



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE APOLIPOPROTEÍNAS
Y ENZIMAS DEL METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS SOBRE
LA RESPUESTA A UN TRATAMIENTO DIETARIO CON PROTEÍNA
DE SOYA EN HIPERCOLESTEROLEMIA.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LA MAESTRÍA EN:

CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MARTHA GUEVARA CRUZ



INCMNSZ

TUTOR:
DR. ARMANDO ROBERTO TOVAR PALACIO
COTUTOR:
DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

MÉXICO D. F.

JUNIO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA O LAS INSTITUCIONES PARTICIPANTES.

Institución: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dirección: Vasco de Quiroga # 15, Colonia Sección 16, Delegación Tlalpan, CP 14380, México, DF.

Patrocinio

Nombre: CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y tecnología).grant C01-016

Dirección: Av. Insurgentes Sur 1582, Col Crédito Constructor. Del. Benito Juárez CP 03940, México, DF.

Agradecimientos y dedicatorias:

Agradezco a:

Dr. Armando R. Tovar por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente

Dra. Nimbe Torres por su valiosa comprensión, colaboración y orientación.

A mis maestros: Dra. Florencia Vargas, Dr. Sergio Ponce de León, Dr. Juan Calva, Dra. Rebeca Aguirre, Dra. Carmen Lara, Dr. Villa, por su disposición permanente e incondicional para aclarar mis dudas.

Dr. Julio Granados y Dr. Gilberto Vargas por sus grandes aportaciones, que me ayudó a mejorar la presente investigación.

Agradezco a las licenciadas en Nutrición: Berenice Palacios, Victoria Ramos, Gabriela Quiroz, María de Lourdes Solorio, Montserrat Flores que sin su ayuda, su apego al paciente no se hubiera realizado esta tesis.

A todos los que pertenecen y pertenecieron al departamento de fisiología de la Nutrición, del INCMNSZ. por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno. Por sus consejos, enseñanzas y ayuda durante este lapso

Agradezco a mis amigos por su confianza y lealtad

Dedicatoria especial a:

A Dios que me ha abierto las puertas y
me da la oportunidad de aprender,
así como permitiéndome llegar hasta este momento
y lograr otra meta más en mi carrera.

A Lupita por escucharme cuando la he necesitado.

A mis padres Delia y Guillermo,
por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida,
y a mis hermanos
Juan Guillermo, Luis, David, Abel y Azucena
por sus comentarios, sugerencias y opiniones,
con agradecimiento eterno.

A mi Roberto

por su apoyo, comprensión y amor,
que me permite poder lograr lo que me proponga.

Gracias por escucharme y por tus consejos.

Gracias por ser parte de mi vida.

INDICE:

1. Antecedentes

- 1.1 Metabolismo de los lípidos
 - 1.1.1 Clasificación y composición de las lipoproteínas
 - 1.1.2 Transporte de lípidos alimentarios (vía exógena)
 - 1.1.3 Transporte de lípidos hepáticos (vía endógena)
 - 1.1.4 Metabolismo de las HDL y Transporte inverso de colesterol
- 1.2 Detección, valoración y tratamiento de la hipercolesterolemia en adultos.
 - 1.2.1 Principales puntos del Tercer informe del Panel de Expertos sobre la Detección, Evaluación y Tratamiento de los niveles sanguíneos elevados de colesterol en el adulto (ATP III)
 - 1.2.3 Prevención primaria con terapéutica de reducción de las concentraciones de LDL-C.
- 1.3 Efecto de la proteína de soya sobre los lípidos plasmáticos
- 1.4 Variación genética: SNPs
 - 1.4.1 Apolipoproteína A-1
 - 1.4.2 Apolipoproteína E
 - 1.4.3 ABCG8/5

2. Definición del problema y justificación

3. Pregunta de investigación

4. Hipótesis

5. Objetivos

6. Material y Métodos

- 6.1 Diseño del estudio
- 6.2 Reclutamiento y selección
- 6.3 Criterios de inclusión
- 6.4 Criterios de exclusión
- 6.5 Descripción de la maniobra.
- 6.6 Programa de estudio
- 6.7 Descripción de la maniobra o intervención

7. Tamaño de muestra

8. Variables a medir

- 8.1. Cumplimiento de la dieta
- 8.2. Colesterol Total
- 8.3. Triglicéridos
- 8.4. Colesterol HDL
- 8.5. Colesterol LDL
- 8.6. Análisis de PCR- Tiempo Real
 - 8.6.1 Aislamiento de DNA

- 8.6.2 Cuantificación de DNA
- 8.6.3 Ensayos Taqman utilizados.
- 8.6.4 Detención de polimorfismos por discriminación alélica en PCR tiempo real

9. **Análisis Estadístico**

10. **Resultados**

- 10.1 Genotipos y frecuencia de alelos
- 10.2 Concentración basales de lípidos séricos en los pacientes
- 10.3. Efecto de los polimorfismos sobre la respuesta al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada
- 10.4 Efecto de los polimorfismos sobre la respuesta al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada y una bebida a base de proteína de soya.

11. **Discusión**

12. **Conclusión**

13. **Bibliografía**

TERMINOLOGIA

Las abreviaturas utilizadas en esta tesis son las siguientes:

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ABCA1	Proteína de unión de ATP de la proteína de membrana A1
ABCG	ABC ATP binding cassette transporters
APOA-1:	Gen de la apolipoproteína de tipo A-1
APOE:	Gen de la apolipoproteína de tipo E
ATP III	Tercer informe del Panel de Expertos sobre la Detección, Evaluación y Tratamiento de los niveles sanguíneos elevados de colesterol en el adulto
CT	Colesterol total sérico
ECV:	Enfermedades cardiovasculares
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
HL	Lipasa hepática
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HDL-C	Colesterol HDL
IDL	lipoproteínas de intermedia densidad.
IMC	Índice de masa corporal
LCAT.	lecitina-colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-C	Colesterol LDL
LPL	Lipoprotein lipasa
mmol.	milimol
MUFA	ácidos grasos monoinsaturados
PCR	Reacción de cadena de la polimerasa
PUFA	ácidos grasos polinsaturados
SFA:	ácidos grasos saturados
SNP:	Polimorfismos de un único nucleótido
SR-B1	Receptor depurador B1
TG.	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad.

RESUMEN.

Introducción: El aumento en la concentración de colesterol plasmático, incrementa el riesgo de presentar enfermedad cardiovascular (EC). Sin embargo las concentraciones de colesterol en los individuos varían ampliamente en respuesta al consumo de grasa y colesterol en la dieta. Estas variaciones no se explican solamente por la diferencia en la adherencia o cumplimiento a seguir los tratamientos dietarios, sino a otros factores. Entre estos factores esta la variabilidad genética, por lo tanto, es importante considerar el efecto de varios polimorfismos de múltiples genes. Por otra parte se ha demostrado que una cantidad tan pequeña como 25g de proteínas de soya/día en lugar de proteína animal por 6 semanas reduce las concentraciones de colesterol. De esta manera investigando la interacción gen-dieta se mejorara el entendimiento del papel de la dieta en reducir el riesgo de presentar daño cardiovascular.

Objetivo: Estudiar la asociación de uno o más de los siguientes polimorfismos de APOA1 (-75bp G/A), APOE (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4), ABCG8 (D19H) y ABCG5(Q604E) en la concentración de lípidos al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada y una bebida proteína de soya en pacientes con hipercolesterolemia.

Material y Métodos: Se solicito a pacientes de la consulta y/o personas y/o familiares del personal que labora en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran a participar en el estudio. Hombres y mujeres, entre 30 y 65 años de edad, con índice de masa corporal entre 20 y 34.9 kg/m² y con colesterol total mayor de 210mg/dl. Se excluyeron los pacientes con enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes mellitus, hipotiroidismo, enfermedad renal, hepática, tabaquismo positivo, terapia hormonal o que

consumía medicamentos hipolipemiantes. Una vez cumplidos los criterios de selección, los sujetos con hipercolesterolemia participaron en 2 fases: la primera con duración de un mes, la segunda con duración de 2 meses. En la primera fase, los integrantes del protocolo ingirieron diariamente una dieta baja en grasa saturada (BGS) como la recomienda el National Cholesterol Education Program y en la segunda fase de 2 meses se consumió el mismo tipo de dieta BGS con la adición de la bebida de soya (25g) (BGS-S). El estudio consistió en una examinación previa, al inicio se tomo una muestra de sangre para aislamiento de ADN y para determinar la concentración de colesterol total (CT), colesterol LDL (LDL-C), colesterol HDL (HDL-C) y triglicéridos (TG) séricos, posteriormente cada mes, se medía la concentración de lípidos en sangre, peso del paciente y se realizaban encuestas dietarias

Resultados: El apego encontrado a la dieta BGS fue mayor del 90% y al consumo de la bebida de soya fue del 100%. Durante el estudio, los pacientes no tuvieron perdida significativa de peso debido al tratamiento dietario, tampoco hubo cambios de estilo de vida como cambios en la actividad física. La distribución de genotipos (homocigoto del alelo silvestre, heterocigoto, y homocigoto del alelo no común) en cada polimorfismos fueron los siguientes: ABCG5 C1950G (15,19,9), ABCG8 D19H (37,6). APOA1 -75(AG) (20,20,3) y APOE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 (0,33,10). Y para ver si las frecuencias de cada genotipo en los pacientes eran representativas de nuestra población, se calculo el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), y la distribución de los genotipos estuvo en equilibrio de H-W.

Las concentraciones de los perfiles de lípidos séricos de todos los pacientes fueron analizadas a lo largo del tratamiento dietario y el consumo de la bebida

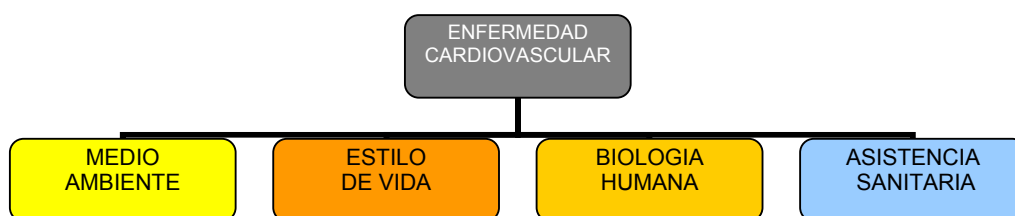
de soya durante los tres meses, observando una reducción de CT del 19.20 % ($p = 0.0001$), TG de 41.7% ($p= 0.0001$) y LDL de 17.4 % ($p= 0.06$) con un aumento de HDL 15.11% ($p= 0.29$), Posteriormente para el análisis de polimorfismos se dividieron los pacientes en dos grupos: un grupo fueron los homocigotos para el alelo común, y el otro los heterocigotos u homocigotos para el alelo no común. Los resultados indican que, hubo una interacción entre genotipo x tiempo en pacientes con genotipo DH, del gen ABCG8 D19H sobre reducción de TC y LDL-C de 18.7 y 21.1%, después del consumo de la dieta BGS-S.

Conclusión: Este estudio mostró que los sujetos con el polimorfismo ABCG8 (D19H), mostraron una reducción significativa en las concentraciones de CT y LDL-C después del consumo de la dieta BGS-S por dos meses. Los resultados de este estudio indican que la nutrigenética es muy importante para conocer que individuos pueden responder o no a un tratamiento dietario en base a la presencia de polimorfismos específicos

1. ANTECEDENTES

Las enfermedades cardiovasculares (EC) constituyen actualmente la primera causa de mortalidad mundial y en México. [1] Esto representa un importante problema de salud pública por lo que se requiere precisar esfuerzos para su prevención. No solo en su tratamiento, sino fundamentalmente en la investigación de las causas (factores) de riesgo que originan las EC para poder actuar sobre ellas de manera preventiva [2]

Las EC son enfermedades complejas y multifactoriales. Con excepción de algunas cardiopatías congénitas y otros síndromes poco prevalentes con un gran componente genético, la mayoría de EC es el resultado de la interacción entre varios factores genéticos y ambientales que determina el riesgo de padecer un incidente cardiovascular. Estos factores o causas se denominan formalmente factores de riesgo expresando así su componente probabilístico más bien que determinista. Estos factores de riesgos se han clasificado en 4 grupos: medio ambiente, estilo de vida, biología humana y asistencia sanitaria. [3]



El medio ambiente comprende los factores poco modificables por el individuo, entre ellos se encuentran las radiaciones ionizantes, los contaminantes atmosféricos, las bacterias, los virus, la temperatura, la humedad, etc. El estilo de vida comprende los comportamientos que adopta el

individuo en su manera de vivir (consumo de tabaco, alcohol, ejercicio, consumo de alimentos, drogas, etc.). La biología humana hace referencia a la dotación genética de los individuos, mientras que la asistencia sanitaria comprende todos los cuidados de salud que proporciona el sistema sanitario. Simplificando este esquema clásico, La Epidemiología genómica considera solo dos factores de riesgo: los genéticos (genoma) y los ambientales (factores no genómicos). [4]

EPIDEMIOLOGIA GENOMICA

Factores Genéticos

Variaciones en genes candidatos relacionados con:

- Metabolismo de lípidos
- Obesidad
- Diabetes
- Hipertensión

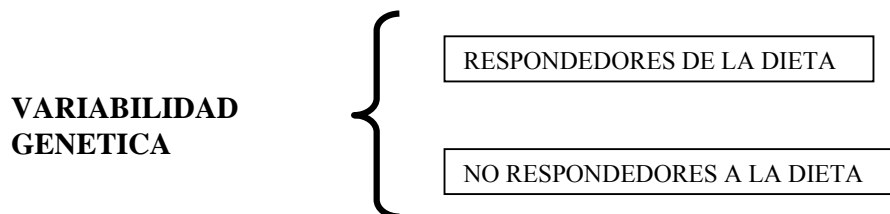
Factores Ambientales

- Dieta
- consumo de tabaco
- alcohol
- actividad física

Por lo tanto esta tesis se enfocara a la integración del estudio de ambos tipos de factores de riesgo, factores genéticos relacionados con el metabolismo de lípidos y factores ambientales principalmente la dieta.

Un gran número de estudios indica que un aumento en las concentraciones de colesterol, específicamente colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), incrementa el riesgo de presentar EC [5] Las concentraciones elevadas de LDL-C en la población en general resultan en parte, de un alto consumo de grasas saturadas y colesterol. Sin embargo, las concentraciones de LDL-C en los individuos varían ampliamente en respuesta al consumo de grasa y colesterol en la dieta [6] Estas variaciones no son

explicadas solamente por diferencias en la adherencia o cumplimiento a seguir los tratamientos dietarios, sino a otros factores tanto genéticos, hormonales y del medio ambiente que están involucrados en la respuesta. La variabilidad genética de la respuesta de un individuo al consumo de colesterol y grasa se ha documentado previamente. Por ejemplo, polimorfismos genéticos los cuales se derivan generalmente de uno o más variaciones en el ADN en un locus particular, pueden influenciar una respuesta a un desafío dietario. Tales polimorfismos pueden crear o eliminar sitios de corte para una enzima de restricción específica. Aunque el consumo de grasas saturadas y colesterol aumenta las concentraciones de colesterol en suero, dando lugar a un riesgo más alto de enfermedades arterio-coronarias, no todos los individuos dentro de la población son susceptibles, ya que los factores genéticos parecen dividir a los individuos en “respondedores a la dieta” o “no respondedores a la dieta [7, 8]



Esto puede deberse a los polimorfismos; un polimorfismo se define como una mutación en la secuencia del ADN, se presenta con una frecuencia $\geq 1\%$ en la población. [9]

1.1 METABOLISMO DE LOS LIPIDOS.

1.1.1. CLASIFICACIÓN Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas son complejos de gran tamaño, en su mayor parte esféricos, que transportan lípidos (principalmente triglicéridos, ésteres de colesterol y vitaminas liposolubles) a través de los líquidos del organismo (plasma, líquido intersticial y linfa) hacia los tejidos. Las lipoproteínas desempeñan un papel esencial en la absorción del colesterol de los alimentos, los ácidos grasos de cadena larga y las vitaminas liposolubles, el transporte de triglicéridos, colesterol y vitaminas liposolubles desde el hígado hasta los tejidos periféricos y el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado.

Las lipoproteínas contienen un núcleo de lípidos hidrófobos (triglicéridos y ésteres de colesterol) rodeados por lípidos hidrófilos (fosfolípidos, colesterol no esterificado) y por proteínas que interactúan con los líquidos corporales. Las lipoproteínas del plasma se dividen en cinco clases principales, basadas en sus densidades relativas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoproteins, VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (intermediate-density lipoproteins, IDL), lipoproteínas de baja densidad (low-density lipoproteins, LDL) y lipoproteínas de alta densidad (high-density lipoproteins, HDL). Cada clase de lipoproteínas comprende una familia de partículas que tienen variaciones leves en densidad, tamaño, migración durante la electroforesis y composición proteínica. La densidad de una lipoproteína está determinada por la cantidad de lípido y proteína por partícula. Las lipoproteínas de alta densidad son las menores y más densas de las lipoproteínas, en tanto que los quilomicrones y las VLDL son las partículas de lipoproteína de mayor tamaño y menos densas. La mayor parte de los

triglicéridos son transportados en quilomicrones o VLDL y la mayor parte del colesterol es transportado en forma de ésteres de colesterol en las LDL y las lipoproteínas de alta densidad o HDL-C.

Se requieren las apolipoproteínas para la formación de las lipoproteínas. Las apolipoproteínas también sirven para activar enzimas importantes en el metabolismo de las lipoproteínas y para mediar su fijación a los receptores de la superficie. La ApoA-I, que es sintetizada en el hígado y en el intestino, se encuentra prácticamente en todas las partículas de HDL. La ApoA-II es la segunda apolipoproteína de HDL más abundante y se halla en casi dos tercios de todas las partículas de HDL. La ApoB es la principal proteína estructural de quilomicrones, VLDL, IDL y LDL; todas las partículas de lipoproteína contienen una molécula de ApoB, sea ApoB-48 (quilomicrones) o ApoB-100 (VLDL, IDL o LDL). La ApoE se encuentra en múltiples copias en quilomicrones, VLDL y IDL y desempeña un papel decisivo en el metabolismo y en la depuración de las partículas ricas en triglicéridos. Tres apolipoproteínas de la serie C (apoC-I, -II y -III) también participan en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos [10]

Hasta la fecha se conocen alrededor de 15 distintas moléculas específicas de apoproteínas, y pueden clasificarse como a continuación se muestra. (Tabla 1.1.1)

Tabla 1.1.1 Apoproteínas y sus funciones

Apoproteínas	Peso molecular x 10 ³	Vida media	Función
A-I	28.3	5 días	LCAT-activación
A-II	17	5 días	¿?
B-100	250	3 días	VLDL-transporte, LDL catabolismo
B-48	125	3 días	Transporte de quilomicrones
C-I	7	½ día	LCAT-activación
C-II	10	½ día	LPL-activación
C-III	8.5	½ día	LPL-in activación
D	20		HDL-LDL colesterol-éster-transferencia
E	36.5		LPL-inhibición, transporte de colesterol
F	30	¿?	¿?
G	72	¿?	¿?
H	54	¿?	¿LPL-activación?

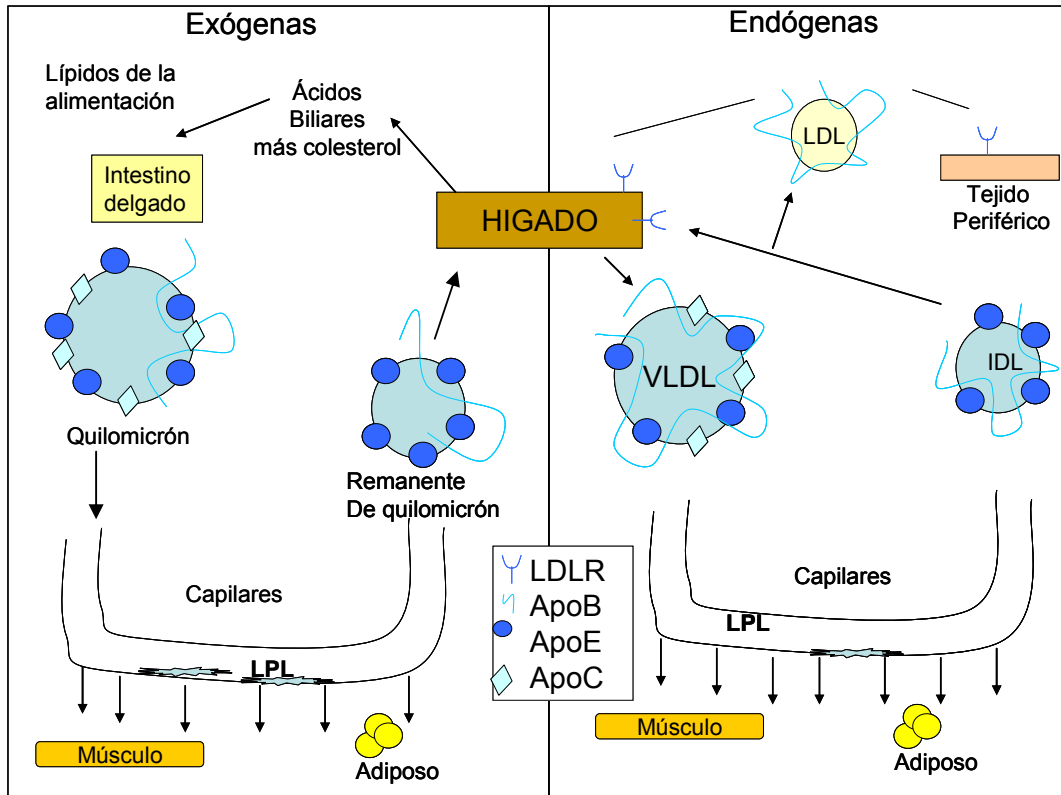
LCAT: lecitina-colesterol aciltransferasa; LPL: Lipoprotein lipasa; ¿? : se ignora la función o el tiempo de vida media.

1.1.2. TRANSPORTE DE LÍPIDOS ALIMENTARIOS (VÍA EXÓGENA)

La vía exógena del metabolismo de las lipoproteínas permite transportar los lípidos provenientes de la dieta. Los triglicéridos de los alimentos son hidrolizados por lipasas pancreáticas dentro de la luz intestinal y son emulsificados con ácidos biliares para formar micelas. El colesterol y el retinol de los alimentos son esterificados (por la adición de un ácido graso) en el enterocito para formar ésteres de colesterol o ésteres de retinol, respectivamente. Los ácidos grasos de cadena más larga (>12 carbonos) son incorporados a los triglicéridos y rodeados con ApoB-48, ésteres de colesterol, ésteres de retinol, fosfolípidos y colesterol para formar quilomicrones. Los quilomicrones que se van generando son secretados hacia la linfa intestinal y luego liberados directamente en la circulación generalizada, donde experimentan múltiples cambios en los tejidos periféricos antes de llegar al hígado [11]. Las partículas encuentran la lipoproteína lipasa (lipoprotein lipase, LPL), la cual está anclada a los proteoglucanos que revisten las superficies del endotelio capilar del tejido adiposo, el corazón y el músculo estriado. Los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por la LPL, con liberación de ácidos grasos libres; la ApoC-II, que es transferida por los quilomicrones de la circulación, actúa como un cofactor para LPL en esta reacción. Los ácidos grasos libres liberados son captados por los miocitos o adipocitos adyacentes y oxidados o reesterificados y almacenados en forma de triglicérido. Algunos ácidos grasos libres fijan albúmina y son transportados a otros tejidos, ante todo al hígado. Las partículas de quilomicron se retraen progresivamente de tamaño conforme el núcleo hidrófobo es hidrolizado y los lípidos hidrófilos (colesterol y fosfolípidos) de la superficie de la partícula son transferidos a las

HDL. Las partículas resultantes, menores, más ricas en éster de colesterol, se denominan remanentes de quilomicrón. Las partículas remanentes son retiradas rápidamente de la circulación por el hígado mediante un proceso que requiere ApoE [12]. (Figura 1.1.2)

Figura 1.1.2.



Las vías metabólicas exógenas y endógenas de las lipoproteínas. La vía exógena transporta lípidos alimentarios periferia y al hígado. La vía endógena transporta lípidos hepáticos a la periferia. LPL, lipasa de lipoproteínas; FFA, grasos libres (free fatty acids); VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de densidad interna; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad.

1.1.3 Transporte de lípidos hepáticos (vía endógena)

La vía endógena del metabolismo de las lipoproteínas representa la secreción hepática del metabolismo de VLDL a IDL y LDL. Las partículas de VLDL semejan a los quilomicrones en cuanto a su composición de proteínas pero contienen apoB-100, más que apoB-48, y tienen un mayor índice de colesterol triglicérido (alrededor de 1 mg de colesterol por cada 5 mg de triglicéridos). Los triglicéridos de las VLDL derivan predominantemente de la esterificación de los ácidos grasos de cadena larga. El empaquetamiento de los triglicéridos hepáticos con los otros componentes importantes de la partícula de VLDL naciente (apoB-100, ésteres de colesterol, fosfolípidos y vitamina E) requiere la acción de la enzima proteína de transporte microsómico (microsomal transfer protein, MTP). Después de su secreción hacia el plasma, las VLDL adquieren múltiples copias de apoE y apolipoproteínas de la serie C. Los triglicéridos de VLDL son hidrolizados por LPL, ante todo en tejidos muscular y adiposo. Conforme los remanentes de VLDL experimentan hidrólisis adicional, siguen disminuyendo su tamaño y se convierten en IDL, las cuales contienen cantidades similares de colesterol y triglicéridos. El hígado retira entre 40 y 60% de los remanentes de VLDL y IDL mediante endocitosis mediada por el receptor LDL a través de la unión a la apoE. La IDL restante es remodelada por la lipasa hepática (hepatic lipase, HL) para formar LDL; durante este proceso, la mayor parte del triglicérido de la partícula es hidrolizada y todas las apolipoproteínas excepto apoB-100 son transmitidas a otras lipoproteínas. El colesterol de las LDL constituye casi 70% del colesterol plasmático en la mayoría de los individuos. Aproximadamente 70% de las LDL de la circulación

son aclaradas mediante endocitosis mediada por el receptor a LDL en el hígado. [13]

1.1.4. Metabolismo de las HDL y transporte inverso de colesterol

Todas las células con núcleo sintetizan colesterol, pero sólo los hepatocitos pueden metabolizar de manera eficiente y excretar el colesterol del organismo. La vía predominante de la eliminación de colesterol es mediante la excreción hacia la bilis, sea en forma directa o tras su conversión a ácidos biliares. El colesterol de las células periféricas es transportado desde las membranas plasmáticas de dichas células hasta el hígado por un proceso mediado por las HDL y denominado transporte inverso de colesterol.

Las partículas de HDL nacientes son sintetizadas por el intestino y el hígado. Las partículas de HDL discoideas recién formadas contienen apoA-I y fosfolípidos (principalmente lecitina) pero rápidamente adquieren colesterol no esterificado y fosfolípidos adicionales de los tejidos periféricos al transportarse por la proteína de unión a el trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate, ATP) de la proteína de membrana A1 (ATP-binding cassette protein A1, ABCA1). Una vez incorporado en la partícula de HDL, el colesterol es esterificado por la lecitina aciltransferasa del colesterol (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT), una enzima del plasma vinculada a HDL. Conforme las HDL adquieren más ésteres de colesterol, se vuelven esféricas y apolipoproteínas y lípidos adicionales son transferidos a las partículas desde las superficies de quilomicrones y VLDL durante la lipólisis.

El colesterol de las HDL es transportado a los hepatocitos por una vía indirecta y una directa. Los ésteres de colesterol de las HDL se transfieren a lipoproteínas que contienen apoB en intercambio por triglicérido, por acción de

la proteína de transporte de ésteres de colesterol (cholesteryl ester transfer protein, CETP). Los ésteres de colesterol luego son retirados de la circulación mediante endocitosis mediada por el receptor de LDL. El colesterol de las HDL también puede ser captado directamente por los hepatocitos a través de la clase de receptores depuradores BI (scavenger receptor class BI, SR-BI), un receptor de la superficie celular que media el transporte selectivo de lípidos hacia las células. [12]

Las partículas de HDL sufren una remodelación considerable dentro del compartimiento plasmático a medida que transportan lípidos y proteínas a las lipoproteínas y células. (Figura 1.1.3), [14]

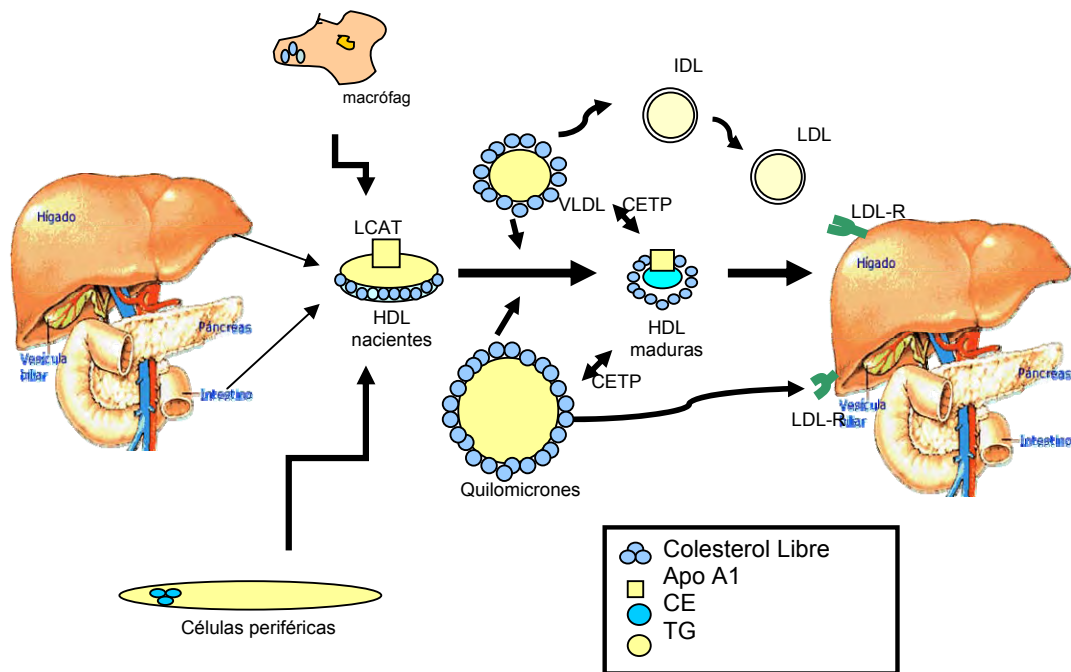
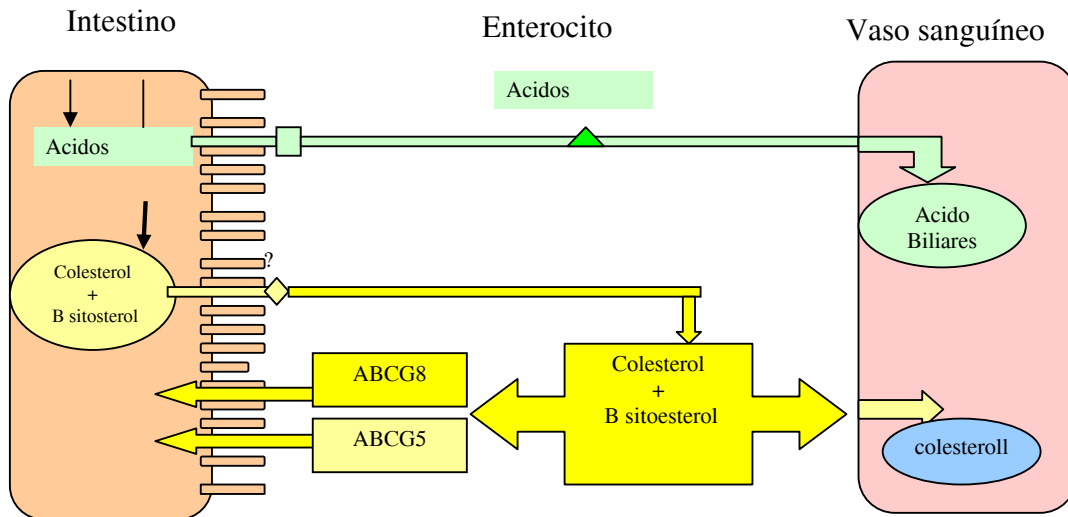


Figura 1.1.3. Metabolismo de las HDL y transporte inverso de colesterol. Esta vía transporta el exceso de colesterol desde la periferia de nuevo al hígado para su excreción en la bilis. El hígado y el intestino producen HDL nacientes. El colesterol libre es adquirido por macrófagos y otras células periféricas y esterificado por LCAT, formado HDL madura. El colesterol unido a HDL puede ser captado selectivamente por el hígado a través de SR-B1. Como alternativa, el colesterol de HDL puede ser transferido por CETP desde las HDL hasta las VLDL y los quilomicrones, de luego ser captados por el hígado. LCAT, aciltransferasa de lecitina y colesterol; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; TG, triglicéridos.

En el transporte reverso del colesterol, también intervienen los transportadores ABCG5 y ABCG8 (ABC ATP-binding cassette transporters) que son proteínas transmembranales que utilizan energía de la hidrólisis de ATP para mover sustratos a través de la membrana. Estos transportadores son necesarios para la regulación de la excreción de colesterol y otros esteroides [15] trabajan en conjunto y representan una bomba excretora de esteroides, la cual promueve una salida continua del colesterol y esteroides desde el enterocito y hepatocito hacia el lumen intestinal y bilis respectivamente para su excreción (figura 1.1.4).

Figura 1.1.4: transportadores ABCG5 y ABCG8



1.2. DETECCIÓN, VALORACIÓN Y TRATAMIENTO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA EN ADULTOS.

El Tercer Informe del Panel de Expertos sobre la Detección, Evaluación y Tratamiento de los Niveles Sanguíneos Elevados de Colesterol en Adultos (Adult Treatment Panel III o ATP III) [16] , constituye una actualización de las guías clínicas existentes del Programa de Educación Nacional sobre Colesterol (NCEP [National Cholesterol Education Program's] en Estados Unidos). El ATP I delineó una estrategia para la prevención primaria de la enfermedad coronaria (EC) en personas con niveles elevados de colesterol asociado con LDL de 160 mg/dl o más o valores límites (130-159 mg/dl) y que se acompañen de múltiples factores de riesgo mencionadas en la tablas 1.2.2 (2 o más). El ATP II elaboró un tratamiento intensivo para disminuir los niveles de LDL-C en personas con EC establecida (meta terapéutica: niveles de LDL-C de 100 mg/dl o menos). El ATP III mantiene la atención sobre el tratamiento intensivo de los pacientes con EC y enfoca sobre la prevención primaria en individuos con múltiples factores de riesgo. [6]

1.2.1 Principales puntos de la guía ATP III. Estimación del riesgo, niveles de LDL-C como meta terapéutica

Las investigaciones experimentales, de laboratorio, epidemiológicas y de las formas genéticas de hipercolesterolemia indican que los niveles elevados de LDL-C constituyen la causa principal de EC. Ensayos clínicos recientes demostraron que la terapia de disminución de los valores de LDL-C reduce el riesgo de EC, incluso a corto plazo. Por ende, el objetivo principal de la terapia hipolipemiente del ATP III es la disminución de los niveles de LDL-C. El principio básico de la prevención refiere que la intensidad de la terapia de

reducción del riesgo debe ajustarse al riesgo absoluto de cada persona. La valoración del riesgo requiere la medición de los niveles de LDL-C como parte del análisis del perfil de lipoproteínas y la identificación de determinantes de riesgo asociados. En adultos de 20 años o más, el perfil de lipoproteínas en ayunas (CT, LDL-C, HDL-C y TG) debe evaluarse cada 5 años.

La guía ATP III adopta la siguiente clasificación del perfil de lipoproteínas (niveles en mg/dl). de LDL-C < 100: óptimo, 100-129: casi óptimo, 130-159: en el límite superior, 160-189: elevados, 190 o más: muy elevados; CT < 200: adecuado, 200-239: límite superior, 240 o más: elevados; y HDL-C < 40: bajos, 60 o más: elevados. (Tabla 1.2.1)

TABLA 1.2.1 Perfil de lípidos recomendados por la guía ATPIII

Colesterol LDL < 100 100-129 130-159 160-189 ≥ 190	Optimo Casi optimo Moderadamente altos Alto Muy alto
Colesterol total < 200 200-239 ≥ 240	Deseable Moderadamente altos Alto
Colesterol HDL <40 ≥ 60	BAJO ALTO
TRIGLICÉRIDOS <150 150-199 200-499 ≥500	Normal Nivel alto tolerable Altos Muy alto.

Las recomendaciones del ATP-III modificaron los límites de normalidad.

A continuación se describen los límites de “normalidad” de cada parámetro y la razón para escogerlo.

COLESTEROL-HDL : La relación entre mortalidad cardiovascular y el HDL-C es una línea continua, sin un punto de inflexión, por ello, cualquier criterio diagnóstico que se escoja será arbitrario; su selección dependerá del riesgo absoluto al que se asocie en la población estudiada. En el ATP-II se definió como punto de corte una concentración menor de 35mg/dl. En la nueva versión se decidió aumentar la sensibilidad del criterio; por lo que niveles por debajo de 40 fueron considerados como anormales. Los autores justificaron el cambio con base en que la obesidad y la vida sedentaria (factores de riesgo considerados claves en la prevención) se asocian a niveles entre 35 y 40mg/dl. Sin embargo, la sustentación del cambio es pobre, sin presentar los datos en que se basaron. Esta definición identifica como afectados a 33% de los hombres y a 20% de las mujeres en Estados Unidos. El consenso decidió utilizar el mismo criterio para hombres y mujeres, pese a que las mujeres tienen concentraciones promedio más altas. Esta decisión busca evitar que mujeres con un riesgo cardiovascular bajo califiquen para recibir tratamiento hipolipemiante. Este abordaje contrasta con la estrategia del consenso Europeo de 2003 en que se usan puntos de corte distintos para hombres y mujeres (40 y 46 mg/dl. respectivamente).

El porcentaje de casos afectados es mayor en el estudio mexicano representativo de la población [17], en el que 48.4% de los adultos entre 20 y 69 años que viven en zonas urbanas tiene un HDL-C < 35 mg/dl. Al aplicar el criterio del ATP-III aumenta el porcentaje a 60%. El alto porcentaje de la población considerado como afectado por el nuevo criterio y la pobre sustentación del cambio obliga a meditar sobre su aplicabilidad en nuestra población. Para seleccionar el criterio diagnóstico se requieren datos obtenidos en estudios prospectivos hechos en población mexicana. Es necesario conocer

el riesgo absoluto al que se asocian las distintas concentraciones de HDL-C en nuestra población, ya que el riesgo varía entre los grupos étnicos. Sin esta información es arbitrario cualquier criterio que se proponga.

Niveles altos de HDL-C (> 60 mg/dl) se consideran como un factor protector. Esta aseveración debe analizarse con juicio clínico ya que se han descrito familias con niveles altos de HDL-C y complicaciones vasculares en un alto porcentaje de sus miembros. [18]

TRIGLICERIDOS: El ATP-III identificó a los TG como un factor de riesgo independiente. Reconoció la opinión de múltiples autores que demostraban que la definición de hipertrigliceridemia usada por el ATP-II (200mg/dl) era inapropiada. La evidencia para seleccionar el nuevo punto de corte (> 150 mg/dl) es que los factores de riesgo cardiovascular, aumenta exponencialmente por arriba de este punto de corte. Las dislipidemias aterogénicas como la hiperlipidemia familiar combinada o la asociada al síndrome metabólico, se asocia a valores entre 150 y 200mg/dl; estos casos serían considerados erróneamente como normales con el criterio anterior. Este punto de corte también fue aceptado por el consenso Europeo 2003 que antes reconociera como límite el valor de 180mg/dl. En México, 17.9% de los adultos tienen una concentración de triglicéridos en ayuno entre 150 y 200mg/dl [17].

El ATP III identificó categorías entre las cifras anormales de triglicéridos: limítrofes (150-199mg/dl), alta (200-499 mg/dl) y muy alta (≥ 500 mg/dl). Los casos con niveles muy altos generalmente tienen un hiperlipidemia primaria y tienen como complicación potencial el sufrir pancreatitis. El 3.1% de los mexicanos tienen triglicéridos muy altos, porcentaje significativamente mayor a lo observado en caucásicos.

COLESTEROL TOTAL Y COLESTEROL LDL: El ATP-III conservo los puntos de corte usados en su versión previa. El colesterol total se considera deseable si es < 200mg/dl, limítrofe si es de 200-239 y alto si es ≥ 240mg/dl. Estos puntos de corte fueron seleccionados de estudios epidemiológicos en que se observó que la relación entre colesterol y la mortalidad cardiovascular es logarítmica con dos puntos de inflexión (200 y 240mg/dl). El riesgo aumenta por arriba de 200mg /dl y rebasa un riesgo relativo de dos cuando supera los 240mg/dl. En el consenso europeo se usa un solo punto de corte (190mg/dl); la diferencia de 10mg/dl se debe a la facilidad de emplear un número entero en el sistema de unidades internacional (5mM). El colesterol LDL se calcula con la fórmula de Friedewald, donde: Colesterol LDL = Colesterol total- (colesterol-HDL - (triglicéridos/5).

Se considera como óptimo si es < 100 mg/dl., cercano al óptimo si se encuentra entre 100 y 129mg/dl, limítrofe entre 130 y 159 mg/dl., alto entre 160 y 189 mg/dl y muy alto si es mayor a 190mg/dl.

1.2.2 Factores de Riesgos de la enfermedad cardiovascular

Los determinantes de riesgo en adición a los valores de los lípidos séricos incluyen: la presencia de EC, diabetes, otras formas clínicas de patología aterosclerótica y factores de riesgo principales, como hábito de fumar, hipertensión, bajos niveles de HDL-C, antecedentes familiares de EC temprana (en parientes de primer grado, varones menores de 55 años y mujeres menores de 65 años) y edad (hombres de 45 años o más y mujeres de 55 años o más). (Tabla 1.2.2.1)

TABLA 1.2.2.1. EVALUACION CLINICA PARA IDENTIFICAR PERSONAS CON MULTIPLES (2+) FACTORES DE RIESGO.

Factor de riesgo	Definición	Comentarios
Tabaquismo	Tabaquismo en el mes pasado	
hipertensión	Presión sanguínea \geq 140/90 mmHg, o tomar medicamentos antihipertensivos	Múltiples medidas de presión sanguínea se requiere para realizar el diagnóstico
HDL C bajo	HDL-C < 40 mg/dl	
Historia familiar de EC prematura	ECV clínica o muerte súbita documentada en familiares de primer grado hombres con edad menor de 55 años o en mujeres con edad menor de 65 años	

Sobre la base de estos y otros determinantes de riesgo, el ATP III identifica 3 categorías de riesgo que modifican las metas y modalidades de las terapias de reducción de los niveles de LDL-C. La categoría de alto riesgo abarca a las personas con EC o equivalentes de riesgo de EC (otras formas de patología aterosclerótica, como enfermedad arterial periférica, aneurisma de aorta abdominal y enfermedad sintomática de la arteria carótida; diabetes; múltiples factores de riesgo que confieren un riesgo a 10 años de tener EC mayor al 20%); la meta terapéutica es alcanzar niveles de LDL-C inferiores a 100 mg/dl. La segunda categoría incluye individuos con múltiples factores de riesgo (2 o más), cuyo riesgo de EC estimado a 10 años es de 20% o menos; la meta terapéutica es el logro de niveles de LDL-C menores de 130 mg/dl. La tercera categoría consiste en personas con 0-1 factores de riesgo, con un riesgo de EC estimado a 10 años menor del 10% y una meta terapéutica de valores de LDL-C inferiores a 160 mg/dl. (Tabla 1.2.2.2).

TABLA 1.2.2.2. METAS DE LDL-C

NIVEL DE RIESGO	META DE LDL-C
EC y Riesgo equivalente de EC	< 100 mg/dl.
Factores de riesgo múltiples (2+)	< 130mg/dl.*
Factores de riesgo de 0-1	< 160mg/dl.

* Metas de LDL-C para personas con múltiples factores de riesgo (2 o mas), cuyo riesgo de estimado a 10 años es de 20% o menos.

El riesgo estimado de EC a 10 años en sujetos con 2 o más factores de riesgo se basa en la escala de puntuación de riesgo de Framingham. En aquellos con 0-1 factores de riesgo no es necesario la utilización de esta escala debido a que el riesgo a 10 años raramente alcanza niveles para la intervención intensiva. Los factores de riesgo utilizados en la escala de Framingham incluyen: edad, CT (debido a la mayor base de datos disponible para los niveles de CT que para los de LDL-C), HDL-C, presión arterial y hábito de fumar para hombres y mujeres. El puntaje de Framingham divide a las personas en aquellas con un riesgo de EC a 10 años mayor del 20%, entre 10-20% y menor del 10%.

La valoración inicial del riesgo en la guía ATP III utiliza los factores de riesgos principales independientes para definir el estado de riesgo. Así, para ajustar el enfoque terapéutico, se consideran otros modificadores de riesgo. Entre estos modificadores de riesgo se encuentran los factores relacionados con el estilo de vida como obesidad, inactividad física y dieta aterogénica y los factores emergentes como niveles de lipoproteína (a), homocisteína y factores proinflamatorios y protrombóticos, glucemia en ayunas y evidencia de enfermedad aterosclerótica subclínica. Los factores de riesgo vinculados con el estilo de vida son objetivos directos de las intervenciones clínicas; no obstante, no se emplean para establecer una meta terapéutica de reducción de los

niveles de LDL-C. Los factores de riesgo emergentes no modifican en forma categórica las metas de la terapia de disminución de LDL-C, aunque parecen contribuir en diversos grados al riesgo cardiovascular y pueden ser útiles para guiar la intensidad del tratamiento en personas seleccionadas. (Tabla 1.2.2.3)

TABLA 1.2.2.3. FACTORES DE RIESGO NO LIPIDICOS PARA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (EC).

Factores de riesgo modificables	Factores de riesgo no modificables
Hipertensión*	Edad*
Tabaquismo*	Genero masculino*
Trombogénico, estado hemostáticos	Historia familiar de EC prematura*
Diabetes	
Obesidad	
Actividad física	
Dieta aterogénica.	

1.2.3 Prevención primaria con terapia de reducción de los niveles de LDLC

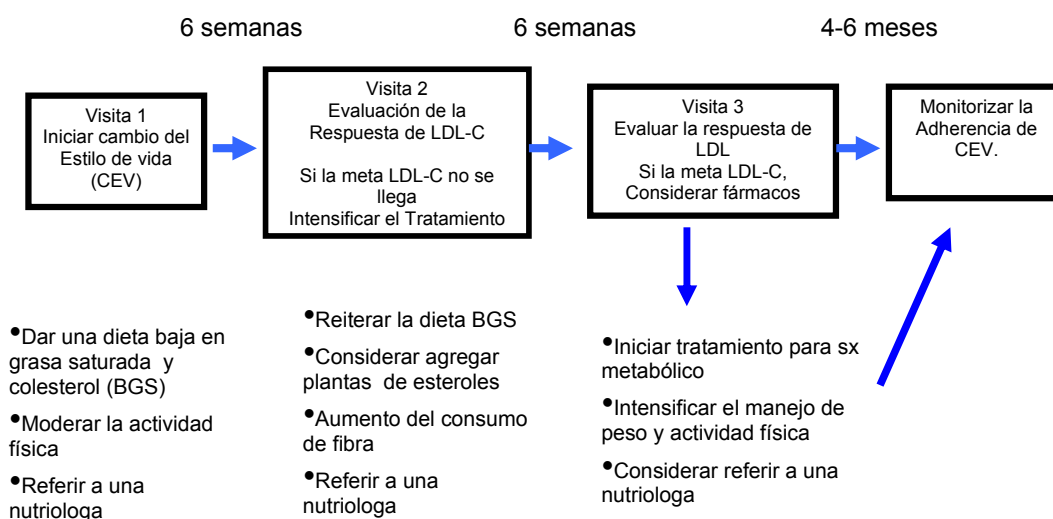
El enfoque clínico para la prevención primaria de EC se basa en los cambios en el estilo de vida que incluyen: la reducción de la ingesta de grasas saturadas (< 7% de las calorías totales) y colesterol (< 200 mg/día) con grasas totales entre el 25-35% de las calorías totales, incremento en la actividad física y control de peso. El primer paso en la terapéutica de cambios en el estilo de vida es la disminución de la ingesta de grasas saturadas y colesterol para reducir los niveles de LDL-C y el riesgo de EC. (Tabla 1.2.3.1). Transcurridas 6 semanas se determina la respuesta; si no se alcanzó la meta, se recomienda el agregado de esteroides (2 g/d) y fibra viscosa soluble (10-25 g/d). (Figura 1.2.3.1)

TABLA 1.2.3.1.

Componente	Cantidad
Grasas saturadas	< 7% de la calorías totales
Grasas poliinsaturadas	Hasta un 10% de las calorías totales
Grasas monoinsaturadas	Hasta un 20% de las calorías totales
Grasas totales	Hasta un 25 a 35% de las calorías totales
Hidratos de carbono	50 a 60% de las calorías totales
Fibra	20 a 30 g/día
Proteína	Aproximadamente 15% de las calorías totales
Colesterol	< 200mg/día
Calorías totales	Equilibrio entre la ingesta y el gasto, para mantener el peso corporal deseable y evitar su aumento.

Los cambios en el estilo de vida constituyen la base de la prevención clínica primaria cuyo objetivo es disminuir el riesgo de EC a largo plazo (más de 10 años) y a corto plazo (10 años o menos). No obstante, algunos sujetos con alto riesgo de EC debido a sus valores altos o muy altos de LDL-C o que presentan múltiples factores de riesgo son candidatos a la terapia con medicamentos hipolipemiantes, como los agentes inhibidores de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (estatinas), drogas secuestradoras de ácidos biliares (colestiramina, colestipol, colesevelam), ácido nicotínico y fibratos (gemfibrozil, fenofibrato y clofibrato).

FIGURA 1.2.3.1. CAMBIOS DE ESTILO DE VIDA TERAPEUTICO



Después de la reducción del LDL-C con la dieta. Se revalora al paciente a las 6 semanas y es cuando ya se considera la utilización de medicamentos y debe continuarse con la terapia de modificación del estilo de vida. En general, el fármaco de inicio es una estatina, puesto que el primer objetivo es disminuir los niveles de LDL-C; como opciones alternativas se encuentran los agentes secuestradores de ácidos biliares y el ácido nicotínico. En la mayoría de los casos las dosis de inicio de las estatinas son moderadas. La respuesta del paciente se valora a las 6 semanas; si no se logra la meta debe considerarse la intensificación de la terapia mediante el incremento de las dosis de la estatina utilizada o la combinación de estatinas con un agente secuestrador de ácidos biliares o ácido nicotínico. Luego de 12 semanas, debe revalorarse la respuesta; si no se alcanza la meta, hay que considerar la intensificación de la terapia o la consulta con un especialista en lípidos. Cuando se logra la meta, los pacientes deben ser vigilados en su perfil de lípidos plasmáticos cada 4 o 6 meses. [6].

1.3 EFECTO DE LA PROTEÍNA DE SOYA SOBRE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS.

Resultados en 23 estudios clínicos controlados en humanos con hipercolesterolemia[19] y previos estudios en ratas nefróticas con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia [20] han demostrado que el consumo de proteína de soya produce una significativa reducción en las concentraciones en suero de CT, LDL-C y TG sin afectar significativamente las concentraciones de HDL-C. La reducción de colesterol en humanos es de un 3.77%, de LDL-C en un 5.25%, y de TG en aproximadamente un 7.27%. Se ha demostrado que el efecto hipocolesterolemico de la proteína de soya depende de las concentraciones del colesterol sérico al inicio del tratamiento. [21] Es decir la capacidad de la proteína de soya en reducir los niveles séricos de colesterol es mayor en personas con concentraciones de colesterol inicial >300mg/dl que en personas con valores ligeramente altos aproximadamente de 200mg/dl. Los sujetos que tienen niveles normales de colesterol, menor de 200mg/dl, no tienen una significativa reducción de colesterol cuando reciben dieta a base de proteína de soya. Cuando la concentración de colesterol esta entre 200 y 255mg/dl, la reducción es del 4.4%, y en pacientes con colesterol de 259 a 333mg/dl tienen disminución significativa de 7.4 %.[22]. En pacientes con colesterol mayor de 335mg/dl, la reducción de colesterol fue del 19.6%. Además también se ha reportado una reducción de las lipoproteínas VLDL en sujetos normolipidemicos, indicando el valor potencial antiaterogénico de proteínas de origen vegetal como la de la soya. Los cambios en lípidos son independientes de cambios en peso corporal, consumo de grasa saturada y

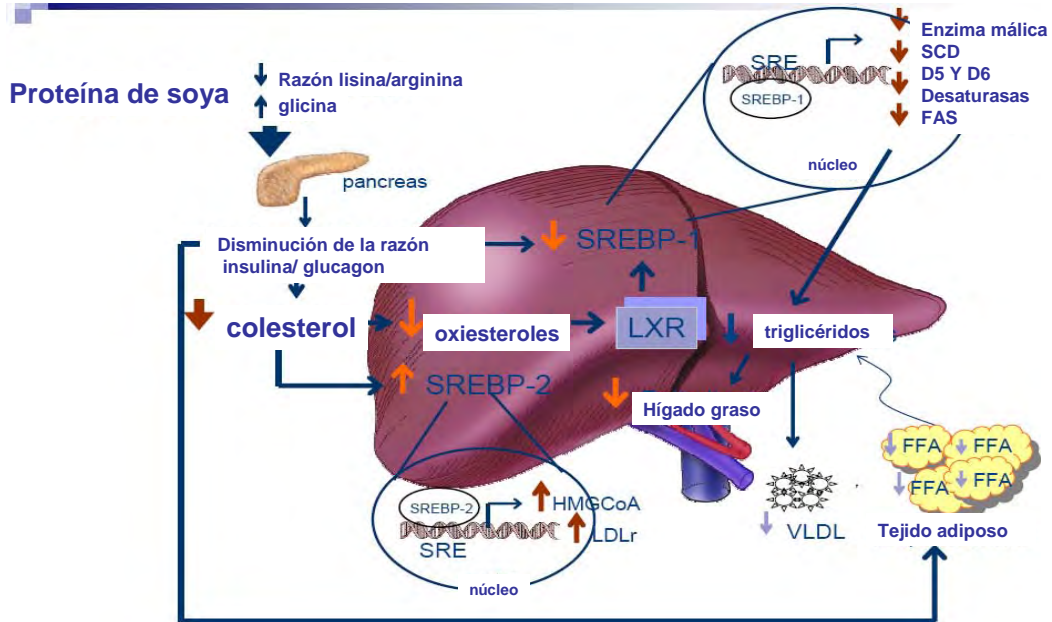
colesterol. La cantidad de proteína de soya que debe ser consumida varía de 25 a 50g de proteína de soya/día[23].

Aunque los productos de soya en nuestro país se han incrementado debido al consumo de soya en una variedad de productos de panificación y cárnicos sin conocimiento del consumidor, la mayor parte de la población no consume productos de soya de forma habitual. Actualmente en el mercado existen productos a base de soya de segunda generación como leche de soya, miso y texturizados de soya, sin embargo un pequeño porcentaje de la población consume productos de soya de forma habitual.

El valor nutricional de los aislados o de los concentrados de proteína de soya es equivalente a proteínas de origen animal. La proteína de soya llena los requerimientos de los aminoácidos indispensables incluyendo aminoácidos azufrados cuando se ingiere de 0.5 a 0.6 gramos de proteínas de soya por Kg. por día. El aislado de proteína de soya puede servir como una excelente fuente de proteínas para llenar las necesidades fisiológicas de los humanos de todas las edades y es considerada como una proteína completa con una calificación química de 1 [24] Un trabajo reciente, ha demostrado que el consumo de proteína de soya por tiempo prolongado no permite que se produzcan picos de insulina como se observa cuando se consume proteína de origen animal [25]. Al reducir las concentraciones de insulina se disminuye la activación del factor de transcripción SREBP-1 (siglas en inglés sterol regulatory element binding protein) [26] el cual controla la expresión de genes de la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado [27] y el tejido adiposo, y por lo tanto disminuye la lipotoxicidad. [28] La proteína de soya disminuye la expresión de SREBP-1 en tejido adiposo[29]. Este efecto es de gran importancia por el posible beneficio

que puede tener el consumo de proteína de soya en personas obesas con resistencia a la insulina, ya que el consumo de al menos 25g de proteína de soya podría reducir o retrasar el desarrollo de resistencia a la insulina.

FIGURA 1.3



Nimbe Torres, Ivan Torre-Villalvazo and Armando R. Tovar
 J. Nutr Biochem. 2006 Jun;17(6):365-73[30]

1.4. VARIACION GENETICA: SNPs

El genoma de un individuo se organiza en cromosomas, los cuales contiene genes o unidades de herencia, formados a su vez por secuencias de ADN, molécula que contiene y trasmite la información genética. El ADN esta compuesto por dos cadenas enrolladas alrededor de si mismas para formar una “doble hélice” [31]. Cada cadena esta formada de millones de bloques químicos llamados “bases”. El ADN solamente contiene 4 tipos de bases diferentes designadas por las letras A (adenina), T (timina), G (guanina) y C (citosina), cuyo orden secuencial determina el mensaje para un gen concreto [32]. Menos del 0.1% del genoma humano es variable entre los distintos individuos. Las formas mas frecuentes de variación del ADN se denominan SNPs o polimorfismos de una sola base, que consiste en sustituciones de una base por otra en la secuencia del ADN, se presenta con una frecuencia de $\geq 1\%$ en la población. Cada una de las formas variantes de un gen o de un marcador particular como pueden ser los SNPs, se denominan alelos. Por lo tanto, diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias. [9]. Los SNPs, están presentes en el genoma humano con una frecuencia de uno por cada 1000 pares de bases. Son, por lo tanto, diferentes variaciones, que aparecen con menor frecuencia.

Por lo tanto existen miles de variaciones genéticas que contribuyen directamente a la diversidad estructural genética del ser humano. Para definir la frecuencia de estas variaciones en las distintas poblaciones se pusieron en marcha diversos proyectos de secuenciación a gran escala, como el Proyecto Genoma Humano, así como proyectos de genotipado a gran escala en los que

participan numerosos países como es el caso del Proyecto Hap Map [33], actualmente vigente.

El proyecto Genoma Humano (Human Genome Project en inglés) consistió en determinar las posiciones relativas de todos los nucleótidos (o pares de bases) e identificar los 20,000 a 25,000 genes presentes en el genoma. En este proyecto se invirtieron 3000 millones de dolares, que fue iniciado en 1990 por el departamento de Energía y los Institutos de Salud de los Estados Unidos, con un plazo de realización de 15 años con las siguientes metas: 1) construir mapas y secuencias del genoma humano; 2) construir mapas y secuenciar el ADN de otros organismos; 3) desarrollar bases de datos y forma de utilizarlas; 4) discutir los aspectos éticos, legales y sociales del proyecto; 5) formar investigadores en el área; 6) propiciar el desarrollo tecnológico, y 7) transferir las tecnologías. Donde participaron de manera principal Alemania, China, Estados Unidos, Francia, Inglaterra y Japón.

El proyecto de Hap Map surgió con el objetivo central de crear una herramienta que facilite los estudios de asociación entre factores genéticos y diversas enfermedades comunes. El proyecto se inicio oficialmente en octubre del 2002 con financiamiento de Canadá, China, Estados Unidos, Inglaterra y Japón.

Unos de los frutos del proyecto Genoma Humano ha sido el descubrimiento de millones de variantes de secuencias en el genoma humano. La mayoría de estas variantes son SNPs, lo que supone una oportunidad para estudiar la base genética de enfermedades complejas por medio de estudios de población [34]. Hasta la fecha se han identificado más de 9 millones de

SNPs de los que han sido validados y depositados en bases de datos públicas unos cinco millones. [35] .

Se han descrito miles de genes posiblemente implicados en el riesgo de EC actuando a distintos niveles: metabolismo lipídico, tensión arterial, obesidad, etc. En esta tesis se han elegido, como principales genes candidatos (APOA1, APOE, ABCG8/5), los más relevantes en el metabolismo lipídico y que se asocian con una respuesta que responde a tratamientos dietarios [8] .

A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de estos genes así como de los polimorfismos

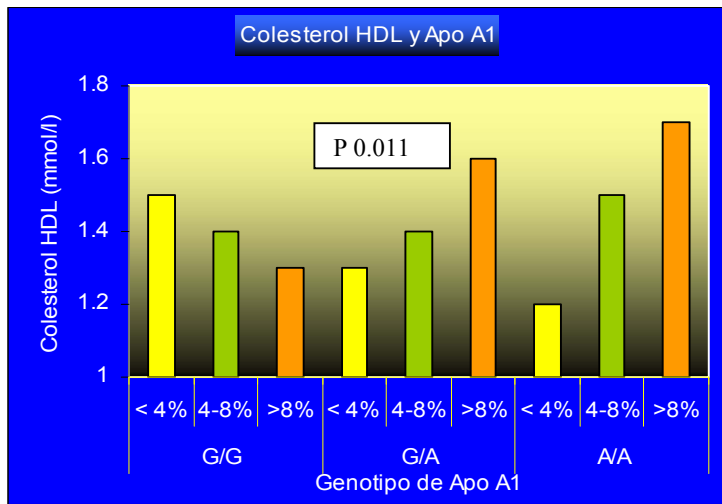
1.4.1 Apolipoproteína A-1 (Apo A1)

Es la principal Apolipoproteína de la lipoproteína de alta densidad (HDL), constituyendo cerca del 70 a 80% de la masa proteica del HDL, es una proteína anfipática involucrada en el transporte reverso de colesterol. Una de sus funciones es actuar como cofactor de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), enzima responsable de la esterificación del colesterol en el plasma. Por lo tanto el locus Apo A1 es un primer candidato para el estudio de la variabilidad genética en niveles de HDL; el locus se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11, junto con el locus para apo C-II y Apo A-IV. [36-38].

En el estudio de Framingham observaron una asociación entre el polimorfismo de Apo A1 -75 G/A y concentración de HDL colesterol (HDL-C) en una población de 755 hombres y 822 mujeres. En este estudio se realizó un modelo de regresión lineal multivariado que mostró que la concentración de HDL-C en mujeres se asoció con el cambio de dieta de acuerdo al porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. (PUFA). Se observó que si se daba menos del 4% de

PUFA en la dieta a individuos con el genotipo silvestre aumentaba el HDL-C aproximadamente un 14%, y cuando se daba una menor concentración de PUFA en la dieta disminuía el HDL-C. En cambio en los individuos con el genotipo G/A se observaba lo contrario, es decir si se restringían los PUFA en la dieta disminuía el HDL-C y cuando se daban mas, aumentaba el HDL-C aproximadamente 13% (Figura 1.4.1.1) en las mujeres pero no en los hombres [38]

Figura 1.4.1.1.



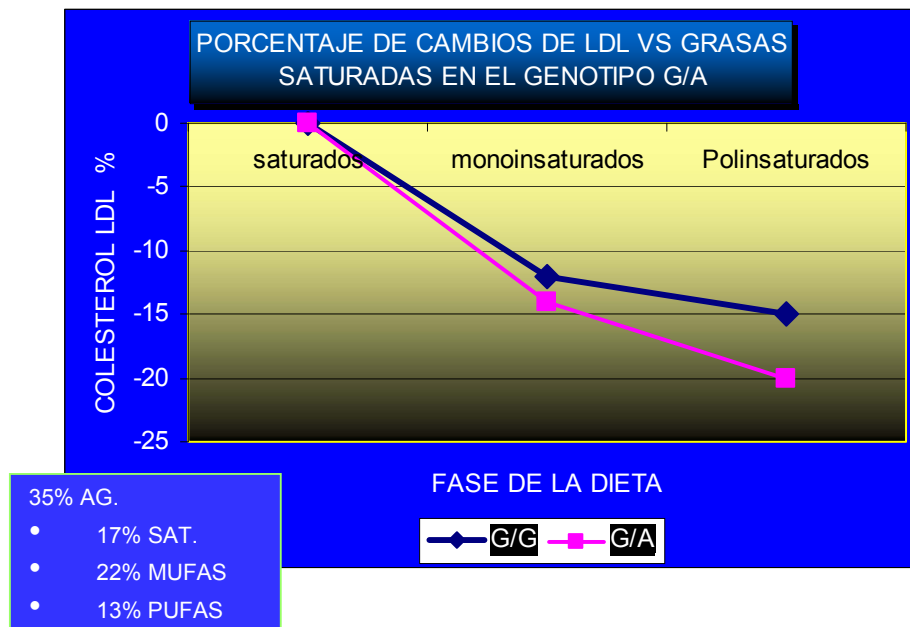
Promedio HDL-C por genotipo APOA1 y consumo de PUFA en diferentes categorías (<4%, 4-8%, > 8% de energía) en mujeres. El valor de P muestra obtención de la interacción entre genotipo APOA1 y el consumo de PUFA en un modelo de regresión lineal en un análisis multivariado.

Estos estudios demuestran la posibilidad de proveer una nutrición individualizada recomendada de acuerdo a su genotipo. Mujeres que tiene el genotipo AA o genotipo G/A podrían aumentar el consumo de PUFAs y así incrementar la concentración de HDL-C reduciendo el riesgo de EC, mientras mujeres con el genotipo G/G podrían recibir recomendación opuesta [39].

En otro estudio en 50 individuos: hombres y mujeres que fueron alimentados primero con una dieta con predominio de ácidos grasos saturados (SFA) por 28 días, posteriormente se les dio una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) por 35 días y finalmente se les dio una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) por 35 días.

En relación con la dieta inicial rica en ácidos grasos saturados, con la dieta rica en MUFAs, se observó casi la misma respuesta en la disminución del LDL-C cuando el genotipo en el promotor de la Apo A1 (-75 G/A) tenía el genotipo G/G, o el genotipo G/A. En cambio cuando se dio la dieta rica en PUFAs se observó que respondían más los individuos con el genotipo G/A que aquellos con el genotipo G/G. ($p = 0.01$) (Figura 1.4.1.2)[40, 41] .

Figura 1.4.1.2



1.4.2 Apolipoproteína E. (Apo E).

El ApoE se encuentra en los quilomicrones. Los triglicéridos de los quilomicrones son hidrolizados por la lipoprotein lipasa, y las partículas de quilomicrones remanentes resultantes se remueven a través de la interacción de ApoE con el receptor de LDL. De esta forma se permite una captura específica de estas lipoproteínas en el hígado, como también partículas de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) remanentes y de la lipoproteína de densidad intermedia (IDL).

El gen que codifica la ApoE se localiza en el cromosoma 19, y presenta 3 isoformas, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. La diferencia de estas isoformas se debe a un cambio del aminoácido cisteína por arginina en 2 posiciones, en el residuo 112 y 158 con lo que se produce 3 genotipos homocigotos ($E2/2$, $E3/3$ Y $E4/4$) y 3 heterocigotos ($E2/3$, $E2/4$ y $E3/4$). La denominación del genotipo se define como sigue:

- $\epsilon 2$ Cisteína- Cisteína (T-T)
- $\epsilon 3$ Cisteína- Arginina (T-C)
- $\epsilon 3$ Arginina- Arginina (C-C)

En un estudio donde los individuos se dividieron de acuerdo a los 3 genotipos de apo E ($3/3$, $3/4$, $4/4$), se les dio 3 dietas en forma secuencial con diferente concentración de colesterol. Primero se les dio una dieta estandarizada con 38% de grasa y 300mg de colesterol/día (semana 0-4); luego una dieta modificada de acuerdo al National Cholesterol Education Program (NCEP) que contenía 34% de grasa y 265mg de colesterol al día (semana 4-12); finalmente se les dio la misma dieta y 566mg de colesterol al día (semana 12-16). Se incluyeron sujetos con hipercolesterolemia moderada.

Se observó que en los individuos con el genotipo APOE 3/3 bajaba su colesterol total (CT) con la segunda dieta hasta 0.7mmol/l en la sexta semana y volvían a subir el CT hasta llegar al colesterol sérico previo en la semana 16, En los individuos con el genotipo APOE 3/4, se observó disminución del CT 0.6mmol/l en la semana 6 manteniéndose hasta la semana 12, y subiendo 0.1mmol/l en la última semana. En cambio en los individuos con el genotipo APOE 4/4 se encontró una baja de CT de 0.7mmol/l, con decremento continuo hasta la semana doce a 1mmol/l y posteriormente una subida de 0.5 mmol/l con la dieta habitual (Figura 1.4.2) [41].

Figura 1.4.2

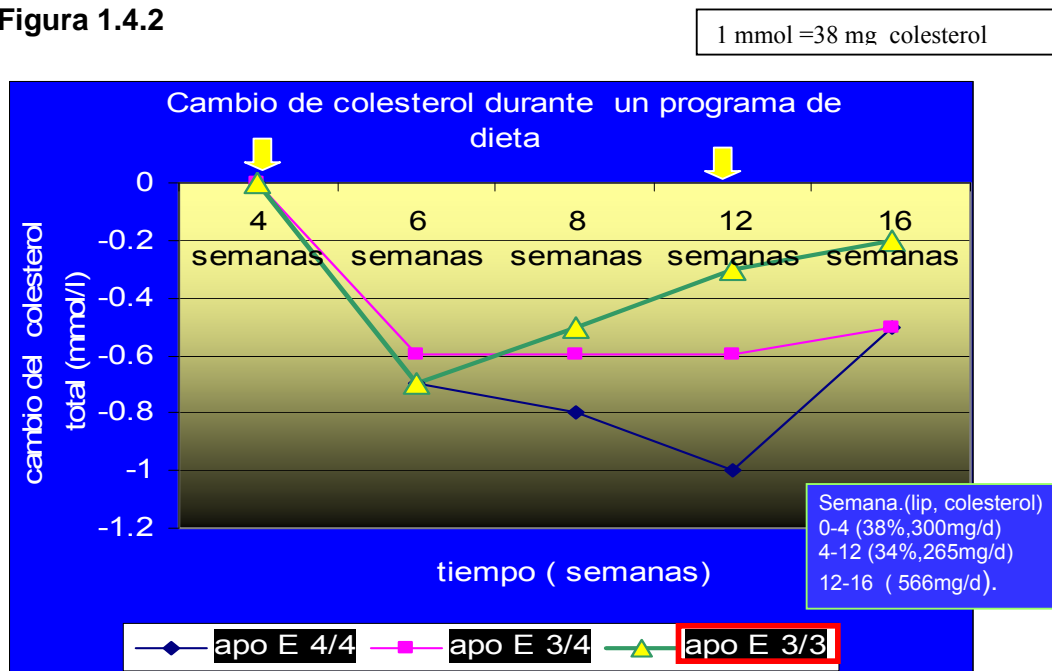


Figura 1.1.2. Promedio de cambios absoluto de CT basal (0- 4 semanas); durante la dieta recomendada por el NCEP (Nacional Colesterol Education Program), (4-12 semanas) y con el la dieta recomendada por NCEP + colesterol (12-16 semanas) en diferentes grupo de genotipos de APOE ε2,ε3,ε4.

El estudio mostró una interacción estadísticamente significativa entre la variación en el gen Apo E (ε2, ε3 y ε4) y el colesterol en la dieta, indicando que los individuos con el genotipo 4/4 tienen mayor respuesta a la dieta baja en colesterol en comparación con los individuos que presentan otros genotipos.

Es importante hacer notar que la frecuencia de los alelos APOE ha sido estudiada en México, y ha sido comparada con otras poblaciones, donde las isoformas más frecuentes en México son APOE ϵ 3, y ϵ 4, y que APOE ϵ 2 no se encontró en nuestra población, Tabla 1.4.2. [42]

TABLA 1.4.2

Frecuencia de alelo APOE en varias poblaciones incluyendo los Mazatecos y Mestizos Mexicanos.

Población	Frecuencias alelicas				Referencia
	N	ϵ 2	ϵ 3	ϵ 4	
Mazatecos (México) Gamboa, 2000	75	0	90%	10%	Gamboa et al. 2000[42]
Mestizos (México) Gamboa, 2000	83	0	91.5%	8.5%	Gamboa et al. 2000[42]
Mayas (México) Kamboh et al. 1991	135	0	91.1%	8.9%	Kamboh et al. 1991[43]
Mexican-American (USA) Haffner et al. 1996	210	2.3%	90.4%	7.1%	Haffner et al. 1996
Caucasian (USA) Breslow et al 1982	117	14%	74%	12%	Breslow et al. 1982[44]
Yanomami (Brazil) Crews et al 1993	96	0.0	84.3%	15.7%	Crews et al. 1993[45]
Cayapa (Ecuador) Scacchi et al. 1997	91	0.0	72%	28%	Scacchi et al. 1997[46]
Nuuk (Greenland) Gerdes et al, 1996	100	0.0	77%	23%	Gerdes et al. 1996[47]
Ammassalik (Greenland) Gerdes et al, 1996	78	0.0	0.769	0.231	Gerdes et al. 1996[48]

1.1.3 ABCG8/ ABCG5

Los transportadores ABCG5 y ABCG8 (ABC ATP-binding cassette transporters) son proteínas transmembranales que utilizan energía de la hidrólisis de ATP para mover sustratos a través de la membrana; estos transportadores son necesarios para la regulación de la excreción de colesterol y otros esteroides [15] Las mutaciones en los genes que codifican para ABCG5/8 han sido identificados como la causa de la sitosterolemia [49] un raro error innato del metabolismo caracterizado por concentraciones elevadas de fitoesteroides en suero, secundario a aumento de absorción y disminución de la secreción biliar de esteroides.

Se ha reportado la relación de 5 polimorfismos de ABCG5/8 (Q604E, D19H, Y54C, T400K, y A632V), en 338 pacientes con hipercolesterolemia tratados con 10mg de atorvastatina y su efecto hipocolesterolemico. Se observo que los sujetos que tenían el genotipo DH, del polimorfismo de ABCG8 D19H, reducían en forma significativa el LDL-C ($p= 0.028$) que los que no tenían el genotipo DH, mientras que los otros polimorfismos no se asociaron significativamente con los efectos del tratamientos. Por lo tanto estos resultados sugieren que los pacientes con hipercolesterolemia, con el genotipo DH del polimorfismo ABCG8 D19H, se presentan con una mayor reducción de LDL-C como respuesta al tratamiento de atorvastatina. [50]

En otro estudio en donde se busco la asociación del polimorfismo ABCG5 C1950G con las concentraciones de colesterol en sangre de 486 sujetos que se les dio una dieta baja en colesterol no se encontró cambios significativos en las concentraciones de colesterol, sin embargo, hubo una tendencia a tener mejor respuesta en los pacientes con el genotipo ABCG5 QQ [51]

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia que sugiere que la variación genética puede contribuir a la heterogeneidad en la respuesta a un tratamiento dietario para disminuir la concentración de lípidos en la sangre. Sin embargo, la contribución de un solo gen en la respuesta a un tratamiento dietario es de solo de un 10%. Por lo que la respuesta a un tratamiento dietario puede ser debida a la contribución de varios genes, indicando que la respuesta este bajo un control poligénico [7]. Por lo tanto, es importante considerar el efecto de varios polimorfismos de múltiples genes para entender la respuesta a una terapia dietaria. Por otra parte se ha demostrado que el consumo de 25g de proteínas de soya/día en lugar de proteína animal por 6 semanas reduce las concentraciones de colesterol[52], cantidad que puede ser incorporada fácilmente a una dieta típica. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con hipercolesterolemia moderada deben de empezar primero con un tratamiento o portafolio dietario conteniendo como base a la proteína de soya con la adición de diferentes compuestos dietarios como pueden ser la fibra y los esteroides de plantas sin ningún riesgo para el paciente. Este portafolio dietario puede reducir hasta un 28% las concentraciones de LDL-C [53], valor muy semejante al encontrado con el uso de las estatinas que pueden causar efectos colaterales no deseables como elevación de enzimas en el músculo y en el hígado [54]

Los diferentes modos de acción de los componentes del portafolio dietario pueden en conjunto dar un efecto aditivo. El mecanismo de acción de la proteína de soya es complejo e involucra diferentes mecanismos: 1) después del consumo prolongado de proteína de soya se produce una reducción en la

relación insulina/glucagon que disminuye la expresión génica de SREBP-1 y por lo tanto de la síntesis de ácidos grasos, 2) y al disminuir las concentraciones de colesterol en el hígado, SREBP-2 sensa las bajas concentraciones de colesterol e incrementa la síntesis de colesterol, 3) aumenta la excreción de ácidos biliares. De esta manera, conociendo los mecanismos de acción de los nutrimentos, se puede conocer mejor la interacción gen-dieta, y por lo tanto el papel de la dieta en reducir el riesgo de presentar daño cardiovascular.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe asociación entre los siguientes polimorfismos Apo A1 (-75bp G/A), Apo E (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4), ABCG8 (D19H) y ABCG5(Q604E) y la concentración de lípidos séricos en pacientes hipercolesterolémicos sometidos a tratamiento dietario basado en una dieta baja en grasa saturada y el consumo de una bebida de proteína de soya?

4. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna:

El consumo de una dieta baja en grasa saturada y proteína de soya en pacientes hipercolesterolémicos mostrará una asociación entre el perfil de lípidos y uno o mas de los siguientes polimorfismos: Apo A1 (-75bp G/A), Apo E (ϵ_2, ϵ_3 y ϵ_4), ABCG8 (D19H) y ABCG5(Q604E).

Hipótesis nula:

El consumo de una dieta baja en grasa saturada y proteína de soya en pacientes hipercolesterolémicos no mostrara una asociación entre el perfil de lípidos y uno o mas de los siguientes polimorfismos: Apo A1 (-75bp G/A), Apo E (ϵ_2, ϵ_3 y ϵ_4), ABCG8 (D19H) y ABCG5(Q604E).

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la asociación de uno o más de los siguientes polimorfismos de la Apo A1 (-75bp G/A), Apo E (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4), ABCG8 (D19H) y ABCG5(Q604E) y la concentración de lípidos después del consumo de una dieta baja en grasa saturada y proteína de soya en pacientes con hipercolesterolemia.

OBJETIVO SECUNDARIO:

Determinar el efecto de una dieta baja en grasa saturada y proteína de soya sobre las concentraciones séricas de colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, y HDL

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Diseño del estudio.

Es un estudio longitudinal, prolectivo y experimental.

6.2 Reclutamiento y Selección:

Se solicito a pacientes de la consulta y/o personas y/o familiares del personal que labora en el INCMNSZ a participar en el estudio para evaluar el efecto de una dieta baja en grasa saturada y proteína de soya sobre las concentraciones de colesterol en sangre.

6.3 Criterios de inclusión:

Genero masculino o femenino:

Pacientes entre 30 y 65 años de edad

Índice de masa corporal entre 20 y 34.9

Pacientes con determinación sérica de colesterol total mayor de 210mg/dl

6.4 Criterios de exclusión:

Pacientes con enfermedad cardiovascular conocida:

Paciente con hipertensión: se define como hipertensión cuando la presión sanguínea sistolica ≥ 140 mmHg o ≥ 90 mmHg la diastolica o que el paciente tome medicamentos antihipertensivos.

Sujetos que consuman medicamentos hipolipemiantes: pacientes que 6 meses antes del estudio o durante el estudio tomen medicamentos como inhibidores

de la 3-OH β metil glutaril CoA reductasa, secuestradores de ácidos biliares, niacinas, fibratos u hormonas de reemplazo

Sujetos con padecimientos metabólicos o endocrinos:

Diabetes mellitus: es definida como glucosa en ayuno de 126mg/dl o más

Enfermedad renal: se define como la enfermedad ya diagnosticada por un medico, con apoyo paraclínico (síndrome nefrótico o insuficiencia renal crónica)

Hipotiroidismo: se define como la enfermedad ya diagnosticada por su médico, con apoyo de pruebas tiroideas.

Enfermedades hepáticas: se define como la enfermedad ya diagnosticada por un médico, con apoyo de paraclínicos. (Colestasis hepática o enfermedad obstructiva hepática)

Pacientes con tabaquismo positivo

Mujeres con terapia hormonal.

6.5 Descripción de la maniobra:

Una vez cumplidos los criterios de selección, los sujetos con hipercolesterolemia participaron en 2 fases: la primera con duración de un mes, la segunda con duración de 2 meses.

En la primera fase, los integrantes del protocolo ingirieron diariamente una dieta baja en grasa saturada como la recomienda el National Cholesterol Education Program (Expert Panel on Detection, 2001) a base de 15 % de proteína total de la cual el 7-8% debe ser de origen vegetal, 60% de hidratos de carbono, 22 g de fibra total, 25% de grasa total de la cual 6 - 7% deben ser ácidos grasos saturados, 12 % de ácidos grasos monoinsaturados y 7 % ácidos grasos poliinsaturados. Por último, el colesterol dietario debe ser de 96.1mg/1000kcal.

La segunda fase de 2 meses consistió en consumir el mismo tipo de dieta (baja en grasa saturada) con la adición de la bebida que contenía 25 g de proteína de soya (Tabla 6.5.1 y Tabla 6.5.2) repartido en dos tomas y cumplía con lo estipulado por la Agencia Food and Drug Administration de los EUA[23]. Esta bebida estaba adicionada con un endulzante que no aporta calorías. El producto en polvo estuvo empaquetado en sobres de 50 gramos.

Tabla 6.5.1

Composición de la dieta baja en grasa saturada (BGS) sin y con (BGS-S) la adición de la bebida de proteína de soya usada durante el estudio.

	Dieta BGS	Dieta BGS-S
Hidratos de carbono (%) ²	60	60
Acidos grasos poliinsaturados (%)	7	7
Acidos grasos monoinsaturados (%)	12	12
Acidos grasos saturados (%)	6	6
Lípidos totales (%)	25	25
Colesterol (mg)	60	60
Proteinas vegetales (%)	8 ³	0
Proteina de soya (%)	0	8 ⁴
Proteina animal (%)	7	7
Proteina total (%)	15	15
Fibra (g/d)	22	22

¹ porcentaje de acuerdo al consumo total de calorías

² menos del 10% de azúcar

³ sin ninguna fuente de soya

⁴ proporcionada solamente por la bebida de soya.

Tabla 6.5.2

Menús representativos de una dieta baja en grasa saturada (BGS) sin o con la bebida de soya (BGS-S).

Dieta BGS	Dieta BGS-S
Desayuno	Desayuno
Una taza de papaya 1 taza de yogurt 2 cucharadas soperas de nueces picadas Una cucharada soperas de miel Una taza de jugo de naranja Una tortilla 30grs de queso panela Media cucharada soperas de aceite de maíz	1 taza de papaya Media taza de yogurt 2 cucharadas soperas de nueces picadas Una cucharada soperas de miel Media taza de jugo de naranja Una tortilla 30grs de queso panela Media cucharada soperas de aceite de maíz
Una taza de café negro Una cucharada soperas de azúcar	Bebida de proteína de soya
Colación:	Colación
1 plátano	1 plátano
Comida	Comida
Una taza de sopa de verduras Media pechuga de pollo asada Una cucharada soperas de salsa verde 2 tortillas 2 tazas de agua de melón 2 cucharadas soperas de azúcar	Una taza de sopa de verduras Media pechuga de pollo asada Una cucharada soperas de salsa verde 2 tortillas 2 tazas de agua de melón 2 cucharadas soperas de azúcar
Colación	Colación
Media taza de zanahoria rallada con limón y sal	Media taza de zanahoria rallada con limón y sal
Cena	Cena
2 huevos Media taza de frijoles negros Una cucharada soperas de aceite de maíz Una tortilla Una taza de te de manzanilla.	Media taza de frijol negro 1 cucharada soperas de aceite de maíz Bebida de proteína de soya

6.6 Programa de estudio.

El estudio consistió de una examinación previa y 3 visitas durante el periodo de seguimiento.

Visita 0, pre-ingreso. Se entrevistó a los posibles candidatos. Las entrevistas fueron llevadas a cabo por licenciadas en nutrición para obtener información sobre los patrones dietarios y las características socio-demográficas y clínicas. Se tomó una muestra de sangre total (10ml) para la determinación de CT, LDL-C, HDL-C y TG. Se evaluaron los resultados de las concentraciones de CT en los voluntarios y se definió si era candidato a ingresar al estudio. Los voluntarios firmaron la carta de consentimiento informado.

Visita 1 al inicio. Se informó a los sujetos las características del estudio, los riesgos y beneficios esperados después del consumo de la bebida con proteína de soya. Se tomó una muestra de 10ml de sangre para aislamiento de ADN genómico. Se aplicó la historia clínica, la encuesta dietética y se registró el peso corporal y talla. Posteriormente, se inició la ingesta de una dieta baja en grasa saturada.

Visita 2 al final del primer mes Se tomó una muestra de 10ml de sangre en ayunas para la determinación del CT, LDL-C, HDL-C y TG, se aplicó una encuesta dietética, se registró el peso corporal y se entregaron 31 sobres con la bebida de proteína de soya en polvo

Visita 3 al final del segundo mes Se tomó una muestra de 10ml de sangre en ayunas para la determinación del CT, LDL-C, HDL-C y TG, se registró el peso corporal, se realizó una encuesta dietaria y se entregaron 31 sobres con la bebida de proteína de soya en polvo

TAMAÑO DE MUESTRA.

El presente estudio es de tipo piloto, por lo que el número de pacientes a ser incluidos se eligieron por conveniencia. La muestra fue de 50 pacientes

8. VARIABLES A MEDIR:

variable	Definición	Tipo de Variable	Escala de Medición.
Colesterol sérico total.	Medición de colesterol serico por medio de colorimetría enzimática.	Cuantitativa continua	mg/dl.
Colesterol HDL	Medición de lipoproteína de alta densidad de colesterol por método de inmunoinhibición.	Cuantitativa continua	mg/dl.
Colesterol LDL	Medición de la lipoproteína de baja densidad de colesterol por la formula de Friedewald.	Cuantitativa continua	mg/dl.
Triglicéridos	Medición de los triglicéridos séricos por el método de colorimetría enzimática.	Cuantitativa continua	mg/dl.
Edad	Tiempo transcurrido desde su nacimiento hasta el momento	Cuantitativa continua	Años
Genero	Condición orgánica que distingue al hombre de la mujer	dicotómico	Masculino, femenino.
IMC	Peso en Kg (talla en m ²)	Cuantitativa continúa	Kg/m ²
Polimorfismo Apo A1	Presencia del genotipo G/G, G/A o A/A en el par de base 75 de la región promotora (cromosoma 11) detectados por PCR de tiempo real.	dicotómica	Presencia ausencia
Polimorfismo de Apo E.	Presencia del genotipo (3/3, 3/4, 4/4, 2/4, 2/2 o 2/3) al cambio de la sustitución de aminoácidos cisteina por arginina en la posición 112 o 158 (cromosoma 19), detectados por PCR de tiempo real.	dicotómica	Presencia ausencia
Polimorfismo ABCG8	Presencia del genotipo DD, DH o HH en el aminoácido 19. (Cromosoma 2) detectado por PCR de tiempo real.	dicotómica	Presencia ausencia
Polimorfismo ABCG5	Presencia del genotipo QQ, QE o EE en el aminoácido 19 (Cromosoma 2), detectados por PCR de tiempo real.	dicotómica	Presencia ausencia

8. VARIABLES A MEDIR.

8.1 Cumplimiento de la dieta:

Las encuestas dietéticas son el único instrumento para saber lo que una persona o un grupo de personas come. En los estudios de ingestión de alimentos no existe un “estándar de oro”, para evaluar directamente la validez y se han utilizado validaciones entre diferentes tipos de encuestas dietéticas, pero cualquier validación de un método a través de otro método dietético esta sujeta a limitaciones. [55] Se escogió para evaluar el cumplimiento de la dieta una combinación de métodos que incluía una encuesta de recordatorio de 24 horas (cada 7 días), un registro de consumo de dieta habitual (cada mes) y un registro del consumo de la bebida a base de proteína de soya (cada mes)

1. Método recordatorio de un día

La encuesta de recordatorio de un día es un método retrospectivo, que consiste en registrar mediante una entrevista o por auto-registro todos los alimentos consumidos el día inmediato anterior, por los miembros del hogar o por el individuo en estudio. Se realizó el recordatorio con personal entrenado, hábil y con conocimiento sobre las costumbres del paciente para mejorar la calidad de los datos. Una licenciada en nutrición tenía a su cargo 10 pacientes, quien realizaba el recordatorio cada 7 días por teléfono, para dar seguimiento, obteniendo los siguientes datos: 1.- características de los alimentos consumidos: la información sobre el tipo y cantidad de alimentos ingeridos desde la mañana (hora de despertarse) hasta la noche (hora de acostarse), 2.- cantidades consumidas. Una vez anotados los ingredientes de todas las

preparaciones, se preguntaba las cantidades usadas de cada uno. Posteriormente se realizó el procesamiento de los datos realizando conversiones de equivalentes a gramos; donde se utilizó el sistema mexicano de alimentos equivalentes, [56] para transformar las cantidades de alimentos a cantidad de nutrimentos, y de ahí, se obtuvo el contenido de energía y nutrimentos.

2. Método de dieta habitual.

Este método proporciona información dietética en forma cuali-cuantitativa, fue desarrollado como variante de los métodos de lista de alimentos y de historia dietética por personal de la División de Nutrición de Comunidad del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán [57], como una alternativa para reducir tiempo y costo en relación al beneficio de las encuestas dietéticas cuantitativas mas complicadas.

Por lo tanto el personal entrenado cada mes preguntaba cual era su dieta habitual del paciente, obteniendo información dietética como la distribución de los alimentos en cada tiempo de comida y consumo diario de alimentos en gramos de peso bruto o equivalentes. Una vez recabada la información, se organizaban los datos para transformar las cantidades de alimentos a cantidad de nutrimentos. El valor nutritivo de la alimentación ingerida se estimó por medio del cálculo de los valores de las tablas de composición de alimentos expresado por personas al día, para finalmente evaluar comparativamente los consumos contra las recomendaciones de nutrimentos y establecer la suficiencia o no de la dieta.

Con esto el personal capacitado se daba idea de como eran influenciados los hábitos alimentarios por múltiples factores de índole fisiológico, psicológico,

cultural, económico y social; y por lo tanto se adentraba en la problemática alimentaría con el objeto de encontrar vías alternativas para solucionar problemas del cumplimiento a la dieta. El análisis y las reflexiones que se hacían sobre estos aspectos, dieron condiciones para asegurar que los pacientes tuvieran una alimentación adecuada.

3.- Método de medidas (paquetes de la bebida)

Como su nombre lo dice, cada mes se le pedía al paciente que llevara los paquetes vacíos de la bebida de soya consumida durante el estudio.

8.2 Colesterol total (CT).

La determinación de colesterol total se llevo a cabo por medio de estuches SERA-PAK PLUS. Distribuido por Bayer de México, S.A. de C.V. El principio se basa en que los esteres de colesterol se hidrolizan por la acción del colesterol ester hidrolasa para liberar colesterol y ácidos grasos. El colesterol libre existente junto con el producido por esta reacción se oxida por la acción de colesterol oxidasa en Δ^4 - colesteno y peroxido de hidrogeno. Este último en presencia de peroxidasa, oxida el sistema cromógeno (4-amoniantipirina/fenol) en un compuesto de color rojo.

8.3 Trigliceridos (TG)

La determinación de triglicéridos se llevó a cabo por medio de un estuche SERA/PAK PLUS.El principio se basa en la hidrólisis de triglicéridos por la acción de la lipoproteína lipasa y el glicerol es convertido por la acción de la glicerol cinasa en glicerol 3 fosfato, que se oxida por la acción de glicerolfosfato oxidasa en fosfato de dihidroxiacetona y peroxido de hidrogeno. En presencia de peroxidasa, el peroxido de hidrógeno oxida el cromógeno en un compuesto de color rojo.

8.4 Colesterol HDL.

Se realizó con el método de inmunoinhibición utilizando un estuche de SERA-PAK PLUS El principio consiste en que el anticuerpo anti B- lipoproteína humana del reactivo 1 se une a las lipoproteínas (LDL, VLDL y quilomicrones) distintas de las HDL. Al añadir el reactivo 2, los complejos antígeno anticuerpo formados bloquean las reacciones enzimáticas. La colesterol esterasa y colesterol oxidasa del reactivo 2 reacciona solo con el colesterol HDL. El peroxido de hidrogeno producido por las reacciones enzimáticas con colesterol

HDL dan como resultado un complejo de color azul tras la condensación oxidativa de F-DAOS (N-etilo-N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo-3,5-dimetoxi-4-fluoroanilina), y 4 aminoantipirina en presencia de peroxidasa. Cuando se mide la absorción del complejo de color azul producido a la longitud de onda adecuada, la concentración de HDL de la muestra se puede calcular si se compara con la absorción del calibrador del colesterol HDL.

Variación.

Se garantiza la calidad analítica por medio del control de calidad interna y evaluación externa de calidad calculando los errores analíticos (aleatorio y sistemático).

Error aleatorio: precisión (variabilidad intraobservador)

Error sistemático: variabilidad interobservador y se compara con los errores mencionados por NCEP.

Analito	Error sistemático	imprecisión	Error total
Colesterol total	≤ 3% VR	CV ≤ 3%	≤ 9%
Triglicéridos	≤5% VR	CV ≤ 5%	≤15%
HDL-C	≤5% VR	CV ≤ 4%	≤13%

COLESTEROL LDL.

Se calcula con la formula de Friedewald.

$$LDL-C = CT - HDL-C - (TG /5)$$

8.6 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS POR PCR- TIEMPO REAL

8.6.1 Aislamiento del DNA genómico a partir de sangre total. (36)

-
- Tomar 1 ml de la muestra de sangre total congelada con EDTA a -70 grados centígrados. Descongelar la sangre, tomar 1ml. de esta y agregar 0.8ml de buffer SSC IX y poner un tubo eppendorf de 1.5ml, mezclar. Centrifugar por 1 minuto a 12,000 rpm en micro centrifuga. Remover 1ml del sobrenadante y descartarlo en agua con cloro. Añadir 1ml de buffer SSC 1X, vortexear y centrifugar a 12,000 rpm durante 1min. Remover todo el sobrenadante. Agregar 375 microlitros de acetato de sodio 0.2M a cada pastilla y agitar brevemente (contar 30 segundos). Añadir 25 microlitros SDS al 10% y 5 microlitros de proteínasa K (20mg/ml H₂O) (Sigma P-0390), agitar brevemente e incubar por 1 hora a 55 °C. Agregar 150 microlitros de fenol cloroformo: alcohol isoamilico y agitar por 30 segundos. Centrifugar la muestra por 2 minutos a 12,000 rpm en microcentrifuga. Remover cuidadosamente la fase acuosa a tubo nuevo eppendorf de 1.5ml, agregar 1ml de etanol frio al 100%, mezclar e incubar por 15 minutos a – 20°C. Centrifugar por 2 minutos a 12,000 rpm en microcentrifuga, decantar el sobrenadante y drenar (asegurarse de que la pastilla quede seca al decantar). Agregar 180 microlitros de buffer TE 10:1, agitar e incubar a 55°C por 10 minutos. Agregar 20 microlitros de NaCl 5M y mezclar agitando con la mano vigorosamente. Agregar 1 ml de etanol absoluto frio, mezclar y centrifugar por 1 min. a 12,000 rpm en microcentrifuga. Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 1ml de etanol. Decantar el sobrenadante y secar la pastilla en el speedvac por 20 min para que quede seco. Resuspender

la pastilla agregando 200 microlitros de buffer TE 10:1 e incubar toda la noche a 55 °C, agitando periódicamente para disolver el DNA genómico

8.6.2 Cuantificación de DNA.

Se utiliza una muestra de DNA a una dilución 1:5 y 1:10 con buffer TE pH 7.5. y se cuantifica en un espectrofotómetro a 260 nm. En un tubo Eppendorf nuevo libre de DNAsas y RNAsas se agregará 4 µL de la muestra de DNA. Se agregarán 56 µL buffer TE pH 7.5. Se mezclarán ligeramente en vortex y se leerán a 260 nm en celdas de cuarzo.

Para calcular la concentración del DNA:

1 D.O.₂₆₀ ----- 40 µg de DNA D.O. = Densidad Óptica

D.O. muestra ----- X µg de DNA

(X µg de DNA) (Factor de dilución) = X' µg de DNA / mL.

Finalmente se ajustará el DNA a la cantidad deseada

8.6.3 Ensayos Taqman utilizados:

Los ensayos Taqman para detectar la presencia de polimorfismo en los genes APO A1, APOE, ABCG8 Y ABCG5 se obtuvieron de Applied Biosystems (ABI), Foster City, CA con los siguientes numero de ensayos.

APOA1

No. 4331349

GACCAGTGAGCAGCAACAGGGCC[A/G]GGGCTGGGCTTATCAGCCTCCCAGCCC

APOE:

Posición 112

rs429358

GGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T]GCGGCCGCCTGGTGCAGTACCGCG

Posición 158

rs7412

TCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T]GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGG

ABCG5

rs6720173

GGTTTTCTCAATGAATTGAATTCCTT[C/G]AGTGAAGGCACACATTGGATTAGTT

ABCG8

rs11887534

GGCTGCCGAAAGGGGCCACTCCCCAG[C/G]ATACCTCGGTGAGTGAGCAATGGG

8.6.4 DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS POR DISCRIMINACION ALELICA EN PCR TIEMPO REAL.

Para detectar la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes APO A1, APOE, ABCG8 Y ABCG5 se utilizaron ensayos Taqman y un software de discriminación alélica.

El PCR en tiempo real se basa en la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cual se Amplifica un gen específico en el DNA genómico utilizando la técnica llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su importancia radica en la posibilidad de amplificar millones de veces una secuencia específica de DNA.

El principio del PCR consiste en determinar la secuencia específica y seleccionar oligonucleótidos o iniciadores complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a la secuencia específica, a partir de los cuales se indica la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador.

En la técnica PCR los parámetros más importantes son: 1) un suministro abundante de iniciadores y de desoxinucleótidos trifosfatados dNTPs; 2) una fuente renovada de DNA polimerasa

PCR reactivos:

-
- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 1.- Ensayo Taqman incluye: | - oligonucleótidos iniciadores |
| | - sonda con fluoróforo |
| 2.- Mezcla de reacción incluye | - buffer |
| | - MgCl |
| | - dNTPs |
| | - ADN polimerasa |
| 3.- AND genómico | |
| 4.- Agua | |
-

y 3) ciclos periódicos de cambio de temperatura., estos últimos consisten en:

ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3
Activación de la enzima	desnaturalización	1.- desnaturalización: 95° C x 15 seg. 2.- alineación y síntesis: 60° C x 1 min.
50 ° C x 2 min.	95° C x 10 min.	40 Ciclos

Minutos: min.; segundos: seg.

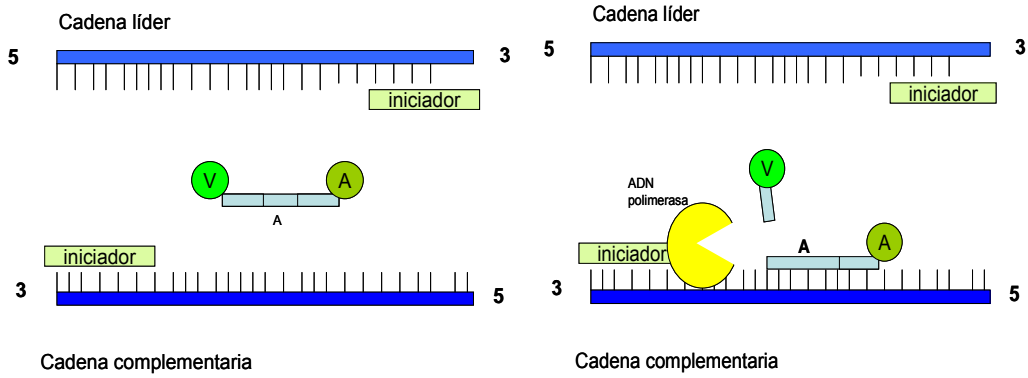
El PCR en tiempo real permite discriminar dos secuencias (SNP) en una mezcla de ADN, utilizando fluoróforos anclados a una cadena corta de ADN complementaria (sonda), (figura 8.6.4). la cual se une a la secuencia de ADN donde se localiza el polimorfismo durante la elongación de ADN. En el PCR la ADN polimerasa rompe la sonda liberando el fluoroforo el cual es detectado por un láser que captura la intensidad de luz y la traduce en forma gráfica. [58], La enzima ADN polimerasa sintetizan una cadena de ADN complementaria en presencia de un iniciador y nucleótidos libres. Cuando encuentran un fragmento de ADN (sonda) unido a la cadena que están replicando elimina ese fragmento para continuar la elongación, esto lo hace debido a que posee actividad de endonucleasa.

La sonda se compone de un fluoróforo verde (V) o rojo(R) y un apagador (A) que captura la luz emitida por el fluoroforo (figura 8.6.4). Cuando la muestra de ADN posee solo el alelo1, la sonda para el alelo 1 se une al gen y libera el fluoroforo verde y se traduce como homocigoto. Cuando la muestra de ADN posee solo el alelo 2, la sonda para el alelo 2 se une al gen y libera el fluoroforo rojo y se traduce como homocigoto 2. Si la muestra posee ambos alelos las dos

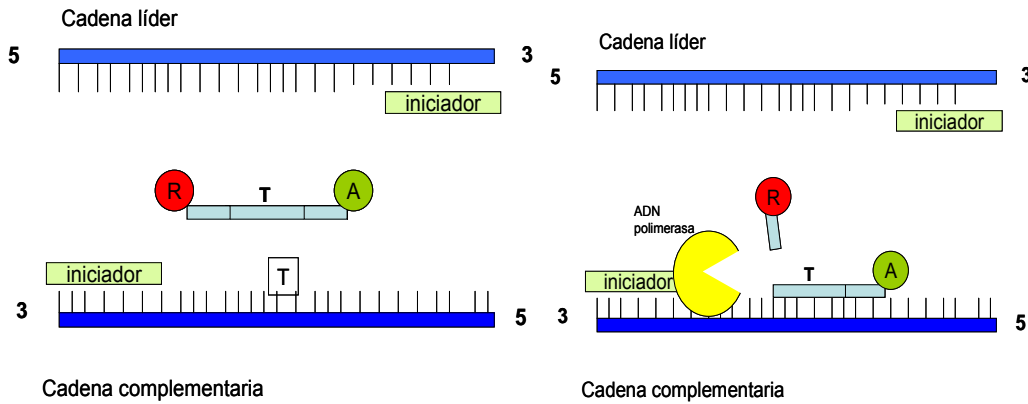
sondas se unen al gen liberando ambos fluoroforos lo que se traduce como heterocigoto.

FIGURA 8.6.4.1

HOMOCIGOTO 1 (ALELO COMUN)

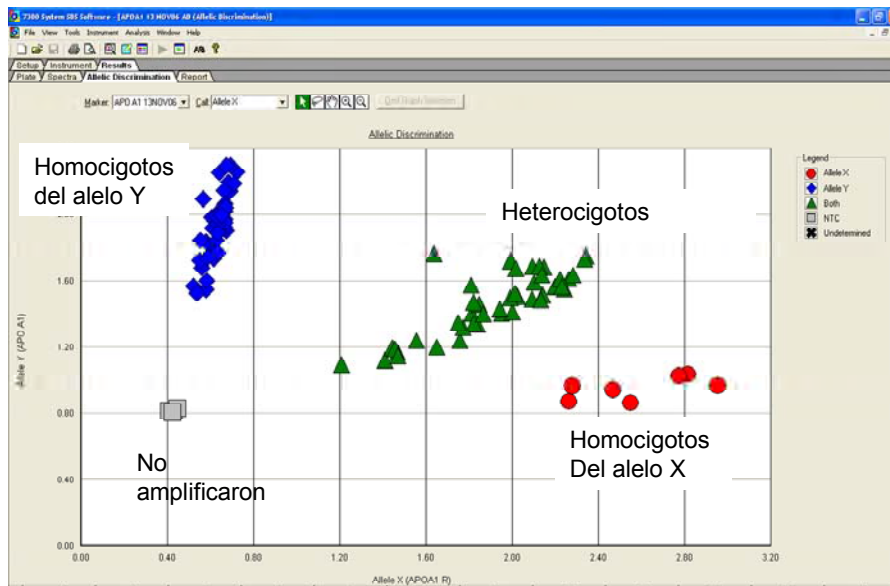


HOMOCIGOTO 2 (ALELO NO COMUN)



Al final de la PCR un láser recopila un espectro de fluorescencia, con las combinaciones de las emisiones de fluorescencia y algoritmos del software produce un diagrama de dispersión de componentes alélicos específicos de cada reacción. (Figura 8.6.4.3)

FIGURA 8.6.4.3



9. ANALISIS ESTADISTICO.

Las variables continuas se expresaron como promedios y error estándar. Las variables dicotómicas como frecuencias y porcentajes. Se reportaron los valores de P basados en prueba de dos colas para ver significancia. La frecuencia alelica fue analizada utilizando la prueba de χ^2 -goodness-of-fit para determinar si los valores observados son diferentes del equilibrio de Hardy-Weinberg, La base de datos de concentraciones de perfil de lípidos, edad e índice de masa corporal entre grupos de pacientes uno con el homocigoto con el alelo común y otro grupo con el hetero o homocigoto para el alelo no común fueron por prueba de U Mann-Whitney. Así también se realizo transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía al comparar el perfil de lípidos a lo largo del estudio, tomando en cuenta a todos los pacientes, después se aplico un ANOVA de dos vías al comparar los lípidos séricos basales con un mes con la dieta BGS, y posteriormente se realizo el análisis de medidas repetidas de ANOVA al comparar el perfil de lípidos a lo largo del tratamiento con la dieta BGS-S para ver la interacción de dos factores entre genotipos y el tiempo con la bebida de soya. Las diferencias con $P < 0.05$ fueron consideradas significativas para perfil de lípidos; y $P < 0.1$ [59] fue considerado significativo para interacción entre genotipo y el tiempo. Los datos fueron analizados por SPSS (versión 10.00; SPSS Inc., Chicago. IL).

10. RESULTADOS

Cincuenta personas fueron incluidas en el estudio, sin embargo, 7 no continuaron con el protocolo ya que una persona era intolerante a la proteína de soya, 3 suspendieron el estudio por falta de tiempo, y 3 tenían un problema de salud no relacionada con el estudio. Por lo tanto, cuarenta y tres sujetos completaron el estudio, 20 hombres y 23 mujeres, con una edad media de 43.8 ± 9.4 , y un índice de masa corporal de $27.4 \pm 4.4 \text{ kg/m}^2$. Todos los sujetos fueron informados sobre el protocolo y dieron a conocer por escrito el consentimiento informado. El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubiran.

Durante el estudio, los pacientes fueron motivados por medio de carteles, recetarios, talleres y folletos para el cumplimiento de la dieta. El apego encontrado a la dieta baja en grasa saturada (BGS) fue mayor del 90% y al consumo de la bebida de soya fue del 100%. Durante el estudio, los pacientes no tuvieron perdida significativa de peso debido al tratamiento dietario, y tampoco hubo cambios de estilo de vida como el ejercicio físico.

10.1 Genotipos y frecuencia de alelos.

10.1.1 Distribución de genotipos.

La distribución de genotipos (homocigoto del alelo silvestre, heterocigoto, y homocigoto del alelo no común) en cada polimorfismo fueron los siguientes: para ABCG5 Q604E fue 15,19,9, para ABCG8 D19H fue de 37,6, para el gen APOA1 -75 A/G fue de 20,20,3 y para APOE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 fue de 0,33,10. Todos los genotipos estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. (Tabla 10.1.1)

Tabla 10.1.1 Distribución de genotipos.

GEN	genotipo	n = 43	Frecuencia
ABCG5 Q604E	QQ	15	35 %
	QE	19	44%
	EE	9	21%
ABCG8 D19H	DD	37	86%
	DH	6	14%
	HH	0	0%
APOA1 -75 A/G	AA	20	46.5%
	AG	20	46.5%
	GG	3	7%
APOE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4	ϵ 2	0	0%
	ϵ 3	33	77%
	ϵ 4	10	23%

10.2 Concentraciones básicas de lípidos séricos en los pacientes.

Las concentraciones de los perfiles de lípidos séricos de todos los pacientes fueron analizadas a lo largo del tratamiento dietario durante los tres meses, observando una reducción de CT del 19.20 % ($p = 0.0001$), TG de 41.7% ($p= 0.0001$) y LDL de 17.4 % ($p= 0.06$) con un aumento de HDL 15.11% ($p= 0.29$). (Tabla 10.2.1.)

Tabla 10.2.1

Respuesta al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada y una bebida a base de proteína de soya

	Basal ¹	Dieta BGS	Dieta BGS-S I	Dieta BGS-S II	P ²
Peso (kg)	72.1 ± 2.3	71.5 ± 2.3	70.7 ± 2.2	70.7 ± 2.2	0.96
Colesterol total (mg/dl)	291.4 ± 9.9 ^a	280.0 ± 11.1 ^a	228.46 ± 6.7 ^b	235.4 ± 8.5 ^b	0.0001
Triglicéridos (mg/dl)	325.5 ± 20.1 ^a	330.2 ± 26.3 ^a	175.6 ± 12.2 ^b	190.2 ± 15.8 ^b	0.0001
Colesterol HDL (mg/dl)	33.27 ± 1.92	35.9 ± 1.9	34.8 ± 1.9	38.2 ± 1.9	0.29
Colesterol LDL (mg/dl)	192.8 ± 11.3	182.2 ± 11.9	158.4 ± 8.2	159.1 ± 9.3	0.06

¹ Todos los valores son en promedio ± SEM

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía al comparar el perfil de lípidos a lo largo del estudio

Las concentraciones de los perfiles de lípidos séricos basales fueron analizadas de acuerdo a los genotipos ABCG8, ABCG5, APOE, y APOA1.

GENOTIPO ABCG8

ABCG8 (D19H) (tabla10.2.2), 37 pacientes fueron homocigotos para el alelo común, y 6 fueron heterocigotos. No se encontró diferencia entre ambos grupos en edad, IMC, CT, LDL-C, HDL-C, y TG al inicio del estudio.

TABLA 10.2.2

Características básicas de los pacientes con genotipo **ABCG8** (D19H)

	ABCG8 DD (n = 37)	ABCG8 DH (n = 6)	P ¹
Femenino/masculino (n)	20/17	3/3	
Edad (años)	43.5 ± 1.5 ²	45.3 ± 4.5	NS
IMC (Kg/m ²)	27.6 ± 0.79	26.7 ± 1.1	NS
CT (mg/dl)	283.8 ± 7.3	338.5 ± 55	NS
TG (mg/dl)	330.1 ± 22.9	296.8 ± 29.5	NS
HDL-C (mg/dl)	33.5 ± 2.0	31.8 ± 6.5	NS
LDL-C (mg/dl)	184.0 ± 9.1	247.3 ± 58	NS

¹ La diferencia entre ambos grupos fue por la prueba de U Mann-Whitney

² promedio ± SEM , n = 43

GENOTIPO ABCG5

ABCG5 (Q604E) (tabla 10.2.3), 15 pacientes fueron homocigotos para el alelo común, 19 fueron heterocigotos y 9 homocigotos para el alelo no común. Por el número pequeño de homocigotos del alelo no común, se unieron con los heterocigotos para realizar el análisis estadístico. No se encontró significancia entre ambos grupos en edad, IMC, CT, LDL-C, HDL-C, y TG entre homocigotos para el alelo común, y heterocigotos u homocigotos para el alelo no común.

TABLA 10.2.3

Características básicas de los pacientes con genotipo **ABCG5** (Q604H)¹

	ABCG5 QQ (n = 15)	ABCG5 QE/EE (n = 28)	P ¹
Femenino/masculino (n)	9/6	14/14	
Edad (años)	44.5 ± 2.6 ²	43.5 ± 1.7	NS
IMC (Kg/m ²)	27.7 ± 1.0	27.3 ± 0.9	NS
CT (mg/dl)	296.2 ± 24.1	288.9 ± 8.6	NS
TG (mg/dl)	303.8 ± 30.3	337.1 ± 26.4	NS
HDL-C (mg/dl)	33.0 ± 3.4	33.4 ± 2.3	NS
LDL-C (mg/dl)	202.42 ± 25.7	187.7 ± 11.0	NS

¹ La diferencia entre ambos grupos fue por la prueba de U Mann-Whitney

² promedio ± SEM, n = 43

GENOTIPO APOA1

APOA1 -75(AG) (tabla 10.2.4), 20 pacientes fueron homocigotos para el alelo común, 20 fueron heterocigotos y 3 homocigotos para el alelo no común, para el análisis estadístico se reunieron los heterocigotos y homocigotos del alelo no común, ya que el número de individuos con el genotipo GG, era pequeño. No se encontró significancia entre ambos grupos; en edad, IMC, CT, LDL-C, HDL-C y TG.

TABLA 10.2.4

Características básicas de los pacientes con genotipo **APOA1**

	APOA1 GG (n = 20)	APOA1 GA, AA (n = 23)	P ¹
Femenino/masculino (n)	11/9	12/11	
Edad (años)	43.9 ± 1.8 ²	43.7 ± 2.2	NS
IMC (Kg/m ²)	26.8 ± 1.0	28.0 ± 0.9	NS
CT (mg/dl)	297.2 ± 18.5	286.4 ± 9.6	NS
TG (mg/dl)	312.3 ± 26	337.0 ± 30.2	NS
HDL-C (mg/dl)	31.6 ± 2.3	34.7 ± 2.9	NS
LDL-C (mg/dl)	202.42 ± 25.7	187.7 ± 11.0	NS

¹ La diferencia entre ambos grupos fue por la prueba de U Mann-Whitney

² promedio ± SEM , n = 43

GENOTIPO APOE

APOE ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 (tabla 10.2.5), 33 pacientes fueron homocigotos para el alelo común, y 10 fueron heterocigotos. No se encontró significancia entre ambos grupos en edad, IMC, CT, LDL-C, HDL-C y TG al inicio del estudio.

TABLA 10.2.5

Características básicas de los pacientes con genotipo **APOE**

	APOE 3/3 (n = 33)	APOE 3/4 (n = 10)	P ¹
Femenino/masculino (n)	19/14	4/6	
Edad (años)	43.9 \pm 1.7 ²	43.5 \pm 2.1	NS
IMC (Kg/m ²)	28.0 \pm 0.8	25.3 \pm 1.0	NS
CT (mg/dl)	295.6.2 \pm 11.9	277.7 \pm 17.5	NS
TG (mg/dl)	325.7 \pm 21.4	324.8 \pm 52.1	NS
HDL-C (mg/dl)	32.2 \pm 2.1	36.8 \pm 4.1	NS
LDL-C (mg/dl)	198.2 \pm 13.1	174.9 \pm 22.6	NS

¹ La diferencia entre ambos grupos fue por la prueba de U Mann-Whitney

² promedio \pm SEM, n = 43

10.3. Efecto de los polimorfismos sobre la respuesta al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada

El efecto de dieta BGS sobre los lípidos de acuerdo a cada genotipo de ABCG8 (D19H), ABCG5 (Q604E), APOA1 -75(AG) y APOE ε2, ε3, ε4 se muestra en la Tablas 10.3.1, 10.3.2, 10.3.3 y 10.3.4 respectivamente, observando que no se encuentra efecto significativo del genotipo sobre el perfil de lípidos con la dieta BGS

Tabla 10.3.1

Efecto de la dieta BGS sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo ABCG8 (D19H) en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Basal	Dieta BGS	P ²
Colesterol total (mg/dl)			
DD	283.8 ± 7.3	268.3 ± 9.9	0.35
DH	338.5 ± 55	352.5 ± 43.0	
Triglicéridos (mg/dl)			
DD	330.1 ± 22.9	341.4 ± 29.1	0.53
DH	296.8 ± 29.54	261.0 ± 56.0	
Colesterol HDL (mg/dl)			
DD	33.5 ± 2.0	36.3 ± 2.0	0.89
DH	31.8 ± 6.5	33.0 ± 6.0	
Colesterol LDL (mg/dl)			
DD	184.0 ± 9.1	168.5 ± 10.2	0.42
DH	247.3 ± 58.0	267.3 ± 47.8	

¹ Todos los valores son en promedio ± SEM

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, se aplicó un ANOVA de dos vías para ver interacción genotipo y el tratamiento con un mes de dieta BGS sobre los lípidos séricos

Tabla 10.3.2

Efecto de la dieta BGS sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo ABCG5 (Q604E) en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Basal	Dieta BGS	P ²
Colesterol total (mg/dl)			
QQ	296.2 ± 24.1 ¹	287.6 ± 21.0	0.753
QE/EE	288.9 ± 8.6	276.0 ± 13	
Triglicéridos (mg/dl)			
QQ	303.8 ± 30.3	361.3 ± 35.9	0.149
QE/EE	337.1 ± 26.4	313.5 ± 35.6	
Colesterol HDL (mg/dl)			
QQ	33.0 ± 3.4	38.3 ± 3.1	0.441
QE/EE	33.4 ± 2.3	34.4 ± 2.4	
Colesterol LDL (mg/dl)			
QQ	202.4 ± 25.7	186.6 ± 21.9	0.978
QE/EE	187.7 ± 11.0	179.8 ± 14.4	

¹ Todos los valores son en promedio ± SEM

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, se aplicó un ANOVA de dos vías para ver interacción genotipo y el tratamiento con un mes de dieta BGS sobre los lípidos séricos

Tabla 10.3.3

Efecto de la dieta BGS sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo APOA1 en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Basal	Dieta BGS	P ²
Colesterol Total (mg/dl)			
GG	297.2 ± 18.5 ¹	281.7 ± 19.2	0.85
GA/AA	286.4 ± 9.6	278.6 ± 13	
Trigliceridos (mg/dl)			
GG	312.3 ± 26.2	330.6 ± 37.1	0.78
GA/AA	337.0 ± 30.2	329.8 ± 38.0	
Colesterol HDL (mg/dl)			
GG	31.6 ± 2.3	37.3 ± 2.7	0.35
GA/AA	34.7.4 ± 2.9	34.6 ± 2.7	
Colesterol LDL (mg/dl)			
GG	202.6 ± 20.0	178.2 ± 21.2	0.29
GA/AA	184.3 ± 12.3	185.8 ± 13.1	

¹ Todos los valores son en promedio ± SEM

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, se aplicó un ANOVA de dos vías para ver interacción genotipo y el tratamiento con un mes de dieta BGS sobre los lípidos séricos

Tabla 10.3.4

Efecto de la dieta BGS sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo APOE en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Basal	Dieta BGS	P ²
Colesterol Total (mg/dl)			
3/3	295.6 ± 11.9 ¹	278.6 ± 12.0	0.58
3/4	277.7 ± 17.4	284.6 ± 28	
Triglicéridos (mg/dl)			
3/3	325.7 ± 21.4	334.6 ± 27.4	0.48
3/4	324.8 ± 52.1	315.6 ± 71.2	
Colesterol HDL (mg/dl)			
3/3	32.2 ± 2.17	35.5 ± 2.1	0.52
3/4	36.8 ± 4.1	37.1 ± 4.6	
Colesterol LDL (mg/dl)			
3/3	198.2 ± 13.2	181.6 ± 13.6	0.47
3/4	174.9 ± 22.6	184.3 ± 26.6	

¹ Todos los valores son en promedio ± SEM

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, se aplicó un ANOVA de dos vías para ver interacción genotipo y el tratamiento con un mes de dieta BGS sobre los lípidos séricos

10.4. Efecto de los polimorfismos sobre la respuesta al tratamiento con una dieta baja en grasa saturada y una bebida a base de proteína de soya

10.4.1. POLIMORFISMO DE ABCG8 (D19H)

Se muestra en la Tabla 10.4.1, una asociación significativa entre el tiempo con la dieta BGS-S y el genotipo ABCG8 (D19H) sobre las concentraciones de CT ($p= 0.03$), Se observa disminución de la concentración de CT del 18.7% con el genotipo DH, y 15.3% con el genotipo DD. De igual forma, se observa interacción significativa ($p= 0.08$) entre el tiempo con la dieta BGS-S y el genotipo ABCG8 sobre las concentraciones de LDL-C, encontrando una reducción del 21.2% con el genotipo DH, y 10.5% con el genotipo DD. Además, observamos que el genotipo DD a lo largo de los dos meses con la dieta BGS-S tiene menos concentración de CT y LDL-C que el genotipo DH.

10.4.2 POLIMORFISMO CON ABCG5 (Q604E).

No se encontraron interacciones significativas entre tratamiento con dieta BGS-S por dos meses y genotipo de ABCG5 (Q604E) con las concentraciones del perfil de lípidos séricos (tabla 10.4.2).

10.4.3. POLIMORFISMO APOA1 (-75 AG)

No se encontraron significancia entre interacción con la dieta BGS-S por dos meses y el genotipo de APOA1 (-75 AG) con las concentraciones del perfil de lípidos séricos (tabla 10.4.3).

10.4.4. POLIMORFISMO CON APOE

Se muestra en la Tabla 10.3.4, que no hubo interacción significativa entre los genotipos de APOE y el tratamiento con la dieta BGS-S con el perfil de lípidos séricos.

TABLA 10.4.1

Efecto de la dieta BGS y la dieta BGS-S sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo **ABCG8 (D19H)** en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Después de un mes con Dieta BGS	Dieta BGS-S 1 mes	Dieta BGS-S 2do. mes	P ²		
				Tiempo	Genotipo	Tiempo x genotipo.
Colesterol Total (mg/dl)						
DD	268.3 ± 9.9 ^b	221.4 ± 6.1 ^c	227.1 ± 8.3 ^c	<0.007	<0.0001	0.03
DH	352.5 ± 43.0 ^a	272.0 ± 25.9 ^b	286.6 ± 26.3 ^b			
Triglicéridos (mg/dl)						
DD	341.4 ± 29.1	181.0 ± 13.7	189.1 ± 13.5	0.002	0.115	0.69
DH	261.0 ± 56.0	142.3 ± 20.7	197.0 ± 83.3			
Colesterol HDL (mg/dl)						
DD	36.3 ± 2.0	35.4 ± 2.0	38.5 ± 2.2	0.401	0.382	0.82
DH	33.0 ± 6.0	31.5 ± 5.2	36.6 ± 2.5			
Colesterol-LDL (mg/dl)						
DD	168.5 ± 10.2 ^b	149.7 ± 7.5 ^b	150.7 ± 9.3 ^b	0.471	<0.0001	0.08
DH	267.3 ± 47.8 ^a	212.0 ± 29.5 ^a	210.6 ± 28.3 ^a			

¹ Promedio ± SEM (todos los valores).

²Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, posteriormente se realizó el análisis de medidas repetidas de ANOVA al comparar el perfil de lípidos a lo largo del tratamiento con la dieta BGS-S para ver la interacción de dos factores entre genotipos y el tiempo con la bebida de soya. Las diferencias con P < 0.05 fueron consideradas significativas para perfil de lípidos; y P < 0.1 para la interacción tiempo x genotipo

TABLA 10.4.2

Efecto de la dieta BGS y la dieta BGS-S sobre la concentración de lípidos sericos de acuerdo al polimorfismo **ABCG5 (Q604E)** en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Después de un mes con Dieta BGS	Dieta BGS-S 1 mes	Dieta BGS-S 2do mes	P ²		
				Tratamiento	Genotipo	Tratamiento x genotipo.
Colesterol total (mg/dl)						
QQ	287.6 ± 21.0	230.0 ± 12.5	251.8 ± 16.8	0.001	0.302	0.620
QE/EE	276.0 ± 13	227.6 ± 8.1	226.7 ± 9.2			
Trigliceridos (mg/dl)						
QQ	361.3 ± 35.9	162.0 ± 17.0	208.4 ± 34.9	0.0001	0.390	0.413
QE/EE	313.5 ± 35.6	183.0 ± 16.5	180.5 ± 15.8			
Colesterol HDL(mg/dl)						
QQ	38.3 ± 3.1	34.2 ± 3.2	40.2 ± 3.6	0.378	0.498	0.529
QE/EE	34.4 ± 2.4	35.1 ± 2.4	37.2 ± 2.2			
Colesterol LDL (mg/dl)						
QQ	186.6 ± 21.9	163.4 ± 14.8	169.9 ± 18.3	0.441	0.477	0.950
QE/EE	179.8 ± 14.4	155.8 ± 9.9	153.3 ± 10.6			

¹ Promedio ± SEM (todos los valores).

²Se realizo transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, posteriormente se realizo el análisis de medidas repetidas de ANOVA al comparar el perfil de lípidos a lo largo del tratamiento con la dieta BGS-S para ver la interacción de dos factores entre genotipos y el tiempo con la bebida de soya. Las diferencias con P < 0.05 fueron consideradas significativas para perfil de lípidos; y P < 0.1 para la interacción tiempo x genotipo

TABLA 10.4.3

Efecto de la dieta BGS y la dieta BGS-S sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo **APOA1** en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Después de un mes con Dieta BGS	Dieta BGS-S 1 mes	Dieta BGS-S 2do mes	P ²		
				Tratamiento	Genotipo	Tratamiento x genotipo.
Colesterol Total (mg/dl)						
GG	281.7 ± 19.2	229.4 ± 11.6	237.2 ± 13.4	0.001	0.96	0.99
GA/AA	278.6 ± 13	227.6 ± 7.9	233.9 ± 11.0			
Triglicéridos(mg/dl)						
GG	330.6 ± 37.1	180.3 ± 18.0	177.5 ± 16.0	<0.0001	0.98	0.91
GA/AA	329.8 ± 38.0	171.6 ± 17.0	201.3 ± 26.3			
Colesterol HDL(mg/dl)						
GG	37.3 ± 2.7	33.2 ± 3.0	37.1 ± 3.2	0.43	0.56	0.20
GA/AA	34.6 ± 2.7	36.2 ± 2.5	39.3 ± 2.3			
Colesterol LDL(mg/dl)						
GG	178.2 ± 21.2	160.1 ± 13.8	164.6 ± 15.5	0.41	0.70	0.64
GA/AA	185.8 ± 13.1	157.0 ± 9.8	154.3 ± 11.4			

¹ Promedio ± SEM (todos los valores).

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, posteriormente se realizó el análisis de medidas repetidas de ANOVA al comparar el perfil de lípidos a lo largo del tratamiento con la dieta BGS-S para ver la interacción de dos factores entre genotipos y el tiempo con la bebida de soya. Las diferencias con P < 0.05 fueron consideradas significativas para perfil de lípidos; y P < 0.1 para la interacción tiempo x genotipo

TABLA 10.4.4

Efecto de la dieta BGS y la dieta BGS-S sobre la concentración de lípidos séricos de acuerdo al polimorfismo **APOE** en pacientes con hipercolesterolemia¹.

	Después de un mes con Dieta BGS	Dieta BGS-S 1 mes	Dieta BGS-S 2 mes	P ²		
				Tratamiento	Genotipo	Tratamiento x genotipo.
Colesterol Total (mg/dl)						
3/3	278.6 ± 12.0	235.5 ± 7.5	240.4 ± 8.3	0.001	0.17	0.34
3/4	284.6 ± 28	215.1 ± 15.1	219.1 ± 24.6			
Triglicéridos (mg/dl)						
3/3	334.6 ± 27.4	180.7 ± 13.2	190.5 ± 18.5	<0.0001	0.21	0.55
3/4	315.6 ± 71.2	158.9 ± 30.2	189.1 ± 32.1			
Colesterol- HDL(mg/dl)						
3/3	35.5 ± 2.1	34.1 ± 1.9	39.0 ± 2.0	0.85	0.91	0.59
3/4	37.1 ± 4.6	37.4 ± 5.2	35.7 ± 4.9			
Colesterol LDL(mg/dl)						
3/3	181.6 ± 13.6	162.2 ± 8.7	163.2 ± 9.6	0.21	0.19	0.35
3/4	184.3 ± 26.6	145.9 ± 20.8	145.5 ± 25.5			

¹ Promedio ± SEM (todos los valores).

² Se realizó transformación logarítmica a los TG, CT, HDL-C, LDL-C antes del análisis, posteriormente se realizó el análisis de medidas repetidas de ANOVA al comparar el perfil de lípidos a lo largo del tratamiento con la dieta BGS-S para ver la interacción de dos factores entre genotipos y el tiempo con la bebida de soya. Las diferencias con P < 0.05 fueron consideradas significativas para perfil de lípidos; y P < 0.1 para la interacción tiempo x genotipo

11. DISCUSION.

La presente investigación demostró que los pacientes con hipercolesterolemia con el genotipo ABCG8 (D19H) DH, son mejores respondedores a reducir CT después de un consumo de una dieta BGS-S, en comparación con aquellos con el genotipo DD con una interacción tiempo x genotipo estadísticamente significativa ($P = 0.03$). De la misma forma se observó una mejor respuesta con la disminución de LDL-C en ABCG8 (D19H) DH con una interacción tiempo x genotipo significativa ($P = 0.08$). Por otra parte, no se observó interacción significativa entre gen y tiempo con dieta BGS-S sobre el perfil lípidos de ABCG5 (Q604E), APOA1 (-75 AG) y los genotipos del APOE. Pero algo muy importante que muestra este trabajo es que independientemente del genotipo de cada individuo, de los genes estudiados, al dar la dieta BGS-S, hay disminución de la concentración de CT 19.25 ($p = 0.0001$), TG 41.7% ($p = 0.0001$) y LDL-C 17.4%, ($p = 0.06$). Es importante señalar que la reducción de CT, y TG no se debieron a cambios en el peso corporal, o a cambios de actividad física.

Se ha demostrado que los pacientes con hipercolesterolemia con el polimorfismo ABCG8 D19H también tienen mejor respuesta al tratamiento con estatinas sobre LDL-C y CT que aquellos con el genotipo DD [50, 60, 61]. El polimorfismo ABCG8 D19H produce un cambio de un aspartato por una histidina, y este cambio se debe a un intercambio de una citosina en lugar de una guanina en el nucleótido 55 ubicado en el exon 1 del gen ABCG8 [60, 61]. Esto indica que el cambio de aminoácido en dicha posición afecta la actividad de la proteína ABCG8.

No se encontró asociación entre el alelo APOE4, el tratamiento dietario y el colesterol LDL. Este hallazgo no es de sorprenderse, ya que muchos estudios de intervención dietética no han podido encontrar un efecto significativo del alelo APOE4 en LDL-C con la respuesta a la dieta [62, 63]. Esto se debe a que el APOE3 y APOE4 es captado por los receptores de alta afinidad de LDL de manera similar, pero APOE2 es captado 50 a 100 veces más débilmente. Como resultado de ello, APOE2 se asocia más a dislipidemias [64]. Sin embargo la relativa baja de frecuencia de APOE2 y APOE4 en México, da lugar a un pequeño número de sujetos en cada grupo, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que nuestros resultados se deben a la casualidad.

En APOA1 (-75 GA) no se observaron cambios entre los genotipos y el perfil de lípidos como se ha demostrado en otros estudios en los cuales este polimorfismo se asocia con aumento de HDL en individuos que consumen mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). [38]. A pesar de que teníamos casi el 50% de la población estudiada con el genotipo APOA1 GG y el 50% con el genotipo GC/CC, permitiendo comparar mejor el efecto de dieta y genotipo en el mismo número de individuos en cada grupo. Llama la atención que se encuentra mayor frecuencia del genotipo GC/CC en comparación con otros estudios. El estudio de Framingham reporta una frecuencia del 83.5% del genotipo APOA1 GG, y el 17.5% de APOA1 GC/CC. Esto apoya la diferente distribución de los genotipos en distintas poblaciones. [38].

Los datos de este estudio sugieren que el consumo de dieta BGS-S en pacientes con hiperlipidemia independientemente del genotipo disminuyen la concentración de TG. El mecanismo por el cual el consumo de proteína de soya disminuye la concentración de triglicéridos en los humanos no se ha establecido, sin embargo los estudios de modelos animales muestran que darle consumo de proteína de soya en la dieta disminuye la relación insulina/glucagon, debido en parte a una reducción de la secreción de insulina. [65] Esto a su vez, reduce la expresión del factor de transcripción SREBP-1 [27]. Este factor de transcripción está implicado en la regulación de la expresión de genes de la síntesis y esterificación de ácidos grasos y triglicéridos [66]. Estudios anteriores demostraron que la reducción de SREBP-1 en ratas alimentadas con proteína de soya se asoció con una reducción en concentración de triglicéridos séricos y hepáticos [29]. La disminución de concentración de triglicéridos en suero se debe principalmente a una reducción de la concentración de partículas VLDL. Por lo tanto, parece probable que la reducción de TG séricos en este estudio, se debe a una reducción en la concentración de partículas de VLDL.

No obstante, la mayoría de los pacientes respondieron al tratamiento a la dieta BGS-S, y debe ser considerado como parte de la dieta de tratamiento de sujetos con hipercolesterolemia. El efecto de la bebida de soya sobre los lípidos sanguíneos, también puede reducir la dosis de las estatinas en estos pacientes, con el beneficio de consumir menos medicamento evitando efectos colaterales. De hecho, otros estudios han demostrado que el consumo de un portafolio dietario que incluya proteína de soya, fibra, esteroides vegetales, y los

ácidos graso omega-3, reduce el CT y LDL-C en la misma medida que las estatinas [53] Por lo tanto, los resultados de este estudio refuerzan el concepto de que la dieta para el tratamiento de las hiperlipidemias debe ser el primer criterio para su tratamiento antes de la utilización de la medicación.

Parte del éxito de nuestro estudio en la reducción de CT en pacientes hipercolesterolemicos, se debió a la adhesión de las recomendaciones de ATPIII, principalmente en el estrecho contacto con los pacientes durante el estudio, ya que se llevo un manejo individualizado por personal especializado, dando un recetario, talleres de cocina, promoción de mensajes de salud con carteles y folletos, y la motivación de los sujetos con asesoramiento individual.

Nuestros resultados pueden explicar, en parte, la variabilidad observada en diversos estudios que se han llevado acabo para analizar el efecto de la proteína de soya en la disminución de CT. Varios meta-análisis estadísticos se han llevado a cabo para ofrecer pruebas de que el consumo de proteína de soya puede o no mejorar los lípidos en la sangre[22, 67], sin embargo, la variabilidad del genotipo es un factor que no ha sido considerado en la mayoría de los estudios. Solo, un estudio anterior mostró que la proteína de soya reducía CT en sujetos con el genotipo de la apolipoproteína E E3/E3 o E3/E4[68]. En futuros estudios que exploren los efectos de la proteína de soya sobre el metabolismo lipídico será necesario considerar las variaciones del genotipo para una mejor interpretación de los resultados.

La reducción de CT, TG, LDL que observamos con el tratamiento BGS-S, apoya a las recomendaciones del ATPIII que sigue teniendo como objetivo principal la modificación de la dieta como piedra angular de la prevención primaria, con la adición de proteína de soya y fibra [67, 69]. Sin embargo, las recomendaciones generales no tienen en cuenta el hecho bien conocido que las personas muestran un amplio abanico de respuestas a cualquier intervención terapéutica y se desconoce cuantas personas pueden alcanzar las concentraciones plasmática de lípidos recomendados mediante las estrategias de cambio de estilo de vida. La razón principal de esta incertidumbre es que, aunque hay algoritmos que permiten predecir la respuesta de colesterol plasmático a los cambios de dieta en grupos de individuo, no es posible, por el momento predecir la respuesta de cada persona como individuo o de cada población.

12. CONCLUSION.

Nuestros resultados facilitaran el camino hacia unas recomendaciones dietéticas que, basadas en factores genéticos, contribuyan a reducir el riesgo de EC. El presente estudio mostró que los sujetos con el genotipo ABCG8 DH tienen una mejor respuesta para reducir el CT con el consumo de la dieta BGS-S. En cambio no hubo asociación con los polimorfismos de ABCG5 (C1950G), APOA1 (-75 AG) y las isoformas del APOE ϵ 2, ϵ 3 ϵ 4 con la disminución de CT y TG. Sin embargo, debemos tener en cuenta que este estudio es solo el comienzo interesante de interacciones de la respuesta de un individuo a un nutrimento. Por lo tanto, es necesario continuar con estudios de este tipo y así analizar la influencia de cada SNP involucrado en la respuesta, para prevenir la EC y para desarrollar terapias más seguras y eficaces para nuestros pacientes

BIBLIOGRAFIA

1. INEGI, *Defunciones Generales*, G.e.I. Instituto Nacional de Estadística, Editor. 2006, 2008: Mexico, D.F.
2. Organization., W.H., *World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life*, WHO, Editor. 2002: Geneva.
3. Dawber, T.R., G.F. Meadors, and F.E. Moore, Jr., *Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study*. *Am J Public Health Nations Health*, 1951. 41(3): p. 279-81.
4. Cortell, O., *Integración de la Bioinformática en la Investigación Genómica Cardiovascular: Aplicaciones en el Framingham Heart Study*, in *Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos*. 2004, Universitat Jaume I: Castellón. p. 486.
5. Amarenco, P. and P.G. Steg, *The paradox of cholesterol and stroke*. *Lancet*, 2007. 370(9602): p. 1803-4.
6. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)*. *JAMA*, 2001. 285(19): p. 2486-97.
7. Masson, L.F., G. McNeill, and A. Avenell, *Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review*. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(5): p. 1098-111.
8. Ye, S.Q. and P.O. Kwiterovich, Jr., *Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol*. *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(5 Suppl): p. 1275S-1284S.
9. Gusella, J.F., *DNA polymorphism and human disease*. *Annu Rev Biochem*, 1986. 55: p. 831-54.
10. Gurr, M.I.H., J.L. , *Lipid Biochemistry: An Introduction* C. Hall, Editor. 1991: Londres.
11. Hamosh, M., Klaeveman, H.L., Wolf, R.O., Scow, R.O., *Pharyngeal lipase and digestion of dietary triglyceride in man*. *J. Clin. Invest*, 1975. 55: p. 908.
12. Fauci, B., Wilson, Martin, Kasper, Hauser, *Principios de Medicina Interna*, in *Harrison*, McGraw-Hill, Editor. 2006: USA.
13. Goodman, D.S., Noble, R.P. , *Turnover of plasma cholesterol in man*. *J. Clin. Invest*, 1968. 47(231): p. 1968.
14. Aschen, M.D., Blumenthal, R.S. , *Low HDL Cholesterol levels*. *N Engl J Med*, 2005. 353: p. 1252-60.
15. Freeman, L.A., et al., *The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter*. *J Lipid Res*, 2004. 45(7): p. 1197-206.
16. Expert panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, *Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III Final Report)*. 2002: Bethesda, MD. p. 280.
17. Aguilar-Salinas, C.A., et al., *High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey*. *J Lipid Res*, 2001. 42(8): p. 1298-307.
18. Barter, P.J., et al., *Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(2): p. 160-7.
19. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988. 16(3): p. 1215.
20. Tovar, A.R., et al., *A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephrotic syndrome*. *J Nutr*, 2002. 132(9): p. 2562-9.
21. Zhan, S. and S.C. Ho, *Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(2): p. 397-408.
22. Anderson, J.W., B.M. Johnstone, and M.E. Cook-Newell, *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. *N Engl J Med*, 1995. 333(5): p. 276-82.
23. Meinertz, H., K. Nilausen, and O. Faergeman, *Soy protein and casein in cholesterol-enriched diets: effects on plasma lipoproteins in normolipidemic subjects*. *Am J Clin Nutr*, 1989. 50(4): p. 786-93.
24. Young, V.R., *Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition*. *J Am Diet Assoc*, 1991. 91(7): p. 828-35.

25. Tovar, A.R., C. Ascencio, and N. Torres, *Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 283(5): p. E1016-22.
26. Manzano Leon, N., N. Torres, and A.R. Tovar, [*Mechanism of action of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) in cholesterol and fatty-acid biosynthesis*]. *Rev Invest Clin*, 2002. 54(2): p. 145-53.
27. Ascencio, C., et al., *Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats*. *J Nutr*, 2004. 134(3): p. 522-9.
28. Torre-Villalvazo, I.T., AR. Ramos-Barragán, VE. Cerbón-Cervantes, MA. Torres, N. , *Soy Protein Ameliorates Metabolic Abnormalities in Liver and Adipose Tissue of Rats Fed a High Fat Diet*. *J. Nutr.*, 2008. 138: p. 462-468.
29. Tovar, A.R., et al., *Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats*. *J Lipid Res*, 2005. 46(9): p. 1823-32.
30. Torres, N., I. Torre-Villalvazo, and A.R. Tovar, *Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders*. *J Nutr Biochem*, 2006. 17(6): p. 365-73.
31. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. *Nature*, 1953. 171(4361): p. 964-7.
32. Wilkins, M.H., A.R. Stokes, and H.R. Wilson, *Molecular structure of deoxyribose nucleic acids*. *Nature*, 1953. 171(4356): p. 738-40.
33. *International HapMap Project*. [cited; Available from: <http://www.hapmap.org/downloads/index.html.en>.
34. Kwok, P.Y., *Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2001. 2: p. 235-58.
35. *Hapmap Project Data*. [cited; Available from: <http://www.hapmap.org/downloads/index.html.en>.
36. Han, H., et al., *A novel mutant, ApoA-I nichinan (Glu235-->0), is associated with low HDL cholesterol levels and decreased cholesterol efflux from cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(6): p. 1447-55.
37. Juo, S.H., et al., *Mild association between the A/G polymorphism in the promoter of the apolipoprotein A-I gene and apolipoprotein A-I levels: a meta-analysis*. *Am J Med Genet*, 1999. 82(3): p. 235-41.
38. Ordovas, J.M., et al., *Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study*. *Am J Clin Nutr*, 2002. 75(1): p. 38-46.
39. Ordovas, J.M., *Genetic interactions with diet influence the risk of cardiovascular disease*. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(2): p. 443S-446S.
40. Mata, P., et al., *Human apolipoprotein A-I gene promoter mutation influences plasma low density lipoprotein cholesterol response to dietary fat saturation*. *Atherosclerosis*, 1998. 137(2): p. 367-76.
41. Sarkkinen, E., et al., *Effect of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid response to the separate modification of dietary fat and dietary cholesterol*. *Am J Clin Nutr*, 1998. 68(6): p. 1215-22.
42. Gamboa, R., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico*. *Hum Biol*, 2000. 72(6): p. 975-81.
43. Kamboh, M.I., K.M. Weiss, and R.E. Ferrell, *Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico*. *Clin Genet*, 1991. 39(1): p. 26-32.
44. Zannis, V.I. and J.L. Breslow, *Apolipoprotein E*. *Mol Cell Biochem*, 1982. 42(1): p. 3-20.
45. Crews, D.E., et al., *Population genetics of apolipoprotein A-4, E, and H polymorphisms in Yanomami Indians of northwestern Brazil: associations with lipids, lipoproteins, and carbohydrate metabolism*. *Hum Biol*, 1993. 65(2): p. 211-24.
46. Scacchi, R., et al., *Apolipoprotein B and E genetic polymorphisms in the Cayapa Indians of Ecuador*. *Hum Biol*, 1997. 69(3): p. 375-82.
47. Gerdes, L.U., et al., *Are men carrying the apolipoprotein epsilon 4- or epsilon 2 allele less fertile than epsilon 3 epsilon 3 genotypes?* *Hum Genet*, 1996. 98(2): p. 239-42.
48. Gerdes, L.U., et al., *The apolipoprotein E polymorphism in Greenland Inuit in its global perspective*. *Hum Genet*, 1996. 98(5): p. 546-50.
49. Heimerl, S., et al., *Mutations in the human ATP-binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia*. *Hum Mutat*, 2002. 20(2): p. 151.

50. Kajinami, K., et al., *ATP binding cassette transporter G5 and G8 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin*. *J Lipid Res*, 2004. 45(4): p. 653-6.
51. Weggemans, R.M., et al., *ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans*. *Clin Genet*, 2002. 62(3): p. 226-9.
52. Teixeira, S.R., et al., *Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men*. *Am J Clin Nutr*, 2000. 71(5): p. 1077-84.
53. Jenkins, D.J., et al., *Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein*. *JAMA*, 2003. 290(4): p. 502-10.
54. FDA, A., *Soy protein and coronary heart disease.*, F. Register, Editor. 1999, Online via GPO Acces.
55. Madrigal, H.H., S. , *Manual de Encuestas de Dieta* primera ed. Perspectivas en Salud Pública. 1996, Mexico, D.F. 190.
56. Perez-Lizaur, A.M.-L., L. Palacios-González, B. , *Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes*, A. Fomentos de nutrición y salud, Editor: México, D.F.
57. Norris, T., *Encuestas Alimentarias. Su técnica e interpretación*. *Est Nutr*, 1950. 4: p. 32-54.
58. McGuigan, F.E. and S.H. Ralston, *Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan*. *Psychiatr Genet*, 2002. 12(3): p. 133-6.
59. Herron, K.L., et al., *The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs*. *J Nutr*, 2006. 136(5): p. 1161-5.
60. Hubacek, J.A., et al., *Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels*. *Physiol Res*, 2004. 53(4): p. 395-401.
61. Berge, K.E., et al., *Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8*. *J Lipid Res*, 2002. 43(3): p. 486-94.
62. Ordovas, J.M., et al., *Gene-diet interaction in determining plasma lipid response to dietary intervention*. *Atherosclerosis*, 1995. 118 Suppl: p. S11-27.
63. Dreon, D.M., et al., *Apolipoprotein E isoform phenotype and LDL subclass response to a reduced-fat diet*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(1): p. 105-11.
64. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function*. *Trends Biochem Sci*, 2006. 31(8): p. 445-54.
65. Noriega-Lopez, L., et al., *Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones*. *J Biol Chem*, 2007. 282(28): p. 20657-66.
66. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. *J Clin Invest*, 2002. 109(9): p. 1125-31.
67. Reynolds, K., et al., *A meta-analysis of the effect of soy protein supplementation on serum lipids*. *Am J Cardiol*, 2006. 98(5): p. 633-40.
68. Gaddi, A., et al., *Dietary treatment for familial hypercholesterolemia--differential effects of dietary soy protein according to the apolipoprotein E phenotypes*. *Am J Clin Nutr*, 1991. 53(5): p. 1191-6.
69. Jenkins, D.J., et al., *Direct comparison of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods with a statin in hypercholesterolemic participants*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 81(2): p. 380-7.