

El agua rica en hidrógeno disminuye el suero.

Niveles de colesterol LDL y mejora la función HDL en pacientes con síndrome metabólico potencial

Canción Guohua,^{1,*†} min-li^{1,§} Hui Sang,^{1,††} Mentir Zhang,[§] Xiu Hong Li,^{**} Shutong Yao,^{††} yang yu,^{*,†} Chuan Long Zong,^{*,†} Yazhuo Xue^{2,§} y Shucun Qin^{2,*,†}

Laboratorio Clave de Aterosclerosis en las Universidades de Shandong*, Shandong, China; Instituto de † aterosclerosis, Instituto de Enfermería [§] Instituto de Medicina Básica, ^{††} universidad médica de taishan, Shandong, China ; y Hospital de Enfermedades Mentales de Taishan, ^{**} Shandong, China

Resumen Hemos encontrado que el hidrógeno (dihidrógeno; H₂) tiene efectos benéficos para reducir los lípidos en hámsters dorados srios alimentados con una dieta rica en grasas. El objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos del agua rica en H₂ (0,9–1,0 l/día) sobre el contenido, la composición y las actividades biológicas de las lipoproteínas séricas en 20 pacientes con síndrome metabólico potencial. El análisis de suero mostró que el consumo de agua rica en H₂ durante 10 semanas resultó en una disminución del cho total en suero niveles de lesterol (TC) y colesterol LDL (LDL-C). El análisis de transferencia Western reveló una marcada disminución de la apolipoproteína (apo) B100 y la apoE en el suero. Además,² encontramos que H significativamente mejoró la funcionalidad de HDL evaluada de cuatro maneras independientes, a saber, i) protección contra la oxidación de LDL, ii) inhibición de la adhesión de monocitos inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) a las células endoteliales, iii) estimulación de la salida de colesterol de las células espumosas de macrófagos, y iv) protección de las células endoteliales de la apoptosis inducida por TNF. Además, encontramos que el consumo de agua rica en H₂ dio como resultado un aumento de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y una disminución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en suero completo y LDL. En conclusión, la suplementación con agua rica en H₂ parece disminuir los niveles séricos de LDL-C y apoB, mejorar las funciones de HDL lesionadas por dislipidemia y reducir el estrés oxidativo, y puede tener un papel beneficioso en la prevención del posible síndrome metabólico.—Song, G., M. Li, H. Sang, L. Zhang, X. Li, S. Yao, Y. Yu, C. Zong, Y. Xue y S. Qin . El agua rica en hidrógeno disminuye los niveles séricos de colesterol LDL y mejora la función HDL en pacientes con posible síndrome metabólico. *J. Lipid Res.* 2013; 54: 1884–1893.

Palabras clave complementarias apolipoproteína B • propiedad antioxidante • lipoproteína de baja densidad • lipoproteína de alta densidad

Este trabajo fue apoyado por Taishan Scholars Foundation de la provincia de Shandong (zd056, zd057); financiación especial de investigación de la Universidad Médica de Taishan (2008); Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China (81200216) y Fondo de Investigación Promotora para Científicos Jóvenes y de Mediana Edad Excelentes de la Provincia de Shandong (BS2012YY034).

Manuscrito recibido el 7 de febrero de 2013 y en forma revisada el 22 de abril de 2013.

Publicado, *JLR Papers in Press*, 22 de abril de 2013

DOI 10.1194/jlr.M036640

El hidrógeno (dihidrógeno; H₂), como elemento químico más ligero y abundante, se considera un nuevo antioxidante que puede reducir el estrés oxidativo (1). El gas de hidrógeno ha llegado a la vanguardia de la investigación de gases medicinales terapéuticos. La evidencia acumulada en una variedad de campos biomédicos usando modelos clínicos y experimentales para muchas enfermedades demuestra que el H₂ administrado ya sea por inhalación de gas o consumo de una solución acuosa que contiene H₂, puede actuar como una estrategia terapéutica factible en diferentes modelos de enfermedades. Por ejemplo, se demostró que la suplementación con agua rica en H₂ tiene un papel beneficioso en la prevención de la diabetes tipo 1 y 2 y la resistencia a la insulina (2, 3); inflamación crónica del hígado (4); estrés oxidativo agudo; y lesión cerebral focal por isquemia/reperfusión (1). Además, hemos informado que el consumo de solución salina saturada con H₂ durante ocho semanas previene la aterosclerosis en ratones con apolipoproteína E-knockout (apoE) (5) y que la administración de solución salina saturada con H₂ durante cuatro semanas disminuye los niveles séricos de colesterol total (CT) y colesterol LDL (LDL-C) en hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas (6). Sin embargo, aún no se ha demostrado el efecto regulador de lípidos de H en humanos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar los efectos del H₂ sobre el contenido y la composición de las lipoproteínas séricas en pacientes con potencial dislipidemia.

El síndrome metabólico se caracteriza por una constelación de anomalías metabólicas y antropométricas, que incluyen exceso de peso, resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipertensión, baja concentración de colesterol HDL (HDL-C),

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; FPLC, cromatografía líquida rápida de proteínas; HDL-C, HDL-colesterol; ácido 12-HETE, 12-hidroxi eicosatetraenoico; 13-HODE, ácido 13-hidroxi octadecadienoico; HUVEC, célula endotelial de vena umbilical humana; IL, interleucina; 8-iso-PGF2 8-iso-prostaglandina F2; LDL-C, colesterol LDL; MDA, malondialdehyde; PG, prostaglandina; PON1, paraoxonasa-1; SOD, superóxido dismutasa; TBARS, sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico; CT, colesterol total; TG, triacilglicerol; TNF, factor de necrosis tumoral; VLDL-C, colesterol VLDL. 1

G. Song, M. Li y H. Sang contribuyeron igualmente a este trabajo.

² A quién debe dirigirse la correspondencia. correo electrónico: shucunqin@hotmail.com (SQ); yzxue@tsmc.edu.cn (YX)

y dislipidemia (7-9). Las enfermedades metabólicas siguen siendo una preocupación grave en el mundo, y las personas con síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y diabetes tipo 2 (9, 10). Se sabe que las funciones y concentraciones séricas de HDL tienen fuertes correlaciones inversas con el riesgo de síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular aterosclerótica (11-13). Se sabe que el HDL sufre modificaciones drásticas en su estructura y composición bajo las acciones concertadas de la inflamación y el estrés oxidativo (14, 15). Como resultado, las partículas de HDL pierden progresivamente sus actividades biológicas normales y adquieren propiedades alteradas. Es bien sabido que el H es un donador de electrones y, por lo tanto, tiene una alta capacidad reductora, y los efectos benéficos del H 2 en diferentes modelos de enfermedades dependen principalmente de sus propiedades antioxidantes. Por lo tanto, es posible que la función HDL lesionada por dislipidemia pueda mejorar mediante el tratamiento con H en animales o pacientes con hiperlipidemia o síndrome metabólico. Hemos demostrado previamente que la administración de solución salina saturada con H 2 mejora notablemente las propiedades funcionales de la partícula de HDL en ratones y hámsteres dorados (5, 6). Sin embargo, si los mismos efectos de H podrían observarse en humanos 2 aún no se ha determinado. Aquí, nuestro objetivo fue caracterizar los efectos de H 2 sobre propiedades funcionales de la partícula HDL en 20 pacientes con potencial síndrome metabólico.

MÉTODOS

Sujetos

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Médica de Taishan. Reclutamos a 20 sujetos de 43 años de edad, hombres ($n = 12$) y mujeres ($n = 8$), de bases de datos de pacientes existentes o por publicidad. En este estudio, se requirió que los sujetos tuvieran una o más de las siguientes condiciones: prehipertensión (presión arterial diastólica de 80-89 mmHg y presión arterial sistólica de 139 mmHg o inferior); prediabetes (glucosa sérica en ayunas de 5,2 a 6,9 mmol/l); TC > 5,18 mmol/l y/o LDL-C > 2,59 mmol/l; índice de masa corporal (IMC) entre 25,0 y 34,9 kg/m²; o circunferencia de cintura 100 cm para hombres y 88 cm para mujeres. Todos los participantes informaron por escrito consentimiento para participar antes de la inscripción en el estudio.

Diseño del estudio y preparación de H 2 agua 2

Los pacientes consumieron 0,9-1,0 l/día de agua pura rica en H 2 durante 10 semanas. Se utilizó un producto con cubierta de plástico (Premium FDR, Friendear, Tokio, Japón) que constaba de magnesio metálico (99,9% puro) y piedras naturales en botellas de agua de polipropileno de 500 ml (NongFu Spring, HangZhou, China) para producir H 2. El producto era capaz de generar H 2 cuando se colocaba en agua potable mediante la siguiente reacción química: $Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$. El H 2 la barra de agua se colocó en la botella de agua sellada durante 12 horas antes de que los pacientes la consumieran. La tapa sellada de la botella protegía el H 2 de escapar, preservando así el H 2 en iones moléculas en el agua. Los pacientes bebieron el agua dentro de los 15 minutos posteriores a la apertura de la tapa sellada, y la concentración de H 2 se mantuvo entre 0,2 y 0,25 mM y el pH entre 7,8 y 8,2 medido con un sensor de H 2 (Unisense, Dinamarca) durante 15 minutos continuos después de abrir la tapa sellada. Se instruyó a los sujetos para que reutilizaran las barras de magnesio transfiriéndolas a una nueva botella de agua después de su uso. En resumen, se esperaba que los sujetos

consumir 450-500 ml de agua rica en H 2 dos veces al día para un consumo mínimo total de 900 ml a un consumo máximo de 1.000 ml. Las muestras de sangre se recogieron al inicio (semana 0) y después de 10 semanas de beber H 2 agua. 2

Ánalisis sérico

Lípidos séricos. Las muestras de sangre se obtuvieron por la mañana después de un ayuno nocturno. Los niveles de glucosa en suero se midieron por el método de glucosa oxidasa. Se midieron TC, HDL-C, LDL-C y triacilgliceroles (TG) séricos mediante métodos enzimáticos en un autoanalizador químico (Hitachi Co, Tokio, Japón). Los perfiles de lipoproteínas se obtuvieron mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando la columna Superose 6 10/300GL (17). En resumen, se aplicaron 100 l de suero en ayunas en una columna Superose 6 y las muestras se eluyeron en una fase móvil nan 3, (NaCl 0,15 M, 0,01 % y EDTA 2 mM, pH 7,5) a razón de 0,3 ml/min en 80 fracciones de 300 l. La composición de lípidos de las fracciones correspondientes a VLDL, LDL y HDL se cuantificó mediante ensayos enzimáticos utilizando kits comercialmente disponibles para TC (E

Medición del estrés oxidativo sérico y la oxidabilidad. Los niveles séricos de malondialdehído (MDA), un marcador de estrés oxidativo, se determinaron mediante una medición espectrofotométrica de sustancias reactivas con ácido bitúrico de tiobar (TBARS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Nanjing Jiancheng Bioquímica, China). La actividad de superóxido dismutasa (SOD), que actúa como antioxidante y protege los componentes celulares de la oxidación por especies reactivas de oxígeno, se midió con un kit comercial (Nanjing Jiancheng Biochemistry, China) según las instrucciones del fabricante. La actividad de la paraoxonasa-1 (PON1), una enzima antioxidante asociada con las HDL, se midió agregando suero a 1 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) que contenía CaCl 1 mM y fenilacetato (Sigma) 1 mM, como se describió anteriormente (18). La velocidad de hidrólisis del acetato de fenilo se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Uvikon 930, Kontron) a 270 nm. La actividad de PON1 se expresó en unidades internacionales (U) por mililitro de suero. Al medir la actividad de PON1 en lipoproteínas, la actividad se expresó en unidades internacionales por gramo de proteína. El contenido de los lípidos oxidados biológicamente activos en el suero, incluidos el ácido 12-hidroxi eicosatetraenoico (12-HETE), el ácido 13-hidroxi octadecadienoico (13-HODE), la prostaglandina (PG) y la 8-iso-prostaglandina F2 (8-iso-PGF2), se determinaron mediante ELISA (Bluegene, Shanghái, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de factores inflamatorios séricos. Las concentraciones séricas de factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina (IL)-6 se determinaron mediante kits ELISA (Bluegene, Shanghái, China) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

transferencias occidentales

Para la medición de la apolipoproteína sérica, se desnaturalizaron 0,2 l de suero a 90 °C durante 10 min y luego se sometieron a análisis de transferencia Western utilizando anticuerpos anti-apoB, anti-apoE y anti-apoAI (Abcam). Las proteínas se visualizaron y cuantificaron usando un método de quimioluminiscencia (Pierce) y el programa de software Cantidad Uno (Bio-Rad).

Medición de las propiedades antioxidantes de HDL

El suero de cada 5-6 pacientes se combinó y las lipoproteínas séricas en ayunas se fraccionaron mediante ultracentrifugación a 40.000 rpm en un Beckman Optima LE-80K en VLDL (densidad inferior a 1,006 g/ml), LDL (densidad = 1,006-1,063 g/ml) y HDL3 (densidad = 1,125-1,21 g/ml) como se describió anteriormente (19). Las fracciones se dializaron en PBS a 4 °C y se incubaron LDL (100 g de proteína/ml) con CuSO recién preparado (10 mol/l) en presencia de

TABLA 1. Características de los pacientes y efectos de beber agua rica en H 2

Característica	Antes de beber agua rica en H 2	Después de beber agua rica en H 2
Número de pacientes	20	
Masculino	12	
Femenino	8	
Años de edad)	55,8 ± 10,6	
PA sistólica media (mmHg)	134 ± 16,6	128,8 ± 16,8
PA diastólica media (mmHg)	82,6 ± 11,5	80,1 ± 11,5
Altura (cm)	164,8 ± 8,5	164,8 ± 8,5
Peso (kg)	74,1 ± 13,4	72,0 ± 10,5
Circunferencia de la cintura (cm)	99,7 ± 8,5	94,6 ± 6,6
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27,3 ± 2,6	26,5 ± 2,1
Glucosa en ayunas (mmol/l)	5,7 ± 0,6	5,8 ± 1,0
consumo de alcohol		
A diario	3	
Semanalmente	3	
Ocasional	14	
El consumo de tabaco		
Sí	10	
No	10	

o ausencia de la HDL aislada (200 g proteína/ml). Después de la incubación a 37 °C durante 2 h, se evaluó el grado de oxidación de LDL midiendo la formación de TBARS (20) mediante un método espectrofotométrico de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Nanjing Jiancheng Bioquímica, China).

Ensayo de adhesión de monocitos de células endoteliales

Los ensayos de adhesión de monocitos se realizaron en condiciones estáticas como se describió previamente (21) con modificaciones menores. Se cultivaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) hasta la confluencia en placas de 24 pocillos y se pretrataron con o sin HDL (100 g de proteína/ml) durante 18 h y se estimularon con TNF- (10 ng/ml) o LDL (100 g de proteína/ml) durante 6 h. Las células THP-1 se marcaron con un colorante fluorescente, éster de acetoximetilo de 2',7'-bis(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína (BCECF-AM), mediante incubación con 10 µmol/l de BCECF-AM a 37 °C durante 1 h en medio RPMI-1640 y se subsecuentemente. luego se lavó con EBM-2. HUVEC confluyentes en placas de 24 pocillos se lavaron tres veces y luego se agregaron células THP-1 marcadas (2 × 10⁵ células por 200 µl) a cada pocillo de HUVEC. Se permitió que las células THP-1 se adhirieran a las HUVEC mediante incubación a 37 °C durante 60 min, y las células THP-1 no unidas se eliminaron mediante lavado (tres veces, 5 min). Las células THP-1 unidas a HUVEC se contaron bajo microscopio fluorescente. El número de leucocitos adherentes se determinó contando cuatro campos por pocillo de campo de alta potencia de 100x usando microscopía fluorescente (Nikon, Japón) y se fotografió. Se contaron cuatro campos de alta potencia elegidos al azar por pocillo. Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado y se repitieron al menos tres veces. La persona que contaba los monocitos adherentes desconocía el tratamiento.

Ensayo de eflujo de colesterol inducido por HDL

Los experimentos de eflujo de colesterol se realizaron como describen Smith et al. (22). Se preparó acetil LDL (AcLDL) según los métodos de Basu et al. (23). Los macrófagos RAW264.7 al 50 % de confluencia se cargaron con colesterol y se marcaron en 1 ml de RGGB (RPMI 1640 suplementado con glucosa 50 mM, glutamina 2 mM y BSA al 0,1 %) que contenía [(100 g de ³H]colesterol (1 Ci/ml) y AcLDL proteína/ml) durante 30 min. Luego, los macrófagos se lavaron dos veces con BSA-PBS al 0,1 % y se equilibraron con RGGB durante 24 h. Al día siguiente, el medio se reemplazó por RGGB que contenía 200 g de proteína/ml de HDL. Después de 12 h de incubación, el cultivo se centrifugó para eliminar los restos celulares y se extrajeron 100 l del medio para la determinación de la radiactividad. Al final del período de persecución, los macrófagos se disolvieron en 0,4 ml

de hidróxido de sodio 0,1 M y se midió la radiactividad por alícuota. El porcentaje de eflujo de colesterol se calculó dividiendo la radiactividad derivada del medio por la suma de la radiactividad en el medio y los macrófagos.

Ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) Se cultivaron HUVEC

hasta la confluencia en placas de 96 pocillos y se pretrataron con o sin HDL (100 g de proteína/ml) durante 18 h y se estimularon con TNF- (15 ng/ml) durante 6 h. Las células tratadas con medio solo sirvieron como grupo de control negativo. Después de retirar el sobrenadante de cada pocillo y lavar dos veces con PBS, se introdujeron 10 l de solución de MTT (5 mg/ml en PBS) y 100 l de medio. Después de la incubación durante otras 4 h, los cristales de formazán resultantes se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (150 l) y la intensidad de absorbancia se midió con un lector de microplacas (Tecan, Suecia) a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado y la viabilidad celular relativa se expresó como un porcentaje relativo a las células de control no tratadas.

Ensayo de oxidación de

LDL LDL se aisló mediante ultracentrifugación del suero. El contenido de MDA de LDL se determinó mediante la medición de TBARS y se expresó como nanomoles por miligramo de proteína.

Para determinar la inflamación mediada por LDL, se añadieron 100 g de proteína/ml de LDL a los macrófagos RAW264.7 cultivados y macrófagos derivados de médula ósea. Después de la incubación durante 24 h, se realizó la cuantificación de las citocinas proinflamatorias secretadas, incluidas IL-6 y TNF- a partir de alícuotas de medio acondicionado por ELISA (Bluegene, Shanghái, China) según las instrucciones del fabricante. mac derivado de la médula ósea

Los rófagos en ratones se obtuvieron como se describió anteriormente (24).

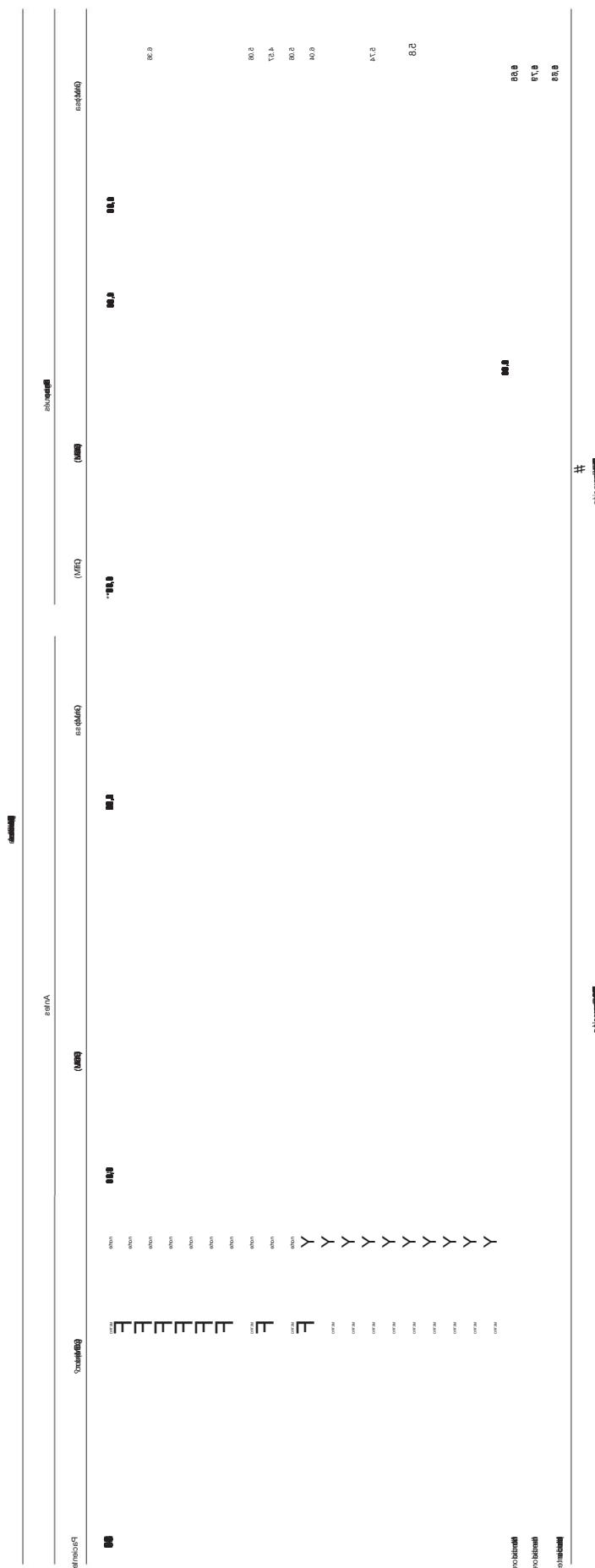
análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA unidireccional (ANOVA) con GraphPad Prism v.4.0. Los resultados se expresan como medias ± DE. P < 0,05 se consideró significativo.

RESULTADOS

Características de los sujetos

Los datos demográficos iniciales de los sujetos se presentan en la Tabla 1. Los sujetos inscritos en el estudio incluyeron aquellos



H₂ disminuye el nivel de LDL-C y mejora la función HDL

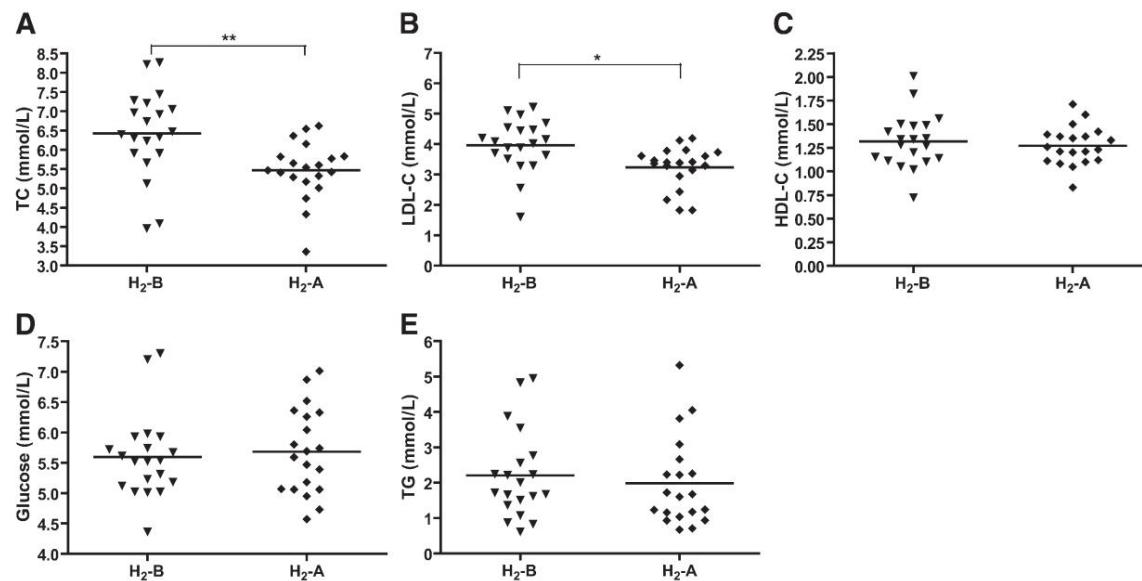


Fig. 1. Efecto del H 2 sobre los niveles de lípidos séricos y glucosa. (A) TC sérico, (B) LDL-C, (C) HDL-C, (D) glucosa y (E) TG en pacientes con síndrome metabólico potencial antes y después de 10 semanas de consumo de H 2 se determinaron por método enzimático. Los datos (medias \pm SD, $n = 20$) se expresaron como mmol por litro. H 2-B, antes de beber agua rica en H 2; H 2-A, después de beber agua rica en H 2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

que tenían CT > 5,18 mmol/l ($n = 17$), LDL-C > 2,59 mmol/l ($n = 18$), IMC 25-34,9 ($n = 17$) y/o fumadores ($n = 10$).

Todos los sujetos mostraron niveles clínicos normales medios de parámetros biométricos basales, química clínica y hematología. Todos los fumadores eran fumadores ocasionales.

Efecto de H 2 sobre perfiles de lipoproteínas séricas y suero niveles de biomarcadores antioxidantes e inflamatorios

Los niveles de lípidos séricos de cada individuo se presentan en la Tabla 2, y la distribución de los niveles de lípidos se muestra en la Fig. 1. Podemos ver que los niveles séricos de TC y LDL-C disminuyeron significativamente después de 10 semanas de tratamiento con H en todos los 20 pacientes con síndrome metabólico potencial.

Entre 20 pacientes, 18 habían disminuido y 1 (paciente 14) había aumentado los niveles de TC y LDL-C, y 1 (paciente 8) no se alteró después del consumo de H 2.

Además, entre los 20 pacientes, 10 eran fumadores y 10 eran no fumadores. Como se muestra en la Tabla 2, los 2 tratados con H 2 tratar niveles séricos de TC y LDL-C disminuyeron no solo en fumadores sino también en no fumadores. Y parece que los efectos hipolipemiantes del H 2 en fumadores fueron mejores que en no fumadores, aunque no hay una diferencia significativa. Los niveles séricos de HDL-C y glucosa no fueron alterados por el consumo de H (Tabla 2 y Fig. 1C, D).

Curiosamente, los niveles séricos de TG se redujeron por H 2 tratado en 10 fumadores, aunque no hay una diferencia significativa (Tabla 2), lo que causó una ligera disminución en los niveles de TG en todos los 20 pacientes (Tabla 2 y Fig. 1E).

Además, el perfil de lipoproteínas séricas por FPLC confirmó aún más la disminución de los niveles séricos de LDL-C en sujetos tratados con H 2 y reveló que el suero VLDL-C y HDL-C permanecieron sin cambios después de la ingesta de H 2 agua (Fig. 2).

Los cambios en los biomarcadores del estado oxidativo e inflamatorio después de 10 semanas de consumo de agua H se muestran en la Fig. 3. Los niveles séricos de MDA, uno de los indicadores de peroxidación lipídica más utilizados, se redujeron.

significativamente (Fig. 3A), y la actividad de SOD, que actúa como antioxidante y protege los componentes celulares de la oxidación por especies reactivas de oxígeno, aumentó después de H 2 consumo de agua (figura 3B). Sin embargo, la actividad de PON1, una enzima antioxidante asociada con HDL, no fue alterada ni en el suero ni en las fracciones de HDL3 por H (Fig. 3C, D). Además, detectamos agua 2 concentraciones séricas de varios lípidos oxidados biológicamente activos, incluidos 12-HETE, 13-HODE, PG y 8-iso-PGF2. Los datos en la Fig. 3E, F muestran que los niveles de 13-HODE y 8-iso-PGF2 mejoraron después del tratamiento con H 2; sin embargo, los niveles de 12-HETE y PG no se vieron alterados por el efecto de la ingestión de agua H sobre los niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, incluidos TNF- α e IL-6 (Fig. 3G, H).

El tratamiento con H disminuye los niveles de proteína apoB y apoE en suero

Las LDL y HDL séricas son partículas compuestas por una variedad de lípidos y componentes proteicos; por lo que es necesario aclarar qué contenido de la lipoproteína podría verse afectado

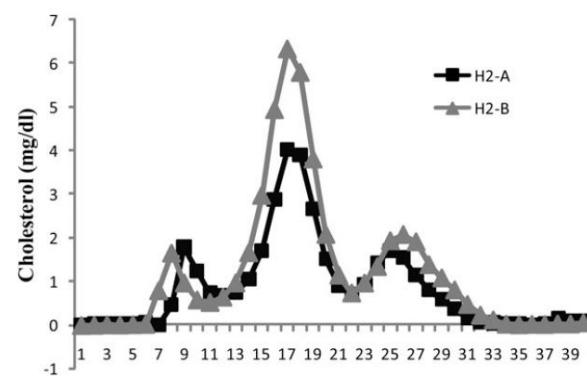


Fig. 2. Perfiles de colesterol de FPLC utilizando muestras de suero agrupadas de $n = 5$ pacientes por grupo que muestran el contenido de colesterol (mg/dl) de las fracciones de lipoproteínas séricas.

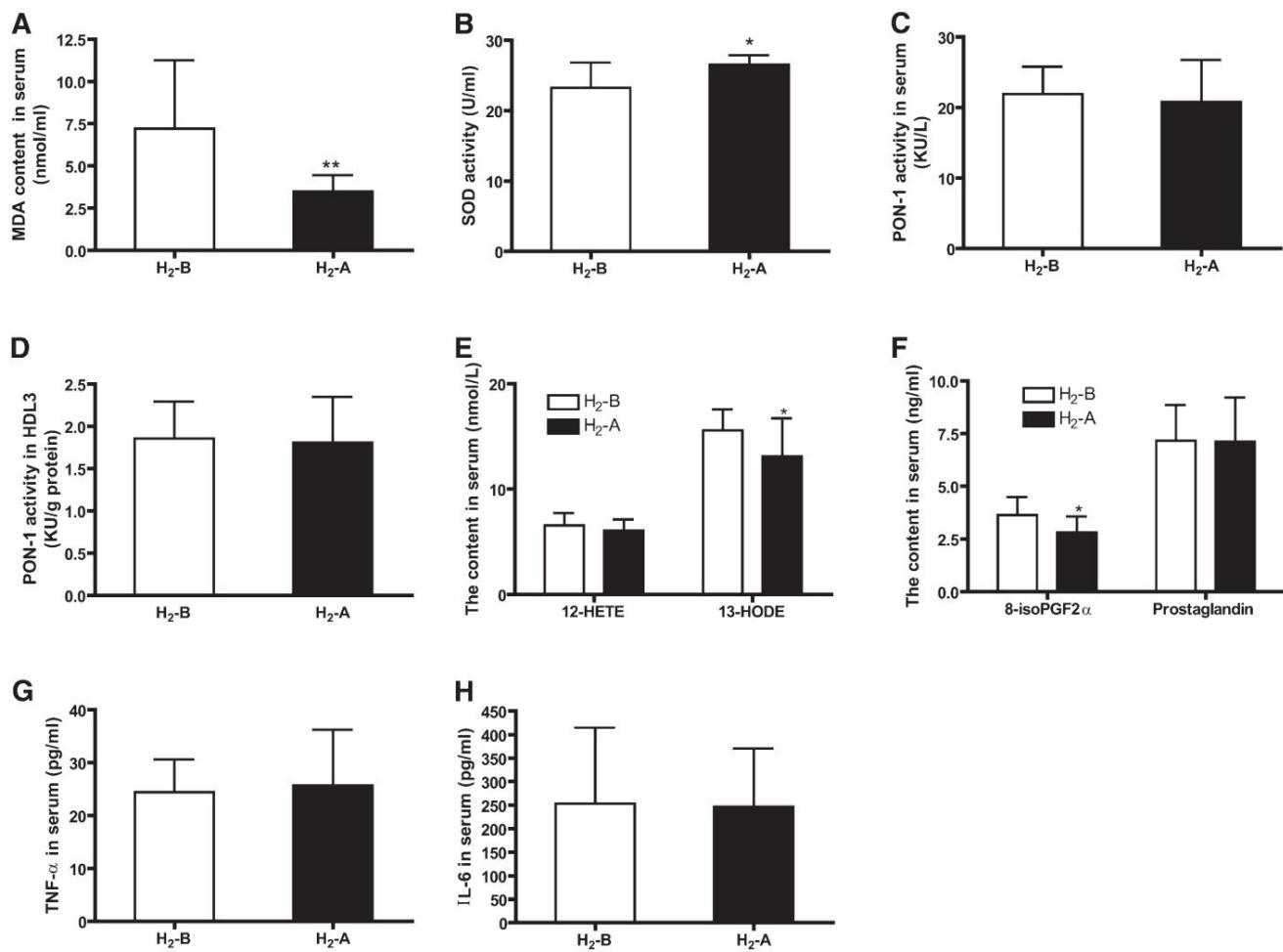


Fig. 3. Efecto del H₂ sobre los niveles séricos de biomarcadores antioxidantes e inflamatorios. (A) Concentraciones séricas de MDA. (B) Actividad de SOD en suero. (C y D) Actividad PON1 en suero y fracción HDL3. (E) Concentraciones séricas de 12-HETE y 13-HODE. (F) Concentraciones séricas de 8-iso-PGF2 α y PG. (G) Concentraciones séricas de TNF-. (H) Concentraciones séricas de IL-6. n = 20, * P < 0,05, ** P < 0,01.

por H₂ tratamiento. De acuerdo con la diferencia observada para LDL-C, apoB100, la proteína principal en LDL, se redujo significativamente por el consumo de agua H en pacientes con síndrome metabólico potencial (Fig. 4). La proteína apoE, que está principalmente presente en las partículas de VLDL y LDL, también disminuyó con el tratamiento de H (Fig. 4). ApoAl, la proteína principal en HDL, no se alteró después del agua ingesta de H₂ (Fig. 4), lo que es consistente con los cambios observados para HDL-C. Estos datos sugirieron que H₂ podría disminuir la expresión de los principales constituyentes proteicos de LDL y VLDL.

H₂ mejora la oxidación y las propiedades funcionales de la partícula de HDL. Se sabe que

la HDL sufre modificaciones drásticas en su estructura y composición bajo las acciones concertadas de la inflamación y el estrés oxidativo (14, 15). Evidencia reciente indica que H₂ actúa como un gas médico terapéutico en una variedad de modelos de enfermedades al ejercer efectos antioxidantes y antiinflamatorios (3, 25, 26). Por lo tanto, es posible que la administración de H₂ pueda mejorar la calidad funcional de la partícula HDL. Primero, la suplementación con agua H tendía a disminuir el contenido de MDA en HDL3.

(Fig. 5A), lo que sugiere que el H₂ mejora la oxidación de las partículas de HDL.

En segundo lugar, se probó el efecto biológico del H₂ sobre la funcionalidad antioxidante de las HDL, es decir, la protección de las partículas de LDL frente a la oxidación. Como se muestra en la figura. El tratamiento 5B inhibió significativamente la formación de TBARES.

En tercer lugar, se probó el efecto del H₂ sobre las propiedades antiinflamatorias de las HDL, incluida la protección de la adhesión de monocitos inducida por citocinas a las células endoteliales y la estimulación de la producción de óxido nítrico endotelial, que se ha sugerido como un importante efecto ateroprotector del endotelio de las HDL. Como se muestra en la Fig. 5C, después de la incubación de HUVEC durante 6 h con TNF-, la adhesión de monocitos a HUVEC aumentó significativamente, y la preincubación de HUVEC con HDL3 aislado de pacientes después de 10 semanas de beber agua H (HDL-H 2-A) redujo notablemente la adhesión de monocitos a HUVEC inducida por TNF en comparación con las de HDL3 aisladas al inicio (semana 0) (HDL-H 2-B). Estos datos sugieren que el agua H₂ mejoró la función antiinflamatoria de las HDL. También determinamos los efectos de HDL H 2-A en comparación con HDL-H 2-B en la producción de óxido nítrico endotelial. Desafortunadamente, la producción de óxido nítrico

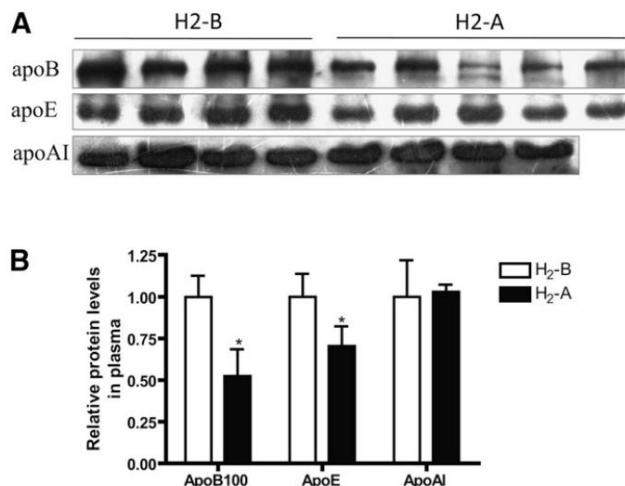


Fig. 4. Efecto de H2 sobre los niveles séricos de las proteínas apoB, apoE y apoAI. (A) Efecto de H2 sobre los niveles de proteína sérica de apoB, apoE y apoAI mediante transferencias Western. (B) Cuantificación densitométrica de datos de Western blot ($n = 4-5$) por el software Cantidad Uno. * $P < 0,05$.

no se modificó significativamente después de la ingesta de agua (datos de H (no se muestra), lo que podría atribuirse a la sensibilidad del método de Griess).

En cuarto lugar, se probó la capacidad de las partículas de HDL aisladas para provocar la salida de macrófagos cargados de colesterol. Como se muestra en la Fig. 5D, las partículas de HDL aisladas del suero después del tratamiento con H exhibieron propiedades de salida 2 dramáticamente más altas en comparación con las partículas de HDL aisladas del suero antes del tratamiento con H 2 , lo que indica que la capacidad de salida del colesterol mediada por partículas de HDL aumentó por 2.

H. Finalmente, se determinó el efecto biológico de H 2 en la funcionalidad antiapoptótica de HDL. Como se muestra en la Fig. 5E, el tratamiento con H inhibió significativamente la apoptosis de células endoteliales inducida por TNF. Estos datos indican que las funciones de HDL lesionadas por dislipemia, incluida la capacidad de proteger contra la oxidación de LDL, la capacidad de inhibir la adhesión de monocitos inducida por citocinas a las células endoteliales, la capacidad de estimular la salida de colesterol de las células espumosas de los macrófagos y la capacidad de proteger la apoptosis de las células endoteliales, mejoraron notablemente mediante la administración de agua H en pacientes con síndrome metabólico potencial.

H reduce la oxidación de LDL y la inflamación mediada por LDL 2

La oxidación de LDL juega un papel importante en la aterogénesis y puede influir en el metabolismo de los lípidos. En este estudio, determinamos los efectos del agua H₂ sobre la oxidación de LDL y la inflamación mediada por LDL. Como se muestra en la Fig. 6A, el contenido de MDA de la LDL aislada se redujo por H₂ ment, lo que sugiere 2 tratar que H₂ determina la inflamación. Reduce la oxidación de LDL. A mediada por LDL, se agregaron 100 g de proteína/ml de la LDL aislada a los macrófagos RAW264.7 cultivados y macrófagos derivados de médula ósea durante 24 h. Como se muestra en la Fig. 6B, C, la secreción de TNF- e IL-6 por los macrófagos se redujo por H₂. Probamos los efectos del H₂ sobre la adhesión de monocitos 2 tratamiento. Además, inducida por LDL a las células endoteliales. Como se muestra en la Fig. 6D, el consumo de

El agua H disminuyó significativamente la adhesión de monocitos 2 inducida por LDL a las células endoteliales. Estos datos revelan que H 2 reduce las propiedades inflamatorias mediadas por LDL en cultivo.

DISCUSIÓN

En un estudio previo, encontramos que H₂ tiene efectos benéficos para reducir los lípidos en hámsters dorados sirios alimentados con una dieta rica en (6). Sin embargo, aún se desconoce si H en el H₂ grasas tiene efectos metabolismo de lípidos y lipoproteínas en humanos. El hallazgo clave de nuestro presente estudio es que el nuevo elemento químico antioxidante H₂ parece aliviar el trastorno del metabolismo de los lípidos, incluida la hiperlipidemia y la función defectuosa de las HDL, en pacientes con síndrome metabólico potencial.

Nuestros resultados no fueron consistentes con los de los estudios en humanos en diabetes mellitus tipo 2, ya que mostraron disminuciones significativas en los niveles modificados de LDL-C y ningún efecto sobre el total y el LDL-C (3). La inconsistencia podría atribuirse a la diferencia en las condiciones patológicas, la dosis de administración o el período de intervención. A pesar de esta posibilidad, la discrepancia podría explicarse por el hecho de que la LDL modificada, al igual que la LDL oxidada, existía en gran medida en el modelo de hiperlipidemia, que se utilizó en nuestro estudio.

Se realizó un subanálisis en 20 sujetos y encontramos que los niveles séricos de TC de 17 sujetos con hiperlipidemia ($TC > 5,18 \text{ mmol/l}$) disminuyeron con la ingesta de H durante 10 semanas, y los niveles séricos de TC de los 3 sujetos restantes sin hiperlipidemia ($TC < 5,18 \text{ mmol/l}$) no se modificaron significativamente con el tratamiento con H 2, aunque el nivel de TC de 1 sujeto aumentó ligeramente después del tratamiento (Tabla 2, paciente 14). Los datos nos dieron una pista de que el H 2 podría ejercer un efecto reductor de lípidos en los pacientes con hiperlipidemia pero tener poco efecto en la población sin hiperlipidemia.

Es bien sabido que el nivel alto de colesterol es uno de los factores de riesgo importantes para la aterosclerosis. Por lo tanto, la aclaración del mecanismo por el cual H disminuye el colesterol sérico proporcionará evidencia sólida para su aplicación en la terapia de enfermedades cardiovasculares. Las LDL séricas de H 2 y VLDL son compuestas por una variedad de lípidos y componentes proteicos; por lo tanto, es necesario aclarar qué contenido de la lipoproteína podría verse afectado por H. Primero, el LDL es un factor que contribuye al desarrollo de la aterosclerosis. ApoB100 es la principal proteína presente en las partículas de LDL y, al igual que el LDL-C, el nivel de apoB en suero se ha correlacionado positivamente con el riesgo de enfermedad aterosclerótica. En el presente estudio, encontramos que H no solo disminuyó los niveles séricos de LDL-C, sino que también redujo hábilmente los niveles de proteína apoB100 y apoE en suero.

Los datos nos dieron una pista de que el H 2 podría regular el metabolismo del LDL-C al disminuir la síntesis de apoB o aumentar el catabolismo del LDL-C. En segundo lugar, al igual que el LDL-C, el VLDL-C se considera un tipo de colesterol "malo" porque los niveles elevados se asocian con un mayor riesgo de enfermedad de las arterias coronarias (27).

Encontramos que apoB y apoE, las principales proteínas en VLDL, se redujeron por H 2, aunque el análisis de colesterol por FPLQo reveló cambios de

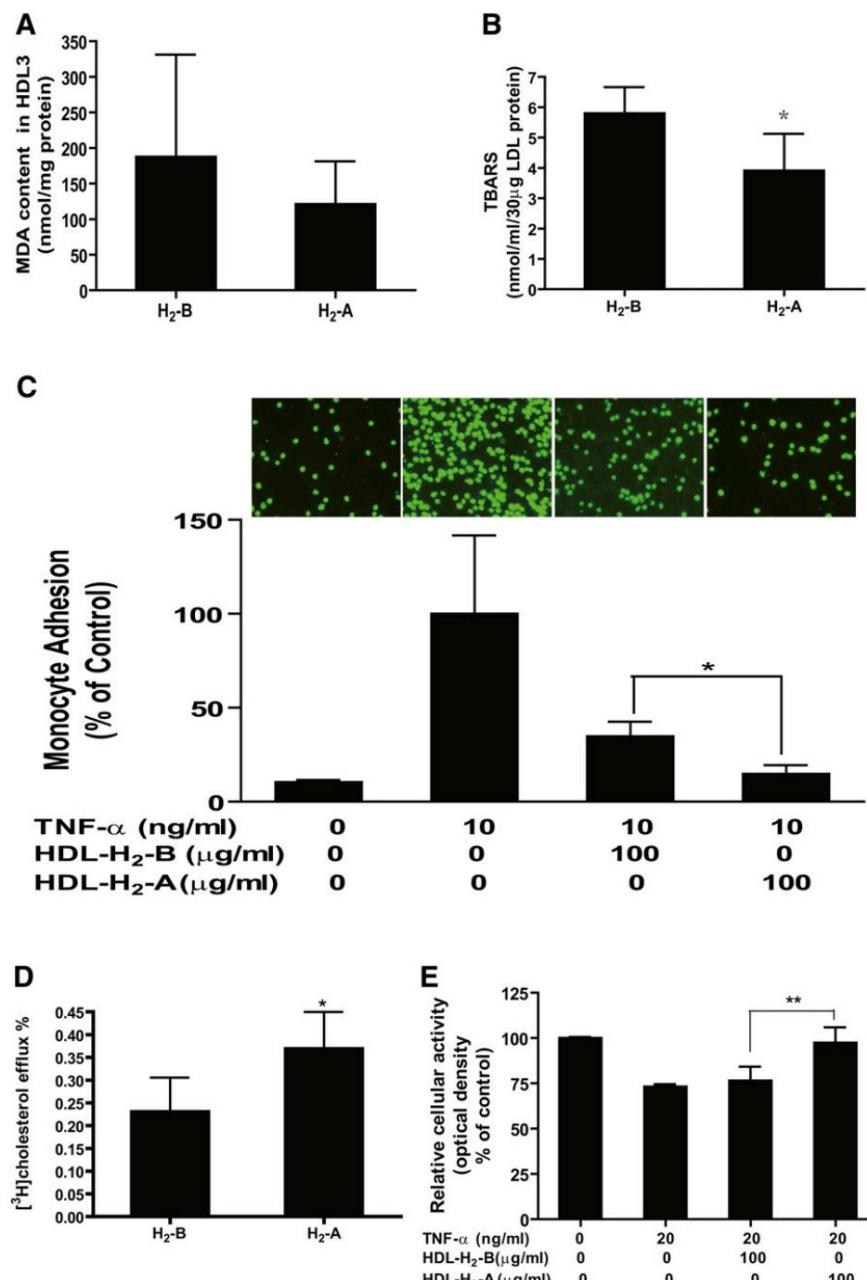


Fig. 5. El H2 parece mejorar la oxidación y las propiedades funcionales de la partícula de HDL. Se combinó el suero de cada 5-6 pacientes y se aisló HDL3 mediante ultracentrifugación del suero. (A) Contenido de MDA en partículas HDL3. La función HDL se determinó como (B) protección de LDL contra la oxidación, (C) inhibición de la adhesión de monocitos THP-1 inducida por TNF a las células endoteliales, (D) estimulación de la salida de colesterol de las células espumosas de macrófagos y (E) protección de las células endoteliales contra la apoptosis inducida por TNF. Los ensayos se realizaron como se detalla en Métodos. n = 3-4 muestras de suero agrupadas. *P < 0,05, **P < 0,01.

VLDL-C después de H₂ tratamiento. Las inconsistencias en los niveles de proteína y colesterol podrían explicarse por la sospecha de que el objetivo funcional de H₂ podría ser la expresión de la apolipoproteína, no el colesterol. En conjunto, los datos indican que el H molecular disuelto en agua podría tener un efecto regulador beneficioso sobre las anomalías lipídicas en pacientes con síndrome metabólico, especialmente en pacientes con hiperlipidemia. Este efecto está parcialmente relacionado con su regulación del contenido de lípidos y proteínas de LDL y VLDL.

Se necesitan más experimentos para identificar los mecanismos por los cuales el H₂ regula el contenido de lípidos y proteínas.

de partículas de lipoproteínas y mejora el perfil de lipoproteínas séricas. Estudios previos han demostrado que la administración de solución salina rica en H₂ mejora la sensibilidad a la insulina (3), lo que, en nuestra opinión, podría contribuir en parte a mejorar el metabolismo de los lípidos en nuestro estudio. Además, las células hepáticas detectan los niveles reducidos de colesterol intracelular hepático y buscan compensar sintetizando receptores de LDL para sacar el colesterol de la circulación (28).

Los estudios futuros sobre la HMG-CoA reductasa hepática y los receptores de LDL pueden dilucidar el mecanismo por el cual H₂ en la regulación de las lipoproteínas.

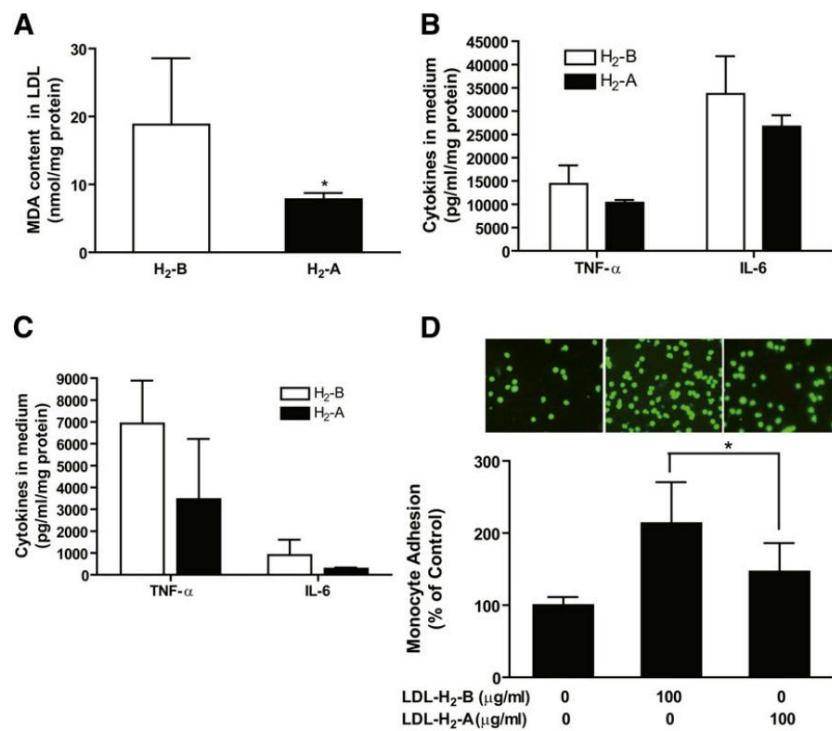


Fig. 6. Se H_2 parece reducir la oxidación de LDL en pacientes y la inflamación mediada por LDL en macrófagos. (A) Combinó el suero H de cada 5-6 pacientes y se aisló la LDL mediante ultracentrifugación del suero. (B) Se añadieron cien microgramos de proteína por mililitro de LDL aislada a macrófagos RAW264.7 cultivados. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 h para la medición de TNF- α e IL-6 mediante ensayo ELISA. (C) Se añadieron cien microgramos de proteína por mililitro de LDL aislada a los macrófagos derivados de la médula ósea cultivada y se midieron las citoquinas en el medio después de 24 h de incubación. (D) Las HUVEC se estimularon con LDL (100 μg de proteína/ml) durante 6 h y se añadieron a las HUVEC células THP-1, marcadas con un colorante fluorescente BCECF-AM. Después de adherirse, las células THP-1 unidas a HUVEC se contaron bajo un microscopio fluorescente como se describe en Métodos. Los resultados se expresan como medias \pm SD ($n = 3-4$ muestras de suero agrupadas). * $P < 0,05$.

Se sabe que el HDL protege contra el desarrollo de la aterosclerosis y está ampliamente documentado como un "factor de riesgo negativo" para las enfermedades coronarias (29). La actividad antiaterogénica de las HDL se atribuye principalmente a una variedad de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas y al transporte inverso del colesterol (30). En el presente estudio, encontramos que el tratamiento con H parece mejorar la funcionalidad de HDL3 sin alterar los niveles séricos de HDL-C. Se sabe que los efectos benéficos del H H_2 en diferentes modelos de enfermedades dependen principalmente de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas (16).

Por lo tanto, es posible que el efecto protector de H H_2 sobre la función de HDL en nuestro estudio sea atribuible, al menos en parte, a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de HA. Se están desarrollando varias estrategias terapéuticas para apuntar a HDL-C en un intento de inhibir la progresión o inducir la regresión de la aterosclerosis y reducir los eventos cardiovasculares. Por lo tanto, el efecto protector de H H_2 sobre la función de HDL en nuestro estudio podría proporcionar una evidencia adicional para la aplicación de H H_2 en la terapia de enfermedades vasculares. No observamos ningún efecto secundario no deseado de H H_2 , incluidos dolor de cabeza, diarrea y vómitos (datos no mostrados), lo que sugiere menos efectos tóxicos y adversos de H H_2 .

La oxidación de LDL juega un papel importante en la aterogénesis y puede influir en el metabolismo de los lípidos. Nuestros datos

revelan que H H_2 parece reducir la oxidación de LDL y la inflamación mediada por LDL, y respalda aún más nuestra predicción de que H H_2 podría mejorar el metabolismo de los lípidos en pacientes con hiperlipidemia al inhibir la inflamación mediada por LDL. Estudios previos han demostrado que la administración de ratones H (5); en nuestra opinión, esto H_2 reduce la aterogénesis en apoE

podría contribuir en parte a los efectos protectores observados del H H_2 sobre la oxidación de LDL y la inflamación mediada por LDL en nuestro estudio.

De hecho, nuestros datos nos dan una pista de que el H H_2 podría tener el potencial de ser utilizado como un nuevo agente regulador de lípidos con la ventaja de no ser tóxico en comparación con otros fármacos reguladores de lípidos de uso común que tienen efectos secundarios en el hígado y los riñones. Se requiere una mayor comprensión de los mecanismos subyacentes a las vías de señalización implicadas en la capacidad del H para influir en el metabolismo de los lípidos y las células para aprovechar al máximo la ingesta de gas H H_2 como estrategia terapéutica.

Existen varias limitaciones en el presente estudio. Primero, el número de sujetos reclutados es pequeño y es difícil sacar una conclusión sólida, particularmente teniendo fumadores entre los sujetos. Sin embargo, se debe enfatizar que analizamos los datos en fumadores y no fumadores por separado, y la respuesta a H en los fumadores parece ser más fuerte que en los no fumadores, pero la diferencia no

no alcanza significación estadística. Sería útil aumentar el tamaño de la muestra y examinar la reacción al H2 en fumadores debido a la propiedad antioxidante del H2. La limitación del estudio fue que no fue 2. Otro un ensayo controlado, aleatorizado, doble ciego, que comparara agua rica en H2 con placebo y comparara los criterios de valoración experimentales de sujetos con síndrome metabólico tratados con H2 con los medidos en 2-individuos sanos no tratados. Es posible que durante las 10 semanas del estudio, los sujetos alteraran sus estilos de vida, lo que podría haber afectado los parámetros estudiados.

Por lo tanto, es difícil para nosotros sacar una conclusión sólida, y limita las conclusiones a afirmar que los H parecen regular el 2 tratamiento metabolismo de los lípidos en los pacientes.

En resumen, nuestros datos muestran que la administración de agua in de H2 vivo parece disminuir los niveles séricos de TC y LDL-C. y mejorar las funciones de HDL en pacientes con síndrome metabólico potencial, lo que sugiere que H2 puede usarse como un agente farmacológico más nuevo para tratar o controlar el trastorno del metabolismo de los lípidos. 

REFERENCIAS

- Ohsawa, I., M.Ishikawa, k takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. Katsura El, Y. Katayama, S. Asoh, y S. Ohta. 2007 hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos. *Nat. Medicina.* 13: 688 – 694 .
- Amitani H., A. Asakawa K. Cheng, M. Amitani Nakano, K. Kaimoto, Y. Li M. T, M. Ueda, K. , , , et al. 2013 . El hidrógeno mejora el control glucémico en un modelo animal con diabetes tipo 1 al promover la absorción de glucosa en el músculo esquelético. *Más uno.* 8: e53913 .
- Kajiyama, G. Hasegawa, M. Asano H. Hosoda N., M. fukui, Nakamura, J. Kitawaki S. Imai La, k nakano, m.ohta, et al. 2008 . suplementación con agua rica en hidrógeno mejora el metabolismo de los lípidos y la glucosa en pacientes con diabetes tipo 2 o intolerancia a la glucosa. *Nutrición Res.* 28: 137 – 143 .
- Gharib, B., s.hanna, OM Abdallah, H. Lepidi, B. Gardette, Y. M. De Reggi. 2001 . Propiedades antiinflamatorias del hidrógeno molecular: investigación sobre la inflamación del hígado inducida por parásitos. *Academia ciencia tercero* 324: 719 – 724 .
- canción, g., h tian, S. Qin, X. Sol, S. Yao, C. Zong, Y. Luo J. Liu, Y. Yu H. Sang, et al. 2012 . El hidrógeno disminuye la aterosusceptibilidad en lipoproteínas que contienen apolipoproteína B y la aorta de ratones knockout para apolipoproteína E. *Aterosclerosis.* 221: 55 – 65 .
- Zong, C., G. Song, S. Yao Y. Yu-Li. Feng, S. Guo y S. Qin. 2012 . La, t luo, administración de solución salina saturada de hidrógeno disminuye los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad en plasma y mejora la función de las lipoproteínas de alta densidad en hámsters alimentados con una dieta rica en grasas. *Metabolismo.* 61: 794 – 800 .
- Furukawa M. Shimabukuro M. Makishima, M.Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O.Nakayama, M. Matsuda, y yo. Shimomura. 2004 . Aumento del estrés oxidativo en la obesidad y su impacto en el síndrome metabólico. *J. Clin. Invertir.* 114: 1752 – 1761 .
- Holvoet, , pag, dh lee, M. Steffes, M. bruto, y DR Jacobs, Jr. 2008 . Asociación entre la lipoproteína de baja densidad oxidada circulante y la incidencia del síndrome metabólico. *JAMA.* 299: 2287 – 2293 .
- Ford E\$, WH Giles, y WH Dietz. 2002 . Prevalencia del síndrome metabólico entre adultos estadounidenses: resultados de la tercera Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *JAMA.* 287: 356 – 359 .
- Grundy, SM, HB Brewer, Jr., JI Cleeman, SC Smith, Jr. y C. Lenfant. 2004 . Definición de síndrome metabólico: Informe de la conferencia del Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre/Asociación Estadounidense del Corazón sobre cuestiones científicas relacionadas con la definición. *Circulación.* 109: 433 – 438 .
- 11 Cifuentes-Goches, JC D. Gómez-López Jde, L. Hernández Anchevta, SE Flores-Fuentes, JL Inchaustegui-Arias, and AO Cañas-Urbina. 2012 . Hipertrigliceridemia y colesterol HDL bajo como factores de alto impacto para el diagnóstico del síndrome metabólico en adultos aparentemente sanos. *Rev.Med. Inst. mex. Seguro Soc.* 50: 301 – 306 .
- 12 Van Lenten BJ, AM Fogelman AJ, D. Shih, Luisis. 2001 . El papel de las lipoproteínas de alta densidad en la oxidación y la inflamación. *Tendencias Cardiovascular. Medicina.* 11: 155 – 161 .
- 13 Tamada, METRO, S. Makita, A. Abiko, Y. Naganuma, M. Nagai y M. Nakamura. 2010 . Relación entre el colesterol de lipoproteínas de baja densidad y el colesterol de lipoproteínas de alta densidad como marcador útil para la aterosclerosis carotídea en etapa temprana. *Metabolismo.* 59: 653 – 657 .
- 14 Klinovidhunkit RA Memon, JK Shigenaga, AH Moser, y G. Grunfeld. 2004 . Efectos de la infección y la inflamación sobre el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas: mecanismos y consecuencias para el huésped. *J. Lipid Res.* 45: 1169 – 1196 .
- 15 Esteve, MI, W. Ricart, y JM Fernández-Real. 2005 Dislipidemia e inflamación: un mecanismo evolutivo conservado. *clin. Nutrición* 24: 16 – 31 .
- 16 diecisési. suzuki, y, M. Sano K. Hayashida, S. Ohta, y ohsawa, Fukuda. 2009 . ¿Los efectos de los inhibidores de la alfa-glucosidasa sobre los eventos cardiovasculares están relacionados con niveles elevados de gas hidrógeno en el tracto gastrointestinal? *FEBS Lett.* 583: 2157 – 2159 .
- 17 Jiang , XC , L. Masucci-Magoulas, J. Mar A. Walsh, , , Breslow y A. Tali. 1993 . Regulación a la baja del ARNm para el receptor de lipoproteínas de baja densidad en ratones transgénicos que contienen el gen de la proteína de transferencia de éster de colesterol humano. Mecanismo para explicar la acumulación de partículas de lipoproteína B. *J. Biol. química* 268: 27406 – 27412 .
- 18 Itahara , t , T.Suehiro , Y.Ikeda , M. Inoue , T. Nakamura , y, kumon , M. Kawada , y K. Hashimoto. 2000 . Actividades de paraoxonasa sérica y arilesterasa en pacientes en hemodiálisis. *J. Aterosclero. trombo.* 7: 152 – 158 .
- 19 Jiang , XC , C. Bruce J. Mar , m.lin , Y. Ji, OL Francone , y a R. alto. 1999 La mutación dirigida del gen de la proteína de transferencia de fosfolípidos plasmáticos reduce notablemente los niveles de lipoproteínas de alta densidad. *J. Clin. Invertir.* 103: 907 – 914 .
- 20 Rikitake , y , K. Hirata , San Kawashima, H. Akita , y M. Yokoyama. 1998 Efecto inhibidor de la óxido nítrico sintasa de tipo inducible sobre la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad por las células del músculo liso vascular. *Aterosclerosis.* 136: 51 – 57 .
- 21 . McCrohon , JA , W. Jessup, DJ Handelsman , y DS Celermajer. 1999 La exposición a andrógenos aumenta la adhesión de monocitos humanos al endotelio vascular y la expresión de células endoteliales de la molécula de adhesión de células vasculares-1. *Circulación.* 99: 2317 – 2322 .
- 22 . Smith J.D. , M. Miyata, M. Ginsberg, C. Grigaux, E. Shmookler AS , y Plump. 1996 El AMP cíclico induce la actividad de unión de la apolipoproteína E y promueve la salida de colesterol de una línea celular de macrófagos a los aceptores de apolipoproteína. *J. Biol. química* 271: 30647 – 30655 .
- 23 . basu, SK , MS Marrón , yk-ho , rj havel , y JL Goldstein. 1981 . Los macrófagos de ratón sintetizan y secretan una proteína parecida a la apolipoproteína E. *Proc. nacional Academia ciencia EE.UU.* 78: 7545 – 7549 .
- 24 . Mori Y, Sañadahira , S. Kawasaki, T. Hayashi y M. Awai. 1990 Heterogeneidad de macrófagos en cultivo de médula ósea in vitro. *J. ciencia celular.* 95: 481 – 485 .
- 25 . Ohsawa K, Nishimaki , K. Yamagata y S. Morikawa , 2008 . El consumo de agua hidrogenada previene la aterosclerosis en ratones knockout para apolipoproteína E. *Bioquímica Biografía. Res. común* 377: 1195 – 1198 .
- 26 . Kolovou G. , K. Anagnostopoulou, dp mikhailidis y dv , Cokkinos. 2008 . Modelos knockout de apolipoproteína E. *actual Farmacia Des.* 14: 338 – 351 .
- 27 . geuriano , k , JB Pinson , y CW Weart. 1992 . el triglicérido conexión en la aterosclerosis. *Ana. Farmacéutico.* 26: 1109 – 1117 . y
- 28 . Mamá, PT , G.Gil , TC Südhoff , DW Bilheimer, JL Goldstein , MS Marrón. 1986 . La mevinolina, un inhibidor de la síntesis de colesterol, induce el ARNm del receptor de lipoproteínas de baja densidad en hígados de hámsters y conejos. *proc. nacional Academia ciencia EE.UU.* 83: 8370 – 8374 .
- 29 . gordon , t , WP Castelli , MC Hjortland, WB Kannel , y T. R. Dawber. 1977 La lipoproteína de alta densidad como factor protector frente a la enfermedad coronaria. El estudio de Framingham. *Soy. J.Med.* 62: 707 – 714 .
- 30 . Kontush , A. , y MJ Chapman. 2006 . Lipoproteína de alta densidad funcionalmente defectuosa: un nuevo objetivo terapéutico en la encrucijada de la dislipidemia, la inflamación y la aterosclerosis. *Farmacol. Rdo.* 58: 342 – 374 .