

Efecto de los niveles de HDL-colesterol sobre el comportamiento del óxido nítrico y malondialdehído circulantes

Effects of HDL-cholesterol levels on circulating nitric oxide and malondialdehyde behaviour

Medina Mayerlim, Cano Raquel, Prado Andreina, Linares Sergia, Peñaranda Lianny, Parra María Graciela, Cano Clímaco. Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez". La Universidad del Zulia. Facultad de Medicina. Maracaibo-Estado Zulia. climacoc@hotmail.com

Recibido: 11/05/2012

Aceptado: 14/07/2012

Resumen Abstract

Las HDL tienen propiedades antioxidantes, ya que a nivel endotelial son capaces de prevenir o disminuir la peroxidación lipídica de las LDL, a través de las enzimas paraoxonasa 1, LCAT y CETP. Las HDL tienen actividad antioxidante a nivel de endotelio vascular sobre las LDL oxidadas (LDL-ox) promoviendo la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), por lo que individuos con niveles de HDL-colesterol disminuidos deben sintetizar menos óxido nítrico (NO), por lo tanto menos acción antioxidante y más producción de malondialdehído (MDA) como indicador de mayor peroxidación lipídica. Al desarrollo del presente estudio fueron incorporados 200 pacientes de ambos géneros, con edades comprendidas entre 20 y 65 años, que asistieron a la consulta metabólica del CIEM, a los cuales se les realizó historia clínica y manifestaron por escrito su consentimiento a participar voluntariamente en el mismo. Previo ayuno de 12 horas, a los pacientes se les tomó una muestra de sangre venosa, para determinar las concentraciones plasmáticas de NO y MDA como marcadores de antioxidación, así como glicemia, colesterol total, HDL-c, LDL-c, VLDL-c y triacilglicéridos como indicadores metabólicos. El nivel de HDL-c de los pacientes que intervinieron en el estudio, fue clasificado como disminuido, normal o elevado, para luego determinar el % de los mismos en cada una de las nueve categorías relacionadas con el comportamiento de las concentraciones de NO y MDA circulantes. Contrario a lo esperado en los pacientes con HDL-c disminuido sufrieron menor peroxidación lipídica, ya que presentaron una relación NO/MDA significativamente superior a la observada en los individuos con HDL-c normal y HDL-c elevado. En conclusión los efectos antioxidantes de las HDL observados in vitro, no fueron reproducidos en la población estudiada por la presente investigación.

HDLs have antioxidant properties since at the endothelium they are able to prevent or diminish LDL lipidic peroxidation through enzymes such as paraoxonase 1, LCAT, and CEPT. HDLs show antioxidant activity over oxidated LDL (LDL-ox) at vascular endothelium promoting endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity, which is why individuals with diminished HDL-c levels must synthesize less NO, thus less antioxidant action and more malondialdehyde (MDA) as an indicator of more lipid peroxidation. At the development of this study, 200 patients of both genders, with ages among 20 and 65 years, that assisted to the metabolic consultation of the CIEM were included. A clinical history was gathered and a written consent expressing to participate voluntarily in the study was filled out by participants. After a 12 hour fasting period, a venous blood sample was drawn from patients to determine serum concentrations of NO and MDA as antioxidant markers. Glycemia, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol and triacylglycerides were determined as metabolic indicators. HDL-c level of patients that intervened in the study was classified as diminished, normal or elevated, to determine afterwards the % of it in each of the nine categories related to the behavior of circulating concentrations of NO and MDA. Opposite to what was expected, patients with diminished HDL-c suffered less lipidic peroxidation since they presented a significantly superior NO/MDA relation to that observed in individuals with normal HDL-c or elevated HDL-c. It can be concluded that HDL antioxidant effects observed in vitro, were not reproducible in the studied population by the present research.

Keywords: HDL-cholesterol, MDA, NO, oxidation, anti-oxidation

Introducción

Diferentes estudios han reportado que bajas concentraciones séricas de HDL-colesterol (HDL-c) están relacionados con una alta incidencia de enfermedad arterial coronaria^{1,2}. La concentración de HDL-c puede ser afectada por numerosos factores como son el género³, hábito tabáquico en una relación dosis dependiente⁴, ejercicio aeróbico⁶, obesidad abdominal^{7,8}, presencia de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico⁹.

Las HDL son un grupo heterogéneo de lipoproteínas que difieren en su tamaño, forma, constituyentes lipídicos y apoprotéicos, migración electroforética y funciones biológicas; tienen origen intestinal, hepático y plasmático, y son consideradas como un subproducto del metabolismo de las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (VLDL y quilomicrones)².

Las HDL tienen propiedades antioxidantes ya que en el endotelio son capaces de prevenir o disminuir la peroxidación lipídica de las LDL, a través de las enzimas paraoxonasa 1, LCAT y CETP. Las LDL oxidadas (LDL-ox) inhiben la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), rompiendo así el balance óxido nítrico (NO)/endotelina, predominando las acciones de la endotelina como son la vasoconstricción y la proliferación de células de músculo liso en el espacio subendotelial, sobre las acciones vasodilatadoras y antiproliferativas ejercidas por el NO, que junto a la ingestión descontrolada de las LDL-ox por los macrófagos, a través de sus receptores scavenger para formar la estría, favorecen la formación de la placa aterosclerótica¹⁰.

La acción oxidante de las LDL es realizada por varios mecanismos entre los cuales cabe mencionar los radicales libres de oxígeno (RLO) como el superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el hidroxilo ($\bullet OH$) producidos por fenómenos como la autooxidación de la glucosa y la reacción de Fenton sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) respectivamente, así como por los macrófagos. Aunque la antigenicidad de las LDL-ox es en respuesta a cambios conformacionales por la oxidación de la apo B100, los lípidos, en especial los ácidos grasos insaturados transportados por las LDL nativas, son también peroxidados por los RLO, generando malondialdehído (MDA) por acortamiento de sus cadenas hidrocarbonadas. Tanto el NO como el MDA pueden ser medidos en suero o plasma sanguíneo como nitritos y como derivados del ácido tiobarbitúrico respectivamente, mediante técnicas espectrofotométricas^{11,12}.

Los sistemas antioxidantes constituyen el balance bioquímico de los mecanismos de oxidación, una excesiva producción de radicales libres o una falta en los mismos mecanismos de antioxidación puede romper el balance oxidación/antioxidación y desencadenar cambios mole-

culares profundos que comprometan los mecanismos de control de la expresión genética de las células.

Las dislipidemias más frecuentes entre nuestra población son las hipertriacilgliceridemias y niveles bajos de HDL-colesterol, lo que incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular, ya que por cada 1mg que disminuye el HDL-colesterol el riesgo de enfermedad cardiovascular se incrementa hasta en un 3%⁵. El propósito del presente estudio fue determinar la relación entre los niveles de HDL-colesterol circulante y los indicadores del balance oxidación/antioxidación: NO como marcador de antioxidación y de MDA como marcador de peroxidación lipídica.

Pacientes y métodos

Fueron estudiados 200 pacientes de ambos géneros, con edades comprendidas entre 20 y 65 años, que asistieron a la consulta metabólica del Centro de Investigaciones Endocrino – Metabólicas “Dr. Félix Gómez” de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, durante los meses de Julio a Diciembre de 2010, a quienes luego de manifestar por escrito su consentimiento de participar en el estudio, se les realizó una historia clínica. Posterior a un ayuno de 12 horas, se les tomó una muestra de sangre venosa, para determinar las concentraciones séricas de NO y MDA como marcadores de antioxidación, así como glicemia, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol y triacilglicéridos. Fueron excluidos 46 individuos fumadores, o sometidos al uso de antioxidantes, fibratos, estatinas, diuréticos tipo tiazidas, derivados del ácido retinoico al menos 30 días antes de incorporarse al estudio. También fueron excluidos aquellos que habían sido tratados con nitritos o medicamentos que promueven su síntesis.

La determinación del malondialdehído se efectuó mediante la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico¹¹. El óxido nítrico se determinó mediante nitritos utilizando el ensayo de diazotización (reacción de Greiss), previa reducción de los nitratos¹². Las concentraciones séricas de glucosa, triacilglicéridos, colesterol total y colesterol de HDL-c se realizó mediante métodos comerciales colorimétricos (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH). Este protocolo cumplió con las pautas señaladas en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de bioética del CIEM de La Universidad del Zulia en Maracaibo (Venezuela).

Patrones de comportamiento de las concentraciones plasmáticas de MDA y NO.

El nivel de HDL colesterol de los pacientes que intervinieron en el estudio, fue clasificado como bajo, normal o elevado, de acuerdo a los criterios de la ATP III¹³ los que fueron cotejados con las siguientes categorías relaciona-

das con el comportamiento de las concentraciones de NO y MDA circulantes y determinar el % de individuos con HDL-c disminuida y HDL-c elevada que cae en cada una de las siguientes nueve categorías:

1. NO normal/MDA normal
2. NO normal / MDA disminuido
3. NO normal / MDA elevado
4. NO disminuido/ MDA normal
5. NO disminuido / MDA disminuido
6. NO disminuido / MDA elevado
7. NO elevado / MDA normal
8. NO elevado / MDA disminuido
9. NO elevado /MDA elevado

Los valores de NO y MDA observados en cada uno de los pacientes con cifras de HDL-colesterol bajas o elevadas fueron comparados con el promedio de las observadas en los individuos con niveles de HDL-colesterol normales para determinar el porcentaje obtenido en cada una de las nueve categorías del comportamiento de los valores de NO y MDA.

Análisis estadísticos

El análisis de los resultados fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 para Windows (Chicago IL). Previa verificación de las distribuciones de las variables mediante la prueba de Kolmogorov-Sminor fue aplicado el ANOVA de una vía para evaluar si existían diferencias entre los grupos, mientras que las significancias entre grupos fueron establecidas a través de la Prueba de Tukey usando el mismo Software. También fue aplicada la prueba t de Student para impares. Los resultados fueron expresados como promedio \pm error estándar consideradas significativas las diferencias cuando $p < 0,05$.

Resultados

Niveles de HDL-colesterol

Los valores de HDL-c de la población estudiada, aparecen en gráfico número 1, en el que puede ser observada una diferencia significativa entre los valores de HDL-c estimados como normales ($52,3 \pm 0,8$ mg/dl), con los considerados como HDL-c disminuido ($34,0 \pm 0,9$ mg/dl; $p < 0,00001$), y aquellos considerados como HDLc elevado ($69,2 \pm 1,3$ mg/dl; $p < 0,0001$). La clasificación fue realizada de acuerdo a los criterios de la ATP III¹³.

Parámetros Metabólicos

La glicemia, colesterol total (CT) y sus fracciones, triacilglicéridos, relación CT/HDL-c y relación LDL-c/ HDL-c se observan en la Tabla N° 1.

Comportamiento del NO.

El grupo de pacientes con cifras de HDL-c disminuidas registró valores de NO ($47,9 \pm 2,7$ μ M), significativa-

mente superiores ($p < 0,02$), a los observados en el grupo de individuos con cifras normales de HDL-c ($37,1 \pm 2,1$ μ M). Mientras que los niveles de NO ($40,6 \pm 2,4$ μ M) del grupo de pacientes con cifras elevadas de HDL-c no fueron significativamente diferentes de los observadas en aquellos individuos con cifras normales de HDL-c ($37,1 \pm 2,1$ μ M). Ver gráfico N° 2.

Comportamiento del MDA.

El grupo de pacientes con cifras de HDL-c disminuidas, presentó niveles de MDA ($1,4 \pm 0,1$ μ M), significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los observados en el grupo de individuos con valores normales de HDL-c ($1,9 \pm 0,2$ μ M). Mientras que en los pacientes con niveles elevados de HDL-c la concentración de MDA ($2,1 \pm 0,2$ μ M) no fueron significativamente diferentes de los niveles de MDA ($1,9 \pm 0,2$ μ M) de individuos con cifras normales de HDL-c. Ver gráfico N° 3.

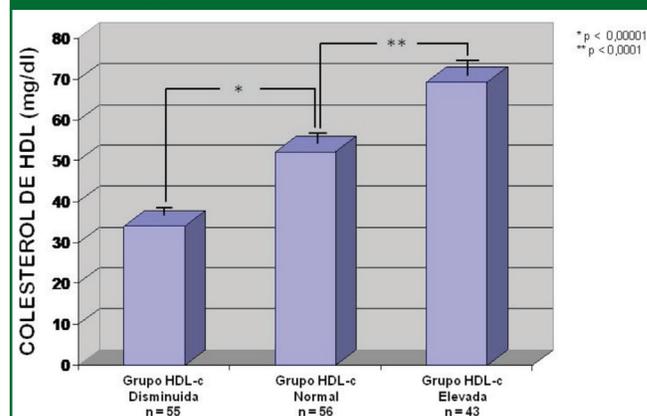
Comportamiento de la relación NO/MDA.

Los pacientes con cifras disminuidas de HDL-c presentaron una relación NO/MDA ($40,0 \pm 3,6$) significativamente superior a la observada en individuos con HDL-c normal ($29,9 \pm 3,3$; $p < 0,03$). La relación NO/MDA no fue significativamente diferente al comparar la observada en pacientes con HDL-c elevado ($24,0 \pm 2,5$) con el grupo de individuos con cifras normales de HDL-c ($29,9 \pm 3,3$). Fue observada diferencia significativa al comparar la relación NO/MDA de pacientes con HDL-c disminuido y aquellos con HDL-c elevada ($p < 0,003$). Ver gráfico N° 4.

Porcentaje de distribución de la población estudiada.

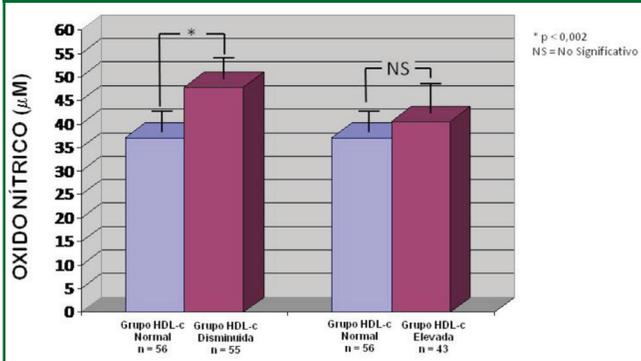
En la tabla N° 2, puede ser observado el porcentaje de individuos de la población estudiada ubicados en las diversas categorías en que fue clasificado el comportamiento de los niveles de NO y MDA de pacientes con cifras disminuidas o elevadas de HDLc con relación a los observados en el grupo de individuos con valores normales de HDL-c.

Gráfico N° 1. Clasificación de la población estudiada según los niveles de HDL-c.



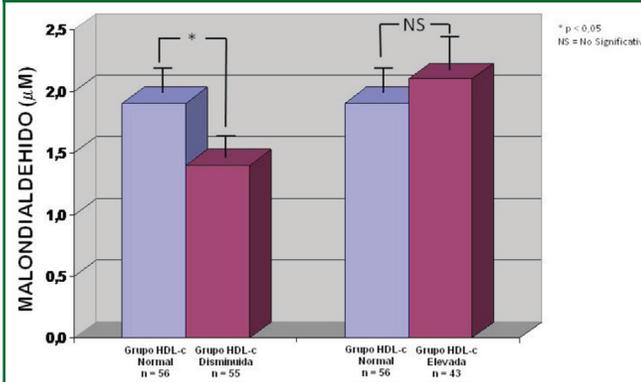
En el eje horizontal aparecen los tres subgrupos en que fueron clasificadas las HDL-c: HDL-c disminuida, HDL-c normal y HDL-c elevada. En el eje vertical aparecen los valores de Colesterol transportado por las HDL en mg/dl. *Indica diferencia significativa ($p < 0,00001$) entre niveles de HDL-c disminuidos y HDL-c normales. **Indica diferencia significativa entre valores de HDL-c elevados y HDLc normales ($p < 0,0001$).

Gráfico Nº 2. Efecto de la concentración de HDL-c sobre los niveles de séricos de NO.



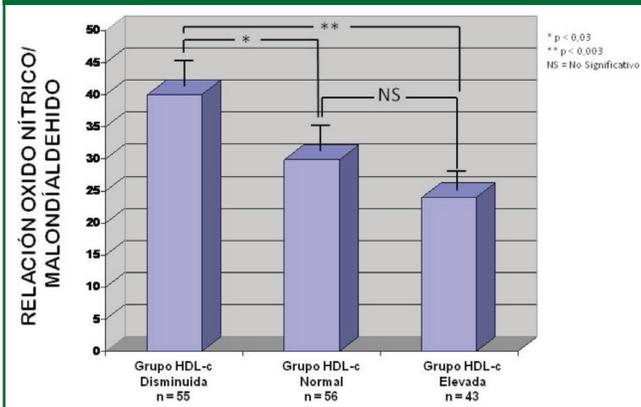
En el eje horizontal aparecen los tres subgrupos en que fueron clasificadas las HDLc: HDL-c disminuidas, HDL-c normal y HDL-c elevadas. En el eje vertical aparecen los niveles séricos de NO expresados como nitritos totales en µM. *indica diferencia significativa, (p < 0,002). NS diferencia no significativa.

Gráfico Nº 3. Efecto de la concentración de HDL-c sobre los niveles séricos de MDA.



En el eje horizontal aparecen los tres subgrupos en que fueron clasificadas las HDLc: HDL-c disminuidas, HDL-c normal y HDL-c elevadas. En el eje vertical aparecen los niveles séricos de MDA expresados en µM. *indica diferencia significativa (p < 0,05), con respecto al valor de HDL-c normal. NS diferencia no significativa.

Gráfico Nº 4. Efecto de la concentración de HDL-c sobre la relación NO/MDA.



En el eje horizontal aparecen los tres subgrupos en que fueron clasificadas las HDLc: HDL-c disminuidas, HDL-c normal y HDL-c elevadas. En el eje vertical aparece la relación NO/MDA. *indica diferencia significativa (p < 0,03). **indica diferencia significativa (p < 0,003).

Tabla Nº1. Parámetros metabólicos de la población estudiada.

Parámetros Metabólicos	Grupo HDL normal	Grupo HDL disminuida	Grupo HDL elevada
Glicemia Basal (mg/dl)	92,2 ± 0,4	106,0 ± 8,3	90,9 ± 2,1
Colesterol Total (mg/dl)	195,4 ± 6,5	184,1 ± 7,4	200,2 ± 6,9
Triacilglicéridos (mg/dl)	117,6 ± 11,7	91,0 ± 6,8	128,5 ± 10,8
HDL-c (mg/dl)	52,3 ± 0,8	34,0 ± 0,9	69,2 ± 1,3
LDL-c (mg/dl)	119,5 ± 6,2	128,6 ± 6,1	115,8 ± 5,4
VLDL-c (mg/dl)	23,5 ± 2,3	25,7 ± 2,2	18,2 ± 1,4
Relación CT/HDL	3,74 ± 0,14	5,40 ± 0,21	2,91 ± 0,10
Relación LDL/HDL	2,29 ± 0,13	3,70 ± 0,21	1,68 ± 0,08

Tabla Nº 2. Porcentaje de distribución del comportamiento de la concentración de NO y MDA en la población estudiada.

Comportamiento de la concentración de NO y MDA	HDL DISMINUIDA		HDL ELEVADA	
	n	%	n	%
NO NORMAL/MDA NORMAL	0	0	0	0
NO NORMAL/MDA BAJO	6	10,9	1	2,3
NO NORMAL/MDA ELEVADO	1	1,8	2	4,7
NO DISMINUIDO/MDA NORMAL	4	7,3	6	14
NO DISMINUIDO/MDA DISMINUIDO	7	12,7	11	25,5
NO DISMINUIDO/MDA ELEVADO	2	3,6	3	7
NO ELEVADO/MDA NORMAL	3	5,5	5	11,6
NO ELEVADO/MDA DISMINUIDO	28	50,9	7	16,3
NO ELEVADO/MDA ELEVADO	4	7,3	8	18,6
TOTAL	55	100,0	43	100,0

Discusión

El presente estudio indica que no existe relación de causalidad entre los niveles de HDL-colesterol y los indicadores de antioxidación/oxidación NO y MDA.

Si las HDL ejerciesen a través de la paraoxonasa, un efecto antioxidante efectivo a nivel de endotelio, que proteja a la NOS de las acciones inhibitorias de las LDLox, entonces un significativo número de los pacientes con HDL-c disminuido debió caer en la categoría NO bajo y MDA elevado, con respecto a los valores observados en el grupo control de personas con niveles de HDL-c considerados como normales. De igual forma los pacientes con niveles de HDL-c considerados como elevados debieron quedar incluidos de forma mayoritaria en la categoría que presenta valores de NO elevado y MDA bajo, en comparación con los valores de referencia del grupo control con HDL-c normal.

De acuerdo a la tabla Nº 2 solo el 3,6% de los pacientes con HDL-c disminuido presentaron valores de NO me-

nor y MDA mayor al observado en el grupo control con HDL-c normal; mientras que en el grupo de pacientes con HDL-c elevado solo el 16% de los mismos tuvo cifras de NO superiores y MDA inferiores a las observadas en el grupo control con HDL-c normales.

Igualmente, si las HDL ejerciesen de forma efectiva tal efecto antioxidante protector sobre la NOS endotelial, la relación NO/MDA debió ser significativamente inferior en el grupo de pacientes con HDL-c disminuido, en comparación con el grupo de individuos con HDL-c normal, mientras que la relación NO/MDA debió ser significativamente superior en el grupo de pacientes con valores de HDL-c elevado con respecto al mismo grupo control.

De acuerdo al gráfico N°4, en el grupo de pacientes con HDL-c disminuido la relación NO/MDA tuvo un comportamiento totalmente opuesto al esperado ya que la misma en lugar de disminuir se incrementó con respecto al grupo con HDL-c normal, mientras que en los pacientes con HDL-c elevado no se observó diferencia en la relación NO/MDA con respecto al grupo de individuos con HDL-c normal.

Finalmente, de existir un verdadero control antioxidante de las HDL sobre los efectos inhibitorios de LDL-ox sobre la NOS endotelial, entonces los pacientes con valores de HDL-c disminuido debieron presentar valores de NO significativamente inferiores y concentraciones de MDA significativamente superiores en comparación con las observadas en el grupo con HDLc normal, mientras que los pacientes con niveles de HDL-c elevado, debieron presentar cifras de NO significativamente superiores y de MDA significativamente inferiores a las observadas en el grupo con valores de HDL-c fisiológicamente normales.

De acuerdo a los gráficos N° 2 y 3 los pacientes con valores de HDL-c disminuido contrariamente a lo esperado, presentaron valores de NO significativamente superiores y de MDA significativamente inferiores a los observados en el grupo control, mientras que los pacientes con HDL elevada los valores de NO y MDA no fueron diferentes a los observados en el mismo grupo control con HDL normal.

Bajos niveles plasmáticos de HDL-c constituyen un factor de riesgo independiente altamente significativo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular². En un ampliamente citado metanálisis de cuatro grandes estudios que involucran 15.251 individuos, cada 1 mg/dl de incremento en la concentración plasmática de HDL-c, está asociado a una disminución de 2-3% del riesgo de enfermedad cardiovascular^{5y6}. Estos resultados constituyeron el argumento epidemiológico necesario para justificar la elevación por medios terapéuticos de los niveles de HDL-c. El talón de Aquiles del efecto protector de las HDL es que no existe una relación directa causa efecto entre niveles de HDL-c y el desarrollo de la aterosclerosis, lo cual contrasta con los niveles de LDL-c que están

en relación directa con el desarrollo de la aterosclerosis y cuyo control terapéutico ha resultado en una reducción significativa de de la morbilidad y la mortalidad por enfermedad cardiovascular^{14y15}.

Los niveles de HDL-c más que causa, son el reflejo de un buen o mal control metabólico; en caso de hipertriacilgliceridemia por ejemplo, ocurre una disminución en los niveles de HDL-c que su vez incide de forma indirecta en los niveles de LDL-c, que pueden transformarse en LDL-ox que al fijarse a receptores en la célula endotelial disminuiría la actividad de la NOS. Los propuestos efectos antioxidantes del NO prevendrían o disminuirían dichos efectos prooxidantes de las LDLox¹⁰.

La célula endotelial desde el punto de vista embriológico e histológico es un solo tipo de célula, mientras que el endotelio vascular lejos de ser una mera cubierta de la luz vascular ejerce numerosas funciones y es el centro de una actividad bioquímica insospechada treinta años atrás¹⁶. Las características bioquímicas del endotelio vascular van cambiando de acuerdo al tejido en que se encuentre el vaso sanguíneo, por su estrecha relación con las células vecinas. También es posible que el efecto regulador de las HDL sobre la NOS endotelial observado en estudios de células endoteliales aisladas, sea sustituido in vivo por la síntesis de moléculas reguladoras de diferente naturaleza bioquímica producidas por la presencia de estados patológicos como obesidad central, inflamación crónica o el síndrome metabólico con todas sus patologías asociadas como hipertensión, obesidad, hipertriacilgliceridemia y HDL-c disminuidos^{17y18}.

Es probable que los efectos antioxidantes de las HDL demostrados en estudios realizados en condiciones ideales con células endoteliales no sean reproducibles en organismos intactos, donde un sin número de variables interactúan simultáneamente, como lo demuestran los resultados del presente estudio. En conclusión en la muestra estudiada la concentración de HDL-c no guarda relación alguna con la regulación de la síntesis de óxido nítrico, ni con sus efectos antioxidantes, en todo caso se hace necesario investigar si estas propiedades antioxidantes son atribuibles a alguna de las subclases de HDL, así como si la interacción con otras moléculas reguladoras de la función celular como las citocinas liberadas en estados inflamatorios crónicos que caracterizan las enfermedades o alteraciones metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico y diabetes mellitus, que cursan con concentraciones de HDL-c disminuidos.

Referencias

1. Barr, D. P., E. Russ, and H. Eder. Protein-lipid relationships in human plasma. II. In atherosclerosis and related conditions. *Am. J. Med.* 1951;11: 480 – 493.
2. Gordon, T., W. P. Castelli, M. C. Hjortland, W. B. Kannel, and T. R. Dawber. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *Am. J. Med.* 1977;62:707–714.
3. Hansel, B., A. Kontush, P. Giral, D. Bonnefont-Rousselot, M. J. Chapman, and E. Bruckert. One third of the variability in HDL-cholesterol level in a large dyslipidaemic population is predicted by age, sex and triglyceridaemia: The Paris La Pitie Study. *Curr. Med. Res. Opin.* 2006;22:1149 – 1160.
4. Criqui, M. H., R. B. Wallace, G. Heiss, M. Mishkel, G. Schonfeld, and G. T. Jones. Cigarette smoking and plasma high-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation.* 1980;62 : IV70 – IV76.
5. Hulley, S. B., R. Cohen, and G. Widdowson. Plasma high-density lipoprotein cholesterol level. Influence of risk factor intervention. *JAMA.* 1977;238 : 2269 – 2271.
6. Kodama, S., S. Tanaka, K. Saito, M. Shu, Y. Sone, F. Onitake, E. Suzuki, H. Shimano, S. Yamamoto, K. Kondo, et al. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: a meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* 2007;167 :999 – 1008.
7. Rashid, S., and J. Genest. Effect of obesity on high-density lipoprotein metabolism. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15 : 2875 – 2888.
8. Busetto, L., G. Sergi, G. Enzi, G. Segato, F. De Marchi, M. Folletto, M. De Luca, S. Pigozzo, and F. Favretti. Short-term effects of weight loss on the cardiovascular risk factors in morbidly obese patients. *Obesity (Silver Spring).* 2004; 12 : 1256 – 1263.
9. Chahil, T. J., and H. N. Ginsberg. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2006;35 : 491 – 510.
10. Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, et al. The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem* 2001; 276:13750–13755.
11. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.* 1993; 15:353–363.
12. Archer, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7: 349–360.
13. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III) *JAMA.* 2001, 285:2486-2497.
14. Rader, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J. Clin. Invest.* 2006;116:3090 – 3100.
15. Hein TW, Liao JC, Kuo L. ox-LDL specifically impairs endothelium-dependent, NO-mediated dilation of coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278:H175–83.
16. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010, 23;4:302-312.
17. Rye, K. A., C. A. Bursill, G. Lambert, F. Tabet, and P. J. Barter. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J. Lipid Res.* 2009; 50 (Suppl): S195 – S200.
18. Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(3):229-238.