerosa[46].

2.3 Disfunción endotelial (DE)

La DE se caracteriza por un desequilibrio en la producción de sustancias vasoactivas y pérdida de la integridad vascular, que produce inhibición de la síntesis de NO y sobreexpresión de agentes vasoconstrictores, provocando un aumento del tono vascular e inflamación, agregación plaquetaria, proliferación de células musculares lisas, incremento de la permeabilidad vascular y desarrollo de la placa aterosclerótica[34, 46].

Enfermedades metabólicas como HTA y DM propician defectos en la función endotelial[46], ocasionando efectos como[47]:

- Reducción en producción de NO
- Aumento en el depósito de lípidos
- Hiperproducción de radicales libres
- Pérdida de control del tono vascular
- Estrés oxidativo
- Aumento de adhesión plaquetaria
- Aumento de adhesión para leucocito-monocito
- Reducción en producción de Prostaglandina II

Estas condiciones también se encuentran asociadas con la presencia de dislipidemia aterogénica, caracterizada por la presencia de partículas LDL pequeñas y densas en el espacio subendotelial [48]. Asimismo, se relacionan con disminución en la función antioxidante de la enzima PON-1, y desacoplamiento de la Apo-AI, responsable de anclar las HDL discoidales a membranas ricas en colesterol y facilitar su intercambio, evitando su acumulación en distintos tejidos periféricos y macrófagos[49, 50].

2.4 Formación de la lesión aterosclerótica

La aterosclerosis es una patología crónico-inflamatoria caracterizada por engrosamiento y pérdida de elasticidad de los vasos sanguíneos, consecuencia de la acumulación en el espacio subendotelial de colesterol, colágeno, calcio, macrófagos y linfocitos, además de la proliferación de células del músculo liso y expresión de citocinas y de factores de crecimiento[47, 51]. El proceso de la formación de la placa aterosclerótica se describe en la **Figura 5**.

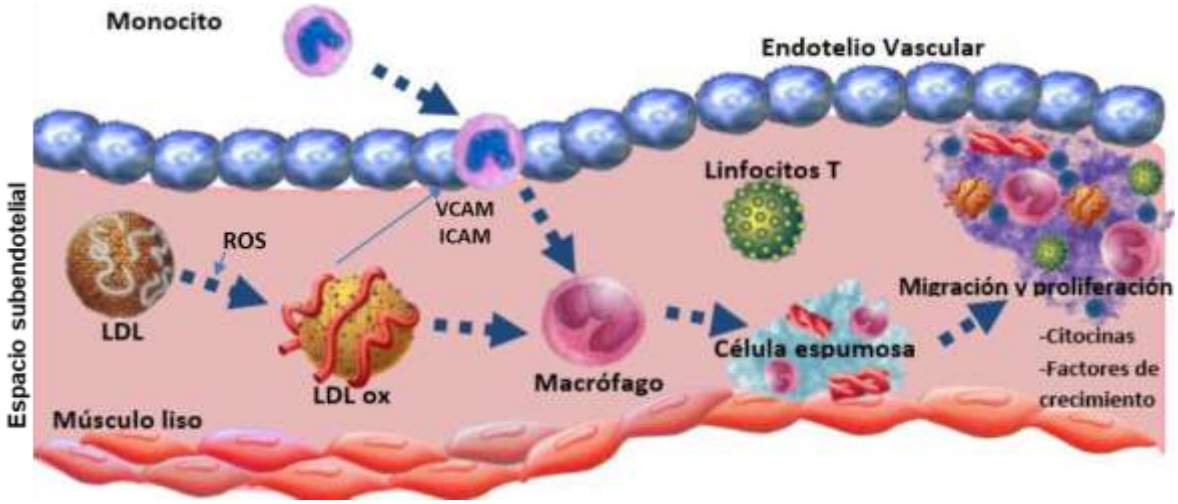

Figura 5. Formación de la placa aterosclerótica

El endotelio vascular disfuncional facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde son oxidadas por especies reactivas de oxígeno (ROS), generando LDL-ox que estimulan al endotelio para producir moléculas de adhesión, como VCAM e ICAM, permitiendo que los monocitos se adhieran a su superficie y se internalicen en la subíntima diferenciándose a macrófagos, los cuales, fagocitan las LDL-ox, pero al no poder metabolizar su colesterol se transforman en células espumosas, generando una respuesta quimiotáctica, que atrae más monocitos a la zona dañada e inducen apoptosis celular. Por otra parte, los macrófagos liberan Interleucina-1 (IL-1), responsable del proceso inflamatorio, lo que induce la migración de linfocitos T, dando paso a la proliferación de musculo liso, debido que junto con el calcio forman una capa fibrosa para cubrir el núcleo lipídico de la zona afectada [52, 53]. (Modificado de Peña de la Sancha, 2018)

A medida que la congregación de diversos factores promueve la progresión de la placa, esta podría ocasionar la oclusión de la luz arterial o el desprendimiento de un trombo a la circulación, provocando un evento cardiovascular agudo[54].

2.5 Factores de riesgo cardiovascular

Las manifestaciones clínicas de la ateroesclerosis son la enfermedad cerebrovascular y EAC[2], que surgen como consecuencia de la suma de factores de riesgo cardiovascular.

Entre los factores no modificables, se incluye la edad (> 40 años), género masculino y predisposición genética. Por otro lado, los factores modificables comprenden el consumo de alcohol y tabaco, inactividad física y una dieta inadecuada, con alto contenido de hidratos de carbono simples y grasa saturada, que se asocian a

alteraciones en el perfil de lípidos como hipertrigliceridemia en ayuno y favorecen el desarrollo de obesidad abdominal[55, 56].

La obesidad abdominal, se caracteriza por exceso de tejido adiposo visceral, relacionado con resistencia a la insulina, dislipidemia e HTA[57]. Según el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos[58], la obesidad abdominal constituye un criterio para la evaluación de riesgo cardiovascular y se define por una circunferencia de cintura >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres. Asimismo, el índice de cintura-cadera (ICC) se determina mediante su cociente y clasifica el riesgo cardiovascular[59] como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Índice de cintura cadera.

Riesgo cardiovascular	Mujeres	Hombres
Bajo	≤ 0.80	≤ 0.95
Moderado	0.81 a 0.84	0.96 a 0.99
Alto	≥ 0.85	≥ 1

El ICC mide el nivel de grasa visceral y se estima como el cociente del perímetro de cintura y cadera. La OMS establece parámetros normales para la determinación de obesidad abdominal. (Modificado de Rosas y Attie, 2007)

De acuerdo con el Panel III de Tratamiento de Adultos (ATP III) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) de Estados Unidos de América, la obesidad abdominal en conjunto con otros factores de riesgo metabólico como sucede con la dislipidemia aterogénica, la presión arterial elevada y la resistencia a la insulina, propician un estado protrombótico e inflamatorio que se encuentran ligados con un incremento del riesgo cardiovascular[60, 61].

2.6 Dislipidemias

Las dislipidemias o alteraciones en la concentración sérica de lípidos incrementan potencialmente el riesgo cardiovascular[62]. En México las de mayor prevalencia son hipercolesterolemia, hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia[62]. En cuanto a los valores de referencia de concentraciones séricas de lípidos, el ATP III establece los parámetros ilustrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de referencia de lípidos plasmáticos.

Lípidos	Concentración (mg/dL)	Categoría
c-LDL	< 100	Óptimo
	100 – 129	Deseable
	130 – 159	Limite alto
	160 – 189	Alto
	≥ 190	Muy alto
Colesterol total	< 200	Deseable
	200 – 239	Limite alto
	≥ 240	Alto
c-HDL	< 40	Bajo
	≥ 60	Deseable

El ATP III establece los parámetros de concentración de lípidos plasmáticos de colesterol-LDL (c-LDL), colesterol total y colesterol-HDL (c-HDL), en la cual, se asigna un riesgo cardiovascular. (Modificado de: Adult Treatment Panel III, ATP III, 2001)

2.6.1 Hipertrigliceridemia

Se define por una concentración plasmática elevada de TGL (>150 mg/dL)[61]. Su importancia clínica radica en que contribuye al desarrollo de ateroesclerosis y EAC[63, 64]. Se asocia con la formación de partículas de LDL más densas y pequeñas, que se internalizan fácilmente en la pared arterial, lo que les confiere alta capacidad aterogénica, por lo cual, es considerada como un factor de riesgo independiente en el desarrollo de ECV[65]. Su clasificación de acuerdo con la concentración sérica de TGL se describe en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación de triglicéridos séricos

Concentración de Triglicéridos (mg/dL)	Clasificación
<150	Deseable
150 – 199	Limite alto
200 – 499	Alto
≥ 500	Muy alto

De acuerdo con el Panel III de Tratamiento de Adultos, establece la concentración de triglicéridos plasmáticos, relacionado al riesgo cardiovascular. (Modificado de: Adult Treatment Panel III, ATP III, 2001)

Los factores que influyen en el desarrollo de la hipertrigliceridemia se clasifican en primarios, cuando son a causa de factores genéticos e incluyen una amplia gama de mutaciones en genes que intervienen en el metabolismo lipídico[66]. Por ejemplo, el déficit de lipoproteinlipasa o de su cofactor ApoC-II, induce una elevación de quilomicrones y aumento de TGL transportados por VLDL, debido a que son un factor clave para su metabolismo e hidrólisis[67].

La hipertrigliceridemia secundaria se presenta como consecuencia de DM, obesidad, insuficiencia renal, resistencia a la insulina, o consumo de fármacos como estrógenos, β-bloqueadores o diuréticos[68]. También, se asocia con consumo excesivo de hidratos de carbono simples, como azúcares refinados[69], por lo que la OMS recomienda que el consumo de azúcar simple debe ser <10%, del requerimiento calórico total[70].

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016, estimó que en la población mexicana la proporción del consumo de bebidas azucaradas no lácteas es de 85.3%, de botanas, dulces y postres un 38.8% y un 45.6% de cereales dulces[71]. El consumo excesivo de carbohidratos propicia la lipogénesis, donde a partir de la glucólisis se obtiene piruvato y posteriormente acetil-CoA, que por acción de CoA-

carboxilasa es convertido en Malonil-CoA, paso clave en la síntesis de ácidos grasos, que son esterificados con glicerol para formar TGL[72].

Por otro lado, en la *vía* exógena del transporte de lípidos, los TGL son distribuidos a tejidos periféricos por medio de quilomicrones, que son hidrolizados por acción de la LPL, liberando ácidos grasos, que son captados por células musculares y adiposas. Asimismo, las VLDL y LDL transportan los derivados lipídicos de la síntesis hepática a diferentes tejidos periféricos[72].

La elevación plasmática de TGL se asocia con incremento de c-LDL, caracterizado por partículas más aterogénicas que promueven el proceso inflamatorio en el endotelio y concentraciones bajas de c-HDL, relacionadas con alteraciones en la funcionalidad de estas lipoproteínas. Por ello, la hipertrigliceridemia se considera un factor importante de riesgo cardiovascular [66, 73, 74, 75].

2.6.2 Epidemiología de la hipertrigliceridemia

En población mexicana, la incidencia de hipoalfalipoproteinemia e hipertrigliceridemia es mayor que en otras poblaciones[63,64]. Al respecto, en un estudio realizado en 161,270 mexicanos, se detectó una incidencia de hipertrigliceridemia de 45,7% en mujeres y 40.40% en hombres, en un rango de edad de 41 a 61 años[63, 64]. Otros estudios epidemiológicos muestran que en México la prevalencia de hipertrigliceridemia de la población total es de 31.5% y se encuentra asociada con la presencia de variantes genéticas como el *APOA5* y *MLXIPL*[76, 77].

La Norma Oficial Mexicana “NOM-037-SSA2-2012: tratamiento y control de dislipidemias”, indica el uso de fármacos hipolipemiantes como niacina, estatinas y fibratos, que a través de diversos mecanismos ejercen una disminución plasmática de triglicéridos e incremento en los niveles c-HDL, con la finalidad de evitar el desarrollo de EAC y sus complicaciones[78, 79].

Sin embargo, indica como intervención primaria para la hipertrigliceridemia la terapia nutricional y cambios en el estilo de vida[79]. Por lo tanto, el uso de nutracéuticos, que se definen como un alimento o parte de este, que proporciona beneficios medicinales para la prevención y/o tratamiento de enfermedades[80], han tomado importancia en los últimos años. Entre estos, destaca el uso de ácidos grasos poliinsaturados, que se asocian con un papel cardioprotector[9, 10 y 11].

2.7 Ácidos Grasos Poliinsaturados

Los ácidos grasos polinsaturados forman parte de los ácidos grasos (AG), se encuentran constituidos por una cadena hidrocarbonada larga y un grupo carboxilo (-COOH), que le proporciona características fisicoquímicas específicas[81]. Los AG se clasifican de acuerdo con la presencia de dobles enlaces en[82]:

- **Ácidos grasos saturados (AGS)**: cuando hay ausencia de enlaces dobles.
- **Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI)**: cuando presentan un doble enlace en su cadena hidrocarbonada.
- **Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)**: cuando presentan dos o más dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada.

De acuerdo con las características de una dieta correcta, los AG deben aportar un 30-35% del requerimiento energético total, del cual los AGS deben cubrir un 10%, los AGMI un 15%, y los AGPI un 10%[79]. Los AGPI, se clasifican de acuerdo con la ubicación del primer doble enlace contando a partir del metilo terminal[11]. Los Omega-6 (n-6) se caracterizan por la presencia del primer doble enlace en el carbono 6, en los cuales se incluye a los ácidos linoleico (LA) y araquidónico (AA). Por otra parte, los n-3 presentan el primer doble enlace en el tercer átomo de carbono e incluye el ácido alfa-linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Cabe señalar que estos se denominan ácidos grasos esenciales, debido a que no pueden ser sintetizados en el organismo humano y es necesario obtenerlos de fuentes dietéticas[83, 84 y 85].

2.7.1 Ácidos Grasos Omega-3

Dentro de la familia de los n-3 destaca el ALA, que se encuentra principalmente en alimentos como la chía, coles de bruselas, nueces y linaza[86]. Su consumo recomendado es de 2,2 g/día[82]. El ALA a través de una secuencia alterna de desaturaciones y elongaciones dependientes de malonil coenzima A, genera EPA (C20:5) y DHA (C22:6)[81], como se describe en la **Figura 6**. Sin embargo, se estima que la tasa de conversión dentro del organismo de ALA a EPA es de 0.2 a 8% y de 0.13 a 6% para el DHA[87, 88 y 89]. Por lo tanto, como parte de una dieta saludable para cubrir los requerimientos fisiológicos, la recomendación de consumo al día de EPA y DHA es de 2.0 y 0.250 g, respectivamente. El EPA y el DHA se encuentran presentes en alimentos como sardina, ostión, trucha, arenque, anchoa y salmón[86].

Por otra parte, dentro de la familia de los n-6 se encuentra el LA que por acción de las enzimas desaturasas Δ5, Δ6 y elongasas dan origen al AA (C20:4), el cual, es precursor de eicosanoides bioactivos, como se describe en la **Figura 6**. Es importante mencionar que los n-3 y los n-6 emplean el mismo complejo enzimático para su síntesis, por lo que el n-6 puede actuar como inhibidor competitivo del n-3 y sus metabolitos derivados, disminuyendo sus efectos antiinflamatorios. En ello radica la importancia de mantener una proporción adecuada en el consumo de AGPI[82, 90 y 91].

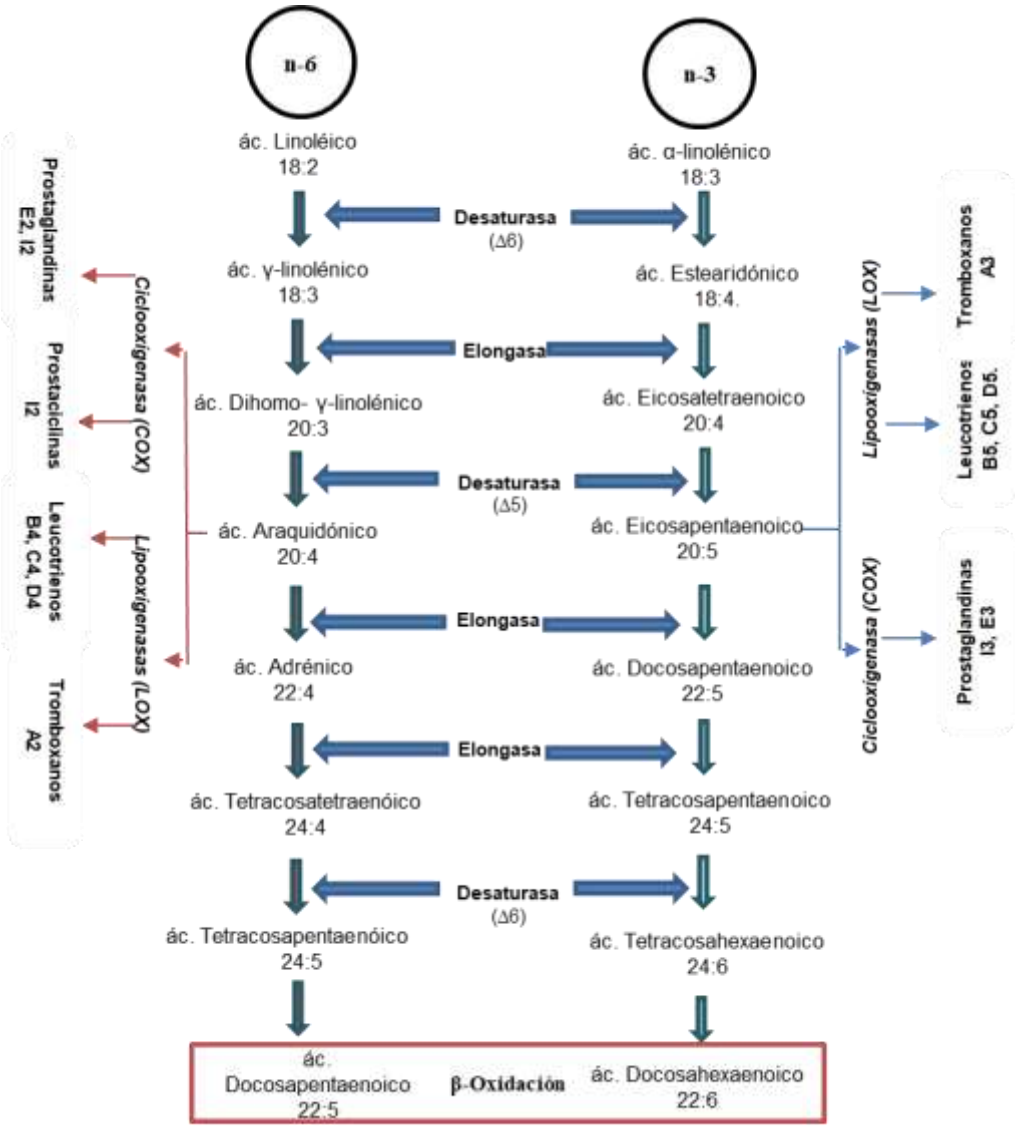

Figura 6. Metabolismo y bioconversión de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6. Durante la biosíntesis de los AGPI, participan las enzimas desaturasa Δ5 y Δ6, las cuales, actúan agregando un doble enlace a través de la eliminación de hidrogeno. Por otra parte, las elongasas agregan dos átomos de carbono a la estructura. La bioconversión de los ácidos grasos insaturados en el organismo depende de dos vías; una por acción de la ciclooxigenasa y otra por lipooxigenasa generando eicosanoides, los cuales son responsables de inducir o inhibir la inflamación[84]. (Tomado y modificado de Valenzuela et al, 2011)

El n-3 y el n-6 compiten por su incorporación en los fosfolípidos de la membrana celular, donde la fosfolipasa A2, hidroliza los enlaces de los fosfolípidos, liberando los AGPI, que por acción de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa dan origen

a eicosanoides como leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas, que intervienen en diversos procesos fisiológicos[84], como se describe en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Efectos metabólicos de los eicosanoides.

	Efecto Proinflamatorio	**Efecto antiinflamatorio**
	Omega 6 (AA)	**Omega 3 (EPA)**
Vía ciclooxigenasa	**PGE2**: potente mediador del dolor, la fiebre y del aumento de la permeabilidad vascular.	**PGI3:** antiagregante leve. **PGE3:** antiagregante leve y vasodilatador.
		Omega 6 (AA)
		Prostaciclina I2: vasodilatador, antiagregación plaquetario[25].
	Omega 6 (AA)	**Omega 3 (EPA)**
Vía lipooxigenasa	**LTB4:** proinflamatorio, produce agregación de neutrófilos y quimiotaxis de neutrófilos y eosinófilos.	**LTB5:** no quimiotáxico, inhibe adhesión.
	LTC4: proinflamatoria, promueve la permeabilidad de las células endoteliales, contrae las células del músculo liso y estrecha vías respiratorias periféricas.	
	LTD4: contrae las células del músculo y estrecha las vías respiratorias periféricas.	**TXA3**: vasoconstrictor débil y baja agregación plaquetaria.
	TX-A2: induce agregación plaquetaria, potente efecto vasoconstrictor.	

Los eicosanoides son metabolitos derivados de los AGPI. Los derivados de los n-6, generan un aumento en la permeabilidad vascular y producción de moléculas mediadoras de inflamación, dolor y agregantes plaquetarios[6]. Por lo que los derivados del metabolismo de los n-3 podrían contrarrestar sus efectos y se asocian con efectos benéficos en la prevención de ECV[8]. (Modificado de Valenzuela et al, 2011)

El EPA ejerce un efecto competitivo con los eicosanoides derivados del AA. A través de la vía ciclooxigensa, genera TX-A3, PG (I3, E3) y LT-B5, que reducen los efectos pro-inflamatorios y mantienen los niveles de Prostaciclina I2, la cual, ejerce un efecto inhibitorio de agregación plaquetaria y vasodilatador[84]. Asimismo, se ha observado que el DHA reduce la expresión endotelial de E-selectina, ICAM-1 y

VCAM-1 e inhibe la capacidad de adhesión de los monocitos[84]. Además, disminuye la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles SREBP-1 (por sus siglas en inglés *sterol regulatory element binding protein-1*) lo cual, reduce la síntesis *de novo* de los ácidos grasos y su almacenamiento[86].

2.7.2 Omega-3 y Enfermedad Cardiovascular

Diversos estudios epidemiológicos han evidenciado la relación entre el consumo de n-3 y menor incidencia de ECV. En 1976 Bang *et al*. (8), observaron en una población de nativos de Alaska, una menor incidencia de eventos cardiovasculares relacionada con un consumo elevado de pescado de agua fría, rico en EPA y DHA[8]. Derivado de estas observaciones, el estudio GISSI (*Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico* GISSI-*Prevenzione*) demostró que al suplementar n-3 (1000 mg/día por 3.5 años) a pacientes con enfermedad miocárdica, estos presentaban menor riesgo de muerte súbita en comparación con el grupo no suplementado[82, 92].

Asimismo, el estudio Japonés de Intervención con Ácido Eicosapentaenoico (*Japan Eicosapentaenoic Acid Lipid Intervention Study*, por sus siglas en inglés JELIS), investigaron el efecto del EPA (1800 mg/día) como tratamiento coadyuvante en pacientes con EAC tratados con estatinas. En el cual, se demostró una reducción en la concentración de colesterol total y TGL, además de una menor incidencia de eventos coronarios en el tratamiento combinado de estatinas y n-3 en comparación con los que únicamente llevaron tratamiento farmacológico[93]. El EPA y el DHA disminuyen la concentración sérica de TGL, VLDL y de marcadores inflamatorios, por lo cual, se ha empleado en el tratamiento y prevención de ECV[85, 90, 94 y 95].

La Asociación Americana del Corazón recomienda el consumo de 2 a 4 g/día de EPA y DHA, para lograr una reducción de TGL del 20 a 40%[96].

Los efectos metabólicos de los n-3 se deben en gran parte a la activación y modulación de una subfamilia de receptores nucleares denominados Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (por sus siglas en ingles PPAR's, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), los cuales, actúan como factores de transcripción. Se encuentran conformados por tres tipos; PPAR-α, PPAR-β y PPAR-γ, que modulan genes que regulan el balance energético, homeostasis de glucosa, metabolismo de lípidos y lipoproteínas[97, 98].

En particular, los PPAR-α estimulan la oxidación de AG a través de la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal en órganos como el hígado, corazón y tejido adiposo marrón, además de aumentar los niveles plasmáticos de c-HDL, regular la síntesis y transporte de colesterol[97, 98] y disminuir los niveles plasmáticos de TGL[73].Por otra parte, los PPAR-γ regulan la diferenciación del tejido adiposo, lipogénesis, sensibilidad a la insulina, expresión de enzimas del metabolismo de lípidos como la LPL, e incrementa el aclaramiento de TGL. El consumo de n-3 estimula la expresión de PPAR's y también modifica la respuesta inflamatoria al modular la expresión de genes como NF-KB[99,100,101].

Por otro lado, los PPAR-β actúan como reguladores de la oxidación de AG en distintos tejidos, regula el metabolismo mitocondrial, interviene en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas y posee una acción antagónica de la respuesta proinflamatoria[102].

A pesar de que es bien conocido el efecto benéfico de los n-3 sobre el perfil lipídico y su efecto cardioprotector, en la actualidad no existe una caracterización sobre los posibles cambios en la estructura y composición lipídica de las lipoproteínas de alta densidad por efecto de los n-3. Asimismo, poco se sabe sobre los cambios en la función endotelial de las HDL durante la suplementación con n-3[19].

2.7.3 Omega-3 y efectos sobre las HDL

Evidencia actual sugiere que el consumo de n-3 ejerce efectos sobre la función y distribución de subclases de HDL y otras lipoproteínas, lo que podría estar relacionado con su efecto cardioprotector. Al respecto, Woodman *et al.* (14), demostraron que tras la suplementación con EPA y DHA (4 g/día) durante 6 semanas en pacientes con DM tipo 2, presentaron cambios en la distribución de subclases de HDL, principalmente un aumento en la subpoblación de HDL-2. Así mismo, identificaron una disminución en la subclase HDL-3, sin cambios en la concentración de c-HDL o c-LDL, sin embargo, se reportó un incremento en el contenido de colesterol en la subclase HDL-2[14].

En adición, Petersen *et al. (13)*, reportaron en pacientes con DM e hipertrigliceridemia, un aumento de partículas HDL-2a y HDL-2b, así como una disminución de la subclase HDL-3, posterior a la suplementación con aceite de pescado (4 g/día durante 8 semanas), sin detectar cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de c-LDL y c-HDL[13]. También, se ha identificado en pacientes con DM2 suplementados con n-3, que induce una reducción en la proporción de partículas VLDL y HDL-2[14].

Calabresi L. *et al.* (7), documentaron que tras la suplementación de 4 g/día de n-3 durante 8 semanas en pacientes con hiperlipidemia familiar, se presentó un incremento en la fracción HDL-2a y HDL-2b y disminución en los niveles de HDL-3a y HDL-3b[7]. Así mismo, Wooten *et al.* (15), reportaron en hombres sanos sedentarios suplementados con ácidos grasos n-3 (EPA 4.55 g/d, DHA 1.6g/d), cambios en la distribución de subclases de HDL, principalmente una disminución de partículas HDL-3a y 3b, y un aumento de HDL-2b y 2a más grandes y flotantes[15].

Tanaka *et al*. (103), observaron en sujetos con dislipidemia, un incremento en la actividad antioxidante de PON-1 asociada a HDL posterior a la administración oral de EPA (1800 mg/d, 4 semanas). También, identificaron que las HDL enriquecidas con EPA promueven la reparación endotelial, además de aumentar el eflujo de colesterol desde los macrófagos y reducir la expresión de moléculas de VCAM-1[103]. Esto sugiere, que tales modificaciones posteriores a la suplementación con n-3, podrían estar relacionadas con mejoras en su función endotelial y convertirlas en partículas con un mayor potencial antiaterogénico que ayuden a reducir el riesgo cardiovascular.

Esto podría explicarse por la estrecha interacción de los n-3 en el metabolismo de las lipoproteínas a través de los PPARs[84]. Se ha comprobado que los fibratos, por medio de la activación de PPAR-α incrementan los niveles de c-HDL, disminuyen los niveles de triglicéridos y la expresión de Apo-CIII e inducen Apo-AI y Apo-AII[97]. PPAR-α promueve el eflujo de colesterol desde los macrófagos a Apo-AI[97].

De acuerdo con la evidencia presentada anteriormente, los n-3 podrían ejercen un efecto cardioprotector por medio de cambios inducidos en el contenido lipídico de HDL. Estos cambios en su composición lipídica podrían mejorar sus funciones

benéficas con respecto al funcionamiento endotelial. Sin embargo, en la actualidad no existe una caracterización de estos cambios y sus posibles efectos en las modificaciones sobre la función endotelial mediada por las HDL. En consecuencia, es necesaria la investigación sobre el efecto de los n-3 sobre la composición y la función de las HDL.

Por lo tanto, en el presente trabajo proponemos que la suplementación con ácidos grasos n-3, induce cambios favorables en la estructura y composición de las partículas HDL, relacionados con una mejora en su capacidad cardioprotectora, específicamente en su función endotelial.

3. JUSTIFICACIÓN

Las ECV constituyen un serio problema de salud pública y representan una gran carga socioeconómica para los sistemas de salud e instituciones gubernamentales[1].

En la actualidad, es común un estilo de vida sedentario acompañado de una ingesta excesiva de hidratos de carbono simples y ácidos grasos saturados, que favorecen el desarrollo de hipertrigliceridemia, desequilibrios en el metabolismo de las lipoproteínas y deterioro de la función del endotelio vascular, lo que incrementa el riesgo metabólico de desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica[2, 59].

Por otra parte, las HDL tienen una relación muy estrecha con la función vascular y modulan diversas funciones del endotelio, como la inhibición de la expresión de VCAM-1 e ICAM-1, previenen la apoptosis de las células endoteliales y promueven la síntesis del NO[16, 38, 39 y 40].

A pesar de que diversos estudios epidemiológicos han comprobado una relación inversa entre la concentración de c-HDL y la incidencia de eventos cardiovasculares[22, 27 y 31], en las últimas décadas, la evaluación de otros parámetros para determinar la capacidad ateroprotectora de las HDL ha cobrado importancia, dentro de los que destaca la evaluación de subclases de HDL[44, 43]. Estas pueden variar en su papel cardioprotector, al ser un grupo de partículas altamente heterogéneas y cuya función podría depender de su composición lipídica y proteica. Sin embargo, la evidencia aún no es concluyente[43, 44].

Por otra parte, el consumo de n-3 se relaciona con una menor incidencia de ECV[8]; principalmente porque promueven una disminución en la concentración de TGL plasmáticos[9, 10 y 11]. Sin embargo, no es suficiente para explicar su efecto

cardioprotector, y en la actualidad no se conocen a profundidad todos sus mecanismos[34]. Una posible explicación, es que sirven como ligando para los PPARs, que modulan diversas vías del metabolismo lipídico y de las lipoproteínas[84]. Lo anterior, pudiera estar relacionado con cambios en el metabolismo y composición de las HDL, así como modificaciones en su función y la distribución de sus subclases[96, 97].

Estudios realizados por diversos grupos de investigación[47, 48], así como resultados de nuestro laboratorio, sugieren que las HDL funcionan como vectores lipídicos del hígado hacia los tejidos periféricos, y que la calidad de los lípidos transportados podría afectar la función de estos tejidos[34].

Además, existe poca evidencia sobre el efecto de los n-3 sobre las HDL; algunos estudios han comprobado que el EPA y DHA promueven modificaciones en la distribución de subclases de HDL[12, 13, 14 y 15]. Sin embargo, en la actualidad no existe una caracterización de estos cambios y su posible efecto en modificaciones sobre las funciones de las HDL, principalmente en la función endotelial, debido a que es un paso clave en el desarrollo de EAC.

Por lo anterior, es preciso implementar ensayos clínicos y bioquímicos que permitan conocer los efectos de los ácidos grasos n-3 sobre las HDL, la distribución de sus subclases y función endotelial en condiciones como la hipertrigliceridemia, para así, generar conocimiento que contribuya a establecer medidas para el tratamiento o prevención de las ECV.

4. HIPÓTESIS

La suplementación con ácidos grasos omega-3 modifica la distribución de subclases y sus efectos sobre la función endotelial de las HDL en sujetos con hipertrigliceridemia.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de la suplementación de ácidos grasos omega-3 en pacientes con hipertrigliceridemia sobre la distribución de tamaños y contenido lipídico de las subclases de HDL y establecer en un modelo *in vitro* si dichos cambios se relacionan con modificaciones en la función endotelial de estas lipoproteínas.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar los cambios en la distribución de tamaños de las HDL aisladas de plasma de pacientes con hipertrigliceridemia mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, después de la suplementación con ácidos grasos omega-3.
2. Determinar los cambios en la composición lipídica de las subclases de HDL aisladas de plasma de pacientes con hipertrigliceridemia mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, después de la suplementación con ácidos grasos omega-3.
3. Cuantificar el contenido de EPA y DHA en las HDL aisladas de plasma de pacientes con hipertrigliceridemia, después de la suplementación con ácidos grasos omega-3.
4. Determinar la función endotelial mediada por HDL usando un modelo *in vitro* en anillos de aorta de rata Wistar, incubadas con las lipoproteínas de alta densidad aisladas del plasma de pacientes con hipertrigliceridemia.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diseño de estudio

Los resultados presentados en esta investigación son complementarios a un estudio previo de nuestro grupo de trabajo[52], en el Laboratorio de Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Intervención: Ensayo clínico cruzado aleatorizado, controlado con placebo. Los sujetos de estudio fueron asignados a 2 grupos (n=9). Un grupo inició con 2 g/d OMACOR (Laboratorio Ferrer, cápsulas blandas de 1000 mg de Omega-3 90, EPA 460 mg, DHA 380 mg) por un periodo de 5 semanas, y el otro grupo inició con placebo (Cápsulas de gelatina sin azúcar).

Actividad física: Se indicó a los pacientes continuar con su actividad física habitual evitando ejercicio intenso durante la duración de la intervención, con el fin de mantener la composición corporal sin modificaciones.

Dieta: Con el fin de homogeneizar la proporción de macronutrientes de los pacientes, previo al tratamiento y toma de muestra, ambos grupos iniciaron con una dieta isocalórica individualizada por un periodo de una semana, ajustada a sus necesidades energéticas determinadas por su consumo habitual, que fue estimado promediando al menos 3 recordatorios de 24 h. La dieta tuvo una distribución de macronutrientes del 30% de lípidos, 50% de carbohidratos y 20% de proteína del requerimiento calórico total.

Tratamiento: El tratamiento consistió en la suplementación de 2 g/d OMACOR o 2 cápsulas de placebo durante 5 semanas. Posteriormente, se procedió a 4 semanas de lavado del tratamiento, en el que los pacientes continuaron únicamente con la

dieta isocalórica, sin ningún tratamiento, con el fin de eliminar el efecto del OMACOR. Posteriormente se procedió con el cruce de tratamientos; el grupo placebo inició con 5 semanas de suplementación con OMACOR y viceversa, como se muestra en la **Figura 7**.

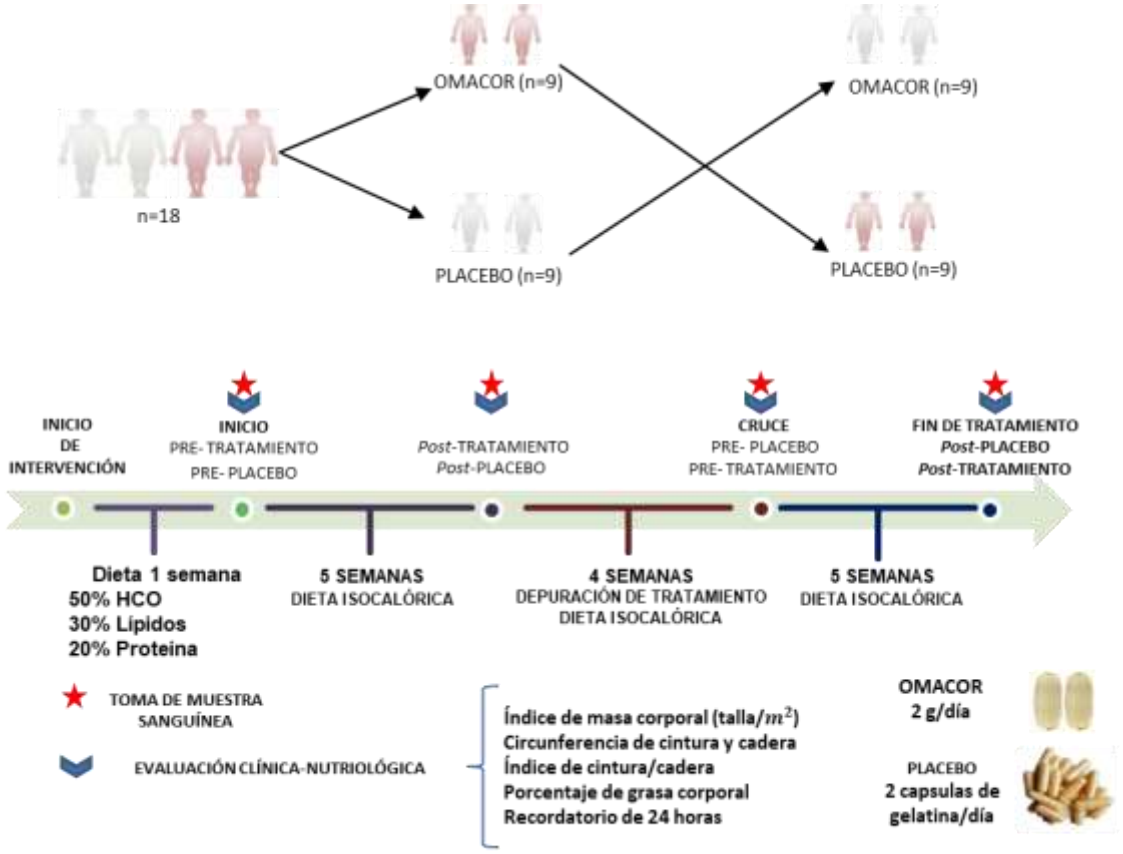

Figura 7. Diagrama de intervención del estudio.
Un grupo inició con 2 g/d n-3 (cápsulas de 1000 mg de n-3 al 90%, EPA 460 mg, DHA 380 mg) y el otro grupo inició con placebo. Después de 5 semanas de tratamiento, los sujetos siguieron 4 semanas sin n-3 o placebo para la depuración del tratamiento y posterior cruce de éste. Se realizó una evaluación clínico-nutriológica y se indicó una dieta isocalórica, con el fin de evitar factores dietéticos de confusión. Adicionalmente en cada una de las fases del estudio se obtuvo muestra sanguínea para estudios relacionados con la composición, estructura y distribución de HDL

Universo de estudio

Población de estudio: Hombres de 30 a 65 años con hipertrigliceridemia (n=18).

El tamaño de muestra fue determinado por conveniencia.

Criterios de Inclusión: Con base en las indicaciones para prescribir OMACOR, se reclutaron 18 sujetos con hipertrigliceridemia (>200 mg/dL), de sexo masculino para evitar variaciones fisiológicas del nivel de triglicéridos plasmáticos asociados al ciclo menstrual o factores hormonales en mujeres.

Criterios de Exclusión: Eventos cardiovasculares previos, tratamiento con fármacos antidislipidémicos (fibratos, niacina o estatinas), fármacos anticoagulantes o suplementación reciente con n-3 (menor a 3 meses), enfermedad hepática crónica o aguda, enfermedades tiroideas, renales, Diabetes Mellitus e hipertensión.

Criterios de eliminación: No concluir el estudio o interrumpir el tratamiento. Niveles de TGL <150 mg/dL después de la intervención con dieta isocalórica.

6.2 Toma de muestra sanguínea

Se obtuvieron muestras de sangre venosa (10 mL) de los pacientes en ayuno. Se colectaron en tubos con EDTA como anticoagulante que fueron centrifugadas a 3000 rpm/12 min. Posteriormente, se separó el plasma del paquete globular y se almacenó a -70°C hasta el momento de su análisis.

Se obtuvieron las siguientes muestras sanguíneas de cada paciente.

Pacientes que inician con tratamiento	Pacientes que inician con placebo
1. Pre-tratamiento	1. Pre-placebo
2. Post-tratamiento	2. Post-placebo
3. Pre-placebo	3. Pre-tratamiento
4. Post-placebo	4. Post-tratamiento

6.3 Evaluación nutricional e historia clínica

Se aplicó a los sujetos de estudio una historia clínica-nutriológica (**Anexo 1**), que incluye antecedentes personales y familiares, patológicos y no patológicos, así como aspectos dietéticos. Para tener un control sobre la ingesta dietética de los participantes, se aplicó un recordatorio de 24 horas de 3 días de la semana anterior a la toma de cada muestra, que incluía 2 días de la semana y 1 de fin de semana para conocer el consumo previo antes de la obtención de muestra sanguínea. Asimismo, se instruyó a los pacientes para llevar el registro de un diario de alimentos durante toda la intervención para conocer su apego a la dieta (**Anexo 2**).

Como parte de la evaluación se determinaron los siguientes parámetros antropométricos:

- Peso (kg) (Báscula OMRON®)
- Talla (m) (Estadímetro electrónico SOHENLE®)
- Índice de Masa Corporal (IMC): Peso (kg) / Talla (m^2)
- Circunferencia de Cintura y Cadera (Cinta métrica marca SECA®)
- Índice Cintura/Cadera (ICC): Circ. cintura (cm) / Circ. Cadera (cm)
- Porcentaje de Grasa Corporal (Medidor de grasa corporal OMRON®)

6.4 Procesamiento de muestras y técnicas utilizadas

A partir del plasma sanguíneo se determinó el perfil bioquímico de tres elementos (glucosa, colesterol y triglicéridos) y mediante ultracentrifugación secuencial se obtuvieron HDL purificadas, que fueron utilizadas para realizar la determinación la composición lipídica y distribución de subclases de HDL (**Figura 8**).

Figura 8. Diagrama de flujo del estudio

El plasma sanguíneo se utilizó para la determinación del perfil de lípidos mediante técnicas enzimáticas colorimétricas. Posteriormente, por ultracentrifugación secuencial se obtuvieron HDL purificadas, para la determinación de su composición lipídica y determinación de EPA y DHA en HDL por cromatografía de gases, así como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para identificar cambios en la distribución de subclases de HDL. Además, se realizaron ensayos de función endotelial en aorta de rata Wistar incubadas con HDL de los pacientes en una cámara de órgano aislado para determinar la vasodilatación mediada por endotelio.

6.4.1 Determinación de la concentración plasmática de lípidos y glucosa

Se realizó la determinación del perfil de lípidos y glucosa a partir del plasma sanguíneo, mediante ensayos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox® Laboratories LTD, Reino Unido), usando los métodos descritos previamente por (52). La absorbancia fue leída a 505 nm en espectrofotómetro Beckman Coulter DU® UV/Vis spectrophotometer; Alemania.

Para la evaluación del perfil de lípidos de HDL, se realizó un precipitado selectivo de las lipoproteínas que contienen Apo-B (VLDL, IDL, LDL) con el reactivo comercial de Randox® (sulfato de dextran/magnesio, 100 µL de plasma/250 µL de reactivo precipitante). Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm/10 min. El sobrenadante que contiene las HDL totales, se utilizó para determinar la concentración de c-HDL,

PLP-HDL y TGL-HDL por ensayo enzimático colorimétrico (Randox® Laboratories LTD, Reino Unido). La absorbancia fue leída a 505 nm en espectrofotómetro Beckman Coulter.

La composición de ácidos grasos EPA y DHA en HDL purificadas por ultracentrifugación secuencial, se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

6.4.2 Ultracentrifugación secuencial (US)

Para el aislamiento y purificación de las HDL, se realizó mediante US (Beckman Optimal TLX; Alemania, **Anexo 3**) a partir de plasma en tubos de policarbonato de 3.2 mL, usando los métodos descritos previamente por (Peña, 52). Se empleó bromuro de potasio (KBr) sólido para ajustar el plasma a diferentes densidades. Inicialmente se aíslan las lipoproteínas que contienen Apo B, ajustando la densidad a 1.063 g/mL con KBr sólido, fue centrifugada a 100,000 rpm, por un lapso de 2.5 h a una temperatura de 4°C. Posteriormente se aislaron las HDL a una densidad de 1.21 g/dL con KBr sólido, durante 3 h y finalmente se realizó un lavado con una disolución de densidad (KBr) 1.25 g/mL, nuevamente durante 3 h. El producto final obtenido es HDL totales purificadas. Con esta técnica se logró colectar hasta el 85 % de estas moléculas sin contaminación de otras partículas de menor densidad.

6.4.3 Ensayo de función endotelial en cámara de órgano aislado

Se evaluó el efecto de HDL aisladas de los pacientes sobre la función endotelial *in vitro* (**Anexo 4**), usando los métodos descritos previamente por (Peña, 52). Se emplearon anillos de aorta de rata Wistar macho, los cuales se incubaron a baño María con una temperatura constante de 37ºC y oxigenación regular durante cuatro

horas en tubos Eppendorf con solución fisiológica, y HDL asiladas a una concentración de 50 mg/dL en un volumen final de 300 µL.

Posterior a la incubación, los anillos de aorta fueron montados en 5 cámaras de órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs (D-glucosa, Sulfato de magnesio, fosfato de potasio monobásico, cloruro de potasio, cloruro de sodio) a 37º C. Se ajustó la tensión basal del gancho-transductor a un 1 g. Se realizaron lavados con solución de Krebs a cada una de las cámaras en intervalos de quince minutos durante una hora. Finalmente, se dejó estabilizar el tejido durante quince minutos y se procedió a agregar 15 µL de fenilefrina 1mM para inducir una pre-contracción en el tejido, cuando alcanzó la contracción máxima, se evaluó el porcentaje de relajación en anillos de aorta de rata Wistar inducida por una curva de acetilcolina (Ach) a diferentes concentraciones.

De los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje de relajación con respecto a los milímetros totales de contracción inducida por la fenilefrina.

6.4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE).

El análisis y determinación de la composición proteica y lipídica de las subclases de HDL aisladas, se llevó a cabo a través de electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente 3-30% en condiciones nativas (**Anexo 5**), usando los métodos descritos previamente (Peña, 104).

El uso de esta técnica permitió diferenciar en 5 subclases las HDL de acuerdo con su radio hidrodinámico utilizando marcadores de alto peso molecular de proteínas (**Figura 9**).

- HDL-2b (10.58-12.36 mm), HDL-2a (9.94-10.58 mm).
- HDL-3a (8.98 -9.94mm), HDL-3b (8.45-8.98 mm) y HDL-3c (7.9-8.45 mm).

Se realizaron cuatro réplicas de cada gel para la determinación del contenido lipídico de HDL; se tiñó cada una con el reactivo revelador de lípidos (**Anexo 6**) correspondiente a colesterol total, colesterol libre, triglicéridos y fosfolípidos, usando los métodos descritos previamente por (104). Posteriormente, se escanearon en el Densitómetro BIO RAD GS-800 para su análisis correspondiente. A continuación, los geles fueron decolorados con una mezcla de metanol (25%), ácido acético (10%) y agua destilada para conocer la distribución de proteína. Los geles se tiñeron con el colorante azul de Coomassie R250 al 0.1% (solubilizado en metanol 25%, ácido acético 10% y agua) y posteriormente decolorados para ser escaneados.

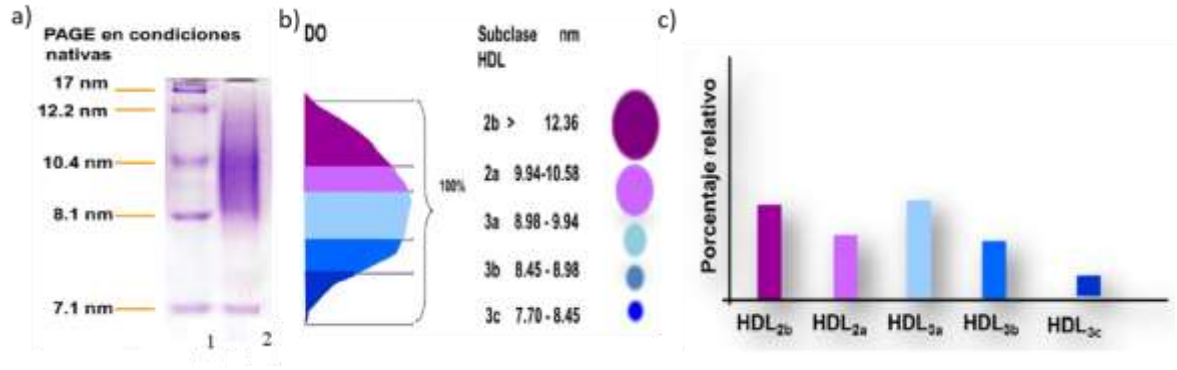

Figura 9. Migración de HDL en PAGE y análisis densitométrico

a) Se muestra la migración de la muestra de HDL aisladas en un gel PAGE nativo teñido con Azul de Coomassie. 1) En este carril se encuentra el marcador de proteína de alto peso molecular, 2) En este carril se encuentra una muestra de HDL al final de la electroforesis. b) Densitograma correspondiente que presenta la DO (densidad óptica) contra la distancia migrada. c) Proporción relativa de cada una de las subclases de HDL, con relación al análisis densitométrico e integración parcial de cada uno de los intervalos. Modificado de Pérez-Méndez et al, 2005.

De cada gel se obtuvo un densitograma correspondiente a los lípidos y proteínas asociadas, las cuales se analizaron en el programa Visionworks 8.2

6.5 Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por la comisión científica y de bioética del Instituto Nacional de Cardiología (No. de Protocolo 17-996). Todos los pacientes incluidos firmaron una carta de consentimiento informado (**Anexo 7**), en la cual se especificó el fundamento, los objetivos y el alcance del protocolo. Asimismo, se detalló en qué consistía su participación. La información y datos personales recabados de los participantes del estudio se manejaron de forma confidencial y sus identidades se mantuvieron en anonimato.

Los posibles efectos secundarios y riesgos de este proyecto se consideran como mínimos. Se explicó a los pacientes que como consecuencia del consumo de cápsulas de n-3 podrían sufrir de trastornos gastrointestinales, como distensión abdominal, estreñimiento, diarrea, dispepsia, flatulencias, eructos, reflujo gastroesofágico, náuseas o vómitos. Derivado de la toma de muestra sanguínea es posible que presentaran dolor durante la punción y posible formación de hematoma.

6.6 Análisis estadístico

La distribución normal de las variables fue evaluada con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. La significancia de las diferencias entre los grupos fue determinada por una prueba *t* de Student para las variables con distribución normal. Las comparaciones independientes de los grupos para las variables que no tienen distribución normal fueron analizadas mediante la prueba de Wilcoxon.

Los valores con un valor de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos ($p < 0.05$ = *, $p < 0.01$=**, $p < 0.001$=***). Los valores de las variables con distribución normal fueron expresados con mediana ± desviación estándar. Para los variables de valores de distribución anormal fueron expresados por error estándar [ES]. El análisis estadístico se realizó con el Software GraphPad PRISM. Versión 6.1 (2012).

7. RESULTADOS

7.1 Características de la población, adherencia a la dieta y determinación de parámetros antropométricos y bioquímicos.

El presente trabajo se desarrolló en colaboración con el banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología, el cual nos brindó la oportunidad de reclutar candidatos para nuestro trabajo experimental. Entre el 1 de julio y el 30 septiembre del 2018 se captaron 105 pacientes masculinos entre 30 y 65 años, los cuales siguieron el protocolo de selección para poder participar en nuestro estudio. Posterior a una minuciosa selección, solamente fueron elegibles 18 participantes, las causas principales de exclusión fueron que la mayoría de los pacientes presentaron glucosa elevada y baja concentración de triglicéridos en ayunas, como se recapitula en la **Figura 10**.

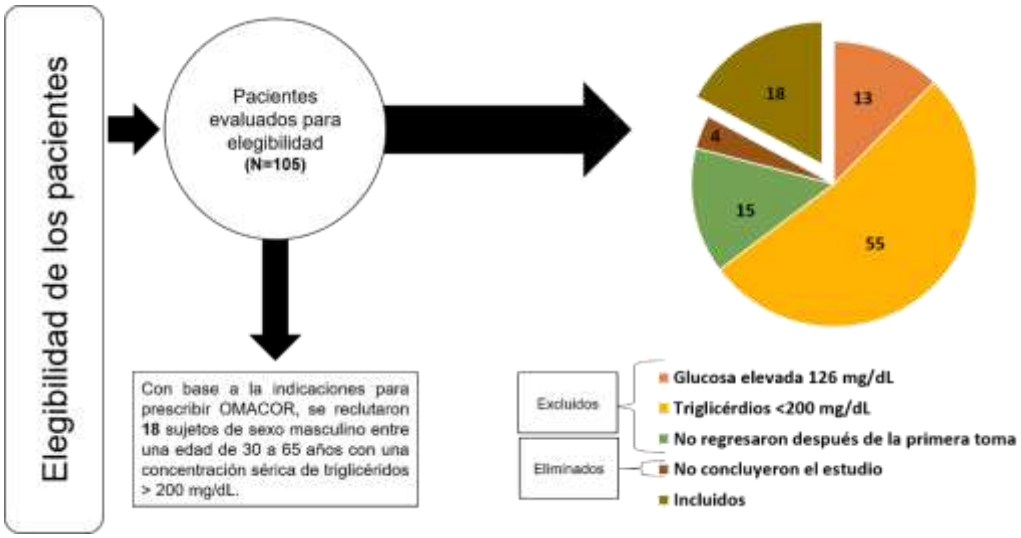

Figura 10. Diagrama de flujo de la selección de pacientes en el estudio

Durante toda la intervención fue muy importante monitorear el apego a la dieta isocalórica que se estableció de forma individual para cada paciente, con el fin de evitar variaciones en el consumo calórico y de macronutrientes que pudieran

modificar los resultados observados en el estudio. Para evaluar el apego a la dieta se realizó un recordatorio de 24 h, cada vez que los pacientes acudían a la intervención. El promedio de 3 recordatorios de 24 h se presenta en la **Figura 11**. Cabe resaltar que durante el análisis no se identificaron cambios significativos en la cantidad de energía y macronutrimentos de los pacientes durante todas las fases del estudio. Es importante mencionar que este instrumento nos permitió identificar el apego a la dieta isocalórica, por lo cual, podemos descartar que los cambios observados en los parámetros antropométricos y bioquímicos sean derivados a modificaciones en la dieta.

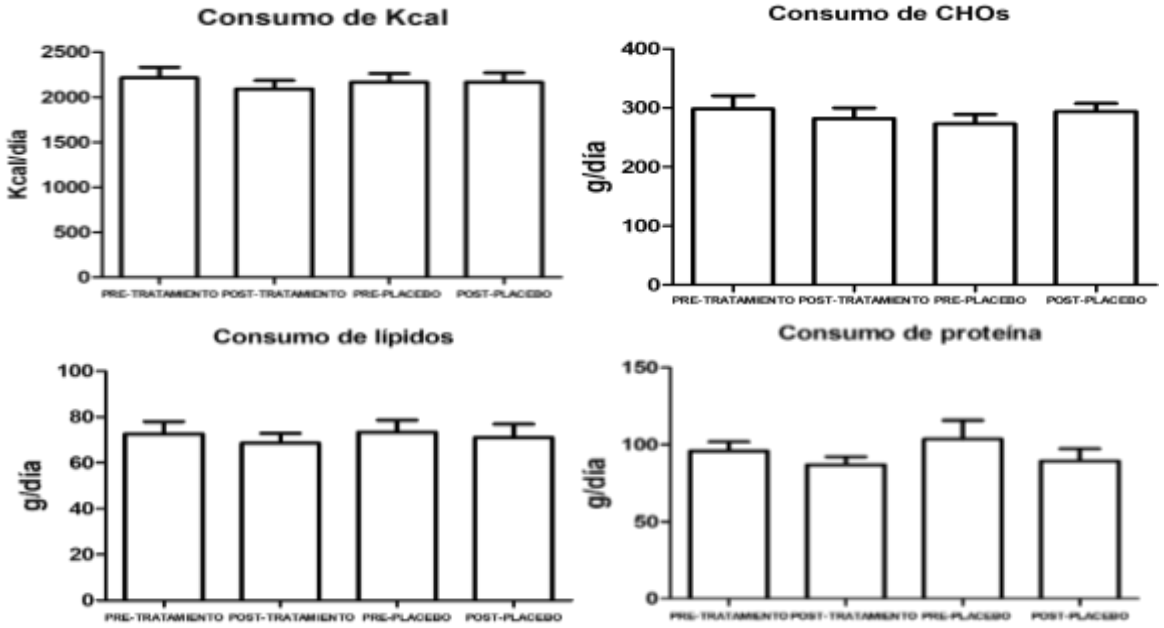

Figura 11. Análisis de recordatorio de 24 h

En el análisis de recordatorio de 24 horas, el consumo energético se mantuvo sin cambios significativos durante toda la intervención. Además, no se encontraron cambios en el consumo de macronutrimentos como son los hidratos de carbono (CHOs), lípidos y proteínas, en los distintos tiempos del tratamiento. Los valores son representados como promedio y desviación estándar.

Adaptado de Peña de la Sancha, 2018 (Ref. 52)

Por otra parte, dentro del análisis de recordatorio de 24 horas se evaluó también la ingesta de AGS, AGMI y AGPI de la dieta como se describe en la **Figura 12**, en la cual, se puede apreciar que en el momento Post-placebo hubo una disminución en

el consumo de AGMI, sin embargo, estas modificaciones no fueron acompañas por cambios antropométricos o bioquímicos significativos. De manera general, con este resultado, podemos tener la certeza de que los cambios observados en la composición corporal y perfil de lípidos no son consecuencia de modificaciones en los hábitos de alimentación.

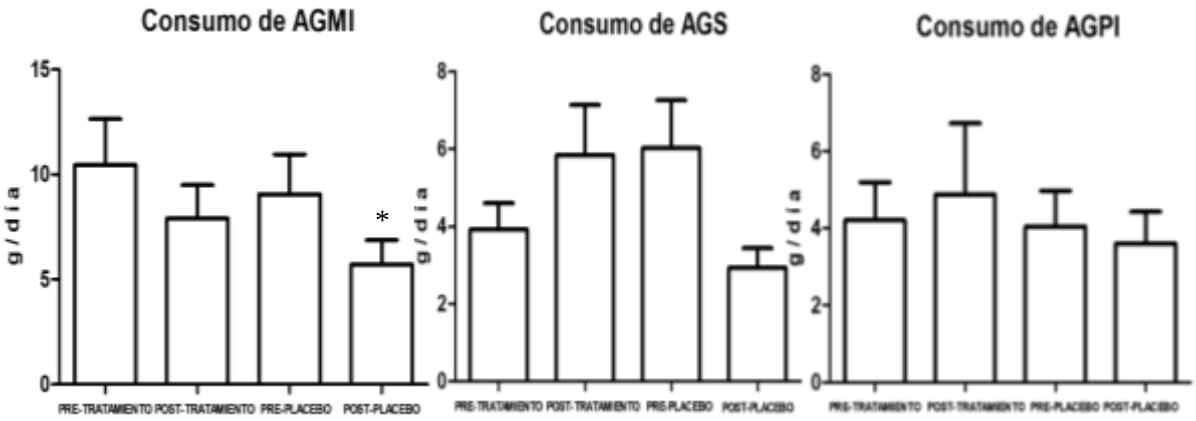

Figura 12. Análisis de consumo de ácidos grasos

No identificaron cambios significativos en la ingesta en gramos de ácidos grasos durante la intervención, a excepción del consumo de AGMI en el momento Post-placebo con respecto al Pre-tratamiento. Los valores son representados como promedio y desviación estándar.

Adaptado de Peña de la Sancha P, 2018 (Ref. 52)

Como se describió anteriormente en este estudio se seleccionaron únicamente sujetos masculinos, los cuales presentaron un promedio de 42 años, con un peso promedio de 87.84 ± 11.05 kg durante el Pre-tratamiento y un índice de masa corporal promedio de 31.56 ± 5.03 kg/m^2, con lo cual, los sujetos presentaban sobrepeso u obesidad. La **Tabla 6** describe las características generales de la población que engloba peso, talla, IMC, circunferencia de cintura, circunferencia de cadera, resultados obtenidos durante la intervención clínica-nutriológica. En particular, de la **Tabla 6**, podemos destacar que posterior a la suplementación con n-3, hubo diferencias significativas en las mediciones antropométricas como: el peso ($p < 0.001$), circunferencia de cintura ($p < 0.001$) y la circunferencia de cadera (p

<0.001) en comparación con otras fases del estudio. La suplementación con n-3 indujo cambios favorables en la composición corporal.

TABLA 6. Características antropométricas de la población durante la intervención

	PRE TRATAMIENTO (n=18)	**POST TRATAMIENTO** (n=18)	**PRE PLACEBO** (n=18)	**POST PLACEBO** (n=18)	**p**
Edad (años)	42.83 ± 6.07				
Peso (kg)	87.84 ± 11.05	**85.53 ± 11.38*****	86.53 ±10.88	**85.35 ± 10.4***	0.001
Índice de masa corporal (kg/m$^{2)}$	31.56 ± 5.03	29.13 ± 4.06	29.23 ± 3.91	29.5 ± 4.6	ns
Circunferencia de cintura (cm)	102.47 ± 10.05	**98.46 ± 8.91*****	100.9 ± 9.23	99.4 ± 9.13	0.001
Circunferencia de cadera (cm)	103.69 ± 9.19	**101.1 ± 9.26*****	104.75±7.26	103.77±7.64	0.001
grasa (%)	30.82 ± 4.89	29.13 ± 4.16	29.38 ± 4.1	28.50 ± 4.71	ns

Se muestra las características de la población. los valores son representados como promedio y desviación estándar. p ≤ 0.05 *, p ≤ 0.001 ***

Adaptado de Peña de la Sancha P, 2018 (Ref. 52)

Por otro lado, con el objetivo de evidenciar cambios en el perfil de lípidos de los pacientes durante la intervención, se realizó un análisis del perfil de lípidos en plasma como se describe en la **Tabla 7**. En la cual, se puede apreciar que al inicio de la intervención los pacientes presentaban una concentración plasmática promedio de colesterol de 200.4 ± 38.7 mg/dL y Colesterol no HDL de 164.9 ± 40.4 mg/dL, sin embargo, conviene subrayar que estos parámetros se mantuvieron sin cambios significativos durante toda la intervención. De la misma forma, se determinó una concentración inicial de TGL de 454.38 ± 344.2 mg/dL, el cual fue un criterio de inclusión indispensable para participar en el protocolo de investigación. Podemos destacar que posterior a la suplementación con n-3, fue el único parámetro en el cual se observó una disminución significativa (-37.52%) en comparación con otras fases del estudio. Así mismo, en la **Tabla 7** se incluyo la determinación de glucosa, la cual, se mantuvo sin cambios significativos durante la intervención.

Tabla 7. Modificaciones en el perfil de lípidos y glucosa durante la intervención

	PRE TRATAMIENTO (n=18)	POST TRATAMIENTO (n=18)	PRE PLACEBO (n=18)	POST PLACEBO (n=18)	p
TGL (mg/dL)	454.38 ± 344.2	**283.9 ± 208.6***	348.7 ± 245.6	269.0 ± 145.58	0.5
CHOL (mg/dL)	200.4 ± 38.7	227.9 ± 64.4	213.8 ± 66.1	207.4 ± 37.1	ns
C- no HDL (mg/dL)	164.9 ± 40.4	179.5 ± 69.4	170.6 ±108.1	118.6 ± 83.3	ns
Glucosa (mg/dL)	89.0 ± 15.8	92.1 ± 19.9	96.6 ± 15.6	99.8 ± 16.2	ns

Se muestra la concentración plasmática del perfil de lípidos que incluye triglicéridos (TGL), Colesterol (CHOL), y colesterol no HDL (C- no HDL), además de la incluir la concentración de glucosa. Los valores son representados como promedio y desviación estándar. * $p \leq 0.05$

Adaptado de Peña de la Sancha P, 2018 (Ref. 52)

7.2 Composición de proteína en subclases de HDL

Se realizó la determinación del porcentaje relativo de proteína en las subclases de HDL en las diferentes fases del estudio mediante electroforesis, que se analizó en el programa Visionworks 8.2, los resultados se muestran en la **Tabla 8**. Sin embargo, no se identificaron cambios significativos en ningún momento del estudio.

Tabla 8. Porcentaje de proteína total en las subclases de HDL de los pacientes en la intervención con omega-3 y placebo

Subclase HDL (%)	PRE TRATAMIENTO (n=18)	POST TRATAMIENTO (n=18)	PRE PLACEBO (n=18)	POST PLACEBO (n=18)
HDL-2b	10.50 (6.00–20.00)	10.00 (7.00-21.75)	10.00 (6.00-14.50)	8.00 (5.50-21.00)
HDL-2a	7.00 (4.00-9.00)	7.50 (5.00-10.00)	7.00 (5.00-8.50)	7.00 (5.00-9.00)
HDL-3a	30.00 (27.00-32.75)	30.50 (27.75-33.00)	31.00 (25.00-32.50)	31.00 (29.00-35.50)
HDL-3b	19.0 (15.00-23.75)	19.50 (13.75-24.25)	21.00 (17.50-23.00)	21.00 (16.50-26.00)
HDL-3c	28.50 (23.75-37.25)	28.00 (16.75-40.25)	28.00 (21.00-42.50)	26.00 (20.00-34.00)

En el análisis de porcentaje de proteína de las subclases de HDL, no se identificaron cambios significativos durante ninguna fase del estudio. Los datos se expresan en mediana e intervalo intercuartilar.

7.3 Perfil de lípidos de las HDL totales

Para identificar si la suplementación con n-3 propicia cambios en el perfil de lípidos de HDL, con el uso de la técnica de ultracentrifugación secuencial, se obtuvieron HDL purificadas del plasma de los pacientes y se evaluó su composición lipídica, como se muestra en la **Figura 13**. Se observó un aumento significativo tanto en la concentración de c-HDL (+29.8%), como en la concentración de PLP-HDL (+68%), además estos cambios fueron acompañados por una disminución significativa en la concentración de TGL-HDL (-56.04%) en el momento Post-tratamiento.

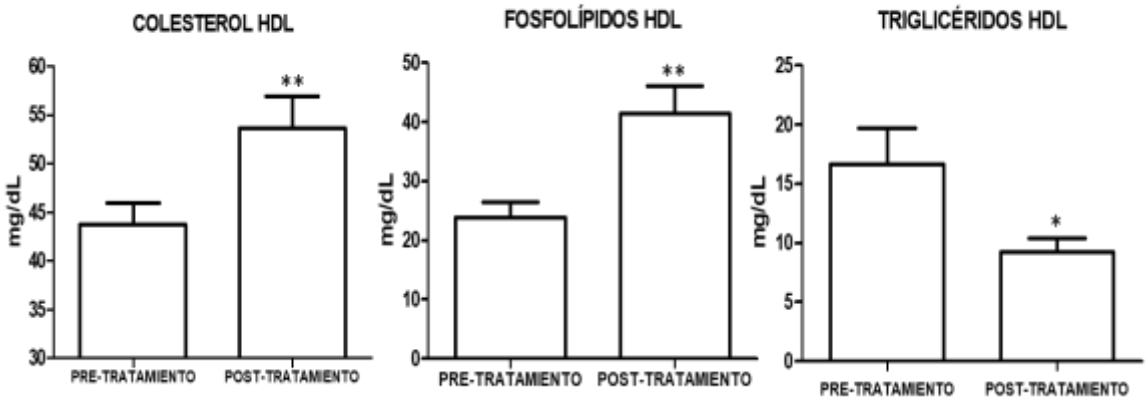

Figura 13. Modificaciones en la composición lipídica de HDL Pre y Post-tratamiento

Se muestra el contenido de lípido (colesterol, fosfolípidos y triglicéridos). Los resultados son representados como promedio y desviación estándar. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Adaptado de Peña de la Sancha P, 2018 (Ref. 52)

7.3.1 Composición lipídica de subclases de HDL

Para caracterizar a detalle la composición lipídica (colesterol, PLP y TGL) de las HDL, se realizó la cuantificación de contenido de lípidos de las subclases de HDL por métodos enzimáticos colorimétricos. Se identificó un aumento significativo en el colesterol de las subclases HDL-2b ($p \leq 0.01$), HDL-2a ($p \leq 0.05$), HDL-3a ($p \leq 0.01$), HDL-3b ($p \leq 0.01$.) y HDL-3c ($p \leq 0.05$) posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3, en comparación con la fase Pre-tratamiento como se muestra en la **Figura 14**.

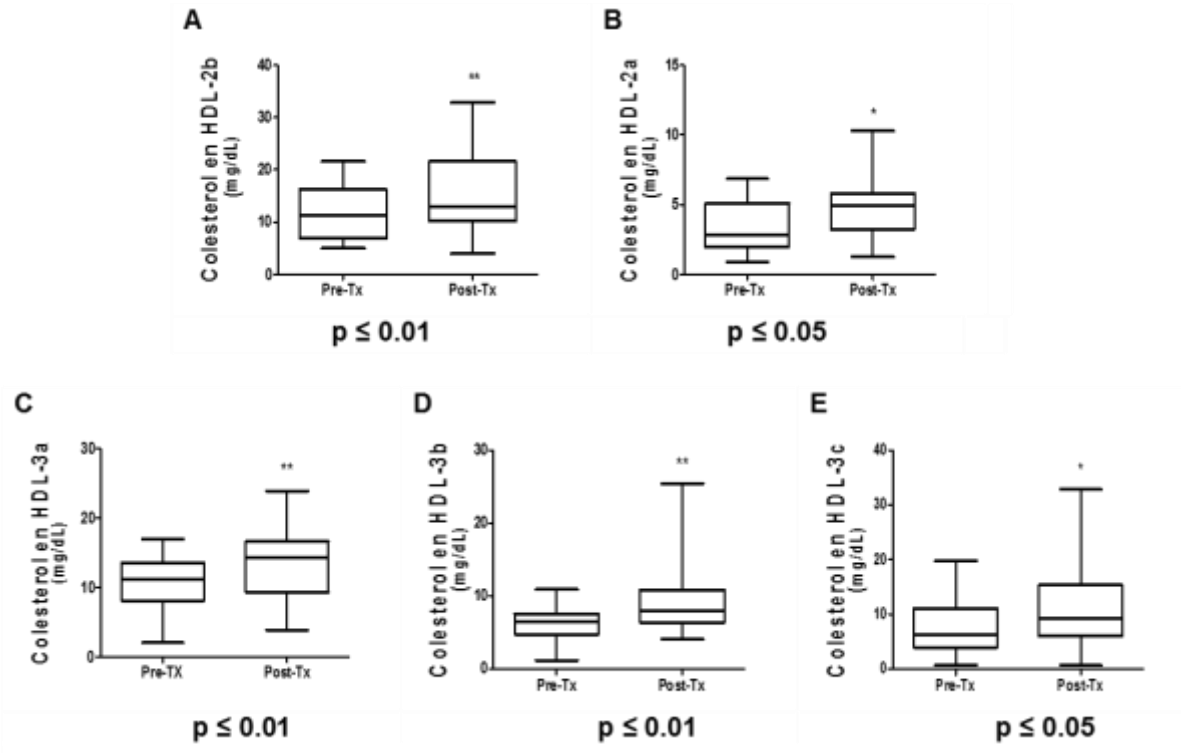

Figura 14. Distribución de colesterol en subclases de HDL
Se muestra la concentración de colesterol en las diversas subclases de HDL. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar las diferencias entre el Pre-tratamiento (Pre-Tx) y el Post-tratamiento (Post-Tx), los valores son representados con mediana y rango intercuartilar. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

De igual forma en la concentración de PLP de las subclases de HDL, se identificó un aumento significativo en las subclases HDL-2b ($p \leq 0.05$), HDL-2a ($p \leq 0.001$), HDL-3a ($p \leq 0.001$), HDL-3b ($p \leq 0.001$) y HDL-3c ($p \leq 0.05$), posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3, en comparación con la fase Pre-tratamiento, como se muestra en la **Figura 15**.

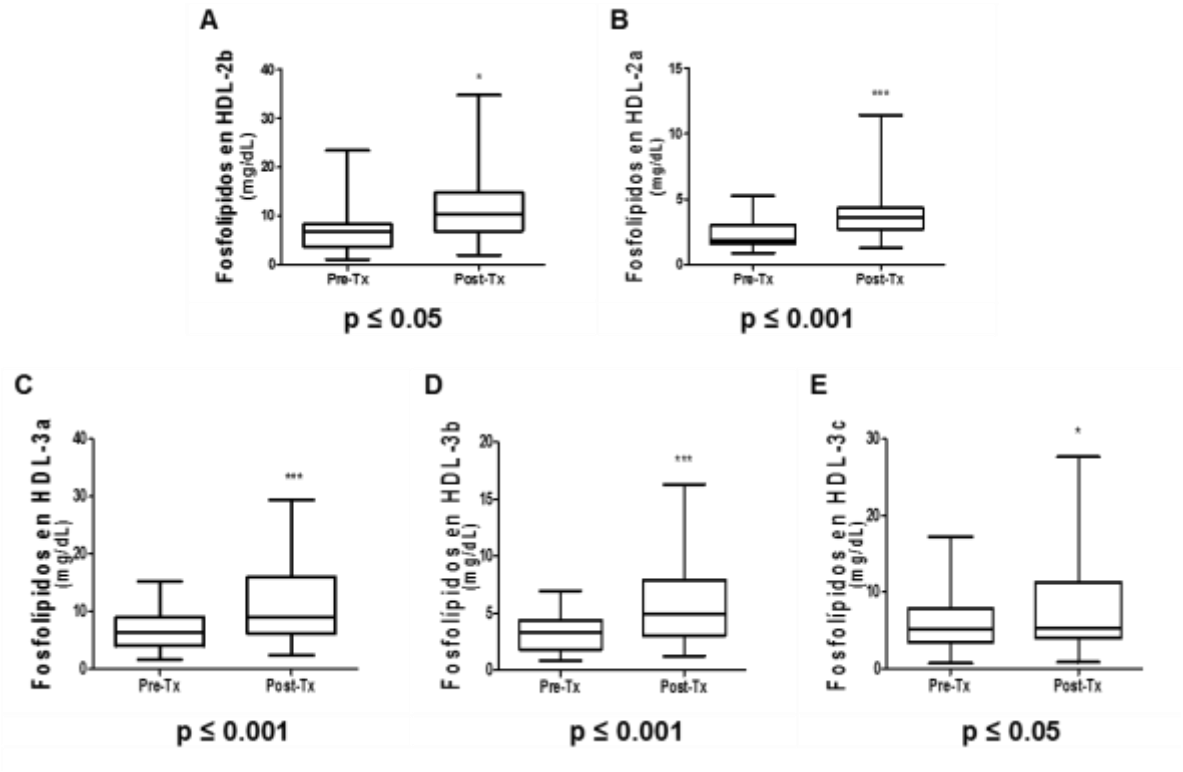

Figura 15. Distribución de fosfolípidos en subclases de HDL

Se muestra la concentración de PLP en las diversas subclases de HDL. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar las diferencias entre el Pre-tratamiento (Pre-Tx) y el Post-tratamiento (Post-Tx), los valores son representados con mediana y rango intercuartilar. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$

Por otra parte, se identificó una disminución significativa de TGL en las subclases HDL-2b ($p \leq 0.05$), HDL-2a ($p \leq 0.001$), HDL-3a ($p \leq 0.001$), HDL-3b ($p \leq 0.0001$.) y HDL-3c ($p \leq 0.05$) posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3, en comparación con la fase Pre-tratamiento (Pre-Tx), como se muestra en la **Figura 16**.

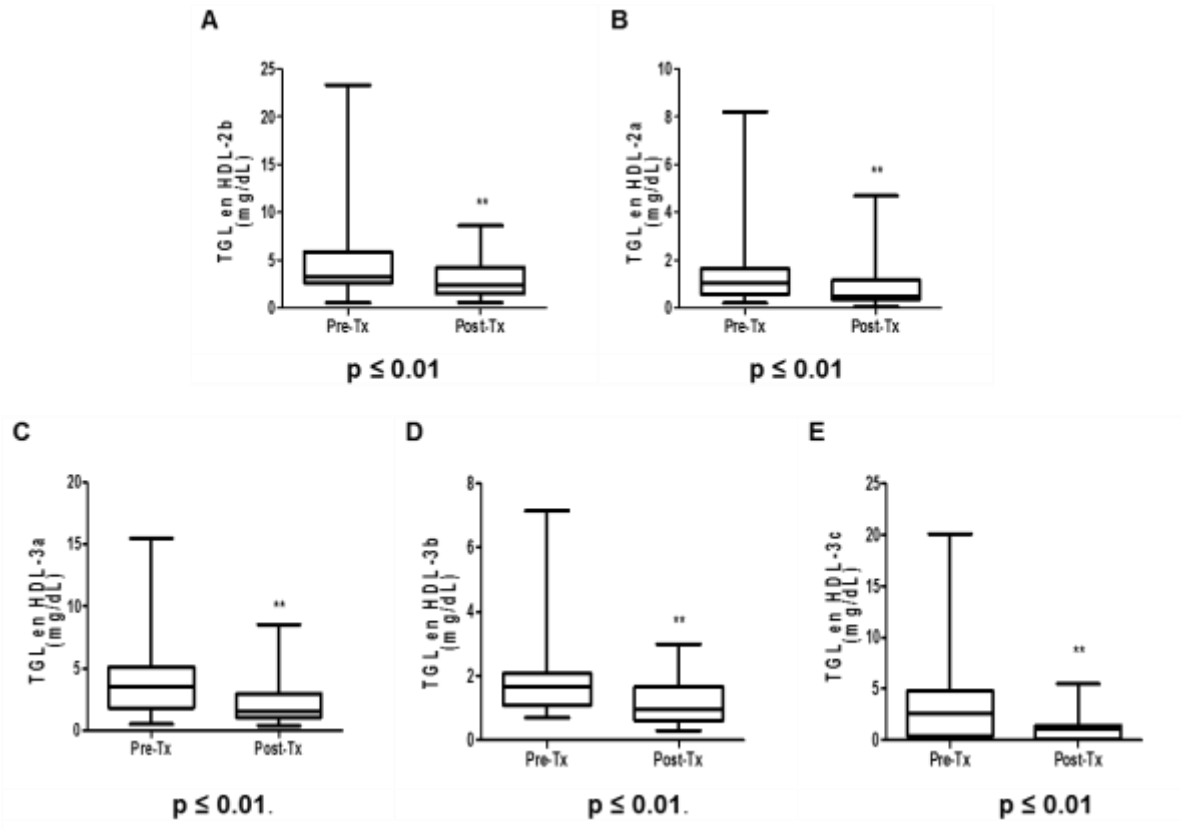

Figura 16. Distribución de triglicéridos en subclases de HDL

Se muestra la concentración de TGL en las diversas subclases de HDL. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar las diferencias entre el Pre-tratamiento (Pre-Tx) y el Post-tratamiento (Post-Tx), los valores son representados con mediana y rango intercuartilar. ** $p \leq 0.01$

García Sánchez *et al*; han reportado que el cociente de concentración de c-HDL/PLP-HDL y TGL-HDL/PLP-HDL, es útil para estimar el contenido de colesterol y TGL por partículas de HDL[105]. Por lo cual, se realizó la determinación de dicho cociente para categorizar los cambios en el contenido de lípidos en las subpoblaciones de las partículas de HDL. Con respecto al cociente de c-HDL/PLP-HDL no se identificaron cambios significativos entre el Pre-tratamiento y el Post-tratamiento, como se muestra en la **Figura 17**.

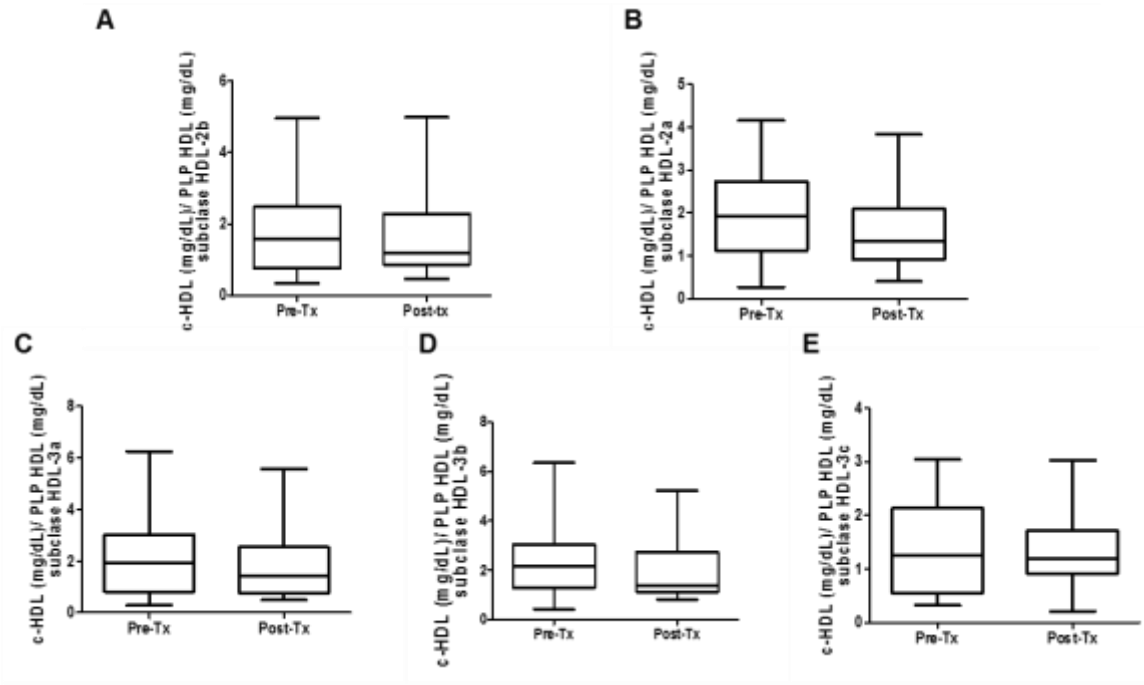

Figura 17. Cociente de la concentración (mg/dL) de c-HDL/PLP-HDL en subclases de HDL
Se muestra el cociente de c-HDL (mg/dL)/PLP-HDL (mg/dL) en las diversas subclases de HDL, en la cual, no se identificó cambios significativos. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar las diferencias entre el Pre-tratamiento (Pre-Tx) y el Post-tratamiento (Post-Tx). Los valores son representados con mediana y rango intercuartilar.

Con relación al cociente de la concentración (mg/dL) de TGL-HDL/PLP-HDL de las diferentes subclases de HDL, se identificaron cambios significativos en las subclases HDL-2b ($p \leq 0.05$), HDL-2a ($p \leq 0.001$), HDL-3a ($p \leq 0.001$), HDL-3b ($p \leq 0.0001$) y HDL-3c ($p \leq 0.05$), posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3, en comparación con el momento Pre-tratamiento como se muestra en la siguiente **Figura 18**.

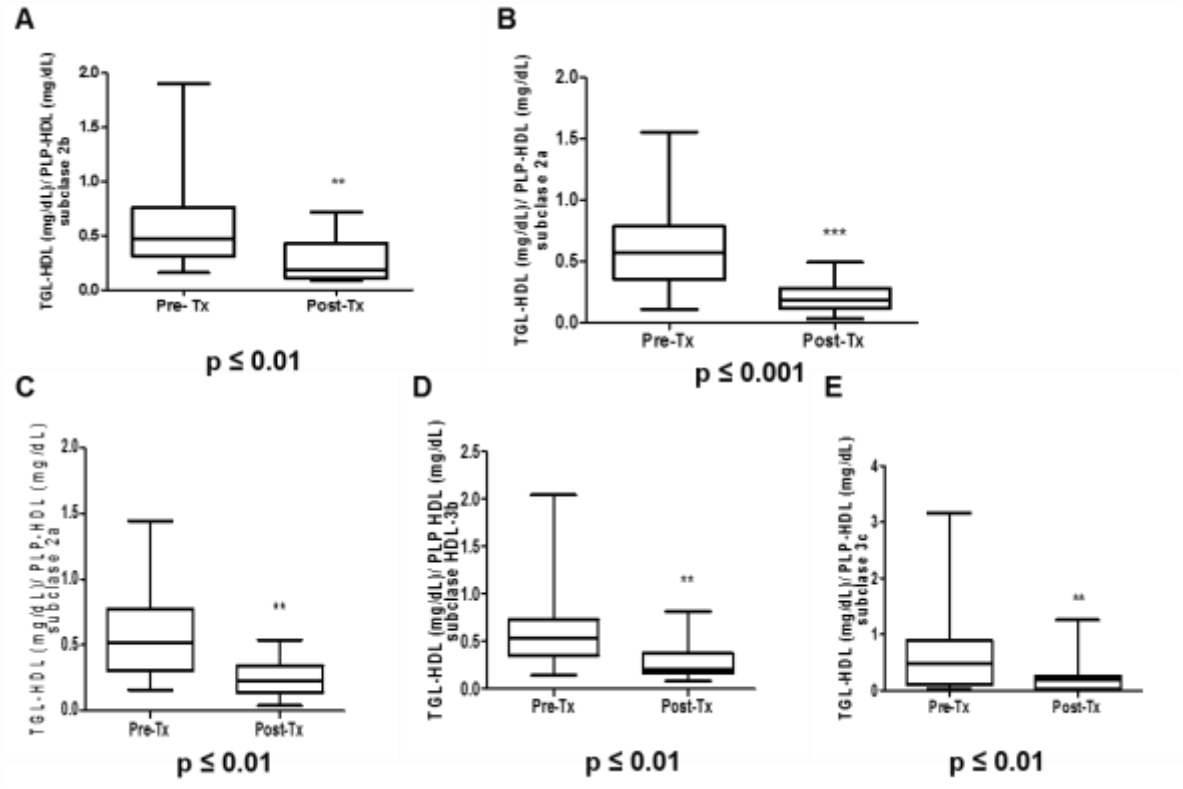

Figura 18. Cociente de la concentración (mg/dL) de TGL-HDL/PLP-HDL en subclases de HDL
Se muestra el cociente de TGL-HDL (mg/dL)/PLP-HDL (mg/dL) en las diversas subclases de HDL. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar las diferencias entre el Pre-Tx y el Post-Tx Los valores son representados con mediana y rango intercuartilar. **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001

7.4 Perfil de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) en HDL

Con el objetivo de identificar si el EPA y el DHA se incorporan a la estructura de las HDL, las muestras de HDL purificadas obtenidas de la fase Pre-tratamiento y Post-tratamiento de los pacientes se utilizaron para realizar la determinación de EPA (**Figura 19**) y DHA (**Figura 20**), mediante cromatografía de gases. En la cual, identificamos que la suplementación con n-3, genera un incremento significativo en el porcentaje de composición de EPA y DHA en las partículas de HDL totales en comparación con el Pre-tratamiento.

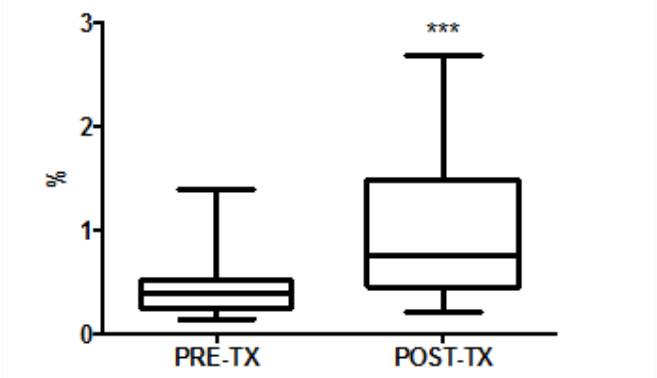

Figura 19. Porcentaje de EPA en HDL

Se observó un incremento significativo con respecto al porcentaje de composición de EPA incorporado en HDL en el momento Post-tratamiento en comparación con el Pre-tratamiento (0.42 vs 0.94 %). Los valores son representados con mediana (línea) e intervalo intercuartilar (cajas). ***p ≤ 0.001

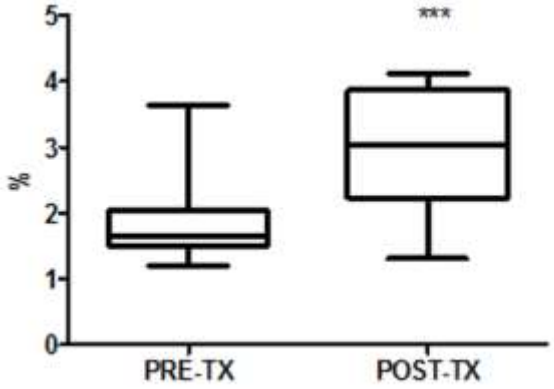

Figura 20. Porcentaje de DHA en HDL

Se observó un incremento significativo en el porcentaje de composición de DHA en HDL en el momento Post-tratamiento en comparación con el Pre-tratamiento (1.84 vs 2.95 %). Los valores son representados con mediana (lineal) e intervalo intercuartilar (cajas). ***p ≤ 0.001

7.5 Determinación de la función endotelial mediada por HDL en cámara de órgano aislado

Dentro del marco del proyecto global en el que enmarca el presente estudio, se evaluó la función endotelial en presencia de las HDL de los sujetos de estudio; los resultados se publicaron previamente [52], y se describen a continuación.

Con el fin identificar los posibles cambios a nivel endotelial relacionados con la suplementación de omega-3, se empleó un método *in vitro* en cámara de órgano aislado, utilizando anillos de aorta de rata Wistar, que fueron pre-incubadas con HDL aisladas previamente de los pacientes.

Como se reportó previamente[52], la aorta fue aislada y diseccionada en anillos, que fueron individualmente incubados durante 1 h con HDL purificadas de las distintas fases del estudio. Posteriormente los anillos fueron colocados en la cámara de órgano aislado ancladas a un transductor de fuerza a una tensión basal de 1 g (40 mm del papel milimétrico utilizado para realizar el registro), en solución de Krebs a una temperatura de 37º C. Posteriormente, se indujo la contracción máxima del anillo de aorta, empleando fenilefrina (un potente vasoconstrictor) a una concentración final de 1mM. Cuando el tejido alcanzó la meseta, se indujo la vasorelajación mediada por endotelio añadiendo dosis crecientes del vasodilatador acetilcolina, en un rango de 1.25 µL Ach [50µM] a 10 µL Ach [100 mM]. La contracción isométrica del vaso se registró en cada dosis de acetilcolina por medio de un polígrafo acoplado a un transductor y se representó en una gráfica de dosis respuesta (datos no mostrados). Se encontraron diferencias significativas en 5 puntos de la curva de relajación en todas las fases del tratamiento con respecto al control, lo que refleja una menor respuesta al estímulo de relajación por acetilcolina en los anillos de aorta incubados con HDL[52].

8. DISCUSIÓN

En este ensayo clínico aleatorizado, cruzado, controlado con placebo, forma parte de un proyecto global diseñado para analizar diversos aspectos de las HDL en sujetos que toman un suplemento de EPA y DHA, La vinculación de los resultados derivados del presente estudio toman relevancia al integrarlos con otros generados previamente por nuestro grupo de investigación dentro del marco del mismo proyecto [52] y que se presentan como parte de este trabajo.

En cuanto al diseño de estudio, este nos permite evaluar mejor la relación causal entre un tratamiento y sus efectos en comparación con otros diseños[106]. Además, cabe resaltar que el paciente constituye su propio control durante la intervención, ya que el mismo sujeto es expuesto a ambos tratamientos, OMACOR y placebo, lo que representa una fortaleza metodológica y permite demostrar causalidad de los efectos observados.

A los 18 pacientes que concluyeron satisfactoriamente cada una de las fases del estudio, se les realizó una historia clínica-nutriológica con la finalidad de conocer sus antecedentes heredofamiliares, estilo de vida y hábitos de alimentación. Derivado de la evaluación antropométrica, se identificó que los pacientes al momento de ser reclutados presentaban sobrepeso u obesidad, de acuerdo con su IMC; esta condición incrementa el riesgo cardiovascular, además de estar posiblemente asociada con manifestaciones clínicas como la insulinorresistencia, dislipidemia e hipertensión arterial[57, 60].

Con relación a modificaciones del peso corporal, en la fase Post-tratamiento se identificó una reducción significativa (-2.31 kg del peso total) en comparación con

otras fases del estudio. Estos resultados concuerdan con reportes de estudios previos; González-Acevedo *et al*., 2013 identificaron en mujeres con obesidad una perdida promedio de 7.1 kg al ser suplementadas con 2 g/d de n-3 por un periodo de 3 meses[107]. De igual forma, en modelos murinos experimentales se ha demostrado que la suplementación con n-3 disminuye la grasa retroperitoneal[108, 109]. Esto podría explicarse porque los n-3 modulan la expresión de PPAR´s. Se ha comprobado que el DHA tiene afinidad por PPAR-α, el cual actúa regulando el metabolismo de lípidos, activando principalmente la β-oxidación mitocondrial/peroxisomal de ácidos grasos[85, 96]. Sin embargo, también se encontró una reducción significativa en el peso corporal después del placebo, posiblemente por el efecto de arrastre del momento Post-tratamiento. Por otro lado, los cambios en la masa corporal no se acompañaron por modificaciones antropométricas ni bioquímicas como se describe en las **Tabla 8** y **Tabla 9**.

Con respecto a la fase Post-tratamiento se observó una reducción significativa en la circunferencia de cintura y cadera. Al respecto, González-Acevedo *et al*., 2013 han documentado también una disminución significativa en la circunferencia de cintura y cadera en mujeres con obesidad suplementadas con n-3[107]. Estos hallazgos son relevantes ya que se ha descrito que la acumulación excesiva de grasa abdominal se asocia con mayor riesgo cardiovascular[59].

Con respecto a la presión arterial sistólica y diastólica[52], se identificó una disminución discreta en el momento Post-tratamiento, sin embargo, estos cambios no alcanzaron significancia estadística, esto podría deberse a que los pacientes eran normotensos, por lo cual, no se esperaba una disminución significativa (datos

no mostrados). Cabe mencionar que en pacientes normotensos como hipertensos se ha descrito un efecto hipotensor posterior a la suplementación con n-3[110,111 y 112]. Por otra parte, se monitoreo el consumo dietético durante las 15 semanas de intervención mediante el promedio de recordatorios de 24 h, dos días entre semana y un día de fin de semana para conocer el apego al plan de alimentación. Los resultados del análisis no mostraron cambios significativos en el consumo energético y de macronutrimentos, lo que demuestra el apego de los pacientes a la dieta isocalórica. Es importante destacar que el recordatorio de 24 h proporciona información valiosa, pero está sujeto a la memoria del paciente, por lo cual, podría haber una sub o sobre estimación en las cantidades reportadas. No obstante, es un instrumento válido que ha sido utilizado ampliamente en múltiples estudios [113]. En este contexto, descartamos que los cambios observados en la evaluación antropométrica y bioquímica después de la suplementación con n-3 sean mediados por modificaciones en la ingesta calórica.

A partir de los recordatorios de 24 h se calculó el promedio de la ingesta de ácidos grasos, donde no identificamos variaciones en el consumo de AGS y AGPI a lo largo del estudio; se observó únicamente una disminución significativa en la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados en la fase Post-placebo. Es importante resaltar que no existió una sobre-ingesta de AGPI n-3 que causara sesgos en los resultados. En este contexto, una fortaleza de nuestro estudio consistió en la evaluación dietética durante la intervención, debido a que muy pocos ensayos toman en cuenta el aspecto nutricional[12,13,14 y 100], que es de gran relevancia en la respuesta metabólica de los individuos y nos permite descartar sesgos inducidos por la dieta.

Como era esperado, observamos una disminución significativa (-37.52%) en la concentración plasmática de TGL asociada al tratamiento con n-3 con respecto al Pre-tratamiento. Al respecto, la Asociación Americana del corazón recomienda de 2 a 4 g/día de EPA + DHA para la disminución de TGL logrando una reducción del 20 al 40%[96]. La suplementación con EPA y DHA induce cambios favorables en el perfil lipídico, principalmente por promover aclaramiento plasmático de TGL como consecuencia del descenso de VLDL, disminución de la síntesis hepática de TGL e inhibición de la esterificación de ácidos grasos[97, 98]. También, estimulan la expresión de PPAR-α, que modulan la expresión génica de varias enzimas implicadas en el metabolismo de lípidos[97, 98], sobre todo al promover la β-oxidación mitocondrial y peroxisomal en hígado, corazón y tejido adiposo marrón[75]. Por otro lado, se ha descrito que la suplementación con n-3 inhibe la expresión del factor transcripcional SREBP-1, el cual se encuentra implicado en la síntesis de AG, en la homeostasis del tejido adiposo y en el metabolismo glucídico[108]. Con relación a la concentración sérica de glucosa y colesterol total no se identificaron cambios significativos en ninguna fase del estudio.

De forma interesante, se encontraron cambios relevantes en la composición lipídica de las HDL. En la fase Post-tratamiento se identificó un incremento significativo en la concentración de c-HDL ($p < 0.01$) en comparación con otras fases del estudio. En la actualidad, no existe un consenso sobre los efectos de la suplementación de n-3 sobre los niveles de c-HDL, debido a que la evidencia disponible ha mostrado discrepancias[111, 103]. Se ha documentado que el consumo de >3 g/día de n-3, se asocia a un incremento en las concentraciones plasmáticas de c-HDL[111]. Por el contrario, Tanaka *et al.,* reportaron en pacientes con dislipidemia que la

suplementación con 1.8 g/día de EPA durante 4 semanas no indujo cambios en la concentración de c-HDL[103]. Sin embargo, en este estudio se mostró que la suplementación con 2 g/día de OMACOR, es suficiente para incrementar la concentración de c-HDL en nuestra muestra de pacientes con hipertrigliceridemia.

De igual forma, posterior al tratamiento con n-3 identificamos una disminución significativa en la concentración de TGL-HDL ($p < 0.05$) en comparación con otras fases del estudio. Además, estos hallazgos fueron acompañados con un incremento significativo en la concentración de PLP-HDL ($p <0.01$).

En estudios previos se ha mostrado que posterior a la suplementación con EPA y DHA, éstos se incorporan en las membranas celulares de glóbulos rojos y cardiomiocitos[94]. Esto se podría explicar en parte al aumento de fosfolípidos de HDL, ya que se ha descrito que los n-3 son incorporados en los fosfolípidos de la membrana celular[94]. En este estudio se demostró que la suplementación con n-3 induce cambios en la composición lipídica de las partículas HDL en sujetos con hipertrigliceridemia.

Otro aspecto analizado fue la determinación del contenido de ácidos grasos n-3 de las HDL aisladas de los pacientes, por medio de cromatografía de gases. Se identificó en la fase Post-tratamiento un aumento significativo de EPA (C20:5, $p=0.0005$) y DHA (C22:5, $p=0.0001$) en comparación con el contenido basal. Estos resultados corroboran que el EPA y DHA se incorporan a la estructura de las HDL posterior a la suplementación con n-3. Es importante resaltar que estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que las partículas de HDL son vectores de lípidos para las células endoteliales[43]; con base en esta evidencia, postulamos que las HDL podrían inducir efectos favorables a la función vascular al aportar EPA y

DHA a las células endoteliales. Es importante destacar que los cambios en la composición de las HDL mediados por n-3 son relevantes, ya que, hasta el momento, no tenemos conocimiento de algún estudio que evalúe los cambios en la composición lipídica las subclases HDL posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3.

Por otra parte, el análisis de la distribución de subclases de HDL no mostró cambios significativos en ningún momento del estudio. Al respecto, Cottin *et al*. (90), reportaron que el consumo de DHA se asocia a un incremento de partículas grandes de HDL[99]. Esto datos coinciden con los reportados por Mostad *et al*. (19), quienes identificaron que la suplementación con n-3 genera cambios en la distribución de subclases de HDL, con un aumento significativo en la subpoblación de partículas HDL-2[19]. Resultados similares fueron identificados por Woodman *et al*. (13), y Petersen *et al.* (14), que en pacientes con DM tipo 2, observaron un incremento significativo en las subclases HDL-2 y disminución en HDL-3, posterior a la suplementación con ácidos grasos n-3[13, 14]. Además, Bogl *et al.* (12); documentaron en pacientes con hiperlipemia familiar combinada, un incremento significativo de partículas HDL-2[12]. Es posible que las discrepancias entre nuestros resultados y lo reportado por otros autores respecto al tamaño de las HDL radiquen en el método de análisis de las subclases de HDL. La precipitación selectiva que usaron en otros estudios es dependiente de la composición lipídica de las partículas; en vista de que los lípidos contenidos en las HDL, es posible que cambie su comportamiento en presencia del reactivo precipitante[12,13,14,19 y 100]. En contraste, nuestro método de separación por electroforesis no está influido por la composición lipídica de las HDL.

Con respecto a la cuantificación lipídica en las subclases de HDL, se observaron cambios significativos en la concentración de colesterol en el Post-tratamiento. Esta disminución no afecta de manera específica a alguna de las subclases, sino a todas las subpoblaciones de HDL, pero es más evidente en las HDL-2b, HDL-3a y HDL-3b, y en menor medida en las HDL-2a y HDL-3c. En investigaciones previas se ha reportado un incremento significativo en el contenido de colesterol en la subclase de HDL-2b posterior a la suplementación con AGPI n-3 (4 a 4.55 g/día), en sujetos sanos, con hiperlipidemia familiar y diabetes [7, 13, 14 y 15].

De igual forma, observamos un incremento significativo en la concentración de PLP-HDL en todas las subclases de HDL después de la suplementación con n-3. Los cambios más evidentes se observaron en las HDL-2a, HDL-3a y HDL-3b y en menor medida en las HDL-2b y HDL-3c, en comparación con los valores basales. Las bajas concentraciones de fosfolípidos en las subclases de HDL se han asociado a la presencia de EAC subclínica determinada por el puntaje de calcio coronario[105]. En este sentido, el aumento de los fosfolípidos en las subclases de HDL puede representar un efecto benéfico de los n-3 en términos de calcificación coronaria[105].

Los cambios antes descritos, fueron acompañados con una disminución en la concentración de TGL-HDL en todas las subpoblaciones de HDL. Además, es importante mencionar que se realizó el cociente de concentración de TGL-HDL/PLP-HDL; este cociente se ha considerado un indicador del contenido de triglicéridos en las partículas HDL[105]. Considerando lo anterior, la suplementación con ácidos grasos n-3 induce una disminución en el contenido de los TGL de las partículas HDL. Las HDL enriquecidas con TGL se han descrito en sujetos con diabetes mellitus, sujetos con síndrome metabólico y pacientes con enfermedad

arterial coronaria[4, 5, 44 y 45], por lo tanto, consideramos como un efecto positivo la disminución de TGL en las HDL mediado por n-3. Es importante destacar que hasta el momento es el primer estudio que reporta resultados que caracteriza el contenido de lípidos en subclases de HDL después de la suplementación con n-3 en pacientes con hipertrigliceridemia.

Derivado de observaciones de estudios previos y de nuestro grupo de investigación, se ha descrito a las partículas HDL como posibles vectores lipídicos[17, 43]. Asimismo, se debe considerar que la funcionalidad de las HDL se ve comprometida al encontrase enriquecidas con TGL[37]. En este contexto, nuestro estudio demostró que el EPA y el DHA se incorporan a la estructura de las HDL, además se identificó que inducen cambios en la composición de lípidos en las subpoblaciones de dichas partículas entre ellas una disminución en el contenido de TGL. Por lo tanto, se plateó que el enriquecimiento de las partículas HDL con ácidos grasos n-3, podría favorecer la homeostasis vascular y mediar de manera directa una mejora en su función. Para demostrar esta hipótesis, se realizaron los ensayos *in vitro* de función endotelial, utilizando anillos de aorta de rata Wistar en cámara de órgano aislado, incubados con las HDL aisladas de los pacientes. En estos ensayos, no se identificaron cambios significativos en la función endotelial mediada por HDL en ninguna fase del estudio.

Cabe mencionar que, como parte de un trabajo colaborativo, se les realizó a los pacientes la prueba de dilatación mediada por flujo; esta prueba consistió en evaluar la vasodilatación en la arteria braquial a través de la medición del cambio en el porcentaje del diámetro posterior a una hiperemia reactiva respecto al diámetro de referencia, este estudio evalúa la respuesta de las células endoteliales ante un

estímulo mecánico. Consecuentemente, la incorporación de los n-3 en la membrana endotelial podría estimular una mejor respuesta del endotelio en la producción de NO ante la hiperemia reactiva inducida en la arteria braquial[100, 114]. Como resultado de la dilatación mediada por flujo, se identificó una mejora significativa en la función endotelial por efecto de la suplementación con n-3. Sin embargo, no fue posible determinar si es mediada por las HDL o por mecanismos independientes. Por lo cual, son necesarios otros estudios para determinar si las HDL enriquecidas en EPA y DHA pueden también regular la función del músculo liso arterial. Al respecto, Limbu *et al*. (115), describieron en un estudio similar en el que emplearon anillos de aorta previamente contraídos con diferentes agentes vasoconstrictores, y co-incubados con diferentes concentraciones de EPA y DHA; los autores reportan una potente respuesta vasodilatadora del tejido mediada por los n-3 dependiente de músculo liso e independiente del endotelio[115]. Los eicosanoides, como los ácidos epoxieicosatetraenoicos (EpETEs) derivados del EPA y ácidos epoxidocosapentaenoicos (EDP) del DHA, propician un efecto vasodilatador. Además, los EDP activan las conductancias de los canales de potasio (BKca), resultando en hiperpolarización y por tanto relajación de las células musculares lisas[115].

Finalmente, es indispensable resaltar que a pesar de no haber identificado modificaciones en la función endotelial mediada por HDL posterior a la suplementación con n-3, se encontraron cambios favorables con relación a la composición corporal (peso, circunferencia de cintura y circunferencia de cadera) y en cuanto a la concentración de TGL plasmáticos. Por otra parte, es importante destacar que este es el primer estudio realizado en población mexicana, en el que

se caracterizó la composición lipídica (TGL-HDL, colesterol-HDL y PLP-HDL) de las partículas HDL, además, se comprobó que el EPA y DHA se incorpora a su estructura posterior a la suplementación con n-3.

9. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se puso en evidencia que la suplementación con ácidos grasos n-3 induce modificaciones importantes en la composición lipídica de las lipoproteínas de alta densidad, con un incremento significativo en el colesterol y fosfolípidos de HDL, así como una disminución significativa de triglicéridos de estas lipoproteínas. Asimismo, se evidenció que el EPA y DHA se incorporan a las HDL. La suplementación con n-3 indujo cambios antropométricos favorables en los pacientes (disminución en la circunferencia de cintura, cadera y en el peso corporal). No obstante, estos hallazgos no se encuentran relacionados con modificaciones en la función endotelial de las HDL evaluada de forma *in vitro*.

10. PERSPECTIVAS

A pesar de que en nuestro estudio la suplementación con ácidos grasos n-3 no modificó la vasorelajación mediada por endotelio vascular a través de las HDL, los cambios observados en la composición lipídica son prometedores. Por lo tanto, no se puede descartar que las HDL enriquecidas con EPA y DHA no tengan otros efectos benéficos en el endotelio vascular; por ejemplo, su capacidad de inhibir la expresión de moléculas de adhesión como VCAM e ICAM implicadas en el desarrollo y/o progresión de la lesión aterosclerótica. Estas propiedades se deberán evaluar en estudios posteriores.

Asimismo, al tratarse de ácidos grasos poliinsaturados, es posible que el enriquecimiento con EPA y DHA, altere la fluidez de la superficie de las HDL, mejorando su estabilidad. Por lo tanto, la evaluación de la estabilidad de las HDL enriquecidas con n-3 es otro aspecto que se debe explorar ulteriormente.

Por otra parte, será necesario comprobar si la suplementación con EPA y DHA induce una mejora en la capacidad antioxidante de las HDL a través de la determinación de la actividad de paraoxonasa, puesto que, se ha identificado[28, 29] que la actividad de dicha enzima evita la peroxidación lipídica de las LDL, al neutralizar lípidos peroxidados y transformándolos en compuestos biológicamente inocuos.

11. ANEXOS

Anexo 1. Historia Clínica-Nutriológica

PROTOCOLO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA.

Fecha: _____ No. De Expediente: _____

I. Datos Generales

Nombre: _____ Genero: F ☐ M ☐
Edad:_____

Estado Civil: Soltero ☐ Casado ☐ Viudo ☐ Divorciado ☐ Fecha de nacimiento:____/____/___

Domicilio:

II. Datos Socioeconómicos

Ocupación: _____ Horario:

_____

Ingreso Mensual aproximado_____ ¿Cuánto destina a la compra de alimentos?

III. Antecedentes Fisiopatológicos

	Personal	Familiar		Personal	Familiares
3.1 Diabetes tipo_____	☐	☐	3.7Trastorno Hormonal	☐	☐
3.2 Hipertensión Arterial	☐	☐	3.8 Cáncer _____	☐	☐
3.3 Obesidad	☐	☐	3.9 Enfermedades tiroideas	☐	☐
3.4 Cardiopatía	☐	☐	3.9.1Gastritis	☐	☐
3.5 Enfermedad Renal	☐	☐	3.9.2 Colitis	☐	☐
3.6 Enfermedad Hepática	☐	☐	3.9.2Ulcera	☐	☐

Trastornos de la alimentación Sí ☐ No ☐ ¿Cuál?

_____

Padecimiento Actual:_____

Prescripción Médica:

_____

IV. Datos Clínicos

Digestivos	Cardiovascular	Otros
4.1Apetito satisfactorio: Sí ☐ No ☐ 4.1.1Pirosis: Sí ☐ No ☐ 4.1.2Meteorismo: Sí ☐ No ☐ 4.1.3Distensión: Sí ☐ No ☐ 4.1.4Flatulencias: Sí ☐ No ☐ 4.1.5Vómito: Sí ☐ No ☐ 4.1.6Estreñimiento: Sí ☐ No ☐	4.2Edema: Si ☐ No ☐ 4.2.1Mareo: Sí ☐ No ☐ 4.2.2Visión Borrosa: Sí ☐ No ☐ 4.2.3Zumbido de oídos: Sí ☐ No ☐ 4.2.4Cefalea: Sí ☐ No ☐ 4.2.5Disnea: Sí ☐ No ☐	4.3Nicturia: Sí ☐ No ☐ 4.3.1Poliuria: Sí ☐ No ☐ 4.3.2Polidipsia: Sí ☐ No ☐ 4.3.3Polifagia: Sí ☐ No ☐ 4.3.4Insomnio: Sí ☐ No ☐ 4.3.5Depresión: Sí ☐ No ☐

v. Estilo de Vida

5.1 Actividad física: Sí ☐ No ☐

5.1.1 Tipo: Aeróbica ☐ Anaeróbica ☐

_____

5.1.2 Frecuencia: <2 veces/semana ☐ 3-5 veces/semana ☐ >6 veces/semana ☐

5.2 Horas sueño: <5 horas ☐ 6-8 horas ☐ >8 horas ☐

5.3 Horas trabajo y / o escuela: <5 horas ☐ 6-8 horas ☐ >8 horas ☐

5.4 ¿Consume alcohol? Sí ☐ No ☐Cantidad:

_____

5.4.1 Frecuencia: <2 veces/semana ☐ 3-5 veces/semana ☐ >6 veces/semana ☐

5.5 ¿Fuma? Sí ☐ No ☐ Cantidad:

_____

5.5.1 Frecuencia: <2 veces/semana ☐ 3-5 veces/semana ☐ >6 veces/semana ☐

6.1No de Comidas al día: <2 comidas ☐ 3-5 comidas ☐ >6 comidas ☐

6.1.2 ¿Cuáles? Desayuno ☐ Colación ☐ Comida ☐ Colación ☐ Cena ☐

6.3 ¿Cuánto tiempo tarda en comer?: _____ 6.4 ¿Quién prepara? _____

6.5 ¿Dónde y con quién ingiere los alimentos?: _____

6.6 ¿Ha realizado algún tipo de dieta? Sí ☐ No ☐ Duración: _____

6.7Consistía en:

_____

¿Ha presentado incremento o pérdida de peso recientes? _____

¿Cuántos kilogramos y en qué tiempo? _____

Nombre del paciente: _____ Fecha: _____/_____/_____

IX. Datos Antropométricos

	Medición	Referencia
9.1 Peso actual (kg)		
9.2 Talla (m)		
9.3 IMC (kg/m$^{2)}$		18.5-24.9
9.4 Peso Ideal (kg)		
9.5 Grasa (%)		6-18%
9.6 Circunferencia cintura (cm)		<102 cm
9.7Circunferencia cadera (cm)		
9.7.1 Índice cintura cadera		< 1
9.8 Presión Arterial (mmHg)		< 120-80 mmHg
9.9 Riesgo Cardiovascular		

X. Datos Bioquímicos.

Dato Bioquímico	Resultado	Valor de Referencia*
10.1 Glucosa en ayuno		**60-120 mg/dL**
PERFIL DE LÍPIDOS		
10.2.1 Colesterol total		**< 200 mg/dL**
10.2.2 HDL colesterol		**29 - 71 mg/dL**
10.2.3 LDL colesterol		**72 - 100 mg/dL**
10.2.4 Triglicéridos		**< 150 mg/dL**

*** Referencia: "laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico"**

La historia clínica refiere _____, con una distribución de grasa de tipo _____ y riesgo _____ de padecer enfermedades de tipo _____, relacionado a su peso (_____kg), evidenciado por un Índice de Masa Corporal de _____kg/mts^2 y la relación cintura-cadera.

Se diagnóstica un requerimiento calórico máximo de _____ Kcal, para reducir cualquier riesgo nutricional y de salud.

Anexo 2. Recordatorio de 24 horas

Recordatorio de 24 horas Fecha:_____

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Recordatorio de 24 horas Fecha:_____

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Alimento	Ingredientes	Cantidad

Anexo 3. Ultracentrifugación secuencial (US) para obtención y purificación de lipoproteínas de alta densidad

El proceso de US se lleva acabo conforme al siguiente protocolo:

I. Se centrifugó la muestra de sangre a 4000 RPM durante un periodo 10 minutos a una temperatura de 4°C, y se parar el plasma en alicuatas de 1mL.
II. Se ajusta 2 mL de plasma sanguíneo a una densidad de 1.063 con bromuro de potasio sólido (KBr), y se llevó a una cantidad de 3 mL con la solución de densidad de 1.063.
III. Se ultracentrifugó (ultracentrifuga Beckman optimal TLX) durante 3:05 h a una velocidad de 100.000 RPM, a 4°C.
Nota: En este paso se separan por flotación las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL Y IDL).
IV. Se retiró el sobrenadante (lipoproteínas que contienen Apo B) y se recuperó el pellet (sedimentos) del tubo.
V. Se cuantificó el volumen recuperado y se ajustó la densidad del plasma a 1.21 g/mL con KBr sólido en un tubo limpio y se llevó a una cantidad de 3 mL con solución de densidad de 1.21.
VI. Se ultracentrifugó a 100,000 RPM durante 3:05 h, a 4°C.
Nota: En estas condiciones se recupera entre el 80% y 85% de las apolipoproteínas Apo A-I del total del plasma por flotación, mediante pipeteo (pipeta Pasteur) con formación de burbujas constantes.
VII. Por último, se ajustó la densidad del sobrenadante con solución de KBr a 1.25 g/mL y se llevó a una cantidad de 3 mL, y se ultracentrifugó a 100.000 RPM durante un periodo de 3:05 h, a 4°C. Con la finalidad de disminuir la cantidad de albúmina residual presente en la muestra.
VIII. La muestra de las HDL recuperadas, se colocan en membrana de diálisis Spectrum Labsr® para ser dializadas en solución amortiguadora de TBE (Tris 0.09 M, EDTA 3 mM, pH=8.4), con la finalidad de retirar de la muestra el KBr restante.

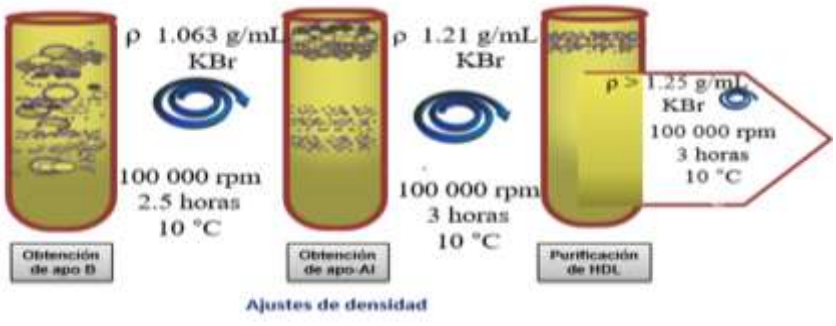

Figura 21. Ajuste de densidad de plasma.
Las muestras de plasma se ajustan a diferentes densidades con el empleo de KBr, con la finalidad de obtener muestra de HDL purificadas.

Anexo 4. Ensayo función Endotelial en cámara de órgano aislado

Se sacrificaron ratas Wistar macho mediante administración intraperitoneal de pentobarbital y se realizó la disección de la arteria aorta torácica. A continuación, se cortaron 5 anillos de aproximadamente 4 mm de grosor. Posteriormente se incubaron en baño María con una temperatura constante de 37ºC y oxigenación regular durante cuatro horas en tubos Eppendorf con solución fisiológica (solución de Krebs), y HDL purificadas a una concentración de 50 mg/dL en un volumen final de 300 µL de la siguiente forma:

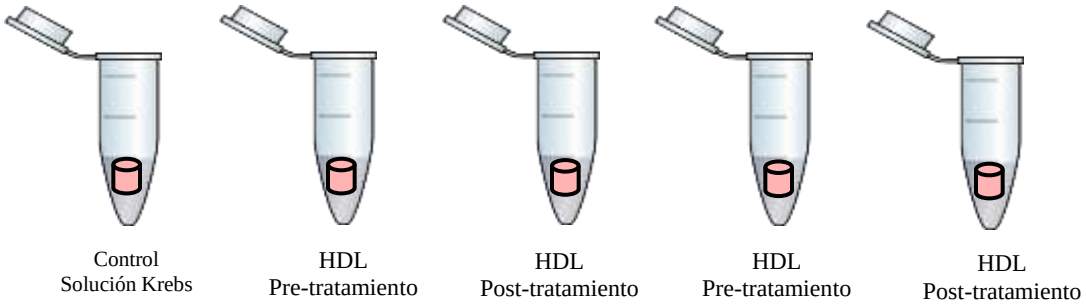

Figura 22. Incubación de anillos de aorta de rata Wistar en HDL
Los anillos de aorta diseccionados se incuban durante 1 hora en HDL aislados del suero de los pacientes en los distintos momentos del tratamiento.

Posterior a la incubación, los anillos de aorta fueron montados en 5 cámaras para órgano aislado con 10 mL de solución de Krebs a 37º C, con la ayuda de ganchos especiales para tal efecto, los cuales, tenían un extremo anclado a la cámara de vidrio y otro a un transductor de la señal. Se ajustó la tensión del gancho-transductor de manera que su tensión basal sea de 1 g (40 mm del papel milimétrico utilizado para realizar el registro). Se realizaron lavados con solución de Krebs a cada una de las cámaras a intervalos de quince minutos durante una hora. Finalmente se dejó estabilizar el tejido durante quince minutos y se procedió a agregar 15 µL de fenilefrina (Phe) 1mM para inducir una pre-contracción en el tejido y así evaluar la relajación inducida por la acetilcolina (Ach).

Cuando el registro alcanzó la meseta, se lleva a cabo una curva de Ach con las siguientes concentraciones:

- *1.25 µL Ach [50µM]*
- *2.5 µL Ach [50µM]*
- *5 µL Ach [50µM]*
- *10 µL Ach [50µM]*
- *20 µL Ach [50µM]*
- *10 µL Ach [1 mM]*
- *1 µL Ach [100 mM]*
- *10 µL Ach [100 mM]*

Finalmente, se determinó el porcentaje de relajación con respecto a los milímetros totales de contracción inducidos por la fenilefrina.

Anexo 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Soluciones
Solución amortiguadora de muestra
Sacarosa 50% + Azul de Bromuro fenol al 0.05% c.b.p. 20mL
Solución A: Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 , EDTA 3mM (TBE 1X) pH 8.35
Solución B: 48 g acrilamida + 1.28 g bis acrilamida c.b.p. 100 mlelectroge
Solución D: persulfato de amonio 10%

	3%	30%
Solución A	500 µL	500 µL
Solución B	300 µL	3 mL
H2O destilada	4.2 mL	750 µL
Glicerol	--	750 µL
Volumen total	5 mL	5 mL
Las soluciones de acrilamida al 3 y 30% se colocaron por separado en los compartimentos de la cámara generadora de gradiente, se mezclaron lentamente y progresivamente con agitación constante (mezclador y agitador magnético). Nota: la solución de acrilamida al 3% se coloca en el lado izquierdo y la de 30% en el lado derecho.		
TEMED Tetrametiletiléndiamina	4 µL	4 µL
SOLUCIÓN Persulfato de amonio 10%	20 µL	20 µL
La solucion D y TEMED se agregaron posteriormente en los pozos de acrilamida al 3 y 30%, en constante agitación.		
Para finalizar se vertió el poso que contiene la solución de acrilamida al 30% entre las placas (0.05 mm) para el gel, en cuanto la primera gota tocó el fondo del vidrio, se abre la llave de circular para que se mezclen los gradientes. Al finalizar el llenado se colocó el peine de forma uniforme, evitando la formación de burbujas. Nota: es una reacción exotérmica libera calor, el gel se habrá solidificado cuando disminuya su temperatura nuevamente.		
Una vez polimerizado el gel, éste se pre-corre 15 minutos a 60 V, para estabilizarlo.		

Carga de muestra en el Gel

I. Los geles se colocaron en la cámara de electroforesis con solución de TBE 1X.
II. Se calculó la cantidad de muestra necesaria para correr el Gel, mediante la determinación de proteína por el metedo de Lowry, y se agregan 5 µl de Buffer de muestra.
III. En el primer carril se colocó el marcador de alto peso molecular y posteriormente las muestras (TB,Pre-tratamiento, Post-tratamiento, Pre-placebo, Post-placebo) de cada paciente.
IV. La separación electroforética se realizó primero durante 20 minutos a 90 V para permitir la entrada de la muestra a el gel, al término de este periodo la separación se continuó durante 22 h a 180 V.
V. Al finalizar el tiempo de migración, el gel se desmoldó y se tiñó según el método seleccionado para determinar proteína (azul de Comassie) o lípidos (reactivo revelador de colesterol, triglicéridos, fosfolípido).

Anexo 6. Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de las lipoproteínas de alta densidad en fase semisólida (sobre el gel de poliacrilamida)

Preparación de reactivo para colesterol total y colesterol esterificado.

Reactivo	Concentración	
	Colesterol Total	Colesterol Libre
Solución salina isotónica (0.9%)	7456 µL	7474 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
Solución Stock (Colato de sodio 3 mM y Tritón de sodio al 0.1%)	500 µL	500 µL
❖ Carboximetilcelulosa	120 mg	120 mg
Peroxidasa (0.25 µU/mL)	12 µL	12 µL
Colesterol estereasa (0.075 µU/mL)	10 µL	--
Colesterol oxidasa (0.05 µU/mL)	13 µL	13 L
❖ Los reactivos se mezclaron hasta homogenizarse y se evitó la formación de grumos o burbujas.		
➢ Azul de tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 µL	400 µL
➢ Fenazin metasulfato (FMS) 0.04mM	600 µL	600 µL
➢ El MTT y FMS se agregaron hasta el momento de uso del reactivo, homogenizando vigorosamente. Nota: Se cubrió de la luz por ser una reacción fotosensible.		

Anexo 6. Tinción para la determinación de la distribución de lípidos de las subclases de las lipoproteínas de alta densidad en fase semisólida (sobre el gel de poliacrilamida)

Preparación de reactivo para triglicéridos y fosfolípidos.

Reactivo	Concentración	
	Trigliceridos	Fosfolípidos
Solución salina isotónica (0.9%)	5500 µL	5500 µL
Buffer PBS 10X (100mM) pH=7.4	1000 µL	1000 µL
❖ Carboximetilcelulosa	120 mg	120 mg
Reactivo comercial trigliceridos	2500 µL	--
Reactivo comercial fosfolípidos	--	2500 µL
❖ Los reactivos se mezclaron hasta homogenizarse y se evitó la formación de grumos o burbujas.		
➢ Azul de tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 µL	400 µL
➢ Fenazin metasulfato (FMS) 0.04mM	600 µL	600 µL
➢ El MTT y FMS se agregaron hasta el momento de uso del reactivo, homogenizando vigorosamente. Nota: Se cubrió de la luz por ser una reacción fotosensible.		

Método de revelación de geles

I. Los geles se colocan sobre la base de vidrio, donde se distribuye el reactivo revelador de forma uniforme (sin dejar exceso de grumos o burbujas), y se introducen dentro de un toupper para evitar la exposición con la luz (reacción fotosensible).
II. Se incuban en baño maría durante 1 hora a una temperatura de 37ºC,
III. Al concluir la reacción, se retira el reactivo revelador del gel con agua, para enseguida ser escaneados y posteriormente analizarlos.

Anexo 7. Carta de consentimiento informado

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
PROPUESTA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Carta de consentimiento informado.

Ciudad de México a ____ de _____ del año _____.

Por medio de la presente yo, _____autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado "Efecto de la suplementación de ácidos grasos omega-3 sobre la estructura y función de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sujetos con hipertrigliceridemia".

El objetivo de este estudio es analizar cambios en la función de las HDL después de la suplementación con ácidos grasos omega-3. Se me ha explicado y he comprendido que mi participación consistirá en asistir en ayuno al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología, en donde se me tomarán 10 mL de sangre y posteriormente, se me indicará una dieta isocalórica que seguiré durante 1 semana. A continuación, se me indicó la toma de 2 cápsulas de omega-3 al día por un periodo de 5 semanas, que serán proporcionadas por el investigador y transcurrido este tiempo, asistiré para la toma de muestra final. Me han informado que la realización de este estudio me permitirá conocer mis niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, y mis medidas antropométricas (peso, talla, índice de masa corporal). Asimismo, se me realizará una valoración clínico-nutricional, con lo cual se determinará mi riesgo cardiovascular y al finalizar el estudio se me harán las recomendaciones dietéticas y nutricionales pertinentes. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes; como consecuencia del consumo de cápsulas de omega-3, es probable que sufra de trastornos gastrointestinales (incluyendo distensión abdominal, dolor abdominal, estreñimiento, diarrea, dispepsia, flatulencias, eructos, reflujo gastroesofágico, náuseas o vómitos) y derivado de la toma de sangre, dolor durante la punción y posible formación de hematoma en el sitio de la misma. Los posibles efectos secundarios y riesgos por el volumen de sangre colectado son considerados como mínimos. Con lo anterior, se generará información para determinar el efecto de los omega-3 sobre la estructura y función de las HDL. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente. Los investigadores en cargo; Dra. Azucena Salazar Piña y Dr. Oscar Pérez Méndez, han confirmado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir con lo anterior, el investigador utilizará para la creación de base de datos (que tendrá mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (no empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

_____
Nombre y firma del paciente.

_____
Firma del Investigador encargado.

_____ _____
Testigo 1. Nombre y firma Testigo 2. Nombre y firma

12. Bibliografía

1 Organización Mundial de la Salud. (enero, 2015). Enfermedades Cardiovasculares. junio, 2017, de OMS, sitio Web.

2 Nacional Heart, Lung, and Blood Institute. (s.f.). Enfermedad Coronaria. junio, 2017, de Nacional Heart, sitio WEB: https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/enfermedad-coronaria.

3 Kwon S, Yoon S, Kang T, Kwon M, Kim J, RheeJ, Hong B. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Yonsei Med J*. 2006 Jun 30;47(3):405-14.

4 Carmena, R. Riesgo elevado de disfunción lipoproteica en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Esp Cardiol*. 2008;8(3), 19-26.

5 Cruz Hernández J, Licea Puig M, Hernández García P, Yanes Quesada M, Salvato Dueñas A. Disfunción endotelial y diabetes mellitus. *Rev Cub Endocrinología*. 2012;23(2):166-185.

6 Posadas Romero C, Posadas Sánchez R, Juárez Rojas J, Medina Urrutia A, Jorge-Galarza E, Cardoso Saldaña G. Alteraciones de las lipoproteínas de alta y baja densidad en pacientes coronarios con C-LDL en meta pero C-HDL y triglicéridos anormales. *Arch Cardiol Mex*. 2008; 78(1):30-39.

7 Calabresi L, Villa B, Canavesi M, et al. An w-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate Increases Plasma High-Density Lipoprotein 2 Cholesterol and Paraoxonase Levels in Patients With Familial Combined Hyperlipidemia. *Metabolism*.2004;53(2):153-158.

8 Castellanos L, Rodriguez, M. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Rev Chil Nutr*.2015;42(1):90-95.

9 Piñeiro Corrales G, Lago Rivero N, Culebras Fernández J. Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Nutr Hosp*.2013;28(1):1-5.

10 Carrero J, Martín Bautista E, Baró L, Fonollá J, Jiménez J, Boza J, López Huertas E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. Nutr Hosp 2013;20(1): 63-69.

11 Valenzuela A, Sanhueza J. Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Rev Chil Nutr.* 2009;36(3): 246-257.

12 Bogl L, Maranghi M, Rissanen A, Kaprio J, Taskinen M, Pietiläinen K. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid intake is related to a protective high-density lipoprotein subspecies profile independent of genetic effects: a monozygotic twin pair study. *Atherosclerosis*.2011:219(2):880-886.

13 Petersen M, Pedersen H, Major Pedersen A, Jensen T, Marckmann P. Effect of fish oil versus corn oil supplementation on LDL and HDL subclasses in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. 2002;25(10):1704-1708.

14 Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension.*Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):1007-1015.

15 Wooten JS, Biggerstaff KD, Ben-Ezra V. (2009). Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2009;107(3): 794-800.
16 Gutiérrez YP, Gutiérrez AP, Rodríguez León A, Llanes Álvarez C. Las lipoproteínas de alta densidad: protectoras vasculares contra la aterosclerosis. *CorSalud*. 2013;5(4):366-378.
17 Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol*.2011;8 (4): 222-32.
18 Alexánderson Rosas E, Calleja Torres R, Martínez García A, Lamothe Molina PA, Ochoa López JM, Meléndez G, Meave González A. El impacto de la detección de disfunción endotelial en la aterosclerosis: estudio mediante tomografía por emisión de positrones. *Arch Cardiol Méx*. 2010;80(1):36-40.
19 Mostad IL, Bjerve KS, Lydersen S, Gril V. Effects of marine n-3 fatty acid supplementation on lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance in subjects with type II diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62:419–429.
20 Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev espanola de cardiología*. 2009;*62*(10):1161-1178.
21 Barquera S, Campos I. (2009). Dislipidemias: epidemiologia, adherencia, evaluación y tratamiento. (3a Ed.). *INSP*. México
22 Pérez M. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis?. *Arch Cardiol Méx*. 2004;74(1):53-67.
23 Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Avila-Vazzini N, Carreón-Torres E, PosadasRomero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzimatic assement of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrarions of HDL subclasses. *J Lipid Res*.2010;51(6):1610-7.
24 Aguilar SC, Melgarejo Hernández MA. Análisis de la composición y de la función de las HDL,¿ un estudio para el clínico del futuro?. *Rev Endocrinol Nutr*. 2011;19(3):113-122.
25 García Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P,Pérez-Méndez O. (2011). Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome.Clin *Chim Acta. 2011;*412: 292–298.
26 Santos-Gallego CG, Badimón JJ. (2012). Lipoproteínas de alta densidad y reducción de riesgo cardiovascular,¿ promesas o realidades?. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65(04):305-308.
27 Delgado Roche L, Martínez-Sánchez G. Nuevos enfoques sobre la función de las lipoproteínas plasmáticas en las enfermedades de origen aterotrombótico. *Rev Cubana Farm*. 2010;44(2):245-258.
28 Tomás M, Latorre G, Sentí M, Marrugat J. (2004). Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma en la arteriosclerosis. *Rev Esp Cardiol*. 57(6), 557-569.
29 Fernández JM, Fuentes Jiménez F, López-Miranda J. (2009). Función endotelial y ejercicio físico. *Rev Andal Med Deporte*. 2009;2(2):61-69.

30 Riwanto M, Landmesser U. High density lipoproteins and endothelial functions: mechanistic insights and alterations in cardiovascular disease. *J Lipid Res*. 2013;54:2031–2033.
31 Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, Bouza KV, Campos FN, Torres V, Guzman E. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs in context*. 2018;28(7): doi: 10.7573/dic.212525.
32 Pérez-Méndez O, González-Pacheco H, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDLcholesterol in coronary artery disease risk: function or structure?. *Clin Chim Acta*. 2014;429(15):111–122.
33 Calvo, C. Bases moleculares de las propiedades antiaterogénicas de las lipoproteínas de alta densidad. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*. 2008;20(3):116–125. doi:10.1016/s0214-9168(08)72596-8.
34 Badimón L, & Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2006;6(1):21A–30A. doi:10.1016/s1131-3587(06)74817-8.
35 Carranza MJ. Triglicéridos y riesgo cardiovascular. *Med interna Méx*. 2017;33(4):511-514.
36 Ponte CI. Redescubriendo los triglicéridos como factor de riesgo cardiovascular. *Avances cardiol*. 2009;29(4):367-367.
37 Quintanilla-Cantú A, Peña-de-la-Sancha P, Flores-Castillo C, Mejía-Domínguez AM, Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Bautista-Pérez R, Enriquez-Calderón RE, Juárez-Oropeza MA, Fragoso JM, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. (2017). *Clin Chim Acta.* 2017 Jan; 464:98-105. doi: 10.1016/j.cca.2016.11.018.
38 Pérez-Méndez O. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Inst Cardiol Méx*. 200;70: 312-321.
39 Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular Research*.2014;103:350–361.
40 Tran Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Meilhac O. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. 2013;169(3):493-511.
41 Carvajal Carvajal C. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med Leg Costa Rica*. 2017;34(2):90-100.
42 Ramírez Vélez R, Da Silva G, Fernández JM. Evidencia actual de intervenciones con ejercicio físico en factores de riesgo cardiovascular. *Rev Andal Med Dep*. 2011;4(4):141-151.
43 Muñoz-Vega M, Massó F, Páez A, Carreón-Torres E, Cabrera-Fuentes, Pérez-Méndez, Ó. Characterization of immortalized human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) for the study of HDL functionality. *Lipids in Health and Disease*. 2018;17(1): doi:10.1186/s12944-018-0695-7.
44 Dihn T, Diallo D, Delboc S, Varela Pérez M, Dang QB, Lapergue B, et al. HDL and endotelial protection. *Br J Pharmacol*.2013;169(3):493-511.
45 Marín-Palma D, Taborda NA, Urcuqui-Inchima S, Hernandez JC. Inflamación y respuesta inmune innata: participación de las lipoproteínas de alta densidad. *Iatreia*. 2017;30(4):423-435.

46 Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Cub Méd*. 2001;40(3):212-222.
47 Melgarejo Rojas E. El endotelio: 25 años después. *Rev Med*. 2005;13(1):45-61.
48 Cuevas A, Alonso R. Dislipidemia diabética. *Rev Méd. Clín*. Las Condes.2016;27(2):152-159.
49 Awad F, Contreras-Duarte S, Molina P, Quiñones V, Serrano V, Abbott E, Rigotti A. Disfuncionalidad antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en pacientes diabéticos descompensados. *Nutr Hosp*. 2015;32(3):1131-1138.
50 Garda HA, Tricerri MA, Toledo JD, Córsico B, González MC, Prieto ED. Apolipoproteína AI: Estructura y funciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2013;47(2):327-341.
51 Martínez-González J, Llorente-CortésbV, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol*. 2001;*54*(02):218-231.
52 Peña de la Sancha P. Efecto de la suplementación de ácidos grasos omega-3 sobre la composición lipídica y función endotelial de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sujetos con hipertrigliceridemia (Tesis de maestría), Morelos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2018.
53 Arrebola-Moreno A, Laclaustra M, & Kaski J. Evaluación no invasiva de la función endotelial en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol*. 2012;65(1):80-90.
54 Lahozb C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(2):184-195.
55 Núñez Rocha GM, López Enríquez I, Ramos Hernández SR, Ramos Peña EG, Guevara Valtier MC, González Treviño IM. Riesgo cardiovascular en pacientes de primer nivel de atención. *Rev Sal Púb Nutr*.2018;14(1):1-8.
56 O'Donnell CJ, Elosua R. Factores de riesgo cardiovascular. Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61(3):299-310.
57 Carvajal Carvajal C. Tejido adiposo, obesidad e insulino resistencia. *Med Leg Costa Rica*. 2005;32(2):138-144.
58 Grosso CP, Wassermann AO. Obesidad y riesgo cardiometabólico.*FEPREVA*. 2015;17(8):2-22.
59 Rosales Ricardo Y. Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos: una revisión. *Nutr Hosp*. 2012;27(6):1803-1809.
60 Rosas-Peralta M. Attie F. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Arch Cardiol Méx* .2007;77(2):91-93.
61 Expert Panel on Detection, E. 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(19):2486.
62 Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades Programa de Salud en el Adulto y en el Anciano, Secretaría de Salud. Guía

de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención. *Rev Mex Cardiol*. 2013;24(3):103-129.
63 Fuentes GO, Mata AH. Frecuencia de hipertrigliceridemias en población mexicana ambulatoria. Rev Latinoamer Patol Clino.2013;60(2):110-115.
64 Escobedo de la Peña J, de Jesús Pérez R, Schargrodsky H, Champagne B. Prevalencia de dislipidemias en la ciudad de México y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular. Resultados del estudio CARMELA. *Gac Méd Méx*. 2014;150(2):128-136.
65 Kwon SW, Yoon SJ, Kang TS, Kwon HM, Kim JH, Rhee J, Hong BK. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Yonsei Med J*. 2006;47(3):405-414.
66 Cuéllar R, Nuche ML. Aterosclerosis y lesión endotelial:¿ proceso irreversible?. *Med Int Méx*. 2010;26(6):590-596.
67 Travieso J. Consideraciones genéticas sobre las dislipidemias y la aterosclerosis. *Rev CENIC*.2008;39(3):161-172.
68 Sociedad Española de Medicina Interna (enero, 2017). Protocolos hipertrigliceridemia. Junio 2017, de la SEMI, sitio web: https://www.fesemi.org/sites/default/files/documentos/publicaciones/capitulo-1_3.pdf
69 Patel AA, Budoff MJ. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipoproteins in hypertriglyceridemia. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.2016;23(2):145–149
70 Instituto Nacional de Salud Pública. (2015). El consumo de azúcar en México y la nueva directriz de la OMS para su reducción global. Marzo, 2018, del INSP, sitio web: https://www.insp.mx/epppo/blog/3609-consumo-azucar-mexico-nueva-directriz-oms.html.
71 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 medio camino. (2017). Marzo, 2018, salud publica, sitio web: http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/doctos_2016/ensanut_mc_2016-310oct.pdf.
72 Angosto MC. (2015). Lipogénesis de" novo" y termogénesis. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Mazo, 2018, sitio web: https://themedicalbiochemistrypage.org/es/lipoproteins-sp.php.
73 Ros E, Laguna JC. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol*.2006;6(4):52-61.
74 Rosales AJ, García VD, Chávez AA. El papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial de la aterosclerosis. *CIENCIA ergo-sum*. 2010;17(3):258-268.
75 Espondaburu OR. (2006). Hipertrigliceridemia: influencia sobre parámetros que estiman el transporte reverso del colesterol. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2006;40(2):166-172.
76 Cárdenas Monroy C, González Andrade M, Guevara Flores A, Lemus L, Matuz Mares D. genética de las dislipidemias en México. mensaje bioquímico, 40:125-142.
77 Saavedra N, Cuevas A, Hernández A, Caamaño J, Jaramillo P *et al*. Polimorfismos genéticos de APOA5 se asocian a hipertrigliceridemia e

hiperglicemia en individuos chilenos con enfermedad coronaria y controles. *Rev Chil Cardiol*. 2010;29(1):19-27.
78 Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Estatinas y ácidos grasos omega-3. Disminución de la mortalidad cardiovascular dependiente e independiente de la reducción de la colesterolemia. *Rev Esp Cardiol*. 2006;6(4):20-30.
79 Solís G, Hernández H. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias. *Rev Mex de Cardiol.* 2013;24(S1):3-22.
80 Sociedad Española De Nutraceútica Médica (2019). Mayo, 2019. Sitio web: http://www.nutraceuticamedica.org/definicion.htm
81 Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin*. 2005;57(3):457-472.
82 Castro-González MI. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia*. 2002;27(3):128-136.
83 Konrad Biesalski H, Grimm P. Nutrición: texto y atlas. 6.ª ed. argentina : Panaamericana; 2007.
84 Valenzuela R, Tapia G, González M, Valenzuela A. Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas*. Rev Chil Nutr*. 2011;38(3):356-367.
85 Herrera M, Vega S, Tolentino R, Fernández B, González G. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *Rev REB.* 2006;25(3):72-79.
86 Food and Agriculture Organization. (2008). Resumen de las conclusiones y recomendaciones dietéticas sobre grasa total y ácidos grasos.enero, 2018, de Fao.org.sitio WEB:Available from: http://www.fao.org/3/i1953s/i1953s.pdf
87 Nasiff-Hadad A, Meriño-Ibarra E. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. Lo bueno y lo malo. *Rev Cub Med*. 2003;42(2):128-133.
88 Burdge G, Wootton S. Conversion of α-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *B J Nutr*. 2002;88(4):411-420.
89 Burdge G, Calder P. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*. 2005;45(5):581-597.
90 Endo J, Arita M. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids.*J Cardiol*. 2016;67(1):22–27.
91 Jump DB, Depner CM, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J Lipid Res*.2012;53(12):2525–2545.
92 Stone N. The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio (GISSI)-Prevenzione Trial on fish oil and vitamin E supplementation in myocardial infarction survivors. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2(5):445-451.
93 Yokoyama, M. JELIS-Japan Eicosapentaenoic acid (EPA) Lipid Intervention Study. *Am Heart J*. 2005:13-16.
94 Skulas R, Alaupovic P, West SG. Dose Response Effects of Marine Omega-3 Fatty Acids on Apolipoproteins, Apolipoprotein-Defined Lipoprotein

Subclasses, and Lp-PLA2 in Individuals with Moderate Hypertriglyceridemia. *J Clin Lipidol*. 2015;9(3):360–367

95 Borow K, Nelson J, Mason R. Biologic plausibility, cellular effects, and molecular mechanisms of eicosapentaenoic acid (EPA) in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;242(1):357-366.

96 Penny MK, Harris SW, Appel JL. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease New Recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:151-152.

97 Uauy D, Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus. *Rev Méd Chile V.* 2000;128(4):437-446.

98 Han L, Shen W, Bittner S, Kraemer F, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR-α. *Future cardiol*. 2017;13(3):259-278.

99 Waitzberg D & Garla P. Contribución de los ácidos grasos Omega-3 para la memoria y la función cognitiva. *Nutr Hosp*. 2014;30(3):467-477.

100 Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc*. 2011;70(7):215–231.

101 Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res*. 2011;50(4):372–387.

102 Rodríguez-Cruz M, Serna DS. Nutrigenomics of omega-3 fatty acids: regulators of the master transcription factors. *Nutrition*. 2017;41:90-96.

103 Tanaka N, Ishida T, Nagao, M, Mori T, Monguchi T, Sasaki M, Irino Y. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2014;237(2):577-583.

104 Peña de la Sancha P. Efecto de un alimento rico en triglicéridos sobre la composición de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en sujetos con alto riesgo cardiovascular. [tesis licenciatura]. Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2015.

105 García-Sánchez C, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, et al. Low concentrations of phospholipids and plasma HDL cholesterol subclasses in asymptomatic subjects with high coronary calcium scores. Atherosclerosis. 2015;238(2):250–255. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.004

106 Lazcano-Ponce E, Salazar-Martínez E, Gutiérrez-Castrellón P, Angeles-Llerenas A, Hernández-Garduño A, & Viramontes L. Ensayos clínicos aleatorizados: variantes, métodos de aleatorización, análisis, consideraciones éticas y regulación. Salud pública de México. 2004;46(6): 559-584.

107 González-Acevedo O, Hernández-Sierra JF, Salazar-Martínez A, Mandeville P, Valadez-Castillo F, & Mendoza E. Efecto de la suplementación de omega 3 sobre IMC, ICC y composición corporal en mujeres obesas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2013;*63*(3):224-231.

108 Takahashi Y, Ide T. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and White adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br J Nutr.* 2000;84:175–184.

109 Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Wakisaka T, Hase T, Tokimitsu I. Dietary alpha-linolenic acid-rich diacylglycerols reduce body weight gain accompanying the stimulation of intestinal beta-oxidation and related gene expressions in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Nutr*. 2002;132(10):3018-3022.

110 Peñailillo Escarate L, Mackay Phillips K, Serrano Duarte N, Canales Espinoza P, Miranda Herrera & Zbinden-Foncea H. Efectos de la suplementación de omega-3 y entrenamiento de intervalos de alta intensidad en el rendimiento físico, presión arterial y composición corporal en individuos sedentarios con sobrepeso. *Nutr Hosp*. 2016;33(4):848-855.

111 López Farré A, Macaya C. Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. *Reb Esp Cardiol*. 2006;6(4):31–37. doi:10.1016/s1131-3587(06)74824-5

112 Mori T, Burke V, Watts G. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1085–94.

113 Castell G, Serra L, & Ribas L. ¿ Qué y cuánto comemos? El método Recuerdo de 24 horas*. Rev. esp. nutr. Comunitaria*. 2015;2(1):42-44.

114 Dessi M, Noce A, Bertucci P, et al. Atherosclerosis, Dyslipidemia, and Inflammation: The Significant Role of Polyunsaturated Fatty Acids. ISRN Inflamm. 2013:191823. doi: 10.1155/2013/191823.

115 Limbu R, Cottrell GS, McNeish AJ. Characterisation of the vasodilation effects of DHA and EPA, n-3 PUFAs (fish oils), in rat aorta and mesenteric resistance arteries.PLoS ONE. 2018;13(2): e0192484.

Cuernavaca, Morelos, a 20 de Octubre de 2020
Asunto: Voto aprobatorio.

DR. JOAQUÍN SALGADO HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Nutrición **Adolfo Muñoz García**, he leído y revisado la tesis titulada **EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA**, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Dr. Jonathan Román Valdez-Camacho (Sinodal)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JONATHAN ROMAN VALDEZ CAMACHO | Fecha:2020-10-22 13:50:15 | Firmante

MY]0ce9/aV4vdhW9qkJBKacvuTlqWQTORL2juZyEtDGmnjnt/r5TekkjnzoSRC92SJsn+zYIYQTBchyV8KfISOpPgdPBvGFXA3CK9XfPJzyZ1vncalCfRUNvcJrsB8+GzJNfoFgnLLsWoiGjeniFRE3a+zpkdWOwuAeu3FnEQKxAS7xEAK+VE8J6Y1rOcTjVZvswe2wC75KysUf4sl0OJ0qOPJ9SmvRVOyr851e9mJAka/oBRNr5rQRICM87+/Eizb6tprkqF847TShq+SXNbNUM3PSth1yEmrNS39dM8j5L2fUmCyiFosiX9jRwXdLnmkdxvhX5JeT1lhkssIg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

cVg0pq

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ep6mHDfIh1QEgXKlJMh0RBoZqLmRZ38u

Cuernavaca, Morelos, 24 de noviembre de 2020.

DR. JOAQUÍN SALGADO HERNÁNDEZ
DIRECTOR
FACULTAD DE NUTRICIÓN UAEM
P R E S E N T E

Por medio de la presente notifico la emisión de mi **voto aprobatorio** de la tesis desarrollada por el alumno **Adolfo Muñoz García**, cuyo título es: "EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA" en virtud de que cumple con lo necesario para poder realizar la sustentación de examen recepcional.

Sin más por el momento y quedando a sus órdenes, le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Dolores Azucena Salazar Piña

Profesora Investigadora de Tiempo Completo

Facultad de Nutrición-UAEM

Cuernavaca, Morelos, a 28 de octubre del 2020.
Asunto: Voto aprobatorio.

DR. JOAQUÍN SALGADO HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del (a) estudiante de Licenciatura en Nutrición ADOLFO MUÑOZ GARCÍA, de quien he leído y revisado la tesis titulada: "EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional.

Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Mcs. Liliana Karina Valencia Estañón

Cuernavaca, Morelos, a 23 de Octubre del 2020
Asunto: Voto aprobatorio.

DR. JOAQUÍN SALGADO HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN, UAEM
P R E S E N T E

Por este conducto me permito comunicarle que en mi calidad de jurado para examen de grado del estudiante de Licenciatura en Nutrición **Adolfo Muñoz García**, he leído y revisado la tesis titulada **EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA**, y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos de Titulación de la Universidad para tesis profesional. Por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

M. en C. Diana Rivera Bahena

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

FACULTAD DE NUTRICIÓN

ASUNTO: VOTO PROBATORIO

DR. JOAQUÍN SALGADO HERNÁNDEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE NUTRICIÓN
PRESENTE

A través de este documento me permito informarle que en mi calidad de jurado de examen de grado del estudiante en licenciatura en nutrición **Adolfo Muñoz García,** he leído y revisado la tesis titulada: **EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SUBCLASES DE LAS PROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL) Y SU FUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA,** y considero esta cumple con los requisitos señalados en los lineamientos que rigen la titulación para tesis profesional en la UAEM. Con lo anterior mencionado el alumno puede continuar con los trámites correspondientes para solicitar fecha de examen.

Sin más por el momento agradezco la atención prestada.

Carolina Bustos Rivera Bahena

ATENTAMENTE
Dra. Carolina Bustos Rivera Bahena
SINODAL DE TESIS