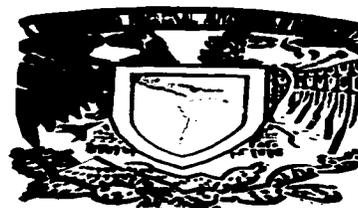


00524  
191



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LAS  
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD EN ADOLESCENTES CON  
DIABETES TIPO 2**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A :  
VLADIMIR JESÚS VIDAURE GARCÉS**

**MÉXICO, DF.**

  
**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**2003**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: RAÚL AGUILAR CABALLERO**

**VOCAL: ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES**

**SECRETARIO: ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ**

**1ER. SUPLENTE: GRACIELA NAVA DÍAZ**

**2DO. SUPLENTE: MARIA DEL SOCORRO REYNA RODRÍGUEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

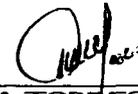
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA ÁREA DE INVESTIGACIÓN**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"**



**ÓSCAR A. PÉREZ MÉNDEZ**

**ASESOR DE TESIS**



**MARGARITA TORRES TAMAYO**

**SUPERVISOR TÉCNICO**

**Vidaure Garcés Vladimir Jesús**

**VIDAURE GARCÉS VLADIMIR JESÚS**

**SUSTENTANTE**

**Dedicada a**

**María M. Garcés Jiménez**

**Norma Patricia**

**A mi padre, tíos y hermanos: Argelia, Ivonne, Apolo, Guadalupe y Rosa.**

**Agradecimientos**

**Dr. Óscar A. Pérez Méndez**

**Dra. Margarita Torres Tamayo**

**A mis amigos: Marichely, Ely, Tomás, Belinda, Claudia, Juan Carlos, José y Ricardo.**

## **INDICE**

RESUMEN.....	7
I ANTECEDENTES.....	9
I.1 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	9
1.1 LÍPIDOS.....	9
1.2 IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS.....	9
1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES LÍPIDOS ENCONTRADOS EN LAS Lp.....	10
1.4 LIPOPROTEÍNAS.....	11
1.5 APOLIPOPROTEÍNAS.....	13
1.6 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	14
1.7 METABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES.....	17
1.8 METABOLISMO DE LAS VLDL.....	18
1.9 METABOLISMO DE LAS LDL.....	19
I.2 LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD.....	20
2.1 CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN.....	20
2.2 SUBCLASIFICACIÓN BASADA EN LOS TAMAÑOS.....	21
2.3 IMPORTANCIA DE LAS HDL.....	21
2.4 METABOLISMO DE LAS HDL (TRC).....	22
I.3 ATROSCLEROSIS.....	25
3.1 ENDOTELIO VASCULAR.....	25
3.2 LDL OXIDADA Y ATROSCLEROSIS.....	26
3.3 FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS.....	27
I.4 DIABETES TIPO 2.....	29
4.1 DIABETES MELLITUS.....	29
4.2 CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO.....	29
4.3 DIABETES TIPO 2.....	30

4.4 COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES TIPO 2.....	33
4.5 DIABETES TIPO 2 Y ATROSCLEROSIS.....	33
4.6 METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN LA DIABETES TIPO 2.....	34
II. JUSTIFICACIÓN.....	37
III. HIPÓTESIS.....	38
IV. OBJETIVOS.....	38
V. MATERIAL, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO.....	39
VI. RESULTADOS.....	45
VII. DISCUSIÓN.....	56
VIII. CONCLUSIÓN.....	65
ANEXOS.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## ABREVIATURAS

- ABCA-1:** ATP-Binding cassette transporter A1
- AGNE:** Ácidos grasos no esterificados
- apo:** Apolipoproteínas
- apo C's:** Apolipoproteínas CI, CII y CIII
- BHT:** Butil hidroxitolueno
- CE:** Colesterol esterificado
- CETP:** Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
- C-HDL:** Colesterol de las lipoproteínas HDL
- CL:** Colesterol libre
- C-LDL:** Colesterol de las lipoproteínas LDL
- CT:** Colesterol total
- DM2:** Diabetes mellitus tipo 2
- EAC:** Enfermedad aterosclerosa coronaria
- FNT- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa
- HDL:** Lipoproteínas de alta densidad
- IDL:** Lipoproteínas de densidad intermedia
- ITG:** Intolerancia a la glucosa
- LCAT:** Lecitina colesterol acilo transferasa
- LDL:** Lipoproteínas de baja densidad
- LDLox:** Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
- LH:** Lipasa hepática
- Lp:** Lipoproteína
- LPL:** Lipoproteína lipasa
- LRTG:** Lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, LDL, IDL y VLDL)
- LSD:** Least significant difference
- PLTP:** Proteína de transferencia de fosfolípidos

**PON 1:** Paraoxonasa 1

**SR-AI/AII:** Receptor "barrendero" clase A tipos I y II

**SR-BI:** Receptor "barrendero" clase B tipo

**TG:** Triglicéridos

**TRC:** Transporte reverso del colesterol

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad

## RESUMEN

---

La diabetes mellitus es un importante problema de salud a nivel mundial, se ha estimado que en el mundo existen aproximadamente 176 millones de personas diabéticas; casi 5 veces más que hace 10 años. La DM2 es la forma más prevalente de diabetes, que en otro tiempo era considerada estrictamente una patología metabólica de los adultos, recientemente ha mostrado un incremento en el número de niños y adolescentes que la padecen. Esta epidemia emergente pediátrica se asocia ampliamente con las crecientes tasas de obesidad, que se deben en gran parte a los cambios en los hábitos de alimentación y, en los estilos de vida tendientes actualmente al sedentarismo y la inactividad física. La fisiopatología de la DM2 se caracteriza por resistencia a la insulina, una hiperinsulinemia compensatoria y disfunción de las células- $\beta$  del páncreas, lo que origina alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Estas alteraciones producen hiperglucemia y a su vez determinan la presencia de dislipidemias, asociadas con un aumento en el riesgo a desarrollar EAC.

Se conocen muy bien las alteraciones de las LDL en la DM2, pero son pocos los estudios realizados sobre las anormalidades en las subclases de las HDL en esta situación fisiopatológica, dichas alteraciones podrían afectar la función antiaterosclerosa de las HDL que dependen de su estructura y distribución. Un método para estudiar la estructura de las HDL es el PAGGE, que separa a las HDL en 5 subclases con base a su tamaño.

Los objetivos del estudio fueron: a) determinar el perfil de distribución de las subclases de HDL mediante PAGGE, en adolescentes con obesidad, ITG y DM2, b) determinar la actividad de las proteínas -LCAT, CETP y PLTP-, las cuales participan en la remodelación de las HDL y en consecuencia pueden estar involucradas de manera indirecta en la distribución de sus tamaños y funcionalidad.

Los adolescentes con DM2 fueron divididos en aquellos con y sin control glucémico, con el objeto de investigar diferencias de acuerdo a el control glucémico. Se compararon además con un grupo de adolescentes obesos y otro de intolerantes a la glucosa, con el fin de evaluar las etapas previas al desarrollo de la DM2. Las concentraciones medias de lípidos y lipoproteínas de los 4 grupos de

pacientes fueron similares. Los valores medios de CT, TG y C-LDL fueron más elevados, que los de los mexicanos adolescentes sanos. En estos 4 grupos hubo además una elevada frecuencia de hipertrigliceridemia y hipoalfalipoproteinemia, alteraciones relacionadas con el síndrome metabólico. Por otra parte, los pacientes con DM2 presentaron una mayor proporción de partículas HDL pequeñas, subclases HDL 3b y 3c, con respecto a las de los sujetos en etapas previas a la enfermedad (obesidad e ITG) en donde predominaron las subclases HDL 2a y 2b. La distribución de tamaños HDL en las etapas previas a la DM2 tuvieron una fuerte asociación con la actividad de la CETP, mientras que en la DM2 la distribución parece depender fundamentalmente de la PLTP. Los cambios en la distribución de tamaños HDL no mostró impacto en su capacidad antioxidante mediada por la enzima PON 1. La contribución de la distribución de tamaños de las HDL en la DM2, asociado con el desarrollo de la aterosclerosis deberá ser considerada en investigaciones futuras.

## I. ANTECEDENTES

---

### I.1 METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

#### 1.1 LÍPIDOS

Los lípidos (del griego lipos, grasa) son compuestos orgánicos de origen biológico que no se asocian con el agua, presentan una tendencia mucho mayor a asociarse entre sí o con otros compuestos hidrófobos. Esta condición de apolaridad e hidrofobicidad es la característica que los define, además su presencia en los organismos vivos constituye una propiedad importante.

#### 1.2 IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS

##### **Estructurales**

Estas biomoléculas junto con las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos forman parte de la composición química fundamental de todos los seres vivos. Son un componente estructural esencial de todas las membranas celulares y subcelulares (mitocondrial, nuclear, vacuolar, lisosomal, etc). En el humano, grandes masas de lípidos se depositan en células especializadas (adipocitos) para dar lugar al tejido adiposo. El tejido adiposo desempeña funciones de aislante térmico, cojín visceral y subcutáneo para protección de los órganos internos.

##### **Energéticas**

Como fuente de energía, los lípidos proporcionan más del doble de energía con respecto a la que se obtiene de la oxidación de una cantidad equivalente de proteínas o carbohidratos. Se ha calculado que en promedio el 40% de las calorías que utiliza el organismo provienen de los lípidos. Obviamente, el tejido adiposo tiene como una de sus funciones más importantes la de actuar como material de reserva energética.

##### **De transporte**

Sirven también como un eficaz vehículo de sustancias liposolubles como vitaminas y hormonas. Son además importantes en el transporte de materiales alimenticios como lipoproteínas (1).

### 1.3 CLASIFICACIÓN DE LOS PRINCIPALES LÍPIDOS ENCONTRADOS EN LAS Lp.

#### Ácidos Grasos

Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos, por lo que tienen la fórmula molecular general R-COOH. En donde R es un hidrocarburo de cadena lineal, de 15 a 23 átomos de carbono. Cuando todos los enlaces de la cadena R son sencillos la molécula es un ácido graso saturado. Si la cadena R presenta un doble enlace entre carbonos se denominan ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados si hay dos o más dobles enlaces. Estos dobles enlaces tienen casi siempre la configuración cis. Los ácidos grasos raramente se encuentran libres ya que más bien se hallan en forma esterificada como componentes de otros lípidos o en algunas proteínas.



Figura 1. Estructura química general de un ácido graso, n=14 a 22.

#### Acilglicerolípidos (ésteres de glicerol)

Las dos clases principales de acilglicerolípidos son los triacilgliceroles y los fosfoglicéridos. El núcleo de estos compuestos es un poliol de tres carbonos, el glicerol (propanotriol).

Triglicéridos (triacilgliceroles).

En los triglicéridos (TG) los tres grupos -OH del glicerol se han esterificado con ácidos grasos. Un triglicérido simple contiene 3 ácidos grasos idénticos y un triglicérido mixto contiene ácidos grasos diferentes. La naturaleza apolar y el estado altamente reducido que poseen los hacen compuestos eficientes para el almacenamiento de energía. Estos compuestos prevalecen en el plasma y en la grasa de almacenamiento de los tejidos.

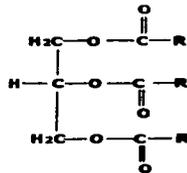


Figura 2. Estructura química general de los triglicéridos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Fosfoglicéridos.

Los ácidos fosfatídicos, que consisten de un glicerol esterificado por dos ácidos grasos y un ácido fosfórico, son los precursores de los fosfoglicéridos. Un fosfoglicérido contiene un ácido fosfatídico y una base generalmente nitrogenada (colina, serina, etanolamina) unidos mediante un enlace fosfodiéster. Los fosfoglicéridos más abundantes son la fosfatidilcolina (también llamada lecitina), la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina.

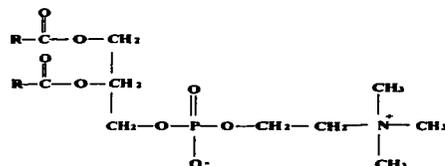


Figura 3. Estructura química general de una lecitina (fosfoglicérido)

### Colesterol

Los esteroides son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno. El colesterol es el esteroide más abundante en los animales, se clasifica además como esteroide debido a su grupo C(3)-OH y su cadena lateral alifática ramificada en C(17). Esta molécula es el precursor de las sales biliares, las hormonas esteroideas y un componente de las membranas celulares (2,3).

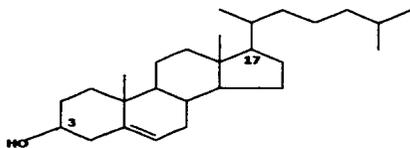


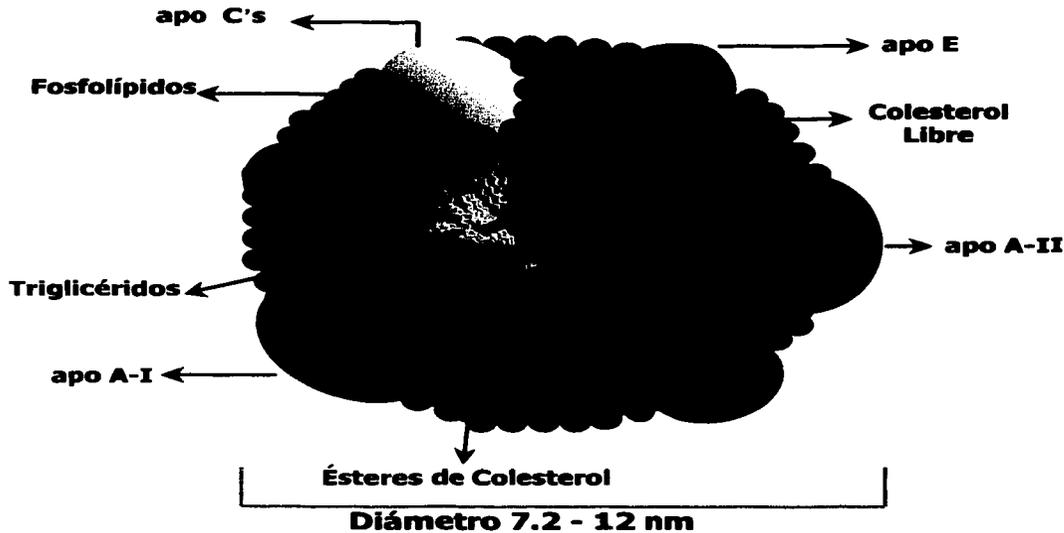
Figura 4. Estructura del colesterol libre (CL).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.4 LIPOPROTEÍNAS

El plasma es un medio acuoso, los lípidos para ser llevados de un lado a otro del organismo necesitan ser transportados por proteínas (lipoproteínas) solubles en él. Las lipoproteínas (Lp) son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y CL), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas

(apo) ver figura 5. Presentan generalmente una forma globular, en la cual, los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. La estabilidad de esta monocapa está garantizada en términos fisicoquímicos, por las apo. Los lípidos no polares se sitúan en el interior de las Lp, evitando así las interacciones con grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables (4).



**Figura 5. Representación esquemática de la organización de los lípidos y apolipoproteínas en una lipoproteína de alta densidad.**

La ultracentrifugación preparativa, una técnica que se emplea para separar las distintas clases de lipoproteínas, ha proporcionado un método operativo ampliamente utilizado para su clasificación. Las clases de lipoproteínas obtenidas del plasma humano mediante esta técnica se describen en el siguiente cuadro (5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 1. Propiedades de las Lipoproteínas Plasmáticas Humanas.**

	<b>Quilomicron</b>	<b>VLDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Densidad de Flotación (g/mL)</b>	<0.93	0.93-1.006	1.006-1.063	1.063-1.21
<b>Movilidad electroforética</b>	Permanece en el origen	Pre-beta	Beta	Alfa
<b>Diámetro (nm)</b>	75- 1 200	30-80	18-25	5-12
<b>% Proteínas</b>	2	8	22	45
<b>% Triglicéridos</b>	86	55	6	4
<b>% Colesterol libre</b>	2	7	8	4
<b>% Colesterol esterificado</b>	3	12	42	14
<b>% Fosfolípidos</b>	7	18	22	34
<b>Función</b>	Transporte de colesterol y triglicéridos desde el intestino	Transporte de lípidos de origen hepático hacia los tejidos periféricos	Transporte de colesterol a tejidos periféricos	Transporte de colesterol de tejidos periféricos hacia el hígado.
<b>Origen</b>	Pared Intestinal	Hígado	Catabolismo de las VLDL e IDL	Hígado e Intestino

VLDL = (Very Low Density Lipoproteins) Lipoproteínas de muy baja densidad; LDL = (Low Density Lipoproteins) Lipoproteínas de baja densidad; IDL = (Intermediate Density Lipoproteins) Lipoproteínas de densidad intermedia, HDL = (High Density Lipoproteins) Lipoproteínas de alta densidad.

Como puede observarse en el cuadro 1 las diferentes clases de Lp presentan diferencias en cuanto a: composición química, tamaño, densidad de flotación, movilidad electroforética y función.

### 1.5 APOLIPOPROTEÍNAS

Las apo A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E, contienen secuencias que forman hélices anfipáticas que pueden asociarse con los grupos polares de los fosfolípidos de la monocapa en la superficie de las Lp. Tienen un peso molecular relativamente bajo y se pueden intercambiar entre las diferentes clases de lipoproteínas. En contraste las apo B poseen un peso molecular mucho mayor, pocas hélices anfipáticas y un gran contenido de estructura hoja  $\beta$ -plegada. Estas apo penetran en algunos puntos para sustituir a la monocapa de fosfolípidos e interactúan directamente con los lípidos del núcleo del cuerpo lipídico (6).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Las apo tienen 3 funciones generales básicas en una Lp: son proteínas estructurales, cofactores de enzimas y son los ligandos de receptores específicos. En el cuadro 2 se enlistan las principales apo así como algunas de sus características.

**Cuadro 2. Características y Propiedades de las Principales Apolipoproteínas Humanas (7).**

apo	No de a.a.	Peso Molecular (kD)	Concentración (mg/ dL )	Principal Sitio de Síntesis	Lipoproteínas en que se Encuentran	Función
<b>A-I</b>	243	28 016	100-150	Hígado, intestino	Quilomicrones, HDL	Principal proteína estructural de las HDL, cofactor LCAT, ligando para sitios de unión de las HDL
<b>A-II</b>	77	17 414	30-50	Hígado	HDL	Proteína estructural de las HDL, inhibición de la LH
<b>A-IV</b>	376	46 465	15	Intestino	Quilomicrones, HDL	Activación de LCAT, estimulación del flujo de colesterol
<b>B-100</b>	4 356	512 000	80-100	Hígado	VLDL, IDL, LDL	Proteína estructural, ligando para receptor apo B/E
<b>B-48</b>	2 152	264 000	< 5	Intestino	Quilomicrones	Proteína estructural
<b>C-I</b>	57	6 630	6	Hígado	Todas las lipoproteínas	Activación de LCAT, inhibición de la captación de las LRTG
<b>C-II</b>	79	8 900	3-8	Hígado	Todas las lipoproteínas	Activación de LPL
<b>C-III</b>	79	8 800	8-15	Hígado	Todas las lipoproteínas	Inhibe LPL, modula la captación de remanentes, inhibición de la captación de las LRTG
<b>E</b>	299	34 145	2-6	Hígado	Quilomicrones, LDL, IDL, HDL	Ligando para el receptor apo B/E

LCAT = (Lecithin cholesterol acyltransferase) Lecitina colesterol acilo transferasa, LH = (Hepatic lipase) Lipasa hepática, LPL = (Lipoprotein lipase) Lipoproteína lipasa, LRTG = Lipoproteínas ricas en triglicéridos (Quilomicrones, LDL, IDL y VLDL).

### 1.6 PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

El metabolismo de las lipoproteínas es un proceso complejo y dinámico, en el cual están involucradas diversas proteínas de transporte, enzimas y receptores, las más importantes se enlistan en el cuadro 3.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 3. Principales Proteínas Involucradas en el Metabolismo de las Lipoproteínas (7).**

	<b>No de a.a.</b>	<b>Función</b>	<b>Principal Sitio de Síntesis</b>
<b>Enzimas y Proteínas de Transferencia Plasmáticas</b>			
LCAT	416	Esterificación del colesterol, remodelación de las HDL Inhibe la oxidación de las LDL	Hígado, testículos, SNC Hígado
PON 1	354		
CETP	476	Transferencia e intercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre HDL y LRTG, remodelación de las HDL	Hígado, bazo, Intestino delgado, macrófagos
PLTP	493	Transferencia de fosfolípidos entre LRTG y HDL, remodelación las HDL	Hígado y endotelio
<b>Enzimas Unidas al Endotelio Vascular</b>			
LPL	475	Hidrólisis de triglicéridos de las TGRL	Músculo liso y tejido adiposo
LH	499	Hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos de las HDL	Hígado
<b>Receptores y Transportadores Celulares</b>			
ABCA-1	2 201	Mediación del eflujo de colesterol y fosfolípidos	Hígado, macrófagos, intestino
SR-BI	509	Mediación de la captación y eflujo selectivo de colesterol	Hígado, testículos, ovarios, macrófagos
R-apo B/E ó receptor LDL	839	Receptor para Lp con apo B-100 y también Lp con apo E	Hígado

LCAT = (Lecithin cholesterol acyltransferase) Lecitina colesterol acilo transferasa, PON 1 = paraoxonasa 1, CETP = (cholesteryl ester transfer protein) Proteína de Transferencia de Ésteres de Colesterol, PLTP = (phospholipid transfer protein) Proteína de Transferencia de Fosfolípidos, LRTG = Lipoproteínas ricas en triglicéridos (Quilomicrones, LDL, IDL y VLDL), LPL = (Lipoprotein lipase) Lipoproteína lipasa, LH = (Hepatic lipase) Lipasa hepática, ABCA-1 = Por sus siglas en Inglés ATP-Binding Cassette transporter A1, SR-BI = (Scavenger Receptor, class B, type I) Receptor "Barrendero" Clase B Tipo I.

### **Lecitina colesterol acilo transferasa (LCAT)**

El gen humano de la LCAT se sitúa en el cromosoma 16. La expresión del ARNm se realiza esencialmente dentro del hígado, sitio en el que la LCAT es secretada por los hepatocitos. La enzima madura de 63 kD contiene 416 aminoácidos y 4 sitios de glicosilación. Esta enzima cataliza la esterificación del colesterol y es responsable de la mayor parte de colesterol esterificado (CE) encontrado dentro del plasma humano. Pertenece a la clase de las enzimas hidrolíticas de tipo serina esterasas. Tradicionalmente, a la actividad LCAT se le atribuye un papel antiaterogénico, ya que el CE aparentemente crea un gradiente necesario para el eflujo de CL desde los tejidos hacia el plasma.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La LCAT cataliza la transferencia de un grupo acilo de un ácido graso preferentemente de la posición sn-2 de la lecitina (fosfatidilcolina) al grupo 3-hidroxilo del colesterol, produciendo ésteres de colesterol y lisolectina (lisofosfatidilcolina). La esterificación del CL esta muy asociado con la remodelación de las subpoblaciones de las HDL y con la formación de partículas HDL<sub>2</sub>.

#### **Proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP)**

La CETP es una glicoproteína hidrofóbica, con un peso molecular aparente de 66 a 74 kD. En su forma madura esta compuesta de 476 aminoácidos, con cuatro sitios N-glicosilados y numerosas regiones apolares (cerca de 44%). También cuenta con un dominio C-terminal apolar que se ha postulado como el sitio de interacción con las lipoproteínas. El gen de la CETP se encuentra situado sobre el brazo largo del cromosoma 16, en los seres humanos el suministro más abundante de ARNm de la CETP es el hígado, bazo y tejido adiposo y con niveles más bajos de expresión en el intestino delgado, glándula adrenal, riñón y corazón. El tejido que tiene mayor cantidad de ARNm de la CETP es el tejido adiposo. La CETP tiene la capacidad de transferir o intercambiar ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos entre las Lp de una manera equimolar.

#### **Proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP)**

El gen de la PLTP se encuentra en el cromosoma 20 su ARNm codifica para una proteína de 493 aminoácidos, de unos 78 kD. Presenta 6 posibles sitios de glicosilación. La PLTP es un factor plasmático que regula la composición y el tamaño de las HDL, y juega un papel importante al afectar los niveles de C-HDL en plasma (una actividad PLTP alta se asocia con un aumento del C-HDL). La PLTP realiza la transferencia neta de fosfolípidos y CL desde las LRTG hacia las HDL.

#### **Paraoxonasa 1 (PON 1)**

El gen PON 1 está localizado en el brazo largo del cromosoma 7 y contiene de 9 exones y 8 intrones. La expresión del gen PON 1 da origen a una glicoproteína de 354 aminoácidos y de masa aparente entre 43 y 45 kD. La PON 1 es una enzima estearasa tipo A que cataliza la hidrólisis de ácidos carboxílicos y organofosfatos. El sustrato más utilizado para el estudio de la enzima es el paraoxón (O,O-dietil-O-*p*-nitrofenil fosfato), el cual le da el nombre a la enzima de paraoxonasa. La

enzima es sintetizada en el hígado, se encuentra asociada a las HDL, particularmente a la fracción HDL<sub>3</sub>.

Estudios *in vitro* han mostrado que la PON 1 inhibe la oxidación de las LDL, este efecto biológico se relaciona con la capacidad de la PON 1 de hidrolizar los lipoperóxidos asociados a las Lp y en particular las LDL. Por lo anterior, se ha propuesto que esta enzima participa en la prevención de la formación y de la progresión de la placa ateromatosa por poseer una actividad de lipoperóxido-hidrolasa.

### **1.7 METABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES**

Las grasas y aceites alimenticios son principalmente mezclas de TG mixtos. Después de su ingestión en la dieta, son hidrolizados principalmente en la luz intestinal por acción de las enzimas pancreáticas y la contribución de las sales biliares. Estas disminuyen la tensión superficial del agua, formándose micelas pequeñas (proceso denominado emulsificación) y con ello favorecen la acción de las enzimas digestivas. De esta manera, se liberan CL y ácidos grasos libres, los cuales, son absorbidos hacia el interior del enterocito. Una vez dentro de éste, se reesterifican para formar TG y CE.

Los quilomicrones se ensamblan en las células de la mucosa intestinal, a partir de los TG, el colesterol (proveniente de la dieta, de la bilis y de síntesis de novo) y de la apo B-48 sintetizada en los enterocitos. Además los quilomicrones naciotes contienen también apo A-I, apo A-II y apo A-IV. Los quilomicrones pasan a los conductos quilíferos del intestino y se dirigen por el conducto linfático torácico a la vena subclavia para llegar finalmente a la circulación general. Las HDL ceden las apo C-II, C-III y E, a los quilomicrones, importantes para su metabolismo (8).

La hidrólisis de los TG presentes en los quilomicrones, se lleva a cabo principalmente en los capilares del tejido adiposo y del músculo estriado. Esta hidrólisis es catalizada por la enzima LPL (cuadro 3), la cual, se encuentra unida a las células endoteliales de la pared vascular. La síntesis de la LPL es regulada por la insulina y requiere para su actividad la presencia de su cofactor apo C-II. La hidrólisis intravascular de TG libera ácidos grasos libres y glicerol, junto con apo A-I y apo C s. Los ácidos grasos, penetran en el adipocito, en donde servirán para sintetizar TG.

El quilomicrón al perder TG disminuye de tamaño, transformándose finalmente en un remanente de quilomicrón, pobre en TG y con alta proporción de CE y apo E que recibieron de las HDL. A su vez, les ceden a las HDL los TG intercambiados por CE, transferencia mediada por la CETP (cuadro 3). La monocapa de la superficie formada por fosfolípidos y CL se transfiere a las HDL por medio de la PLTP. La apo E permite al quilomicrón ser captado por los receptores apo B/E, que están presentes en el hígado, lugar donde los remanentes son internalizados para ser catabolizados (9). Tanto los TG como el colesterol son utilizados en la secreción de las VLDL por el hígado.

### **Transporte de ácidos grasos**

Los ácidos grasos, liberados durante la lipólisis de las LRTG, se fijan inmediatamente a la albúmina circulante y como resultado son retenidos en solución. La albúmina posee tres sitios de alta afinidad caracterizados por hendiduras apolares con cadenas laterales de aminoácidos catiónicos que pueden interaccionar con el ión carboxilato (10). Estos ácidos grasos pueden tener tres destinos.

1. Pueden ser captados por el músculo estriado (y otros tejidos) y ser utilizados para producir energía.
2. Pueden ser captados por el tejido adiposo donde se reesterifican en TG para su almacenamiento. Cuando se necesita combustible, estos TG son sometidos a lipólisis por la lipasa intracelular del tejido adiposo (regulada por la insulina) y de nuevo se liberan ácidos grasos en la circulación.
3. Pueden ser captados por el hígado donde sirven como fuente de energía o se reesterifican en TG, que se utilizarán en la síntesis de VLDL.

### **1.8 METABOLISMO DE LAS VLDL**

Las VLDL son sintetizadas en el hígado a partir de TG, pequeñas cantidades de fosfolípidos y colesterol, y las apo A, B-100 y C. Cada VLDL naciente contiene una sola copia de apo B-100. Al entrar en la circulación, las VLDL adquieren apo C-II de las HDL, son sometidas a hidrólisis por la LPL, mientras sucede esto, los lípidos de la monocapa de superficie son transferidos por la PLTP a las HDL. Por un mecanismo similar al del remanente de quilomicrón, las VLDL se transforman en remanentes de VLDL o IDL, enriquecidas en colesterol y apo E obtenidos por intercambio con las HDL.

Algunas IDL se unen a receptores hepáticos apo B/E, para ser internalizadas y catabolizadas en el hepatocito. El resto de las IDL permanecen mas tiempo en circulación y al pasar por el hígado la LH hidroliza los TG para convertirlas en LDL.

### **1.9 METABOLISMO DE LAS LDL**

La hidrólisis de los TG de las VLDL, da origen a las LDL **(11)**, que consisten de un núcleo lipídico compuesto casi exclusivamente por CE. El revestimiento superficial de las LDL contiene CL y fosfolípidos, y sólo una molécula apo B-100. Estas LP transportan el mayor porcentaje de colesterol en el organismo. Las LDL pueden ser eliminadas de la circulación por el hígado o por los tejidos extrahepáticos. Aproximadamente, un 75% de las LDL séricas son eliminadas por el hígado, mientras que el 25% restante es eliminado por tejidos extrahepáticos. Su principal mecanismo de eliminación es la endocitosis a través del receptor apo B/E, para el cual apo B-100 es el ligando. El receptor LDL es una molécula con un peso molecular de 120 kD que contiene aproximadamente 820 aminoácidos.

Cuando los receptores de LDL fijan las LDL circulantes (o las VLDL remanentes), los complejos receptor-ligando se internalizan y se fusionan con lisosomas. Después de la internalización, los receptores se disocian de las LDL y son reciclados a la superficie de la célula para ser utilizados de nuevo ó son catabolizados en los lisosomas por proteasas. El CE de LDL se hidrolizan en CL y la apo B-100 se degrada en aminoácidos. La cantidad de colesterol que entra en la célula tiene tres efectos importantes:

- Disminuye la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima que limita la velocidad y controla la biosíntesis de novo del colesterol endógeno **(12)**.
- Aumenta la actividad de la colesterol acil transferasa intracelular, que esterifica el CL.
- Disminuye la tasa de síntesis de receptores para apo B-100.

Este último evento evita la acumulación de colesterol en el interior de las células **(13)**.

## I.2 LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

### 2.1 CARACTERÍSTICAS Y CLASIFICACIÓN

Las HDL abarcan una clase heterogénea de Lp que tienen en común una densidad de flotación entre 1.063-1.21 g/mL y un tamaño (diámetro de Stoke's) de 7.2 a 12 nm **(14)**. Lo anterior es debido a que son las lipoproteínas con menor proporción de lípidos y mayor proporción proteica (55-60% de su masa seca), siendo la apo A-I su apo más abundante (65% de su masa proteica total). La apo A-I, aparte de su función estructural es indispensable para el eflujo de colesterol de las células periféricas **(15)**. La apo A-II es la segunda apo estructural más abundante de las HDL representa del 20% al 30% de su masa proteica total. Además, las HDL contienen pequeñas cantidades de apo C's (apo C-I, apo C-II y apo C-III), apo E y apo A-IV, y cantidades mínimas asociadas a CETP, PLTP, LCAT y PON.

Diferencias cuantitativas y cualitativas, en el contenido de lípidos y apo, enzimas y proteínas de transferencia de lípidos resulta en la presencia de varias subclases de HDL. Estas subclases se caracterizan por diferencias en forma, densidad, tamaño, movilidad electroforética y composición de apo. Una subclasificación con base en la densidad de flotación, las distingue en HDL<sub>2</sub> 1.063-1.12 g/mL y HDL<sub>3</sub> 1.12-1.21 g/mL. Las HDL<sub>2</sub> son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL<sub>3</sub> están formadas por fosfolípidos y proteínas, principalmente. La electroforesis en gel de agarosa, se para las HDL en función de su carga y de su tamaño en partículas con migración  $\alpha$  y en una subpoblación pequeña con migración pre- $\beta$  **(16)**. Estas últimas, al realizar una electroforesis posterior en gradiente de poliacrilamida, se separan en tres partículas; pre- $\beta$ 1, pre- $\beta$ 2 y pre- $\beta$ 3. Por otra parte, usando cromatografía de inmunoafinidad (basada en diferencias inmunoquímicas entre las partículas de HDL) se obtienen 2 subpoblaciones: partículas HDL que contienen apo A-I y apo A-II (Lp A-I: A-II) y partículas con sólo apo A-I (Lp A-I) **(7)**. No existe una correspondencia exacta entre cada una de las diferentes subclasificaciones.

## 2.2 SUBCLASIFICACIÓN BASADA EN LOS TAMAÑOS

Hasta la fecha, la diversidad estructural de las HDL es bien establecida especialmente en términos de la distribución de tamaños. Dicha distribución de tamaños se consigue mediante electroforesis nativa de poliacrilamida con un gradiente 4%-30% en condiciones no reductoras (PAGGE) y permite una subclasificación más fina de las partículas HDL.

**Cuadro 4. Subclases de Partículas HDL Definidas en Base al Tamaño.**

Subclases	Rango de Tamaño (nm)
HDL 2b	9.71-12.9
HDL 2a	8.77-9.71
HDL 3a	8.17-8.77
HDL 3b	7.76-8.17
HDL 3c	7.21-7.76

El uso de la técnica anterior en combinación con la densitometría se ha empleado en la separación, caracterización y estimación de cada una de las diferentes subclases anteriores **(17)**.

## 2.3 IMPORTANCIA DE LAS HDL

Los resultados obtenidos en diversos estudios epidemiológicos han demostrado que hay una correlación negativa entre la concentración de colesterol-HDL (C-HDL) y el riesgo a desarrollar EAC **(18-20)**. Los mecanismos exactos por los cuales las HDL son ateroprotectoras se desconoce aún. Varias hipótesis se han postulado para intentar explicarlos, siendo las más importantes las siguientes:

- La participación de las HDL en el transporte reverso del colesterol (TRC), que se define como el regreso del colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje **(21)**.
- Las propiedades antioxidantes de las HDL asociadas a la PON 1 **(22,23)** y la actividad antioxidante intrínseca de apo A-I **(24)**.

- Regulación negativa por parte de las HDL para la expresión de las moléculas de adhesión celular VCAM-1 e ICAM-1, en la superficie del endotelio vascular, con efecto antiinflamatorio **(25)**.
- Inhibición de la agregación plaquetaria con propiedades antitrombóticas **(26)**.
- Prevención a la inhibición de la óxido nítrico sintetasa por las LDL oxidadas, ayudando aparentemente a mantener las funciones normales de los vasos sanguíneos **(27)**.
- Posible promoción del eflujo de colesterol, debida a una regulación positiva en la expresión del ABCA-1.

De las hipótesis anteriores, el mecanismo del TRC ha sido el que ha ganado una mayor aceptación. En él se describe el metabolismo de las HDL.

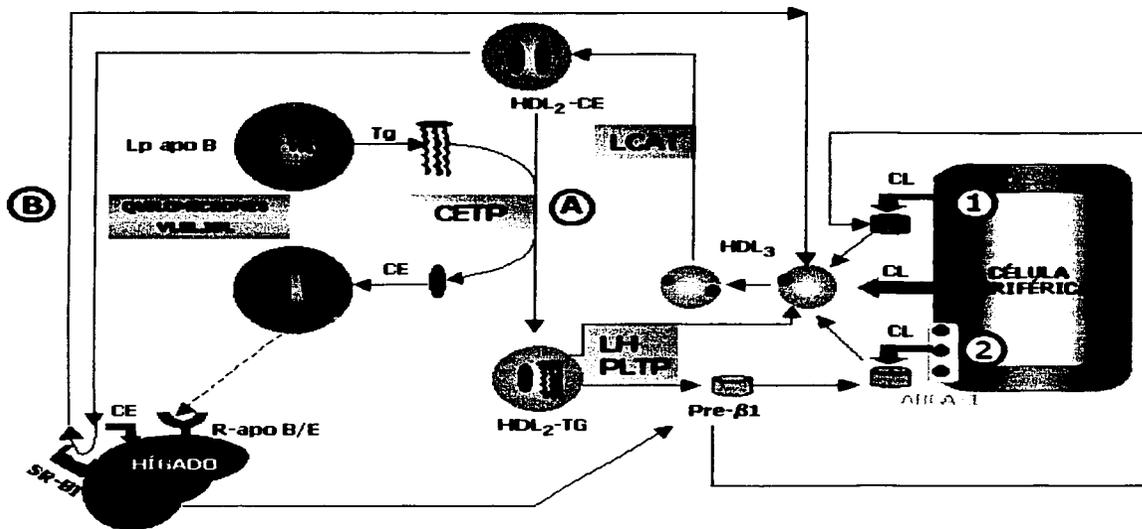
#### **2.4 METABOLISMO DE LAS HDL (TRC)**

El hígado secreta unas partículas de forma discoidal llamadas "HDL nacientes", que presentan movilidad electroforética pre- $\beta$ 1 **(28,29)**. Estas partículas están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I, tienen una masa molar aparente alrededor de 60 kD y flotan a la densidad de las HDL<sub>3</sub>. Son los aceptores primarios que captan el excedente de colesterol libre proveniente de las células periféricas (tejidos extrahepáticos).

La primera etapa del TRC es el eflujo del colesterol de las células. Este eflujo de colesterol es el resultado tanto de procesos pasivos e inespecíficos, como de procesos activos y específicos. Entre los mecanismos postulados de eflujo de colesterol celular se encuentra el mediado por la proteína ABCA-1 **(30)** y la difusión pasiva de CL a través de la fase acuosa entre la membrana plasmática y las partículasceptoras. El colesterol captado por las partículas pre- $\beta$ 1, es esterificado inmediatamente por la LCAT (Figura 6). Esta esterificación hace que el colesterol pierda su carácter anfipático transformándose en una molécula hidrofóbica. En consecuencia, el CE abandona la superficie de la lipoproteína y migra hacia el interior hidrofóbico de la partícula, aumentando el tamaño de la misma y transformándose en una partícula esférica. La forma esférica más pequeña de HDL se denomina HDL<sub>3</sub>. Sin embargo, la HDL<sub>3</sub> continúa captando más CL, que a su vez se esterifica a través de la acción de la LCAT, este proceso da lugar a un aumento del tamaño y disminución de la densidad, y

produce en consecuencia HDL<sub>2</sub> ricas en CE (31). A su vez las HDL<sub>2</sub>-CE se convierten en HDL<sub>2</sub> ricas en TG intercambiando CE por TG provenientes de Lp que contienen apo B, principalmente VLDL e IDL, que a cambio reciben CE de las HDL y lo conducen al hígado donde se metaboliza. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la CETP. Los fosfolípidos de las HDL son transferidos hacia las VLDL por la proteína PLTP. Los TG de las HDL<sub>2</sub>-Tg provenientes de las LRTG, son hidrolizados por la LH. Esta hidrólisis, en asociación con la actividad PLTP, disminuye el tamaño de las HDL<sub>2</sub> transformándolas en HDL<sub>3</sub> y en partículas pre-β<sub>1</sub>, regenerando los aceptores primarios que pueden reiniciar el ciclo de captación del colesterol.

Otra vía de eliminación de colesterol plasmático es el receptor SR-BI, que se encuentra principalmente en el hígado (32). Se unen a él con gran afinidad las HDL y LDL, y por un mecanismo mal conocido internaliza únicamente el colesterol dejando el resto de la Lp intacta. De esta manera se regeneran las partículasceptoras de colesterol que pueden comenzar nuevamente el ciclo del TRC. Por este mecanismo se elimina una buena proporción del colesterol circulante.



**Figura 6. Esquema del metabolismo de las HDL (fase postabsortiva).**

Los aceptores primarios (partículas pre- $\beta$ 1 o HDL<sub>3</sub> en menor proporción) captan el CL excedente de las células periféricas por **1**) simple contacto con la membrana celular, o **2**) por medio del ABCA-1. La incorporación de colesterol en los aceptores primarios y la esterificación del mismo por la LCAT, dan origen a aumentos progresivos del tamaño de la Lp, generando sucesivamente HDL<sub>3</sub> y HDL<sub>2</sub>. El CE puede seguir dos rutas **A**) por acción de la CETP es intercambiado por TG provenientes principalmente de VLDL e IDL y, posteriormente, ser transportado al hígado para su excreción o reciclaje, gracias a su captación mediada por el R-apo B/E, o **B**) es eliminado directamente de la Lp por un mecanismo mediado por el SR-BI, generando partículas HDL de menor tamaño capaces de reiniciar el ciclo. La LH hidroliza los TG de las HDL captados por la ruta **A**. Esta hidrólisis en asociación con la actividad PLTP, regenera los aceptores primarios de colesterol.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **1.3 ATEROSCLEROSIS**

La aterosclerosis es un proceso crónico, degenerativo e inflamatorio de la pared vascular de las arterias grandes **(33)**. Las primeras lesiones de la aterosclerosis se inician como respuesta a una forma de lesión del endotelio arterial (hipótesis de la "respuesta a la lesión"), estas comienzan en la infancia y la adolescencia con la formación de las estrías grasas. La estría grasa consiste en una acumulación de lípidos (principalmente colesterol) dentro de macrófagos que los transforma en "células espumosas" en la íntima de la arteria. El colesterol no puede ser degradado por el organismo, por lo que es necesario su transporte hacia el hígado para su eliminación ó reciclaje. La acumulación continua de lípidos dentro de la íntima, aunado a la proliferación de músculo liso y del tejido conectivo forma placas elevadas (ateromas). En la etapa media de la vida, las placas ateromatosas pueden sufrir diversas alteraciones (ruptura, hemorragia, ulceración, trombosis o calcificación), algunas de las cuales producen oclusión, isquemia y enfermedad clínica como son el infarto de miocardio, la enfermedad cerebro vascular y la angina de pecho. A continuación se mencionan los principales factores de riesgo para desarrollar aterosclerosis:

No modificables; edad, género masculino y predisposición genética.

Modificables; tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo y dieta inadecuada.

Controlables; obesidad, hipertensión arterial, diabetes mellitus, intolerancia a la glucosa (ITG), síndrome metabólico y dislipidemia **(34)**.

#### **3.1 ENDOTELIO VASCULAR**

Tres constituyentes básicos forman las paredes de los vasos sanguíneos: endotelio, músculo liso y tejido conectivo. Estos están dispuestos en las capas concéntricas: íntima, media y adventicia. La capa íntima está constituida por células endoteliales, que forman una membrana de espesor monocelular (endotelio vascular, que recubre todos los vasos sanguíneos), y tejido conectivo subendotelial. Originalmente considerado como una barrera pasiva, actualmente se considera al endotelio como un órgano multifuncional y secretor de varias sustancias. Alteraciones en su estructura y función provocadas por citocinas y proteasas locales **(35)**, infecciones, variaciones del cizallamiento

(36), radicales libres, diabetes y lípidos oxidados (37), pueden ocasionar cambios localizados, agudos y crónicos. Estas manifestaciones se denominan colectivamente disfunción endotelial. En el cuadro 5 se mencionan las principales funciones del endotelio vascular y las manifestaciones de disfunción endotelial.

**Cuadro 5. Principales funciones del endotelio vascular y manifestaciones de disfunción endotelial (38).**

<b>Funciones del Endotelio Vascular</b>	<b>Manifestaciones de Disfunción Endotelial</b>
Contenedor de la sangre	Incremento en la adhesión leucocitaria
Barrera con permeabilidad selectiva	Permeabilidad aumentada a las lipoproteínas plasmáticas
Órgano secretor	Síntesis de citocinas e incremento en la producción de factores de crecimiento
Regulador del tono vascular	Alteración en el balance de las sustancias vasoactivas
Regulador del crecimiento vascular	Disminución de la actividad fibrinolítica
Regulador de la actividad homeostática y trombótica	Aumento de actividad procoagulante
Regulador de la respuesta inflamatoria e inmune	

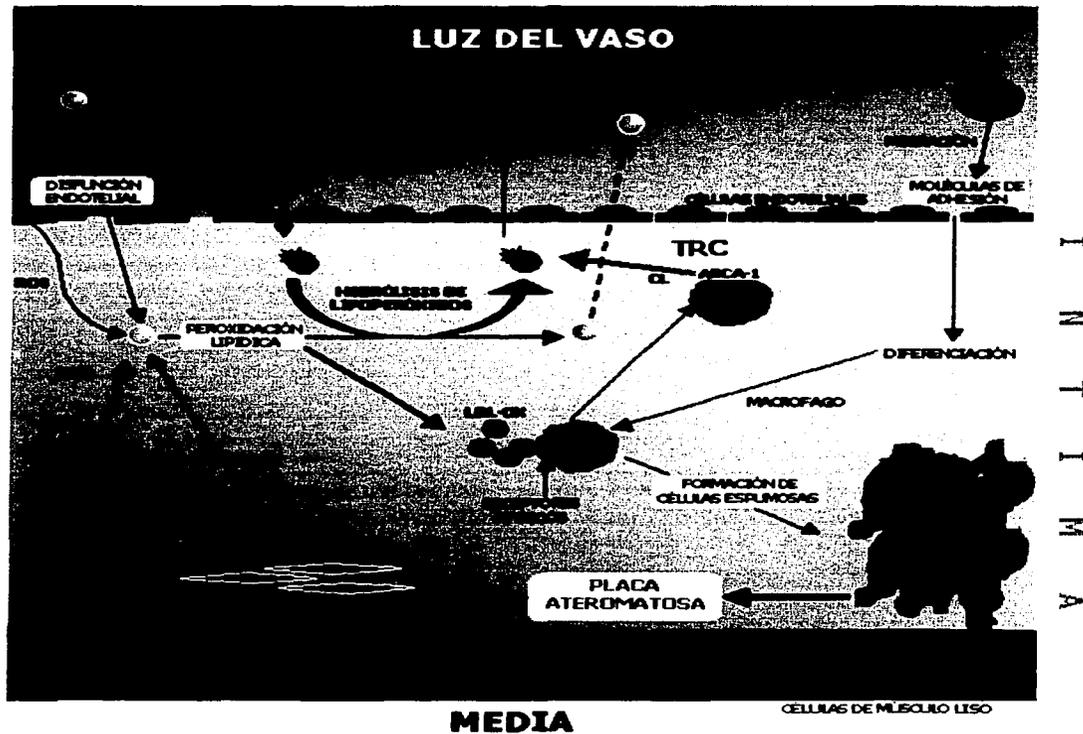
### **3.2 LDL OXIDADA Y ATEROSCLEROSIS**

El endotelio disfuncional presenta una permeabilidad alterada permitiendo una mayor entrada y acumulación de LDL en la matriz subendotelial (íntima). En este sitio las cadenas alifáticas de los fosfolípidos de las LDL son susceptibles a la peroxidación lipídica mediada por especies oxidantes reactivas (ROS), provenientes de macrófagos, células musculares lisas o del endotelio vascular (39-40). Los lipoperóxidos formados son compuestos ligeramente oxidantes, pero generan compuestos fuertemente oxidantes que alteran la estructura de las LDL llamadas LDL oxidadas (LDL<sub>ox</sub>). Los cambios químicos en la apo B- 100 permiten el reconocimiento de la misma por los macrófagos y dan origen epitopos que son desconocidos por el sistema inmune generándose anticuerpos (anti-LDL<sub>ox</sub>).

### **3.3 FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS**

Las LDL oxidadas (LDL ox) en el espacio subendotelial intervienen en la formación de la placa aterosclerótica por sus actividades quimiotáctica y quimioestática que fomentan la invasión monocitaria de la íntima y por favorecer la formación de células espumosas (41).

Una vez reclutados en la íntima, los macrófagos derivados de monocitos captan las LDL ox, vía receptores inespecíficos con independencia de la cantidad de colesterol que se acumule en las células. Esto conduce a la formación de numerosas gotitas de lípidos (colesterol principalmente) que dan a la célula un aspecto espumoso, de donde proviene el nombre de célula espumosa. La mayoría de las células espumosas derivan de los macrófagos, pero algunas provienen de las células del músculo liso. La acumulación de células espumosas en la íntima resulta en la formación de estrías grasas.



**Figura 7. Formación de células espumosas.**

Las LDL que entran al espacio subendotelial son susceptibles a la oxidación (peroxidación lipídica) por radicales libres provenientes de células endoteliales, macrófagos y células de músculo liso. Los cambios ocasionados en la estructura de las LDL provoca que sean fagocitadas por los macrófagos vía receptores para LDL-ox (tales como; CD-36 y SR-AI/AII). Las HDL evitan la formación de las células espumosas por medio de la eliminación del exceso de colesterol en los macrófagos gracias al TRC. Adicionalmente, inhiben la oxidación de las LDL por medio de la PON 1. La formación de las células espumosas y la proliferación del músculo liso contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## I. 4 DIABETES TIPO 2

### 4.1 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas debidas a diversas causas que se caracteriza por hiperglucemia. El sujeto que la padece tiene alteraciones del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, junto con una deficiencia en la secreción de insulina y/o grados variables de resistencia a esta hormona (42). Tanto la diabetes tipo 1 como la tipo 2 son factores poderosos e independientes de riesgo de enfermedad cardiovascular. El infarto del miocardio y la enfermedad cerebro-vascular son la primera causa de muerte en los pacientes con diabetes y ambas enfermedades son consecuencia de la aterosclerosis.

### 4.2 CLASIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO

La diabetes mellitus se subdivide en 4 grupos diferentes: la tipo 1 y la tipo 2 son las formas más frecuentes en el mundo occidental, otros tipos específicos incluyen entidades secundarias o asociadas con ciertas alteraciones o síndromes y por último la diabetes gestacional se define como intolerancia a la glucosa de severidad variable con inicio o detección durante el embarazo.

#### Cuadro 6. Clasificación Etiológica de la Diabetes (43).

- Diabetes tipo 1 (destrucción de células  $\beta$ , que conduce a una deficiencia absoluta de insulina)
- Diabetes tipo 2 ( con variaciones desde la resistencia a la insulina predominante con relativa deficiencia de insulina, al defecto en la secreción predominante con resistencia a la insulina)
- Otros tipos específicos.
- Diabetes mellitus gestacional.

En el siguiente cuadro se mencionan las tres maneras posibles de diagnosticar diabetes y cada una debe confirmarse.

#### **Cuadro 7. Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus (43).**

1. Síntomas de diabetes y una elevación casual de glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dL.

Casual se refiere en cualquier tiempo y día, pero sin relación con el tiempo del último alimento.

Los síntomas clásicos son: poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso inexplicable por otras causas.

6

2. Glucosa en ayuno  $\geq 126$  mg/dL.

Ayuno es definido como la falta de ingestión de calorías por lo menos en las 8 horas anteriores.

6

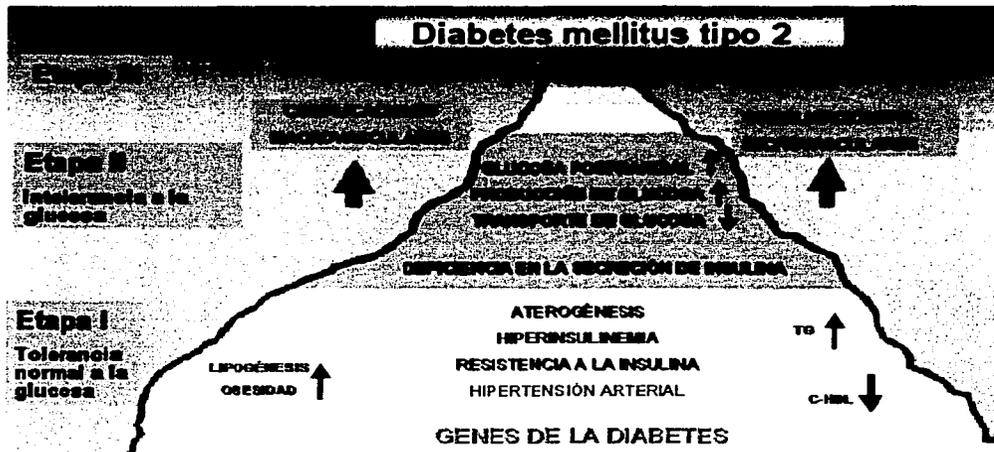
3. Glucosa 2 horas poscarga  $> 200$  mg/dL durante una prueba de tolerancia a la glucosa.

La prueba debe ser realizada con los criterios de la OMS, utilizando 75 g de glucosa para la carga oral disuelta en agua.

#### **4.3 DIABETES TIPO 2**

Es el tipo más frecuente de diabetes, en ella se presentan tanto resistencia a la insulina como un defecto en la secreción de la misma (aunque los niveles basales de insulina sean normales o altos), aún sigue sin dilucidarse cual de las dos es el defecto primario en la patogénesis de este síndrome. Una hipótesis predominante sostiene que primero aparece la resistencia a la insulina, con la participación de factores genéticos y ambientales. Varios de los estados de resistencia a la insulina, como la obesidad y la hipertensión arterial esencial, presentan una hipersecreción pancreática (hiperinsulinemia) que compensa la resistencia a la insulina. Cuando la incapacidad del páncreas para incrementar su secreción de insulina en respuesta a la demanda aumentada que le impone la disminución en la sensibilidad a la insulina alcanza un nivel crítico, la disfunción de la célula- $\beta$  conduce primero a ITG y después a hiperglucemia en ayunas (44).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 8. Diabetes mellitus tipo 2: la punta del iceberg.** La representación esquemática simplificada ilustra la evolución de la DM2. La DM2 representa la fase final de un proceso de larga duración de anomalías metabólicas denominado síndrome metabólico, caracterizado por resistencia a la insulina que en asociación con la hiperinsulinemia compensatoria generan: obesidad, dislipidemias, hipertensión arterial y consecuentemente una aterosclerosis prematura. La interacción de factores ambientales con factores genéticos explican el desarrollo de la resistencia a la insulina en un individuo. En la primera etapa de tolerancia normal a la glucosa, el páncreas compensa la resistencia a la insulina sintetizando más insulina, la cual, favorece la obesidad. En esta etapa se desarrollan la hipertrigliceridemia y la hipoalfaipoproteinemia. La disfunción de la célula- $\beta$  conduce primero a la ITG etapa II y después a la hiperglucemia en ayunas DM2 etapa III, que se asocia con complicaciones micro y macrovasculares.

En otro tiempo considerada estrictamente una enfermedad de los adultos, la diabetes tipo 2 (DM2) ha mostrado un incremento en su prevalencia en la edad pediátrica en que la padecen, en el cuadro 9 se mencionan los principales factores de riesgo que predisponen para el desarrollo de la DM2 y la ITG.

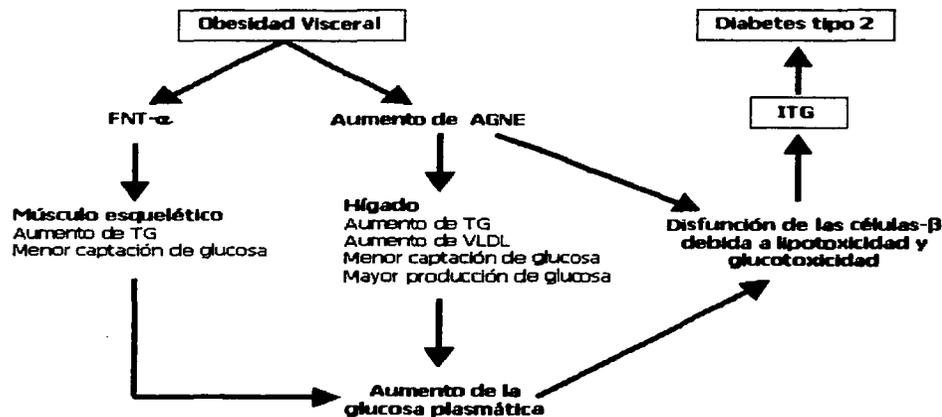
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 8. Factores que predisponen al desarrollo de ITG y diabetes tipo 2 en niños, adolescentes y adultos jóvenes (45).**

1. Edad ( adultos > adolescentes > niños en la prepubertad)
2. Obesidad
3. Historia familiar de diabetes tipo 2
4. Historia de diabetes gestacional maternal
5. Etnicidad
6. Estilo de vida sedentario
7. Bajo peso al nacer
8. Género (mujeres > hombres )
9. Acantosis nigricans
10. Síndrome de ovario poliquístico
11. Tabaquismo
12. El factor dietético (entre otros una ingesta excesiva de calorías)

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La obesidad sobre todo la de tipo central ó visceral se asocia con el desarrollo de la ITG y la diabetes tipo 2 a continuación se describe esta relación (45).



**Figura 9. Obesidad y su relación con el desarrollo de la ITG y la DM2.** La obesidad se acompaña de la producción del FNT- $\alpha$  y la sobreproducción de AGNE. Los AGNE se asocian con la generación de la resistencia a la insulina en hígado. El FNT- $\alpha$  se asocia con la generación de resistencia a la insulina en músculo esquelético. La resistencia a la insulina provoca alteraciones, que producen un aumento en los niveles plasmáticos de AGNE y glucosa, ambos provocan la disfunción de las células- $\beta$ , por medio de lipotoxicidad y glucotoxicidad respectivamente. La disfunción de las células- $\beta$  lleva a la ITG y después a la hiperglucemia en ayunas. FNT- $\alpha$ = factor de necrosis tumoral alfa, AGNE= ácidos grasos no esterificados.

#### 4.4 COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES TIPO 2

Complicaciones crónicas principales.

Macrovasculares:

- EAC acelerada.
- Aterosclerosis cerebrovascular acelerada.
- Vasculopatía periférica acelerada.

Microvasculares.

- Retinopatía.
- Nefropatía.

Neuropatía: periférica y autonómica.

La diabetes tipo 2 se asocia con factores de riesgo cardiovascular que incluyen hipertensión arterial, obesidad y dislipidemias caracterizadas especialmente por elevación de triglicéridos y disminución de los niveles de colesterol HDL. En las personas con diabetes las lipoproteínas HDL son el mejor predictor de EAC. Varios estudios han demostrado que el riesgo de enfermedad cardiovascular en personas con diabetes tipo 2 está aumentado entre 2-4 veces en comparación con la población general.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.5 DIABETES TIPO 2 Y ATEROSCLEROSIS

La diabetes acelera la progresión natural de la aterosclerosis a través de los mecanismos potenciales que se mencionan en el cuadro 9:

**Cuadro 9. Factores que contribuyen a la aterosclerosis en la diabetes (46).**

Dislipidemias  
Anomalías en los niveles y composición de las lipoproteínas  
Hipertensión  
Resistencia a la insulina  
Glicosilación avanzada de las proteínas plasmáticas y oxidación  
Disfunción endotelial

**Cuadro 10. Anomalías en la composición de las lipoproteínas en la diabetes tipo 2 (46).**

<b>Lipoproteína</b>	<b>Modificaciones</b>
<b>VLDL</b>	VLDL ricas en triglicéridos
<b>LDL</b>	VLDL ricas en CE Glicosilación no enzimática de las LDL LDL más susceptibles de modificación oxidativa LDL pequeñas y densas
<b>HDL</b>	Glicosilación de las HDL Disminución de las HDL <sub>2</sub>

### **METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN LA DIABETES TIPO 2**

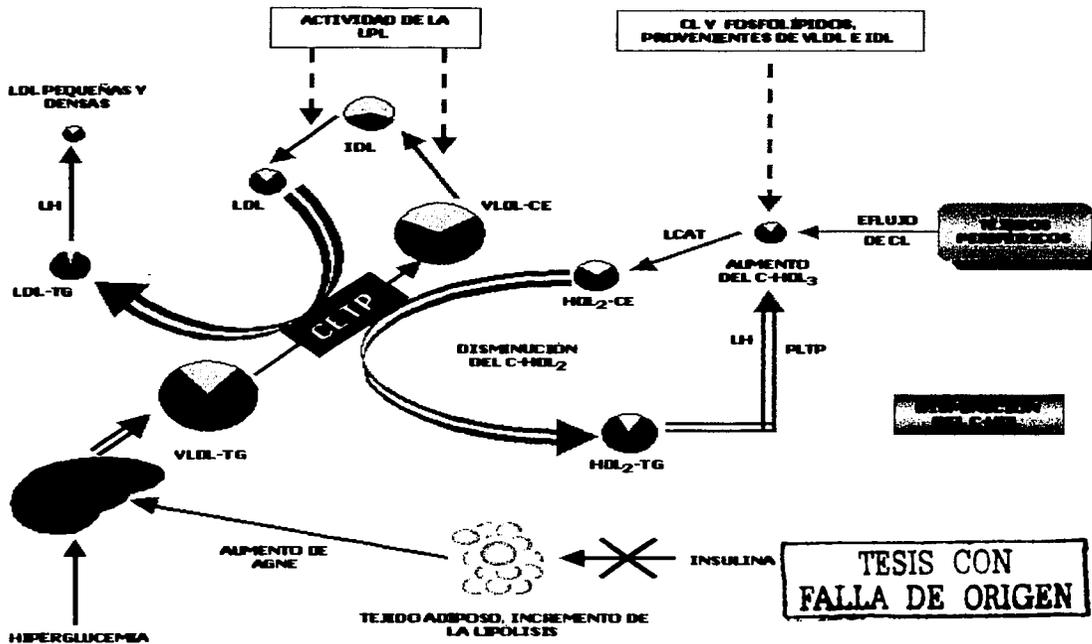
Se han descrito anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas en la DM2, que están estrechamente relacionadas con la resistencia a la insulina y con la disfunción de las células- $\beta$  del páncreas. En condiciones normales la insulina tiene las siguientes acciones importantes:

- 1) Estimula la captación de glucosa por las células periféricas.
- 2) Disminuye los niveles de ácidos grasos no esterificados (AGNE) en plasma mediante la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo.
- 3) Supresión de la producción de glucosa en el hígado.

Los AGNE que están presentes en el plasma, son principalmente el producto de la lipólisis de los TG del tejido adiposo. En las personas resistentes al efecto supresor de la insulina, la lipólisis del tejido adiposo aumenta los niveles de AGNE en plasma, lo cual incrementa el transporte de AGNE al hígado. Los niveles aumentados de glucosa circulante y AGNE (precursores de triglicéridos), actúan recíprocamente en el hígado para causar aumento en la síntesis de apo B100 y la secreción de grandes VLDL ricas en TG (47-48). Lo anterior genera hipertrigliceridemia que es la anomalía más frecuente en la DM2. De manera normal las VLDL se transforman a LDL por medio de la LPL, sin embargo, en la diabetes tipo 2 la actividad de la LPL está disminuida por alteraciones en su producción celular, así como, posiblemente su transporte y asociación con las células endoteliales. En presencia de concentraciones elevadas de VLDL en la circulación, la CETP realiza un intercambio excesivo de

TG (VLDL) por CE de las LDL y HDL. Las VLDL ricas en CE pueden ser captadas por macrófagos y células de músculo liso, generando células espumosas. La posterior interacción de las LDL con la LPL ó la LH provoca la generación de LDL pequeñas y densas que son más aterogénicas. Las LDL pueden sufrir glicosilación inespecífica no enzimática (reacción de Maillard) favoreciendo su captación por los macrófagos y aumentando su susceptibilidad a la oxidación.

Las HDL<sub>2</sub> ricas en CE que lo intercambian por TG con las VLDL, mediado por la CETP, generan HDL<sub>2</sub> ricas en TG, las cuales son convertidas en HDL<sub>3</sub> por la LH, resultando en una disminución de los niveles de HDL<sub>2</sub> ateroprotectivas. Otro contribuyente de las HDL es la transferencia realizada por la PLTP de fosfolípidos y CL, estos se transfieren a las HDL durante la lipólisis de las VLDL dependiente de la LPL, debido a lo anterior hay una lipólisis ineficaz acompañada de una disminución de las HDL.



**Figura 10. Metabolismo de las lipoproteínas en la diabetes tipo 2.**

- ➔ En el hígado, los niveles elevados de glucosa y AGNE causan la elevada producción de VLDL ricas en TG (VLDL-TG), que explica la hipertrigliceridemia presente en la DM2.

---

- ➔ Las LDL realizan un intercambio excesivo de CE por TG (procedentes de las VLDL-TG), generando LDL ricas en TG (LDL-TG) que por medio de la LH dan origen a las LDL pequeñas y densas.

---

- ➔ Las HDL<sub>3</sub> captan el CL proveniente de los tejidos periféricos, su inmediata esterificación por la LCAT produce HDL<sub>2</sub> ricas en CE que lo intercambian por TG (procedentes de las VLDL-TG) produciendo HDL<sub>2</sub> ricas en TG (HDL<sub>2</sub>-TG). Las HDL<sub>2</sub>-TG son inmediatamente convertidas en HDL<sub>3</sub>, mediante la LH y la PLTP. Todo lo anterior provoca un aumento del C-HDL<sub>3</sub>, una disminución del C-HDL<sub>2</sub> y una **disminución global del C-HDL (hipoalfalipoproteinemia)**.

---

- ➔ La línea doble indica un proceso aumentado      ➔ La línea punteada indica un proceso disminuido

## II. JUSTIFICACIÓN

---

La aterosclerosis es la principal causa de muerte en los pacientes con DM2 y guarda una relación negativa con la concentración plasmática de C-HDL. Se conoce muy bien las alteraciones de las LDL en la DM2, pero son pocos los estudios realizados sobre las subclases de las HDL así como de las proteínas involucradas en su metabolismo en población pediátrica con diversos grados de resistencia a la insulina como son los portadores de DM2, ITG y obesidad. Los mecanismos exactos por los cuales las HDL son ateroprotectivas son desconocidos.

Estudios *in vitro* han demostrado que tales funciones antiaterosclerosas dependen no solamente de la cantidad de partículas HDL sino de su estructura. En efecto, las HDL abarcan una clase heterogénea de lipoproteínas que tienen en común una densidad de flotación entre 1.063-1.21 g/mL y un tamaño de 7.2 a 12 nm. Debido a lo anterior, es importante relacionar la estructura de las HDL con su función. La electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente del 4% al 30% en condiciones nativas (PAGGE) permite separar las HDL en 5 subclases, con base en su tamaño. Por medio de este método se pueden comparar los perfiles de distribución de los tamaños en diferentes grupos de pacientes, y las alteraciones en su estructura podrían participar en la disfunción de las HDL. Por otra parte, dentro de los factores plasmáticos que afectan los tamaños de las HDL, están las proteínas -CETP, LCAT, PLTP- que participan en la remodelación de las HDL y, en consecuencia, pueden estar involucradas de manera indirecta en la distribución de sus tamaños y su funcionalidad.

### **III. HIPOTESIS**

---

- En los adolescentes con DM2, ITG y obesidad se presentaran anomalías en el metabolismo de las HDL, por lo que la distribución de las subclases de estas lipoproteínas, estarán alteradas en mayor grado en los adolescentes con DM2 sin control glucémico comparados con los sujetos con buen control glucémico y con los pacientes que se encuentran en estadios evolutivos previos a la DM2, lo que correlacionará con la actividad de las proteínas que intervienen en su remodelación (LCAT, CETP Y PLTP).

### **IV. OBJETIVOS**

---

#### **OBJETIVOS PRINCIPALES**

- Determinar la actividad LCAT, CETP y PLTP, en 4 grupos de sujetos en estudio.
- Estimar la proporción relativa de cada una de las subclases de HDL (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b y HDL 3c) en adolescentes con obesidad, ITG, y DM2 con y sin control glucémico.
- Evaluar la asociación entre las subclases (HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b y HDL 3c) y la actividad LCAT, CETP y PLTP.

#### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

- Evaluar la asociación de lípidos y lipoproteínas, y la actividad LCAT, CETP y PLTP.
- Realizar la determinación de la actividad de la PON 1 en los diferentes grupos de sujetos incluidos en el estudio.

## V. MATERIAL, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO

---

### 1) Muestra poblacional

Todos los pacientes son derechohabientes del IMSS y acuden a consulta al servicio de endocrinología pediátrica del HG CMN "La Raza". Se incluyeron 44 obesos, 15 con ITG, 25 con DM2 sin control glucémico (glucosa plasmática en ayuno  $\leq$  120 mg/dL), y 22 con DM2 con control glucémico (glucosa plasmática en ayuno  $>$  120 mg/dL). Los pacientes con DM2 fueron diagnosticados con base a los criterios propuestos por el Comité de Expertos de Clasificación y de Diagnóstico de Diabetes publicados en 1997. En todos ellos se había presentado la sintomatología clínica característica y se ha documentado hiperglucemia.

Los sujetos intolerantes a la glucosa fueron diagnosticados al presentar niveles de glucosa sérica entre 140 y 199 mg/dL a las 2 horas posteriores a una prueba de tolerancia oral a la glucosa. En estos individuos estuvo indicado la realización de esta prueba por presentar obesidad exógena, antecedentes familiares de DM2 y/o presencia de acantosis nigricans al menos en cuello. El grupo de sujetos con obesidad tuvieron las mismas características que el grupo de ITG pero con niveles de glucosa sérica  $<$  140 mg/dL a las 2 horas de una carga oral de glucosa (1.5 g/Kg de peso, sin pasar de 75 g).

### 2) Recolección de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron después de que los pacientes se encontraron en posición sedente por 20 minutos, por extracción venosa se colectaron en tubos de vidrio con Na<sub>2</sub>-EDTA (1.5 mg/mL) y tubos con gel separador, en fase postabsortiva (ayuno no menor de 12 horas). Los tubos con EDTA fueron colocados inmediatamente en hielo, mientras que los tubos sin anticoagulante fueron mantenidos a temperatura ambiente durante su transporte al INC "Ignacio Chavez" (tiempo aproximado 1 hora). Bajo estas condiciones no se altera la actividad de las enzimas y proteínas de transferencia, que se determinaron en este trabajo (Óscar A. Pérez Méndez comunicación personal). Para separar el plasma del paquete celular, se centrifugó la muestra durante 15 min a 3500 rpm. La determinación del perfil de lípidos, glucosa y las subclases de HDL se realizaron a partir de

muestras frescas de plasma. Posteriormente, se hicieron alícuotas del plasma y suero, y se refrigeraron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Dos alícuotas de  $200\text{ }\mu\text{L}$  se utilizaron para la determinación de la actividad de CETP, PLTP, LCAT y PON 1.

### **3) Análisis de laboratorio**

El colesterol total, TG, C-HDL (las concentraciones se expresan en mg/dL), se determinaron mediante métodos enzimáticos y colorimétricos (Boehringer-Mannheim, Alemania) en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez". El C-HDL fue determinado en el sobrenadante después de precipitar las Lp que contienen apo B con una solución precipitante de sulfato de dextran/magnesio (CIBA-CORNING). El colesterol LDL es calculado mediante la ecuación de Friedewald:

$$\text{CLDL} = \text{Colesterol total} - \text{CHDL} - (\text{Triglicéridos plasmáticos}/5)$$

Los coeficientes de variación de estos métodos son menores del 4%. Además, se consideraron para el estudio la talla, peso, y edad de cada sujeto

### **4) Determinación de las subclases de HDL por PAGGE**

La determinación de las subclases se determinó de acuerdo al método descrito por Blanche PJ, *et al* (49), con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

El plasma obtenido ( $1.5\text{ mL}$ ) se ajusta a una densidad  $=1.063\text{ g/mL}$  con solución de KBr con densidad  $=1.34\text{ g/mL}$  y se somete a una ultracentrifugación a  $110\ 000\text{ rpm}$  durante  $2\text{ h }16\text{ min}$ . En esta parte primeramente se aislaron las Lp que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL). El remanente de plasma se ajustó a una densidad  $=1.210\text{ g/mL}$  con KBr sólido y se sometió a ultracentrifugación a  $110\ 000\text{ rpm}$  por  $2\text{ h }35\text{ min}$ . En esta parte se separaron las HDL, sin contaminación de Lp con apo B, obteniéndose del 80% al 85% de la apo AI del total del plasma de las fracciones de HDL, según se verificó por electroforesis PAGE SDS anexo 2 B(50).

Después de llevar a cabo la separación de las HDL por ultracentrifugación, se realizó una diálisis intensa con una solución amortiguadora de TBE (Tris  $0.09\text{ M}$ –Borato  $0.08\text{ M}$ –EDTA  $3\text{ mM}$ ,  $\text{pH}=8.35$ , anexo 10), posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida no desnatu-

ralizante con un gradiente del 4% al 30%, usando como marcadores de radio de Stokes, proteínas globulares (Tiroglobulina 17.0 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.1 nm y albúmina 7.1 nm, Pharmacia, Uppsala, Suecia; ver anexo 2 A). Previamente se cuantificó la cantidad de proteína (Método de Lowry, anexo 11) para establecer la cantidad de muestra equivalente a 20  $\mu\text{g}$  de proteína. A esta cantidad se le adicionó amortiguador de muestra (sacarosa-azul de bromofenol en solución amortiguadora de TBE, 1  $\mu\text{L}/10 \mu\text{g}$  de proteína) y se depositó en cada pozo de un gel, al que se le había aplicado una precorrida a 20 volts por 15 min para equilibrar el gel con la solución amortiguadora de TBE. Después el gel se corrió a 70 volts por 15 min para concentrar la muestra y, por último, se corrió durante 20 h a 165 volts. Al final de ese tiempo se detuvo la electroforesis y para visualizar las bandas de proteína de HDL y marcadores se realizó una tinción con azul Coomassie (Bio-Rad R-250) que se sometió a un análisis por densitometría (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad), para determinar los radios de Stokes de las HDL.

#### **5) Determinación de la actividad LCAT método radiactivo. Procedimiento de incubación empleando proteoliposomas como sustrato: reacción LCAT**

La determinación de las subclases se realizó de acuerdo al método descrito por Chen C y Albers JJ (51), con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

A un tubo de ensaye se le adicionó buffer 235  $\mu\text{L}$  Tris-HCl, 125  $\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 2% (w/v, Sigma Chemical St, Louis MO) y 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de proteoliposomas con colesterol- $[\text{}^3\text{H}]$ . Se realizó una preincubación a 37°C y se adicionaron 15  $\mu\text{L}$  del plasma problema con el fin de llevar a cabo la reacción de esterificación de la LCAT. Se dejó incubar la reacción por 1 hora exactamente a 37°C, deteniéndola por adición de 3.75 mL de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 1:2 (v/v) con 4  $\mu\text{L}$  de estándares de colesterol libre (cholesterol; Sigma, St. Louis MO) y colesterol esterificado 1 mg/mL (Cholesteryl myristate; Sigma, St. Louis MO), respectivamente. Se realizó una extracción posterior agregando 1.25 mL de  $\text{CHCl}_3$  a la fase orgánica y con 1.25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  a la fase acuosa con el fin de realizar una extracción más cuantitativa de colesterol esterificado y no esterificado. La fase acuosa se desechó, mientras que el disolvente de la fase orgánica se evaporó con  $\text{N}_2$  hasta concentrar el colesterol total (esterificado y no esterificado) en un volumen mínimo.

Se llevó a cabo la separación y cuantificación del colesterol marcado mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice sobre poliéster cubiertas (Aldrich, Milwaukee WI) y empleando como eluyente éter de petróleo, éter etílico y ácido acético en proporción 90:10:5. La placa se reveló utilizando yodo sublimado ( $I_2$ ) como cromógeno, para la identificación del colesterol esterificado y no esterificado de las muestras al compararlas con los estándares ( $R_f$  de 0.15 y 0.8 respectivamente).

Estas manchas fueron recortadas y raspadas, introduciendo su contenido en viales, adicionando 4 mL de líquido de centelleo (CytoScint, ICN Costa Mesa, CA) para su lectura en el contador de radiación beta (Liquid Scintillation Analyzer TRI- CARB 2200CA, Packard), el cuál detecta las cuentas por minuto (cpm) como medida de radioactividad, siendo proporcionales a la cantidad de colesterol libre ó colesterol esterificado presente en cada muestra problema. A partir de estos datos se calculó el porcentaje de colesterol esterificado y la actividad de la enzima en nanomoles de colesterol esterificado por mililitro de plasma en una hora de reacción.

#### **6) Determinación de la actividad CETP método radiactivo**

La actividad CETP se determinó de acuerdo al método descrito por Tollefson JH et al (52), con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

#### **Transferencia CETP**

En un tubo de plástico desechable de fondo cónico de 1.5 mL, se colocan 3  $\mu$ L de donador (HDL<sub>3</sub>-<sup>3</sup>H) equivalente a 10,000 dpm (aproximadamente 120  $\mu$ g de proteína), se agregaron 100  $\mu$ L de aceptor (VLDL, LDL), equivalente a 240  $\mu$ g proteína. La mezcla tuvo una proporción 1:2, donador-aceptor. Se agregaron 10  $\mu$ L del plasma problema, 500  $\mu$ L de solución amortiguadora Tris y se mezcló suavemente. Para el blanco se agregó lo mismo excepto el plasma y todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Se incubó a 37 °C por 16 h. Después de la incubación se tomaron 100  $\mu$ L de la mezcla, al restante se agrega 50  $\mu$ L de reactivo precipitante. Las Lp LDL y VLDL fueron precipitadas con sulfato de dextrana y sulfato de magnesio, permaneciendo en el sobrenadante las HDL, posteriormente se centrifuga después de 5 min a 2500 rpm 10 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L, ambas alícuotas se colocan en frasco de vidrio por separado, se les agregaron 4 mL de líquido de centello, para su posterior lectura en el contador de cente-

ileo. Los resultados se expresan como el porcentaje de radiactividad transferida a la fracción precipitada.

$$\text{Tasa de transferencia en \%} = \frac{(\text{cpm fracción precipitada} - \text{cpm blanco}) (100)}{\text{cpm total}}$$

### 7) Determinación de la actividad PLTP

Esta técnica permite definir la actividad de la PLTP, que es responsable de transferir los fosfolípidos entre Lp. Determinación de la actividad PLTP; transferencia de fosfatidilcolina-marcada con tritio de liposomas unilaminares (Anexo 8) a las HDL (53).

**Radiactividad Total;** se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de liposomas marcados, 690  $\mu\text{L}$  de TBS y se midió la radiactividad en 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla (después de precipitar los liposomas con heparanato de magnesio).

**Muestras;** Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de liposomas marcados, 30  $\mu\text{L}$  de muestra (plasma) y 40  $\mu\text{L}$  de ácido iodoacético, se agitó e incubó 30 min a 37°C. Para parar la reacción se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de heparanato de manganeso (445 UI/ mL), 320  $\mu\text{L}$  de TBS, se agitó en vortex durante 10 min, se centrifugó 10 min a 13 000 rpm y se colocaron los tubos en hielo antes de medir la radiactividad en 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla.

**Blanco;** Se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de liposomas marcados, 30  $\mu\text{L}$  de muestra de plasma, 40  $\mu\text{L}$  de ácido iodoacético, se agita y se incuba por 30 minutos a 4 °C. Luego se detuvo la reacción, se agrega 300  $\mu\text{L}$  de heparanato de manganeso (445 UI/ mL), 320  $\mu\text{L}$  de TBS, se agito en vortex durante 10 minutos, se centrifugó 10 min a 13 000 rpm, se colocaron los tubos en hielo y se cuantificó la radiactividad en 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla.

Para calcular la tasa de transferencia en % se empleo la relación

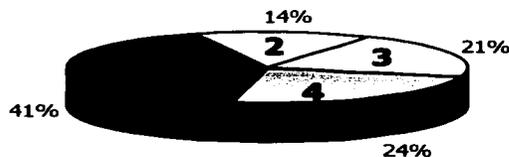
$$\text{Tasa de transferencia en \%} = \frac{(\text{cpm muestra} - \text{cpm blanco}) (100)}{\text{cpm total}}$$

### **Estimación de la actividad ARE**

La actividad aril-estearasa se determina utilizando fenilacetato como sustrato. La hidrólisis del sustrato libera fenol fue determinado espectrofotometricamente a 270 nm. La mezcla de reacción incluyó 1.00 mmol/L de fenilacetato y 0.9 mM  $\text{CaCl}_2$  en 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 a 25 °C. La cinética de la reacción fue medida en un intervalo de 3 minutos. El coeficiente de extinción molar a 270 nm empleado para el fenol fue  $1310 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La unidad de la actividad aril-estearasa es equivalente a 1  $\mu\text{mol}$  de fenilacetato hidrolizado por minuto por mL de suero **(54)**.

## VI. RESULTADOS

El estudio se realizó con 106 pacientes adolescentes de los cuales 44 son obesos, 15 ITG y 47 con DM2. Con base en su nivel de glucosa en ayuno, el grupo de DM2 se separó en sujetos con control glucémico (glucosa de ayuno  $\leq 120$  mg/dL, n=22) y sujetos sin control glucémico (glucosa de ayuno  $>120$  mg/dL, n=25).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Figura 11. Distribución de los grupos de la población estudiada. 1** Obesidad, **2** ITG, **3** DM2 con control glucémico y **4** DM2 sin control glucémico.

Los promedios de las edades así como las características antropométricas de los grupos anteriores se presenta en la tabla 1.

	OBESIDAD	INTOLERANCIA A LA GLUCOSA	DIABETES TIPO 2	
			CON CONTROL	SIN CONTROL
<b>N</b>	44	15	22	25
<b>SEXO F/M</b>	27/17	6/9	11/11	16/9
<b>EDAD (Años)</b>	11.48 $\pm$ 2.67	12.13 $\pm$ 2.83	13.09 $\pm$ 2.49 *	14.00 $\pm$ 2.00 * †
<b>PESO (Kg)</b>	71.11 $\pm$ 18.93	69.47 $\pm$ 24.83	69.45 $\pm$ 17.68	63.96 $\pm$ 13.38
<b>ESTATURA (cm)</b>	152.92 $\pm$ 14.67	152.13 $\pm$ 15.46	156.68 $\pm$ 12.98	156.52 $\pm$ 10.59
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29.86 $\pm$ 4.57	28.91 $\pm$ 5.73	28.05 $\pm$ 5.85	27.39 $\pm$ 7.53

**Tabla 1. Edades y características antropométricas de los pacientes incluidos en el estudio.**

Los valores expresan la media  $\pm$  D.E. \*  $p < 0.05$  vs Obesidad, †  $p < 0.05$  vs ITG. IMC: índice de masa corporal (peso/talla<sup>2</sup>). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA y la prueba LSD (least significant difference).

La mayoría de pacientes de los 4 grupos cursaban con obesidad (IMC > percentil 95 ajustado por la edad y sexo del sujeto, ver anexo 12). La edad promedio de los pacientes con DM2 sin control fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) a la de los pacientes obesos y a la de los sujetos con ITG (Tabla 1). Asimismo los pacientes diabéticos con control glucémico son en promedio significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los pacientes obesos (Tabla 1). Debido a que existen diferencias estadísticas significativas en la edad y a que el perfil de lípidos está fuertemente ligado a esta variable, los análisis estadísticos consecutivos se realizaron ajustando los valores según la edad.

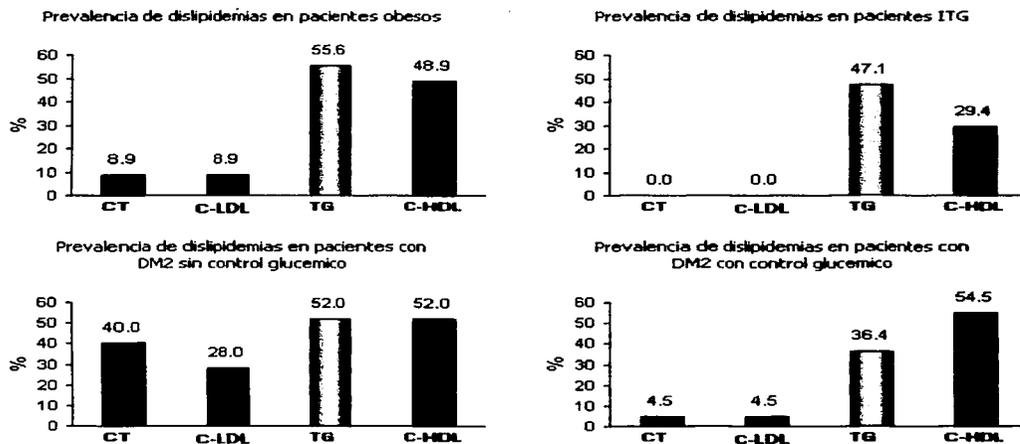
**Tabla 2. Características bioquímicas e índices aterogénicos de los pacientes incluidos en el estudio.**

	OBESIDAD	INTOLERANCIA A LA GLUCOSA	DIABETES TIPO 2	
			CON CONTROL	SIN CONTROL
<b>N</b>	44	15	22	25
<b>CT</b> (mg/dL)	155.8±35.5	157.2±34.4	151.6±34.5	183.0±35.8 *
<b>C-HDL</b> (mg/dL)	35.9±8.9	39.3±8.6	36.8±8.7	37.1±9.0
<b>TG</b> (mg/dL)	149.6±7.2	126.5±4.5	120.5±5.3	148.6±5.6
<b>TG/C-HDL</b>	5.2±3.7	4.1±3.6	4.3±3.6	5.4±3.7
<b>C-LDL</b> (mg/dL)	91.9±28.1	94.7±27.2	92.4±27.3	117.0±28.3 *
<b>CT/C-HDL</b>	4.5±1.41	4.1±1.37	4.3±1.37	5.3±1.42 *
<b>C-LDL/C-HDL</b>	2.7±1.1	2.5±1.0	2.7±1.0	3.4±1.1 *
<b>GLUCOSA</b> (mg/dL)	94.4±50.9	92.8±49.3	97.6±49.5	230.0±51.3 *

Los valores expresan la media ± D.E. \*  $p < 0.05$  vs Obesidad, ITG y DM2 con control glucémico. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba de ANCOVA ajustando por edad y la prueba LSD. Valores de referencia población normal CT <200 mg/dL, C-LDL <130 mg/dL, TG <130 mg/dL (**55**) y C-HDL >36 mg/dL (**56**).

Los pacientes con DM2 sin control glucémico presentaron un perfil de lípidos más aterogénico con respecto a los otros 3 grupos, caracterizado por colesterol total (CT) y C-LDL significativamente más elevados (Tabla 2). En los valores de TG y el C-HDL se observa que no hay diferencias entre los grupos y, en consecuencia, la relación TG/C-HDL no muestra diferencias. Las relaciones CT/C-

HDL y C-LDL/C-HDL son indicativas de un mayor riesgo a desarrollar aterosclerosis, entre más grande sea este valor numérico mayor es el riesgo. De acuerdo con lo anterior, los pacientes con diabetes tipo 2 sin control glucémico son los que presentan el mayor riesgo lipídico de desarrollar aterosclerosis con índices CT/C-HDL y C-LDL/C-HDL significativamente mayores respecto a los otros grupos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 12. Prevalencia de dislipidemias de cada uno de los grupos de estudio, (CT > 200 mg/dL, C-LDL > 130 mg/dL, TG > 130 mg/dL y C-HDL < 36 mg/dL).**

Por otra parte, los adolescentes con DM2 sin control glucémico presentaron una mayor prevalencia de dislipidemias, seguidos por el grupo de pacientes obesos (Figura 12). En este sentido, la hipertrigliceridemia y la hipoalfalipoproteinemia fueron las principales dislipidemias de la DM2 sin control glucémico. La frecuencia de pacientes con niveles de C-HDL bajos fue similar en pacientes diabéticos con y sin control glucémico.

Debido a que el grupo de diabéticos se dividió en controlados y no controlados con base en sus niveles de glucosa plasmática en ayuno, la glucosa plasmática en los pacientes con DM2 sin control fue mayor que en los demás grupos, con una media de 230.0 mg/dL.

Con lo que respecta a las determinaciones realizadas en las enzimas y proteínas de transferencia involucradas en el metabolismo de las HDL, los resultados se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Enzimas y proteínas de transferencia asociadas a las HDL, de los 4 grupos de adolescentes estudiados.**

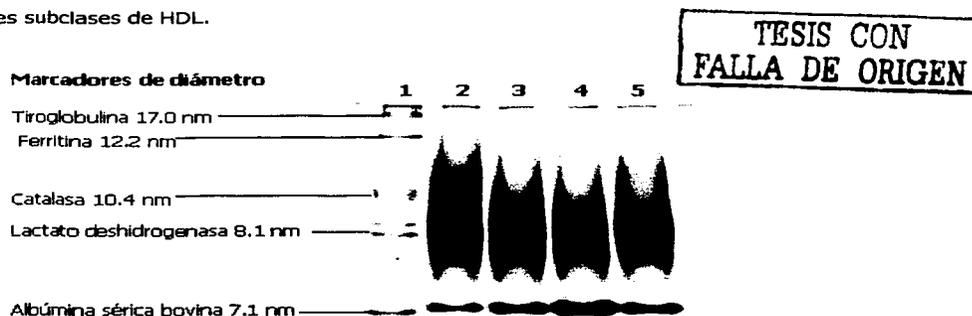
	OBESIDAD	INTOLERANCIA A LA GLUCOSA	DIABETES TIPO 2	
			CON CONTROL	SIN CONTROL
<b>N</b>	44	15	22	25
<b>CETP</b> % transferencia	34.85±8.46	31.30±8.22	36.14±8.27	32.78±8.50
<b>PLTP</b> % transferencia	26.04±11.40	44.58±11.42 ‡	17.42±11.40 †	27.77±11.44 §
<b>LCAT</b> % esterificación	11.43±6.86	12.56±4.23 *	10.19±5.04	9.70±5.39
nmol de CE/h/L	87.70±6.80	96.16±4.22 *	77.98±5.02	74.30±5.39
<b>CETP/LCAT</b>	3.15±1.33	2.58±1.3	3.72±1.30 ☉	3.77±1.34 ☉
<b>HDL 2/HDL 3</b>	0.287±0.16	0.353±0.15 § *	0.167±0.16 †	0.200±0.17 †
<b>PON 1</b> Actividad ARE	117.58±36.43 N=26	123.52±58.94 N=12	125.19±65.35 N=18	106.61±56.56 N=16

Los valores expresan la media ± D.E. \* p<0.05 vs DM2 sin control, ☉ p<0.05 vs ITG, † p<0.05 vs Obesidad, § p<0.05 vs DM2 con control, ‡ p<0.05 vs Obesidad, Diabetes tipo 2 controlada y sin control. El análisis estadístico se realizó utilizando ANCOVA ajustando por la edad y la prueba LSD. El cociente HDL 2/HDL 3, se obtuvo de la suma de las subclases HDL 2b + HDL 2a dividido entre la suma de las subclases HDL 3a + HDL 3b + HDL 3c. Para los parámetros de esta tabla no se cuenta aún con valores de referencia.

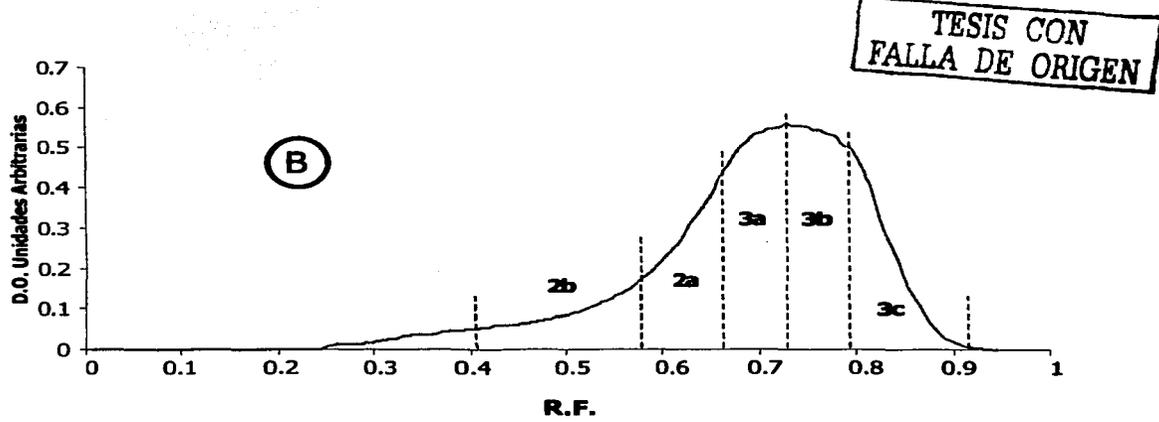
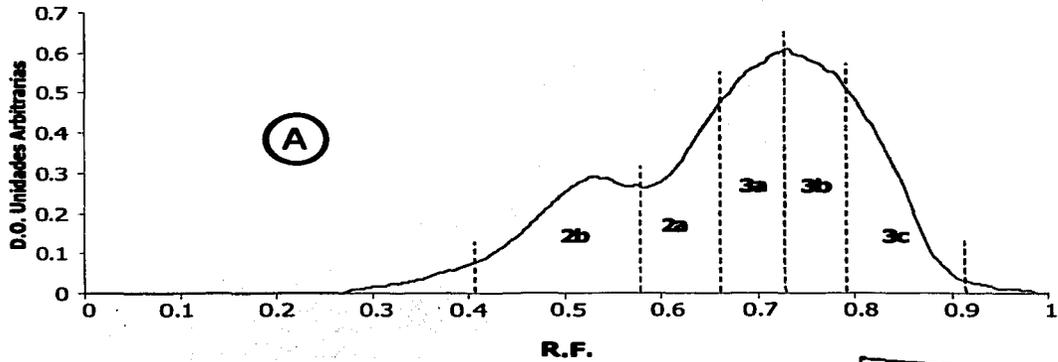
La actividad de la CETP expresada como tasa de transferencia (%) fue semejante entre los grupos. Los pacientes con ITG tuvieron una actividad significativamente mayor de PLTP comparados con los otros 3 grupos. Por otro lado el grupo de DM2 sin control tuvo menor actividad LCAT, alcanzando significado estadístico sólo en la comparación con el grupo de ITG (Tabla 3).

La enzima PON 1 está asociada físicamente a las HDL y se relaciona con la inhibición a la oxidación de las LDL y se ha propuesto que solamente se encuentra en la fracción HDL<sub>3</sub>. Debido a lo anterior, se realizó la determinación de la actividad ARE, en algunas muestras de suero en los pacientes, ya que es directamente proporcional a la masa de la enzima PON 1 presente en la muestra. Observamos una tendencia hacia menor actividad ARE en los pacientes con DM2 sin control, sin embargo, la diferencia no alcanzó significado estadístico (Tabla 3).

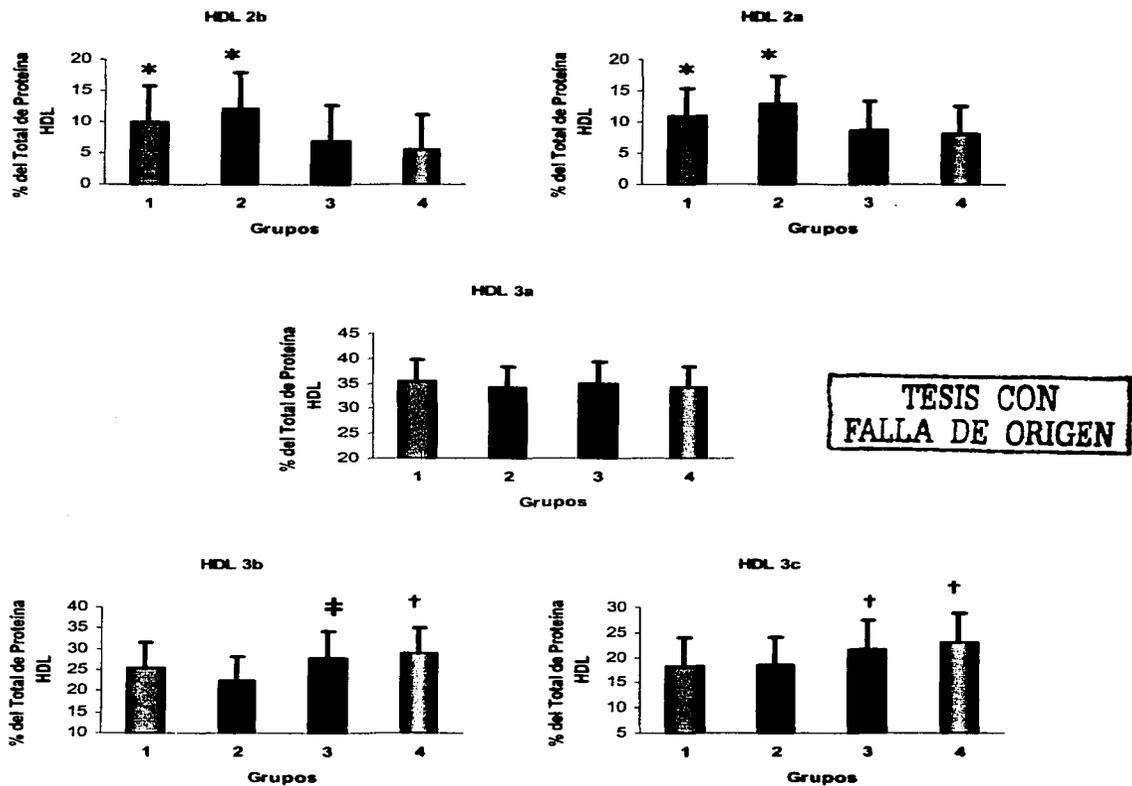
Una vez que los cuatro grupos de pacientes fueron caracterizados en su perfil de lípidos, la actividad de proteínas que intervienen en la remodelación de las HDL, así como la actividad PON 1, procedimos a determinar la proporción relativa de cada una de las subclases HDL según se describe en la sección de métodos. En la figura 13 se muestra un gel representativo de la determinación de las subclases de HDL obtenidas mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida con un gradiente 4%-30% en condiciones no reductoras. El perfil densitométrico de geles como el mostrado en la figura 13 se muestra en la figura 14, en la que se señala la posición que corresponde a cada una de las diferentes subclases de HDL.



**Figura 13.** Gel de poliacrilamida con un gradiente 4%-30%; el carril 1) es de marcadores de radio de Stokes y los carriles 2-5 son de muestras de HDL aisladas por UCF secuencial diferencial; 2) ITG, 3) DMT2 sin control glucémico, 4) DMT2 con control glucémico y 5) Obesidad. Las proteínas se tiñen con azul de coomasie, la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de proteína. La proporción relativa de una subclase depende de la cantidad en que se encuentra así como de la cantidad de proteína que posee.



**Figura 14 . Perfiles densitométricos representativos de la distribución de tamaños de las HDL obtenido mediante PAGGE. A) Perfil de distribución de tamaños de HDL en pacientes obesos y con ITG. B) Perfil de distribución de tamaños de HDL en pacientes con diabetes tipo 2. La posición de las regiones correspondientes a las subclases de HDL se muestra con las franjas 2b, 2a, 3a , 3b y 3c. El perfil de los pacientes con ITG es muy semejante al de los obesos sólo se muestra el de estos últimos.**



**Figura 15. Distribuciones de las subclases de HDL.** 1 Obesidad, 2 ITG, 3 DM2 sin control y DM2 con control glucémico. \*  $p < 0.05$  vs Diabetes tipo 2 controlada y sin control, †  $p < 0.05$  vs obesidad e ITG, ‡  $p < 0.05$  vs ITG, las barras representan la media  $\pm$  D.E.

A partir de la metodología anterior caracterizamos cada una de las subclases de HDL de los sujetos incluidos en el estudio. En la figura 15 están representados los valores relativos promedio de cada una de las subclases de HDL en los diferentes grupos de sujetos. Observamos que los pacientes

diabéticos independientemente de tener o no control glucémico mostraron una mayor proporción de las subclases HDL 3b y HDL 3c en detrimento de las subclases HDL 2b y 2a. En otras palabras, la condición fisiopatológica de DM2 se asoció a un incremento de la proporción relativa de partículas HDL pequeñas en detrimento de las HDL grandes. Esta situación se presentó simultáneamente con disminución en la actividad de LCAT y PLTP en los pacientes con DM2 (tabla 3) respecto a lo que se encuentra en la etapa previa de la enfermedad (ITG). Las observaciones anteriores sugieren diferentes procesos de remodelación de las HDL en función de la etapa de desarrollo de la DM2 en la que se encuentran los pacientes. Para obtener más indicios al respecto, realizamos un estudio de correlación simple entre las proporciones relativas de las subclases de HDL y las actividades de la proteína y enzimas que intervienen en la remodelación de las HDL. Los resultados de este análisis se presentan en la tabla 4 y la figura 16.

**Tabla 4. Coeficientes de correlación lineal entre las subclases de HDL y las proteínas involucradas en su metabolismo.**

	GRUPO	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
<b>CETP</b>	Todos	r=-0.290 **	r=-0.394 **	r=-0.062	r=0.337 **	r=0.276 **
	1	r=-0.360 *	r=-0.454 **	r=-0.131	r=-0.430 **	r=0.339 *
	2	r=-0.647 **	r=-0.693 **	r=-0.027	r=0.713 **	r=0.534 *
	3	r=0.201	r=-0.071	r=-0.190	r=-0.030	r=0.002
	4	r=0.308	r=0.130	r=0.464 *	r=-0.333	r=-0.383
<b>PLTP</b>	Todos	r=-0.027	r=-0.128	r=-0.226	r=0.194	r=0.023
	1	r=-0.090	r=-0.116	r=-0.599 **	r=0.281	r=0.135
	2	r=0.384	r=0.243	r=-0.207	r=-0.243	r=-0.488
	3	r=-0.579 *	r=-0.664 **	r=-0.170	r=0.684 **	r=0.526 *
	4	r=-0.420	r=-0.281	r=-0.067	r=0.538 *	r=0.064
<b>LCAT</b>	Todos	r=-0.059	r=0.035	r=0.069	r=-0.003	r=-0.015
	1	r=-0.174	r=0.011	r=0.178	r=0.085	r=-0.058
	2	r=0.239	r=0.151	r=-0.411	r=-0.066	r=0.128
	3	r=-0.174	r=-0.162	r=0.008	r=0.128	r=0.157
	4	r=-0.297	r=-0.070	r=0.175	r=0.009	r=0.190
<b>PON 1 actividad ARE</b>	Todos	r=-0.083	r=-0.135	r=-0.052	r=0.139	r=0.082
	1	r=-0.236	r=-0.004	r=-0.007	r=0.206	r=0.045
	2	r=-0.582 *	r=-0.578 *	r=0.329	r=0.603 *	r=0.598 *
	3	r=-0.049	r=-0.372	r=-0.273	r=0.150	r=0.358
	4	r=0.307	r=0.012	r=-0.030	r=-0.044	r=-0.254

1 Obesidad, 2 ITG, 3 DM2 sin control y 4 DM2 con control glucémico. \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01

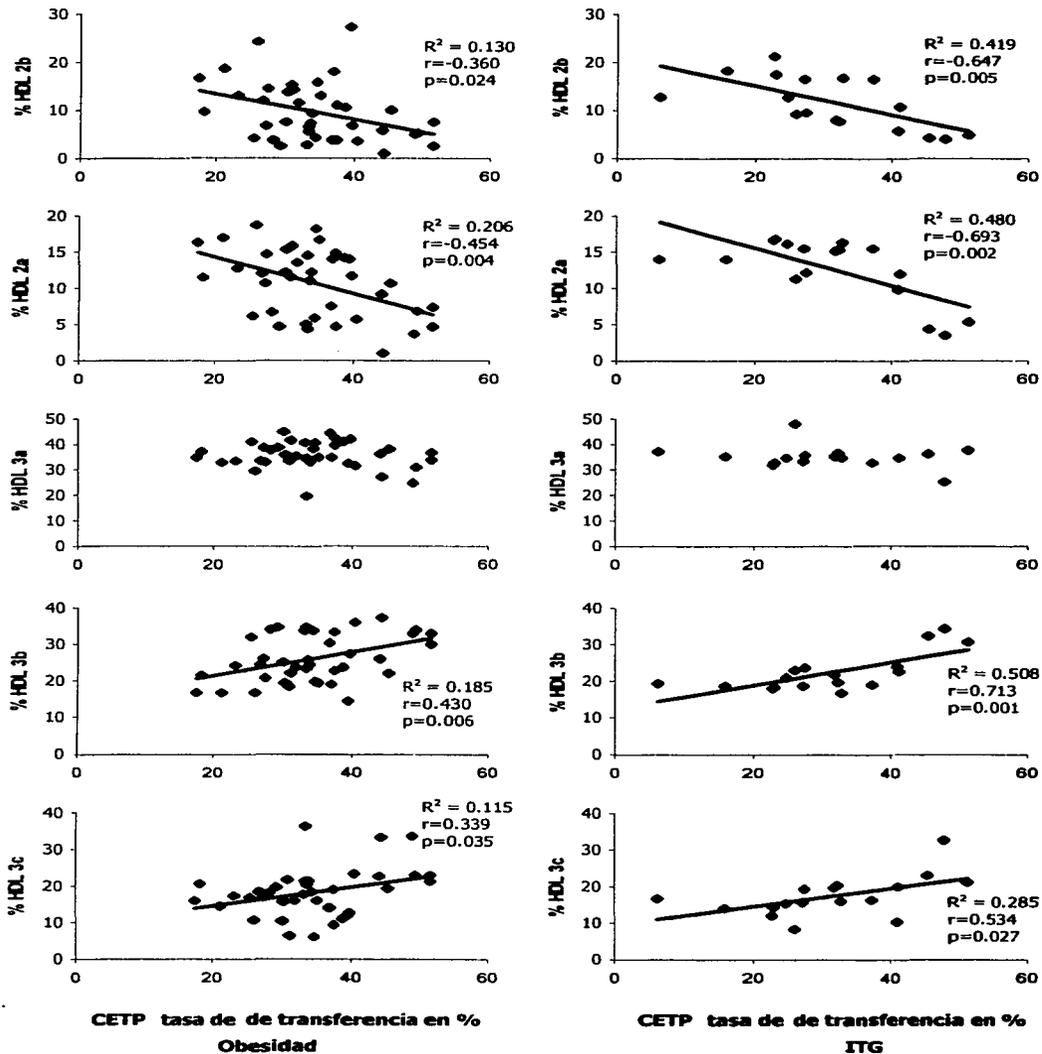
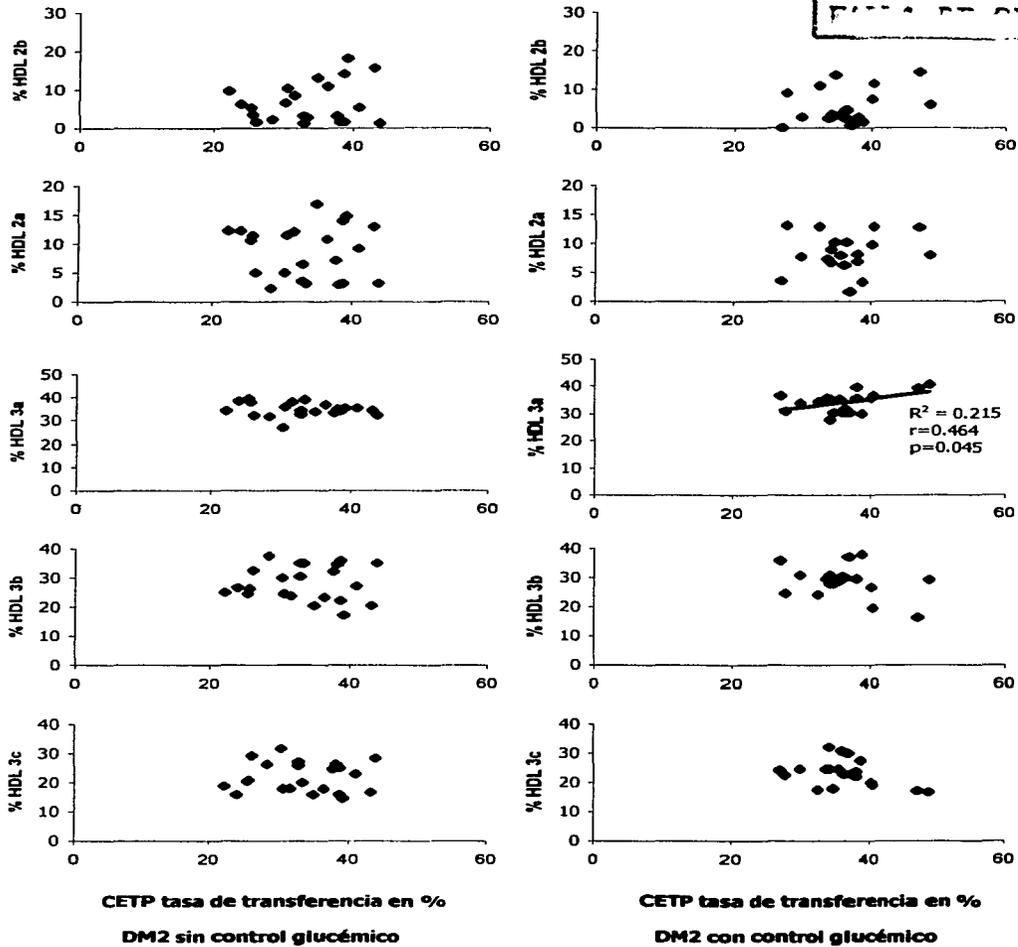


Figura 16. Correlaciones de las subclases de HDL y la actividad de la CETP.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FAMILIA DE ORIGEN**



**Figura 16. Correlaciones de las subclases de HDL y la actividad de la CETP (% de transferencia).  
Continuación.**

Cuando se analizó el total de los individuos incluidos en el estudio, se observó que la CETP fue el factor de remodelación que correlacionó con los tamaños de HDL, sugiriendo que es factor determinante de la distribución de tamaños de HDL en las poblaciones estudiadas. Esta observación se confirma en los obesos y los ITG (Tabla 4 y figura 16). Sin embargo, tal correlación entre la actividad CETP y la distribución de tamaños HDL no se presentó en los sujetos con diabetes tipo 2, independientemente del control glucémico (grupos 3 y 4, tabla 4 y figura 16). Adicionalmente, se observó una asociación importante entre la distribución de tamaños HDL y la actividad PLTP en los pacientes diabéticos con y sin control glucémico (Tabla 4).

## VII. DISCUSIÓN

---

La diabetes mellitus es un importante problema de salud a nivel mundial y la principal causa de muerte en nuestro país (57), siendo la diabetes tipo 2 su forma clínica más prevalente. En este sentido, se estima que la DM2 representa el 90% de todos los diabéticos del mundo occidental. En otro tiempo la DM2 era considerada estrictamente una patología metabólica de los adultos, sin embargo, en la última década su frecuencia ha mostrado un incremento muy importante entre los niños y adolescentes, especialmente Hispano/latinoamericanos, Africano-americanos, Americanos nativos e Isleños del pacífico. Esta epidemia emergente se ha asociado con las crecientes tasas de obesidad, definida como un incremento excesivo de grasa corporal (58-59).

El IMC ofrece una buena estimación indirecta de la grasa corporal y, en consecuencia, del nivel de obesidad. Presenta un bajo costo, y ha sido validado por diversos estudios que demuestran un aumento en la mortalidad en sujetos con valores del índice por arriba de ciertos puntos de corte. Para la población mexicana, de acuerdo al Consenso Nacional de Obesidad, se debe considerar como adulto obeso a todo sujeto con un IMC  $\geq 27$  Kg/m<sup>2</sup> y con un IMC  $\geq 25$  Kg/m<sup>2</sup> para menores de 1.64 m en hombres y 1.51 m en mujeres se define como obesidad (60). En población pediátrica, la obesidad se define como el IMC > percentil 95 ajustado para edad y sexo. La mayoría de los 4 grupos presentan un IMC > percentil 95 ajustado para edad y sexo, es decir en ellos predomina la obesidad que está muy asociada con la patogénesis de la diabetes tipo 2. En efecto, la DM2 es la etapa final de un proceso fisiopatológico de larga duración denominado síndrome metabólico. El síndrome metabólico comienza con una resistencia a la insulina, principalmente, por parte del tejido muscular, adiposo y hepático. Para compensar la resistencia a la insulina, el páncreas sintetiza más hormona que resulta en poco tiempo en hiperinsulinemia. El exceso de insulina, por ser una hormona anabólica, favorece una excesiva ganancia de peso y está a su vez favorece la resistencia a la insulina, creando así un círculo vicioso entre obesidad y resistencia a la insulina. La historia de la enfermedad continua con una etapa de ITG antes de que aparezca la hiperglucemia en ayunas por agotamiento de la reserva de insulina de las células de los islotes pancreáticos. Se distinguen en-

tonces 3 etapas fundamentales en la génesis de la DM2: resistencia a la insulina/obesidad, intolerancia a la glucosa y finalmente la DM2. Cada una de la etapas evolutivas de la enfermedad están comprendidas en el diseño de nuestro estudio.

Además, la DM2 es causa de dislipidemias y es un factor de riesgo de desarrollar EAC. Sin embargo, cuando aparece en edad adulta, otras causas de dislipidemias y otros factores de riesgo se asocian, tales como tabaquismo, alcoholismo, sedentarismo, hábitos alimentarios poco flexibles, estrés, hipertensión arterial, enfermedades e infecciones concomitantes, políngesta de fármacos, etc. En consecuencia, evaluar el efecto exclusivamente debido a la resistencia a la insulina/DM2 sobre el metabolismo de las HDL se convierte en una tarea casi imposible. En este sentido, el adolescente con resistencia a la insulina/DM2 resulta ser un modelo de estudio más apropiado porque varias de las causas de dislipidemias antes citadas aun no están presentes en ellos. Por esta razón, nuestro estudio fue concebido con adolescentes como grupo modelo y no en adultos.

Dentro de los factores más importantes que predisponen a los adolescentes a desarrollar DM2 está la edad **(61)**: se ha reportado que el promedio de edad en los pacientes con diabetes tipo 2 es de 13.5 años al momento del diagnóstico, lo que coincide con el pico del crecimiento y desarrollo de la pubertad. Se ha documentado que durante la pubertad se presenta un período transitorio de resistencia a la insulina, normalmente con un aumento de 2 a 3 veces del pico de respuesta a la insulina a administraciones orales o intravenosas de glucosa y, para quienes padecen diabetes tipo 1, un aumento importante en la dosis de insulina. En nuestro estudio el promedio de los pacientes con diabetes tipo 2 es de 13.6 años lo cuál concuerda con lo reportado en otros estudios **(45)**.

Las características bioquímicas del paciente diabético adulto son hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hiperinsulinemia. Debido a que los niveles de lípidos son dependientes de la edad y a que, en nuestro estudio, hubo una ligera diferencia en la misma entre los grupos, se ajustaron sus valores según esta variable para eliminar su efecto. Aunque no todos los pacientes con DM2 van a presentar dislipidemias (consideradas como las alteraciones cuantitativas del perfil de lípidos y lipoproteínas); en el "San Antonio Heart Study", más del 60% de los pacientes con DM2 presentaban dislipidemia, en comparación con menos del 25% de los no diabéticos **(62)**. Nuestros

resultados muestran que los pacientes del grupo DM2 sin control glucémico poseen, en efecto, los valores promedio más altos de CT y C-LDL plasmáticos en comparación con los otros tres grupos. Cuando el CT se eleva generalmente es por elevación del C-LDL que es considerado la forma más aterogénica del colesterol presente en el plasma, debido a que las LDL están directamente relacionadas con la formación de la placa aterosclerótica. Valores elevados de C-LDL coinciden con un aumento en la incidencia de EAC. En los sujetos con DM2, aún en la presencia de niveles normales de C-LDL, la aterogenicidad de estas Lp es mayor por el predominio del fenotipo B de las subclases de LDL. Este fenotipo se caracteriza por un tamaño menor (< 25.5 nm), mayor densidad y un mayor potencial aterogénico por los siguientes mecanismos **(63)**.

- Entran con mayor facilidad por la pared arterial
- Son más tóxicas para las células endoteliales
- Son más susceptibles a la oxidación
- Aumentan la producción del inhibidor del activador de plasminógeno 1 en las células endoteliales, generando un estado procoagulante que favorece la trombosis
- El receptor LDL presenta una afinidad menor por las LDL pequeñas y densas, por lo que permanecen más tiempo en circulación
- Los receptores SR-AI/AII presentan una mayor afinidad por las LDL pequeñas y densas

Niveles elevados de glucosa en plasma, característico de la diabetes tipo 2 sin control glucémico promueven la glicosilación inespecífica no enzimática de las proteínas plasmáticas. La glicosilación de las LDL pequeñas y densas aumenta su oxidabilidad, y disminuye la afinidad del receptor LDL por ellas **(64)**. Todo lo anterior nos indica que en la diabetes tipo 2 sin control glucémico las LDL presentan una aterogenicidad muy grande, el mayor riesgo de aterosclerosis concuerda con los mayores valores numéricos de las relaciones de CT/C-HDL y C-LDL/C-HDL.

El fenotipo B de las LDL está asociado a concentraciones plasmáticas elevadas de triglicéridos. En efecto, en nuestros grupos de estudio hay una alta prevalencia de hipertrigliceridemia (punto de corte 130mg/dL) que oscila entre 47% a 56% aproximadamente (figura 12). A excepción del grupo de DM2 con control glucémico que sólo presenta una prevalencia del 36 %. La relación resistencia

a la insulina-hipertrigliceridemia se fundamenta en el incremento de AGNE originada por la no inhibición de la lipasa sensible a la insulina del tejido adiposo, situación que surge cuando aumenta la concentración plasmática de insulina. El exceso de AGNE estimula en el hepatocito la síntesis de VLDL ricas en TG, que resulta en la hipertrigliceridemia frecuentemente observada en cualquiera de las etapas de la resistencia a la insulina. A la luz de estos mecanismos, resulta fácil explicar la alta frecuencia de hipertrigliceridemia en todos los grupos. La relación resistencia a la insulina-triglicéridos se verifica al comparar esta frecuencia en los grupos de diabéticos. Mientras que aproximadamente la mitad de los sujetos del grupo de DM2 sin control glucémico presenta cifras de triglicéridos por arriba de 130 mg/dL de triglicéridos plasmáticos, alrededor de la tercera parte de sujetos en el grupo de DM2 con control glucémico presentan cifras de triglicéridos mayores a 130 mg/dL. La razón de esta diferencia radica en la disminución de la resistencia a la insulina a través de reducción de peso, control dietético y de la intervención farmacológica con metformina ó la combinación de metformina-insulina.

En lo que concierne a la hipoalfalipoproteinemia, este es un hallazgo común asociado a la resistencia a la insulina. En efecto, en los cuatro grupos de sujetos estudiados observamos una alta frecuencia de hipoalfalipoproteinemia (definida como C-HDL < 36 mg/dL), que varía desde 29% en el grupo ITG hasta 54% en el grupo de DM2 con control metabólico. Existe una diferencia significativa entre la frecuencia observada en el grupo de obesos y la observada en el grupo ITG. Es importante mencionar que varios de los sujetos con intolerancia a la glucosa estaban dentro de un programa nutricional y de ejercicio por al menos durante 2 meses, por lo que los valores medios bajos de TG y más altos de C-HDL podrán ser explicados por esta causa. La frecuencia de hipoalfalipoproteinemia en los sujetos DM2 fue similar independientemente del control glucémico. La importancia de este hecho radica en que comúnmente la hipoalfalipoproteinemia se describe como un evento secundario a la hipertrigliceridemia a través de un mecanismo que involucra a la CETP (65). De acuerdo con la literatura nuestros resultados muestran que la alta incidencia de hipoalfalipoproteinemia se correlaciona con la hipertrigliceridemia y las concentraciones de los TG plasmáticos, y muy probablemente con la hiperinsulinemia. Con base en esta observación, podemos pro-

poner que la asociación de una triada resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia, están presentes en edades tempranas en sujetos con obesidad y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, como son los diabéticos y los intolerantes a la glucosa **(66)**.

En otro orden de ideas, en principio el perfil de lípidos es el resultado del equilibrio que existe entre las diferentes enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de lipoproteínas, a saber, LCAT, CETP y PLTP. Para establecer la posible influencia de estas enzimas y proteínas de transporte, en el perfil de lípidos, determinamos su actividad en los 4 grupos de estudio. Partiendo de la suposición que alteraciones en las actividades LCAT, CETP y PLTP, generan perfiles lipídicos aterogénicos, las diferencias más notorias eran esperadas en el grupo de diabéticos sin control metabólico (el grupo con más alteraciones lipídicas). En apoyo al planteamiento anterior, la actividad de la LCAT fue menor en el grupo de referencia, pese a que la diferencia sólo fue significativa cuando se comparó con la actividad del grupo de intolerantes a la glucosa. Se ha descrito que una actividad baja de LCAT es causa de hipoalfalipoproteinemia **(4)**, en concordancia con lo anterior, los dos grupos con la actividad LCAT más baja mostraron las mayores prevalencias de hipoalfalipoproteinemia, es decir los sujetos diabéticos. En este estudio, salvo por los sujetos con DM2 con control glucémico, la LCAT no correlaciona con ningún parámetro del perfil lipídico y por lo tanto la LCAT no es el origen metabólico de los niveles elevados de CT y C-LDL observados en la DM2 sin control **(65)**.

En lo que concierne a la PLTP, la actividad de esta proteína, al igual que la LCAT, está relacionada fundamentalmente con los niveles de C-HDL, pero en un reporte reciente, la PLTP también se asoció positivamente con la cantidad de partículas VLDL y LDL en sujetos con diabetes tipo 1 descontrolada, Colhoun *et al* **(67)**. En vista de que el grupo ITG presenta actividades entre 1.6 y 2.5 veces más elevadas que los otros grupos, y con base en los resultados de Colhoun *et al* **(67)**, esperaríamos niveles más altos de C-LDL y de TG (como medida indirecta de las VLDL), y más bajos de C-HDL en este grupo de ITG, pero no fue el caso. Solo encontramos en análisis univariado, una fuerte correlación negativa entre C-HDL y PLTP, sugiriendo que efectivamente en este grupo los niveles de HDL están determinados en buena medida por la actividad de la enzima. La falta

de un impacto directo sobre el perfil lipídico por parte de la PLTP en el grupo con ITG, podría ser por el tratamiento que estaban recibiendo con dieta y ejercicio.

Está ampliamente aceptado que la relación indirecta entre la el C-HDL y la enfermedad aterosclerosa coronaria es de tipo causal, y tradicionalmente se ha explicado por el papel que juegan estas Lp en el transporte reverso de colesterol (68). Sin embargo, en los últimos años, se ha generado mucha información acerca de otras propiedades de las HDL potencialmente antiaterogénicas. Dentro de estas propiedades destacan su capacidad antiinflamatoria, antioxidativa, anticoagulante y profibrinolítica (69). Las HDL comprenden una clase heterogénea de partículas lipoproteicas que comparten una alta densidad ( $>1.063$  g/mL) y un diámetro relativamente pequeño (diámetro de Stoke's 7.2 a 12 nm). Diferencias cuantitativas y cualitativas, en el contenido de lípidos y apo, enzimas y proteínas de transferencia de lípidos resulta en la presencia de varias subclases de HDL. Estas subclases se caracterizan por diferencias en forma, densidad, tamaño, movilidad electroforética y composición de apo (7). En este contexto, se ha sugerido que no es *per se* la concentración del C-HDL, sino la concentración de varias subclases de HDL las determinantes del potencial antiaterogénico de estas Lp (20). Con base en esta propuesta vanguardista y del alto riesgo que la resistencia a la insulina representa, decidimos caracterizar las subclases de HDL en nuestros sujetos.

La estructura heterogénea que caracteriza a las HDL se estudió en términos de la distribución de tamaños, mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida con un gradiente de 4% - 30% en condiciones no reductoras. Como se ha mencionado previamente, las determinaciones de la diversidad estructural de las HDL puede tener relevancia fisiopatológica fuertemente relacionada con el riesgo a desarrollar EAC más que la sola determinación de la concentración del C-HDL. De hecho, debido a que los valores promedio de los 4 grupos son bajos, el C-HDL resulta ser un factor de riesgo presente a temprana edad.

Las proporciones de las diferentes subclases de HDL sí presentaron algunas diferencias. En efecto, los sujetos obesos presentaron una proporción mayor de HDL grandes (tipos 2a y 2b) en comparación con los sujetos diabéticos, independientemente de la existencia o no del control glucémico. Este resultado contribuye a explicar el alto riesgo de desarrollar aterosclerosis en la DM2. En efecto,

se ha reportado la disminución de las subclases 2a y 2b de HDL en pacientes con EAC (17). Asumiendo esta premisa como verdadera, los sujetos con diabetes DM2 tienen un mayor riesgo que los que no han alcanzado aún esta etapa del síndrome metabólico.

Como consecuencia de una baja proporción de partículas grandes, los sujetos diabéticos presentaron niveles más altos de partículas HDL pequeñas (subclases 3b y 3c). Las alteraciones en la distribución relativa de las subclases de HDL en los pacientes con DM2 ocurren independientemente del control de los niveles de glucosa. Esta anomalía también puede persistir a pesar de la aparente normalización de las dislipidemias y se apoya en que las cohortes de diabéticos tienen significativamente aumentado el riesgo de EAC comparado con las poblaciones no diabéticas con niveles similares de lípidos en plasma. A pesar de las similitudes en el perfil de distribución de las subclases de HDL de los pacientes con DM2, con y sin control glucémico, es muy probable que la funcionalidad de las subclases de HDL sea diferente por efecto de una glicosilación inespecífica de proteínas que suele ocurrir cuando se mantienen persistentemente altos los niveles plasmáticos de glucosa. Se ha reportado que la glicosilación de las HDL disminuye su capacidad para captar el colesterol, es decir la primera etapa del TRC se encuentra disminuida (70-71). También la glicosilación de las HDL disminuye sus propiedades antioxidantes como se mencionará más adelante. Por lo tanto, postulamos que pese a existir similitudes estructurales de las HDL determinadas por gradiente de poliácridamida, en los sujetos DM2 con y sin control glucémico, es posible que las HDL no sean necesariamente igualmente funcionales en ambas situaciones, quizá a causa de una glicosilación inespecífica de las mismas.

Las diferencias en la distribución de las subclases de HDL son el resultado de diversos factores plasmáticos que afectan los tamaños de las mismas. Dentro de esos factores están las enzimas y proteínas de transferencia – LCAT, CETP, PLTP-. Éstas participan en la remodelación de las HDL y en consecuencia pueden estar involucradas de manera indirecta en la funcionalidad de estas lipoproteínas. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la PLTP es capaz de modular la composición, el tamaño y la concentración de las HDL plasmáticas. Esto lo realiza mediante el proceso llamado conversión (cambios de tamaño de las partículas HDL mediante la fusión de

partículas) y la capacidad para transferir fosfolípidos y CL, entre las LRTG a las HDL. Mediante el proceso de conversión de las HDL la PLTP promueve principalmente la generación de partículas HDL grandes y partículas pre-β1 aumentando la cantidad de aceptores primarios del colesterol. La CETP otra proteína de la familia de proteínas de transferencia, realiza la conversión de las HDL pero a diferencia de la PLTP solo favorece la formación de partículas HDL pequeñas (72). Otro factor plasmático importante que regula el tamaño de las HDL es la LCAT, estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado ambos que esta enzima promueve la generación de partículas HDL grandes a partir de partículas HDL pequeñas (73).

Los pacientes con ITG presentan la mayor concentración de C-HDL, pero sin alcanzar la diferencia estadística significativa al compararla con los demás grupos, esta concentración mayor de C-HDL posiblemente se debe su mayor actividad PLTP y LCAT, que concuerdan con la presencia de los mayores porcentajes de las subclases HDL 2b y 2a presentes en el grupo anterior. En cuanto a los pacientes con DM2 sin control, estos se caracterizan por los mayores porcentajes de las subclases HDL 3b y 3c. El origen metabólico de estas HDL pequeñas puede ser debido a la menor actividad LCAT.

Para finalizar, en lo que concierne a la paraoxonasa, ésta es una enzima que se asocia físicamente a las HDL y cuyo papel antiaterogénico está aún en discusión. No obstante, se ha demostrado que la enzima se liga preferentemente a las HDL con mayor tensión de superficie, esto es, a las HDL pequeñas. La razón de esta selectividad se fundamenta en hecho de que la PON 1 se sintetiza en hígado y permanece anclada a la membrana del hepatocito. Para poder ser liberada de ella, se requiere de una partícula que pueda competir por los sitios de interacción hidrofóbicos de la proteína. Estas partículas pueden ser micelas de diversas naturalezas pero con ciertas proporciones y con alta tensión superficial, similares a las de las HDL pequeñas. Resulta lógico postular por lo tanto que las alteraciones en la distribución de tamaños de las HDL en los sujetos puede afectar la actividad plasmática de la enzima. Por esta razón, decidimos determinar la actividad de la PON1 en plasma, esperando además que la actividad ARE correlacionara con algunas de las subclases de HDL. A partir de los resultados experimentales obtenidos solo se observa una tendencia en los

pacientes con diabetes tipo 2 sin control a presentar una actividad mas baja, pero sin alcanzar significado estadístico. Este hecho había sido observado en otros estudios, y se ha atribuido a la glicosilación inespecífica de la enzima por el descontrol glucémico (74). La explicación anterior no puede ser contestada por nuestros resultados, pero la diferencia en los tamaños HDL entre la DM2 y las etapas previas del síndrome metabólico, asociada a una tendencia hacia menores actividades ARE en los sujetos con descontrol metabólico, abren la posibilidad de una "disfunción" HDL en esta situación fisiopatológica

En resumen las medias del C-HDL y de TG de la población con DM2 estudiada son anormales y presentan una alta prevalencia de dislipidemias. Las correlaciones entre las actividades LCAT, CETP, PLTP, y el perfil de lípidos son mínimas. La menor frecuencia de hipoalfalipoproteinemia en los sujetos con DM2 con control glucémico e ITG, podría estar asociada con el tratamiento establecido. Por otra parte, la DM2 se asocia con una mayor proporción de partículas HDL pequeñas, subclases HDL 3b y 3c, con respecto a las etapas previas a la enfermedad (obesidad e ITG) en donde predominan las subclases HDL 2a y 2b. La distribución de tamaños HDL en las etapas previas a la DM2 tienen una fuerte dependencia de la CETP, mientras que en la DM2 la distribución se asocio fundamentalmente con la actividad de la PLTP. En el caso de la enzima PON 1, los cambios en la distribución de tamaños HDL no tiene impacto en su actividad ARE. Pese a lo anterior, la determinación de subclases de Lp puede ser empleada para evaluar de manera óptima el riesgo a desarrollar EAC, que en este estudio se enfocó a las HDL, por su papel antiaterogénico.

## VIII. CONCLUSIÓN

---

En nuestro estudio se observó que la DM2 presenta una mayor proporción de partículas HDL pequeñas, asociado fundamentalmente con la actividad PLTP, independientemente de la existencia o no del control glucémico.

Sin embargo, en las etapas previas a la enfermedad, obesidad e ITG predomina una mayor proporción de partículas HDL grandes, posiblemente en conexión con las actividades PLTP Y LCAT.

Las actividades de las proteínas -LCAT, CETP y PLTP- correlacionaron con algunas de las subclases de HDL en los 4 grupos estudiados, destacando las correlaciones de la CETP, que concuerdan con lo reportado en otros estudios.

**Anexo 1. Correlaciones con los datos de todos los grupos.**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas, asociadas a las HDL y el perfil de lípidos.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
CT	r = 0.047 p = 0.650	r = -0.048 p = 0.977	r = 0.145 p = 0.137	r = 0.003 p = 0.981
TG	r = 0.221 p = 0.037 *	r = -0.123 p = 0.375	r = 0.187 p = 0.054	r = 0.084 p = 0.492
C-LDL	r = -0.051 p = 0.615	r = -0.130 p = 0.350	r = 0.141 p = 0.146	r = -0.066 p = 0.588
C-HDL	r = -0.081 p = 0.428	r = -0.087 p = 0.533	r = -0.101 p = 0.298	r = 0.025 p = 0.838

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas asociadas a las HDL, y las 5 subclases de HDL.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
HDL 2b	r = -0.290 p = 0.004 **	r = -0.027 p = 0.847	r = -0.059 p = 0.546	r = -0.083 p = 0.497
HDL 2a	r = -0.394 p = 0.000 **	r = -0.128 p = 0.355	r = 0.035 p = 0.723	r = -0.135 p = 0.268
HDL 3a	r = -0.062 p = 0.546	r = -0.226 p = 0.101	r = 0.069 p = 0.482	r = -0.052 p = 0.672
HDL 3b	r = 0.337 p = 0.001 **	r = 0.194 p = 0.160	r = -0.003 p = 0.973	r = 0.139 p = 0.256
HDL 3c	r = 0.276 p = 0.006 **	r = 0.023 p = 0.869	r = -0.015 p = 0.878	r = 0.082 p = 0.501

Correlaciones de las 5 subclases de HDL y el C-HDL

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
C-HDL	r = 0.241 p = 0.012 *	r = 0.359 p = 0.000 **	r = 0.077 p = 0.427	r = -0.256 p = 0.007 **	r = -0.299 p = 0.002 **

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

### Correlaciones datos de pacientes con obesidad.

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas, asociadas a las HDL y el perfil de lípidos.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
CT	r = 0.041 p = 0.804	r = -0.200 p = 0.413	r = 0.208 p = 0.185	r = -0.117 p = 0.568
TG	r = 0.252 p = 0.117	r = -0.279 p = 0.247	r = 0.276 p = 0.074	r = 0.134 p = 0.514
C-LDL	r = -0.051 p = 0.753	r = 0.394 p = 0.095	r = 0.124 p = 0.427	r = -0.232 p = 0.254
C-HDL	r = -0.162 p = 0.317	r = -0.296 p = 0.219	r = -0.047 p = 0.766	r = -0.049 p = 0.811

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas asociadas a las HDL, y las 5 subclases de HDL.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
HDL 2b	r = -0.360 p = 0.024*	r = -0.090 p = 0.713	r = -0.174 p = 0.271	r = -0.236 p = 0.247
HDL 2a	r = -0.454 p = 0.004**	r = -0.116 p = 0.636	r = 0.011 p = 0.947	r = -0.004 p = 0.986
HDL 3a	r = -0.131 p = 0.426	r = -0.599 p = 0.007**	r = 0.178 p = 0.261	r = -0.007 p = 0.974
HDL 3b	r = 0.430 p = 0.006**	r = 0.281 p = 0.244	r = 0.085 p = 0.592	r = 0.206 p = 0.313
HDL 3c	r = 0.339 p = 0.035*	r = 0.135 p = 0.583	r = -0.058 p = 0.713	r = 0.045 p = 0.827

Correlaciones de las 5 subclases de HDL y el C-HDL

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
C-HDL	r = 0.175 p = 0.256	r = 0.328 p = 0.030 *	r = -0.021 p = 0.893	r = -0.182 p = 0.237	r = -0.212 p = 0.167

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

### Correlaciones datos de pacientes con ITG.

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas, asociadas a las HDL y el perfil de lípidos.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
CT	r = 0.178 p = 0.494	r = -0.076 p = 0.903	r = -0.095 p = 0.715	r = -0.074 p = 0.818
TG	r = 0.494 p = 0.044 *	r = 0.627 p = 0.258	r = 0.130 p = 0.618	r = 0.506 p = 0.093
C-LDL	r = -0.010 p = 0.971	r = -0.239 p = 0.699	r = -0.060 p = 0.818	r = -0.197 p = 0.539
C-HDL	r = -0.225 p = 0.386	r = -0.291 p = 0.634	r = -0.060 p = 0.818	r = -0.286 p = 0.368

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas asociadas a las HDL, y las 5 subclases de HDL.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
HDL 2b	r = -0.647 p = 0.005 **	r = 0.384 p = 0.524	r = 0.239 p = 0.355	r = -0.582 p = 0.047 *
HDL 2a	r = -0.693 p = 0.002 **	r = 0.243 p = 0.694	r = 0.151 p = 0.563	r = -0.578 p = 0.049 *
HDL 3a	r = -0.027 p = 0.918	r = -0.207 p = 0.738	r = -0.411 p = 0.101	r = 0.329 p = 0.297
HDL 3b	r = 0.713 p = 0.001 **	r = -0.243 p = 0.693	r = -0.066 p = 0.802	r = 0.603 p = 0.038 *
HDL 3c	r = 0.534 p = 0.027 *	r = -0.488 p = 0.405	r = 0.128 p = 0.623	r = 0.598 p = 0.040 *

Correlaciones de las 5 subclases de HDL y el C-HDL

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
C-HDL	r = 0.336 p = 0.187	r = 0.436 p = 0.080	r = 0.172 p = 0.510	r = -0.454 p = 0.067	r = -0.418 p = 0.095

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

**Correlaciones datos de pacientes con diabetes tipo 2 sin control glucémico.**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas, asociadas a las HDL y el perfil de lípidos.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
CT	r =0.079 p =0.727	r =0.037 p =0.895	r =0.186 p =0.373	r =0.065 p =0.818
TG	r =0.083 p =0.715	r =0.103 p =0.716	r =0.242 p =0.243	r =0.145 p =0.607
C-LDL	r =-0.018 p =0.935	r =0.199 p =0.478	r =0.231 p =0.266	r =0.024 p =0.931
C-HDL	r =0.191 p =0.395	r =-0.610 p =0.016*	r =-0.284 p =0.168	r =-0.054 p =0.850

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas asociadas a las HDL, y las 5 subclases de HDL.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
HDL 2b	r =0.201 p =0.370	r =-0.579 p =0.024 *	r =-0.174 p =0.406	r =-0.049 p =0.863
HDL 2a	r =-0.071 p =0.753	r =-0.664 p =0.007 **	r =-0.162 p =0.439	r =-0.372 p =0.172
HDL 3a	r =-0.190 p =0.396	r =-0.170 p =0.546	r =0.008 p =0.968	r =-0.273 p =0.325
HDL 3b	r =-0.030 p =0.895	r =0.684 p =0.005 **	r =0.128 p =0.541	r =0.150 p =0.593
HDL 3c	r =0.002 p =0.994	r =0.526 p =0.044 *	r =0.157 p =0.453	r =0.358 p =0.190

Correlaciones de las 5 subclases de HDL y el C-HDL

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
C-HDL	r =0.347 p =0.089	r =0.381 p =0.060	r =0.269 p =0.194	r =-0.318 p =0.122	r =-0.465 p =0.019 *

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

### Correlaciones datos de pacientes con diabetes tipo 2 con control glucémico

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas, asociadas a las HDL y el perfil de lípidos.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
CT	r = -0.021 p = 0.931	r = 0.274 p = 0.324	r = 0.510 p = 0.015 *	r = 0.296 p = 0.266
TG	r = -0.070 p = 0.774	r = -0.343 p = 0.210	r = 0.104 p = 0.645	r = -0.090 p = 0.741
C-LDL	r = -0.071 p = 0.773	r = 0.238 p = 0.392	r = 0.534 p = 0.011 *	r = 0.234 p = 0.383
C-HDL	r = 0.023 p = 0.926	r = 0.514 p = 0.050	r = -0.009 p = 0.969	r = 0.174 p = 0.519

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

Correlaciones entre las actividades de las proteínas de transferencia y enzimas asociadas a las HDL, y las 5 subclases de HDL.

	CETP	PLTP	LCAT	Paraoxonasa (ARE)
HDL 2b	r = 0.308 p = 0.199	r = -0.420 p = 0.119	R = -0.297 p = 0.180	r = 0.307 p = 0.247
HDL 2a	r = 0.130 p = 0.597	r = -0.281 p = 0.310	R = -0.070 p = 0.756	r = 0.012 p = 0.964
HDL 3a	r = 0.464 p = 0.045 *	r = -0.067 p = 0.812	R = 0.175 p = 0.436	r = -0.030 p = 0.911
HDL 3b	r = -0.333 p = 0.163	r = 0.538 p = 0.039 *	R = 0.009 p = 0.967	r = -0.044 p = 0.873
HDL 3c	r = -0.383 p = 0.105	r = 0.064 p = 0.821	R = 0.190 p = 0.398	r = -0.254 p = 0.343

Correlaciones de las 5 subclases de HDL y el C-HDL

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
C-HDL	r = 0.187 p = 0.405	r = 0.332 p = 0.131	r = 0.016 p = 0.943	r = -0.158 p = 0.483	r = -0.253 p = 0.256

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01

## Anexo 2 A. Gel de poliacrilamida en condiciones nativas

Subclases de HDL, para un gel con gradiente 4%-30%.

	4% (5 mL)	30% (5 mL)
TBE (mL)	0.5	0.5
Bis-acrilamida (mL)	0.4	3.0
Agua (mL)	4.1	0.75
Glicerol (mL)	-----	0.75

Una vez que ya se tiene esto, adicionar al momento de hacer el gel lo siguiente:

Persulfato de amonio 10 mg/100 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L

- El buffer de corrida es TBE
- Migrar a 20 V por 15 minutos, sin muestra
- Depositar 10  $\mu$ g de proteína al gel con 1  $\mu$ L de buffer de muestra
- Migrar a 70 V por 15 minutos
- Migrar a 165 V por 20 horas
- Teñir el gel con azul de Coomasie
- Nota usar los marcadores de radio de Stokes

### Marcadores de radio de Stokes

Tiroglobulina	17.0 nm
Ferritina	12.2 nm
Catalasa	10.4 nm
Lactato deshidrogenasa	8.1 nm
Albúmina	7.1 nm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Anexo 2 B. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS). Separación de

apolipoproteínas.

Solución A; 36.3 g Tris-HCl c.b.p. 100 mL, pH=8.9

Solución B; 48.0 g Acrilamida más 1.28 g Bis-acrilamida c.b.p. 100 mL

Solución C; 10 g SDS c.b.p. 100 mL

Solución E; 39.4 g Tris más 2.0 g SDS c.b.p. 1 000 mL, pH=6.8

Gel para lipoproteínas de alta densidad (gradiente 4%-21%)

	4%	21%	St
Solución A (mL)	1.0	1.0	-----
Solución A (μL)	320	1 770	300
H <sub>2</sub> O (mL)	2.68	0.23	1.5
Glicerol (mL)	-----	1.0	-----
SDS (μL)	40	40	-----
Solución E (mL)	-----	-----	2.0

Una vez que ya se tiene esto, adicionar al momento de hacer el gel lo siguiente:

* Persulfato de amonio (μL)	25	25	40
TEMED (μL)	5	5	6

- \*10 mg en 100 μL de agua destilada
- Depositar 15 μg de proteína al gel con 10 μL de buffer de muestra
- Migrar a 60 mA hasta que entren las muestras en el gel concentrador
- Migrar a 90 V durante 2.5 horas (hasta que salga el frente de migración del gel)
- Tefilr el gel con azul de Coomasie
- Nota usar los marcadores de bajo peso molecular

#### Marcadores de bajo peso molecular

α-Lactoalbúmina	14, 400
Inhib. Tripsina	20, 100
Anhidrasa carbónica	30, 000
Ovoalbúmina	45, 000
Albúmina	66, 000
Fosforilasa	97, 000

### **Anexo 3. Aislamiento de Apo AI**

Se obtuvieron HDL por ultra centrifugación secuencial diferencial, posteriormente se liofilizaron y se deslipidaron con una mezcla de solventes orgánicos (etanol:éter;2:1). La parte proteica se disolvió en solución Tris-HCl 30mM (Boehringer Mannheim) y solución amortiguadora de Urea 6 M a pH =8.0, esta mezcla se sometió a cromatografía de intercambio iónico, para separar Apo AI usando una columna Uno<sup>TM</sup>-Q1 (Bio Rad Serie Q1-2291) acoplada a un sistema de cromatografía Bio Rad Dou Flow. La elusión de proteínas se realizó con un gradiente lineal en la misma solución amortiguadora de NaCl 0.1 M. Se colectaron fracciones de 250µL y se seleccionaron solo las fracciones que contenían apo AI, esto se verificó con una electroforesis PAGE-SDS con un gradiente de 4% a 21%, haciendo visibles las bandas con una tinción de azul de Coomasie, obteniéndose una pureza del 98%. La concentración de Apo AI fue estimada por el método de Lowry. Las fracciones que contenían apo AI se dializaron con Bicarbonato de amonio 5mM, posteriormente se liofilizaron y se almacenan a -20°C.

### **Anexo 4. Preparación del sustrato: proteoliposoma con colesterol-[<sup>3</sup>H]; procedimiento de diálisis de colato.**

Los proteoliposomas son partículas discoidales que simulan HDL nacientes y de esta manera se determinó *in vitro* el metabolismo HDL. En un tubo de ensaye se agregó 870 µL de lecitina 10 mg/ml (Sigma, St. Louis MO), 205 µL de colesterol libre 1 mg/mL (Cholesterol Sigma, St. Louis) y 20 µL de <sup>3</sup>H- Colesterol no esterificado 48 Ci/mmol en tolueno (Amersham Pharmacia Biotech). Se evaporó el disolvente orgánico con N<sub>2</sub>.

En otro tubo se adicionó 1.7 mL de buffer Tris- HCl 10 mM pH 7.4 adicionando 1 mL de apo AI (1 mg/ml) ver anexo 2 y 340 µL de solución de colato 0.725 M disuelto en el mismo buffer Tris. El contenido de ambos tubos se mezcló y se agito vigorosamente en uno solo y se llevó a cabo una diálisis por 3 días con buffer Tris con el fin de eliminar el colato excedente. Se llegó así a una proporción molar final 0.8:250:12.5 de apo AI: lecitina: <sup>3</sup>H-colesterol libre en los proteoliposomas.

Se ajustó al volumen de 4.5 mL y se realizaron alícuotas de 100 µL de la solución de proteoliposomas y se congelaron a -20°C.

#### **Anexo 5. Preparación de sustrato aceptor (VLDL, IDL, LDL)**

Se extrae sangre total de sujetos sanos en tubos con EDTA-Na<sub>2</sub> (1.5 mg/ml), para separar el paquete celular del plasma se centrifuga a 3500 rpm por 10 min, se extrae el plasma y se agrega aprotinina (10ul/ml) y PMSF (1 ml/ml) como conservadores. Posteriormente se ajusta el plasma a densidad=1.060 g/ml con KBr sólido y esta fracción se separa por ultracentrifugación secuencial. El sobrenadante obtenido se dializa en una solución amortiguadora 0.14 M NaCl /10mm Tris /mM EDTA/0.01% ácido de sodio a un pH 7.4. Finalmente, se realizan alícuotas de 1 ml y se guardan a -20 °C. Para verificar la calidad del sustrato (VLDL, IDL), se cuantifican proteínas y se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con un gradiente de 3% a 19% en presencia de SDS.

#### **Anexo 6. Preparación de <sup>3</sup>H colesterol esterificado HDL<sub>3</sub>**

Con el remanente de la anterior centrifugación se realiza un pool y se ajusta a una densidad = 1.11 g/ml con KBr sólido y se centrifuga a 110,000 rpm durante 2 h 35 min. a 10° C (Beckman Optima TLX), la densidad es ajustada por la adicción de KBr sólido (Laitz), el sobrenadante se desecha (LDL + HDL<sub>2</sub>) y el remanente (HDL<sub>3</sub> + plasma), se dializa contra amortiguador Tris. Después de la diálisis se recupera la muestra, se coloca en un tubo de vidrio y se le agrega 100 ul de Colesterol tritiado en etanol (equivalente a 50 uCi [1α,2α(n)-<sup>3</sup>H] Colesterol, amersham pharmacia biotech), gota a gota y con una suave agitación. Se deja incubar por 18h a 37°C, se ajusta a una densidad =1.25 g/ml con KBr sólido y se realiza una ultracentrifugación a 110,000 rpm durante 2 h 35 min para obtener HDL<sub>3</sub> . El KBr se elimina por medio de una nueva diálisis contra una amortiguador Tris por dos días. Al término de la diálisis se recupera la muestra y se realizan alícuotas de 200 uL y se guardan a -20°C. Para controlar la calidad de nuestras HDL<sub>3</sub>, se realiza una cuantificación una electroforesis SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida con un gradiente 4% a 21% y otra en gel de poliacrilamida en condiciones nativas con un gradiente 4% a 30%

#### **Anexo 7. Solución de TBS. (buffer Tris, NaCl, EDTA)**

Tris 10 mM, NaCl 150 mM, 1 mM EDTA y NaN<sub>3</sub> 0.200 g/L.

Pesar 1.221 g de Tris, 8.700 g de NaCl, 0.372 g de EDTA y 0.200 g de NaN<sub>3</sub>, disolver con agua deionizada, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con agua deionizada.

### **Anexo 8. Preparación de liposomas**

Mezclar 73.5  $\mu\text{L}$  fosfatidilcolina (10  $\mu\text{mol}$ ), 20  $\mu\text{L}$  fosfatidilcolina marcada (10 nmol-100mCi/mmol) y 100  $\mu\text{L}$  butil hidroxitolueno (1nmol/ $\mu\text{L}$ ), poner los tubos en hielo.

Evaporar la mezcla con nitrógeno durante 10 minutos

Agregar 0.5 mL de TBS (ver anexo 7) y mezclar en vortex

Agregar 0.5 mL de TBS y mezclar en vortex y transvasar el contenido a un tubo cónico

Sonicar la mezcla (35 pulsos, 5 minutos) y esperar 1 minuto, repetir el procedimiento anterior

Sonicar la mezcla (35 pulsos, 5 minutos) y trasvasar el contenido a un eppendorff de 1.5 mL

Centrifugar 10 minutos a 15 000 rpm

Separar el sobrenadante ( $\sim$  1 mL) conteniendo los liposomas marcados

### **Anexo 9.**

El plasma tiene una densidad de 1.006g/mL. Para separar las HDL por ultracentrifugación secuencial se necesita un aumento de la densidad del plasma este aumento se logra gracias a la siguiente formula.

Para pasar un plasma de una densidad **d1** a una **d2**.

$$\text{Vol. solución diluyente} = \frac{\text{Vol. solución } (d2 - d1)}{d \text{ sol. diluyente} - d2}$$

Para preparar la solución de KBr densidad de 1.063g/mL, se pesan 94.26g de KBr + 0.1g de EDTA y se afora a 1L con agua destilada.

Para preparar la solución de KBr densidad de 1.21g/mL, se pesan 337.36g de KBr + 0.1g de EDTA y se afora a 1L con agua destilada.

**Anexo 10. Preparación del buffer TBE (Tris 0.09M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3mM).**

Se pesan 4.89g de ácido bórico, 10.9026g de tris-HCl, 1.12g de EDTA, disolver con agua destilada, ajustar pH=8 y sé afora a un litro.

**Anexo 11. Técnica de Lowry para la cuantificación de proteínas.**

Solución A: NaCO<sub>3</sub> 10 H<sub>2</sub>O 2.39g  
 Tartrato de Na y K 0.02g  
 NaOH 0.1M cbp 100mL

Solución B: CuSO<sub>4</sub> 0.5g  
 H<sub>2</sub>O destilada cbp 100mL

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Solución C. Preparar en el de usarse. 50mL A + 1mL B.

Reactivo de Folin 1:4 H<sub>2</sub>O destilada.

Estándar 1µg de ASB/µL.

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras se hace una dilución 1:10.

Curva patrón.

TUBO	1	2	3	4	5	6
Estándar	0 µL	10 µL	20 µL	40µL	80 µL	100 µL
H <sub>2</sub> O	100 µL	90 µL	80 µL	60 µL	20 µL	0 µL
	M	E	Z	C	L	A
	R					
SDS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Sol. C	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
	Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente					
Folin	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	Mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente					

Leer a 750nm.

**Anexo 12.**

**IMC para niños y adolescentes, de 6 a 19 años National Health and Nutrition Examination Survey I (NHANES I).**

Hombres	Percentil 50	Percentil 85	Percentil 95	Mujeres	Percentil 50	Percentil 85	Percentil 95
	Kg/m <sup>2</sup>	Kg/m <sup>2</sup>	Kg/m <sup>2</sup>		Kg/m <sup>2</sup>	Kg/m <sup>2</sup>	Kg/m <sup>2</sup>
Edad años				Edad años			
6	14.54	16.64	18.02	6	14.31	16.17	17.49
7	15.07	17.37	19.18	7	14.98	17.17	18.93
8	15.62	18.11	20.33	8	15.66	18.18	20.36
9	16.17	18.85	21.47	9	16.33	19.19	21.78
10	16.72	19.60	22.60	10	17.00	20.19	23.20
11	17.28	20.35	23.63	11	17.67	21.18	24.59
12	17.87	21.12	24.89	12	18.35	22.17	25.95
13	18.53	21.93	25.93	13	18.95	23.08	27.07
14	19.22	22.77	26.93	14	19.32	23.88	27.97
15	19.92	23.63	27.76	15	19.69	24.29	28.51
16	20.63	24.45	28.53	16	20.09	24.74	29.10
17	21.12	25.28	29.32	17	20.36	25.23	29.72
18	21.45	25.92	30.02	18	20.57	25.56	30.22
19	21.86	26.36	30.66	19	20.80	25.85	30.72

Valores de referencia: Un IMC entre la percentila 85 y 95 se define como sobrepeso y, un IMC por arriba de la percentila 95 se define obesidad:.

American Journal of Clinical Nutrition, 1991; 53: 839-46.

**Anexo 13. Preparación del azul de Coomasie y el decolorante de tinción.**

Azul de Coomasie. (250mL)

Azul brillante de Coomasie ----- 0.25g

Metanol 25% ----- 62.5mL

Ácido acético 10% ----- 25mL

Agua destilada 65% ----- 162.5mL

Decolorante de tinción (1500mL)

Metanol 25% ----- 375mL

Ácido acético 10% ----- 150mL

Agua destilada 65% ----- 975mL

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.\_ Pacheco Leal D. Bioquímica estructural y aplicada a la medicina, Editorial IPN, México D.F. 1996; 341-429.
- 2.\_ Voet D, Voet JG. Bioquímica, Editorial Omega, Barcelona 1992; 293-339.
- 3.\_ Devlin TM. Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas, 3era edición Reverté, Barcelona 1999; 395-443.
- 4.\_ Pérez-Méndez O, Luc G, Posadas-Romero C: Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. Arch Inst Cardiol Méx 2000; 70: 312-321.
- 5.\_ Kane JP: Estructura y función de las lipoproteínas plasmáticas y de sus receptores. En Fuster V, Ross R, Topol EJ, Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria, Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1997. pp. 97-112.
- 6.\_ Schumaker VN, Phillips ML, Chatterton JE: Apolipoprotein B and low density lipoprotein structure: Implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. Adv Protein Chem 1994; 45: 205-248.
- 7.\_ von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis: Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21 (1): 13-27.
- 8.\_ Gotto AM, Ponnall HJ, Havel RJ: Introduction to the plasma lipoproteins. Methods Enzymol 1986; 128: 341.
- 9.\_ Ginsberg H: Lipoprotein physiology. Endocrinology and metabolism clinics of North America 1998; 27: 503-519.
- 10.\_ He X-M, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature 1992;358:209-215.
- 11.\_ Janero DR, Siuta-Mangano P, Miller KW, Lane MD: Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. J Cell Biochem 1984; 24: 131-152.
- 12.\_ Rudney H, Panini SR: Cholesterol biosynthesis. Curr Opin Lipidol 1993; 4: 230-237.

13. \_ Slater EE, Alberts AW, Smith RL: HMG-CoA reductase inhibitors. In: the role of cholesterol on atherosclerosis: new therapeutic opportunities, edited by Grundy S.M. and Bearn A.G., Haley & Belfus ,Inc. Philadelphia, pp. 35-50. 1987.
14. \_von Eckardstein A, Huang Y, Assman G: Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology* 1994; 5:404-416.
15. \_Phillips MC, Rothblat GH:HDL and cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 1997; 134:114.
- 16.\_Barrans A, Jaspard B, Barbaras R, Chap H, Perret B, Collet X: Pre-[beta] HDL: Structure and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1300: 73-85.
17. \_ Skinner ER: High-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology* 1994; 5: 241-247.
- 18.\_Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouye P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G, et al: A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. *The ECTIM study. Arterioscler Thromb* 1992; 12: 701-707.
- 19.\_Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y: High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124 (S): 11-20.
- 20.\_Sviridov D, Nestel P: Dynamics of reverse cholesterol transport; protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
- 21.\_Fielding C, Fielding P: Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36: 211-228.
- 22.\_ Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du B, Faull KF, Fogelman AM et el: Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891.
- 23.\_Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du B: Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.

- 24.\_ Hayec T, Oiknine J, Danker G, Brook JG, Aviram M: HDL apolipoprotein A-I attenuates oxidative modification of low density lipoprotein; studies in transgenic mice. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 721-725.
- 25.\_Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ: High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1987-1994.
- 26.\_Nofer JR, Walter M, Kehrel B, Wierwille S, Tepel M, Seedorf U, Assmann G: HDL mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide derived second messengers 1-2 diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 861--869.
- 27.\_Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ: High density lipoprotein prevents oxidized LDL-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000; 275: 11278-11283.
- 28.\_ Tall AR: An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998; 19: A31-A35.
- 29.\_ Kwiterovich PO: The antiatherogenic role of HDL cholesterol. *Am J Cardiol* 1998; 82: 13Q-21Q.
- 30.\_ Hayden MR, Clee SM, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Attie A, Kastelein JJ: Cholesterol efflux regulatory protein, Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:117-122.
- 31.\_Gotto AM Jr: High density lipoproteins: Biochemical and metabolic factors. *Am J Cardiol* 1983; 52: 2B-4B.
- 32.\_Krieger M: The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4077-4080.
- 33.\_ Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362: 801-809.
- 34.\_ Luscis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241.
- 35.\_ Pober JS, Cotran RC: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70: 427-451.

- 36.\_ Davies PF, Tripathi SC: Mechanical stress mechanisms and the cell; and endothelial paradigm (Mini review). *Cir Res* 1993; 72: 239-244.
- 37.\_ Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390.
- 38.\_ Guadalajara B JF. *Cardiología* . Ed Médica panamericana Méx D.F. 1996; 801-824.
- 39.\_ Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low-density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984;4 :357-364.
- 40.\_ Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D: Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 505-510.
- 41.\_ Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D: Oxidatively modified low density lipoproteins; A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-2998.
- 42.\_ Saltiel A: New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 2001; 104: 517-519.
- 43.\_ The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999; 22 (Suppl.1): S5-S19.
- 44.\_ Islas Andrade S, Lifshitz Guinzberg A: *Diabetes Mellitus*. Ed McGraw Hill-Interamericana, México 2000; 71-79.
- 45.\_ Freemark M: Pharmacologic approaches to the prevention of type 2 diabetes in high risk pediatric patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88 (1): 3-13.
- 46.\_ Aronson D, Rayfield EJ: *Diabetes y Obesidad*. En Fuster V, Ross R, Topol EJ, *Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria*, Editorial Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1997. pp. 347-383.
- 47.\_ Frayn KN: Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 197-204.
- 48.\_ Howard BV, Howard WJ: Dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocrinol Rev* 1994; 15: 263-274.

- 49.\_ Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV: Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408-419.
- 50.\_ Huesca Gómez C, Franco M, Luc G, Montañó LF, Massó F, Posadas Romero C, Pérez Méndez O: Chronic Hypothyroidism Induces Abnormal Structure of High-Density Lipoproteins and Impaired Kinetics of Apolipoprotein A-I in the Rat. *Metabolism* 2002; 4: 443-450.
- 51.\_ Chen C, Albers JJ: Characterization of proteoliposome containing apolipoprotein A-I: a new substrate for the measurement of lecithin cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res* 1982; 23: 680-691.
- 52.\_ Tollefson JH, Albers JJ. Isolation, characterization, and assay of plasma lipid transfer proteins. In: Albers JJ, Segrest JP, eds. *Methods of Enzymology*. New York, NY: Academic Press Inc; 1994: 797-812.
- 53.\_ Damen J, Regts J, Scherphof G: Transfer of [14C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta* 1982; 712: 444-452.
- 54.\_ Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, Ladu BN: Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 100-106.
- 55.\_ Kwiterovich PO Jr: Dyslipoproteinemia and other risk factors for atherosclerosis in children and adolescents *Atherosclerosis* 1994;108 Suppl:555-71.
- 56.\_ Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, *et al*: High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42: 1298-1307
- 57.\_ <http://www.salud.gob.mx/>  
Fuente: INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño. 2001
- 58.\_ Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE: Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999; 22: 345-354.

- 59.\_ Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R: Type 2 diabetes among North American children adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000; 136: 664-672.
- 60.\_ Consenso de Obesidad. Fundación Mexicana para la Salud. Abril 2002.
- 61.\_ Deed LC: A five-year (1994-98) study of incidence data for diabetes in children at three university diabetes centers in Florida with special attention to type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49 (suppl 1): A 177.
- 62.\_ Stern MP, Peterson JK, Haffner SM, Hazuda HP, Mitchell BD: Lack of awareness and treatment of hiperlipidemia in type II diabetes in a community survey. *JAMA* 1989; 262: 360-364.
- 63.\_ Sniderman AD, Scantlebury, Cianflone K: Hypertriglyceridemic hyperapoB: The unappreciated atherogenic dyslipoproteinemia in type 2 diabetes mellitus. *Ann Med* 2001; 135(6): 447-459.
- 64.\_ Semenkovich CF, Heinecke JW: The mystery of diabetes and atherosclerosis: Time for a new plot. *Diabetes* 1997; 46(3): 327-334.
- 65.\_ Tato F, Vega GL, Grundy SM: Determinants of plasma HDL-cholesterol in hypertriglyceridemic patients: role of cholesterol-ester transfer protein and lecithin: cholesteryl acyl transferase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 56-63.
- 66.\_ Chavéz AG, *et al*: Consenso mexicano sobre el tratamiento integral del síndrome metabólico. *Rev Mex Cardiol* 2002; 13(1): 4-30.
- 67.\_ Colhoun HM, Taskinen MR, Otvos JD, Van Den Berg P, O'Connor J, Van Tol A: Relationship of phospholipid transfer protein activity to HDL and apolipoprotein B-containing lipoproteins in subjects with and without type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(11): 3300-5.
- 68.\_ Assmann G, Nofer JR: Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003; 54: 321-341.
- 69.\_ Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A: HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161(1): 1-16.
- 70.\_ Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991; 40: 377-384.

- 71.\_Gugliucci-Alejandro: Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev Med Uruguay* 2000; 16: 58-75.
- 72.\_ Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C: The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155: 269-281.
- 73.\_ Rye KA, Clay MA, Barter PJ: Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238.
- 74.\_Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL: Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43: 312-320.