

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”



Título del Proyecto:

Alteraciones metabólicas en individuos mexicanos con hiperlipidemia familiar combinada y las variantes del polimorfismo de nucleótido único rs1424032

Para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS

Alumna:
Dra. Paloma Almeda Valdés

Comité tutorial:
Dr. Carlos Aguilar Salinas
Dra. María Teresa Tusié Luna
Dr. Oscar Pérez Méndez

México D.F., septiembre de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Carlos A. Aguilar Salinas
Tutor Principal

Dra. Paloma Almeda Valdés
Alumna del programa de Doctorado en Ciencias Médicas

Índice

	Página
1. Resumen	4
2. Antecedentes	5
3. Definición del problema	16
4. Justificación	17
5. Pregunta de investigación e hipótesis	18
6. Objetivos	19
7. Pacientes y método	
a. Diseño del estudio	20
b. Población de estudio	20
c. Tamaño de muestra	21
d. Variables de interés	21
e. Procedimientos	23
f. Análisis estadístico	24
8. Resultados	26
9. Discusión	39
10. Conclusión	41
11. Lista de abreviaturas	42
12. Bibliografía	43
13. Anexos	
a. Anexo 1. Carta de aprobación del comité de ética	48
b. Anexo 2. Medición de colesterol total	49
c. Anexo 3. Medición de triglicéridos	50
d. Anexo 4. Medición de colesterol HDL	51
e. Anexo 5. Medición de glucosa	52
f. Anexo 6. Medición de aspartato aminotransferasa	53
g. Anexo 7. Medición de alanino aminotransferasa	54
h. Anexo 8. Medición de gama glutamiltransferasa	55
i. Anexo 9. Medición de insulina	56
j. Anexo 10. Medición de apolipoproteína B-48	57
k. Anexo 11. Medición de apolipoproteína B-100	58
l. Anexo 12. Medición de apolipoproteína C-III	59
m. Anexo 13. Medición de adiponectina	60
n. Anexo 14. Medición de leptina	61
o. Anexo 15. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT)	62
p. Anexo 16. Medición de cintura y cadera	63
q. Anexo 17. Consentimiento informado	64

Resumen

Antecedentes. La hiperlipidemia familiar combinada (HFC) es la dislipidemia primaria con mayor prevalencia en la población mexicana. Se caracteriza por niveles aumentados de colesterol, de triglicéridos o ambos y elevación de apolipoproteína B (apo B). La HFC se asocia con riesgo elevado para desarrollar enfermedad cardiovascular, la mortalidad cardiovascular en individuos afectados es del 18% a 10 años. Algunos genes participan en el desarrollo de HFC: el gen del factor de transcripción corriente arriba 1 (USF1), el conglomerado de genes APOA1/C3/A4/A5, el gen de la lipasa lipoproteica (LPL) y del factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4A). En individuos mexicanos con HFC las variantes del polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs1424032 se asociaron significativamente con niveles de apo B. Esta región no codifica algún gen conocido, es una región altamente conservada y pudiera funcionar como un elemento regulatorio. El objetivo de este estudio es determinar si las variantes del SNP rs1424032 tienen un efecto en el metabolismo de lipoproteínas en individuos mexicanos con HFC, evaluando las concentraciones de lipoproteínas, glucosa e insulina en estado basal y después de un alimento mixto.

Material y métodos. Estudio experimental, transversal y comparativo. Se realizó una prueba con alimento mixto estandarizado. Para comparar las características basales de los individuos con las diferentes variantes se realizó prueba T de Student o U de Mann-Whitney. Para evaluar el efecto del alimento y de las variantes del SNP en las concentraciones post-prandiales se realizó análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas. Se calculó el área bajo la curva (AUC) total e incremental post-prandial de lipoproteínas, glucosa e insulina y se compararon en los individuos con las diferentes variantes con prueba U de Mann-Whitney. Se realizaron correlaciones bivariadas de Spearman y análisis de regresión lineal por pasos sucesivos para determinar los factores determinantes del área bajo la curva total e incremental de triglicéridos y de apo-B48 como indicadores principales de la lipemia post-prandial.

Resultados. Participaron 103 individuos, 58 con la variante AA y 45 con la variante GG ó AG del SNP rs1424032. El índice cintura/cadera fue mayor en los individuos con la variante AA. La concentración post-prandial de lipoproteínas, glucosa e insulina no fue diferente en los individuos con las diferentes variantes del SNP después del ajuste para la ingesta de alimento mixto y el índice cintura/cadera. El AUC total e incremental de lipoproteínas, glucosa e insulina fue semejante en los individuos con las diferentes variantes. En los modelos de regresión la concentración basal de triglicéridos y el índice de masa corporal fueron determinantes significativos e independientes del AUC total e incremental de triglicéridos. La concentración basal de apo B-48, el índice cintura/cadera, el AUC total de insulina y las variantes del SNP rs1424032 determinaron significativamente el AUC total de apo B-48. Finalmente, el AUC incremental de triglicéridos, el índice cintura/cadera y la variantes del SNP determinaron en forma significativa el AUC incremental de apo B-48.

Conclusiones. Los individuos mexicanos con HFC tuvieron elevación post-prandial de triglicéridos y quilomicrones. Las concentraciones de lipoproteínas, glucosa e insulina en los individuos con las diferentes variantes del SNP rs1424032 fueron similares en el estado basal y después de la ingesta de un alimento mixto estandarizado.

Antecedentes

Metabolismo de lípidos

Los lípidos son insolubles en agua por lo cual se transportan asociados con proteínas en lipoproteínas. El contenido de las lipoproteínas determina su metabolismo y sus acciones biológicas. El centro o núcleo de las lipoproteínas está formado principalmente por ésteres de colesterol y triglicéridos. Alrededor del centro de cada lipoproteína hay una capa de fosfolípidos y colesterol no esterificado. En esta capa se encuentran también proteínas conocidas como apolipoproteínas que dan la estructura a la lipoproteína y funcionan como ligandos para receptores, cofactores o inhibidores de enzimas (1).

En el siguiente cuadro se muestran las lipoproteínas y sus características de acuerdo a su densidad (2).

Tabla 1. Clasificación y características de las lipoproteínas de acuerdo a su densidad				
Lipoproteína	Densidad (g/cm³)	Principal lípido en el centro	Diámetro (nm)	Apolipoproteínas
Alta densidad (HDL)	1.21-1.063	Ésteres de colesterol	7.5-10.5	A-I, A-II, C, E
Baja densidad (LDL)	1.063-1.019	Ésteres de colesterol	21.5	B-100
Densidad intermedia (IDL)	1.019-1.006	Ésteres de colesterol, triglicéridos	25-30	B-100, C, E
Muy baja densidad (VLDL)	<1.006	Triglicéridos, ésteres de colesterol	39-100	B-100, C, E
Quilomicrones	<1.006	Triglicéridos	60-500	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV
Lp (a)	1.04-1.08	Ésteres de colesterol	21-30	B-100, Lp (a)

Las lipoproteínas también pueden clasificarse en dos grupos: las que contienen apolipoproteína B (apo B) y las que contienen apolipoproteína A-I (apo A-I). La apo B es la apolipoproteína principal de las partículas encargadas de transportar los lípidos del intestino y del hígado hacia el resto de los órganos mientras que el transporte de las partículas de los tejidos periféricos hacia el hígado lo realizan las lipoproteínas que contienen apo A-I.

Apolipoproteína B

La apolipoproteína B es la proteína principal de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Su gen está localizado en el cromosoma 2p23-p24. Existen dos formas de apo B: la apo B-100 y la apolipoproteína B-48 (apo B-48). La apo B-48 es el resultado de la edición del RNA mensajero de la apo B-100 en el codón 2153, que normalmente codifica para glutamina y se convierte en un codón de paro. Esta acción la realiza la enzima APOBEC-1 en el intestino, esta enzima es una citidina desaminasa que elimina un grupo amino mediante una reacción de hidrólisis de citosina a uracilo, liberando amonio en el proceso. El resultado es la síntesis de una proteína que contiene el 48% de la apo B-100.

La apo B es insoluble en agua por lo cual no se transfiere entre las lipoproteínas. La medición de la concentración de apo B estima el número de partículas que potencialmente se pueden depositar en las placas de aterosclerosis o partículas aterogénicas. El metabolismo de las lipoproteínas que contienen apo B inicia con la síntesis de lipoproteínas en el hígado y en el intestino. La principal diferencia entre ambos procesos es la proteína estructural de las lipoproteínas. Las VLDL producidas en el hígado contienen apo B-100 y los quilomicrones producidos en el intestino contienen apo B-48. Esta diferencia permite a los quilomicrones tener una capacidad mayor para transportar triglicéridos en su interior y un catabolismo más rápido. La apo B-48 carece de la región que es reconocida por el receptor de LDL por lo cual su eliminación depende de la presencia de apolipoproteína E (apo E) (1).

Absorción de grasa de la dieta

Los triglicéridos que provienen de la dieta son hidrolizados en el intestino a monoglicéridos y ácidos grasos mediante la acción de la lipasa pancreática. El colesterol y otros esteroides de la dieta son transportados a través de la membrana de los enterocitos por transportadores (ABCG5, ABCG8 y proteína 1 similar a la proteína de Niemann-Pick). El colesterol puede ser secretado nuevamente al lumen intestinal por el transportador ABCG5/G8. Los monoglicéridos y ácidos grasos forman micelas que se absorben en el epitelio intestinal. Después de su absorción, los ácidos grasos son reesterificados con los monoglicéridos para formar triglicéridos y el colesterol libre se esterifica mediante la enzima colesterol aciltransferasa (ACAT). Para formar los quilomicrones los triglicéridos y una cantidad pequeña de ésteres de colesterol, en asociación con apo B-48, adquieren una monocapa de fosfolípidos y colesterol libre, a los cuales se agregan apo A-I y apo A-II. La incorporación inicial de los lípidos depende de la acción de la proteína de transferencia microsomal (MTP). Los quilomicrones son exportados del enterocito al conducto linfático y de ahí al torrente sanguíneo a través del conducto torácico. Los quilomicrones intercambian sus elementos con las HDL adquiriendo apo C y apo E y transfiriéndoles fosfolípidos. Este proceso se lleva a cabo durante el transporte de los quilomicrones desde los linfáticos intestinales hasta el conducto torácico y al torrente sanguíneo (1, 2).

Formación de lipoproteínas de muy baja densidad

El hígado exporta triglicéridos hacia los tejidos periféricos en el centro de las VLDL. Los triglicéridos se sintetizan en el hígado a partir de ácidos grasos absorbidos del plasma o son sintetizados de

novo. La secreción de lipoproteínas del hígado depende de la cantidad de lípidos que contiene el hepatocito. Así, la liberación de VLDL del hígado se incrementa en cualquier condición que ocasione un incremento del flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado, por ejemplo: obesidad, aumento de la ingesta calórica, consumo de alcohol y de estrógenos.

Recientemente se ha demostrado que los receptores nucleares son elementos regulatorios que participan y controlan el metabolismo y secreción de lípidos a diferentes niveles: el receptor hepático X (LXR) incrementa el flujo del colesterol del intestino y del hígado mediante la activación de los transportadores ABG5/8 y ABCA1. Además activa a la enzima Cyp7A1 aumentando la síntesis de ácidos biliares en el hígado. Por otra parte los receptores de estrógenos (ER) incrementan la síntesis de novo de colesterol. (3)

Las VLDL son un grupo heterogéneo de partículas las cuales han sido clasificadas de acuerdo a su contenido de triglicéridos. Las tipo 1 son las más grandes, contienen mayor cantidad de triglicéridos y son precursoras de las LDL pequeñas y densas. Las tipo 2 y 3 tienen densidad mayor, un contenido de triglicéridos menor, se transforman en IDL y en las subclases grandes y ligeras de LDL (1, 2).

Metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos

La lipasa lipoproteica (LPL) se encuentra unida al endotelio de los capilares en el corazón, músculo esquelético, tejido adiposo y glándulas mamarias, entre otros tejidos. Hidroliza los triglicéridos de los quilomicrones y de las VLDL. La hidrólisis de los triglicéridos del centro de los quilomicrones y de las VLDL, así como la transferencia de lípidos y apolipoproteínas de su superficie hacia las HDL, las convierte en remanentes de quilomicrones y remanentes de VLDL, respectivamente. El tamaño de cada partícula disminuye y con ello su afinidad por la LPL. Los remanentes son eliminados por endocitosis en el hígado al interactuar con tres tipos de receptores: receptor de LDL, proteína relacionada al receptor LDL (LRP) y receptor de VLDL. El proceso de endocitosis requiere la presencia de apolipoproteína E. Una vez en el hígado continúa la hidrólisis de los triglicéridos de los remanentes por acción de la lipasa hepática (1, 2).

Metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad

Existen receptores para las LDL en prácticamente todas las células, especialmente en los hepatocitos. Los ligandos para estos receptores son las apolipoproteínas apo B-100 y apo E. Las LDL se internalizan a las células mediante endocitosis. Una vez dentro de las células, la apo B es degradada y el receptor regresa a la superficie de la célula. Los ésteres de colesterol de las LDL son hidrolizados a colesterol libre para la producción de membranas celulares y sales biliares. El exceso de colesterol es esterificado por la enzima ACAT para su almacenamiento (1, 2).

Metabolismo de lipoproteínas de alta densidad

Las apolipoproteínas que componen a las HDL son producidas en el hígado y en el intestino, se organizan con lípidos y forman HDL nativas que circulan en la linfa y en el plasma. El exceso de

colesterol libre y fosfolípidos liberados de la superficie de los quilomicrones y VLDL se transfieren a las HDL por la acción de la proteína de transferencia de fosfolípidos. El colesterol adquirido por las HDL se esterifica por la acción de la enzima lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT). A su vez, las HDL transfieren apolipoproteína C a las VLDL y quilomicrones. El colesterol no esterificado es exportado y adquirido por las HDL a través del transportador ABCA1 y esterificado por LCAT. De forma semejante las HDL adquieren colesterol proveniente de los macrófagos a través del transportador ABCG1. Los ésteres de colesterol de las HDL son transferidos a las LDL y a lipoproteínas ricas en triglicéridos a través de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP). Los ésteres de colesterol también se transfieren de las HDL a los hepatocitos a través del receptor “scavenger” clase B tipo 1 (1, 2).

Hiperlipidemia familiar combinada (HFC)

La HFC es una dislipidemia primaria caracterizada por elevación del colesterol, triglicéridos o ambos en por lo menos dos miembros de una misma familia. Característicamente se observa variabilidad intra-individual e intra-familiar en el fenotipo de los lípidos en mediciones seriadas a lo largo del tiempo. Esta característica fue reportada en un individuo con HFC sin tratamiento médico, quien presentó tres anomalías diferentes durante seis años de seguimiento: elevación de colesterol, de triglicéridos o de ambos (4). En los individuos afectados existe elevación de los niveles de apo B y mayor riesgo de desarrollar enfermedad coronaria (5, 6).

Epidemiología

La hiperlipidemia familiar combinada (HFC) es una de las dislipidemias primarias más frecuentes en la población general. Tiene una prevalencia estimada de entre 1% a 6% en países occidentales y se considera que es la dislipidemia primaria más frecuente en México. Entre un 10% y 20% de individuos con enfermedad coronaria prematura tienen HFC (5). En un estudio que incluyó individuos mexicanos con diabetes mellitus tipo 2 que habían sufrido un evento cardiovascular, se demostró la presencia de HFC en 28.6% de los casos. Esta prevalencia es mucho mayor que la reportada en la población general o en sobrevivientes de infarto del miocardio sin diabetes mellitus (7).

Diagnóstico

En 1986 se propusieron una serie de criterios diagnósticos para HFC que incluyen ausencia de xantomas, presencia de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o hiperlipidemia mixta (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) y dos o más familiares de primer grado con alguna de estas alteraciones. Posteriormente se propuso una nueva definición de HFC que incluye únicamente a los criterios de hipertrigliceridemia y elevación de apo B para realizar el diagnóstico (8, 9).

Para establecer el diagnóstico de HFC se requiere el estudio de por lo menos tres familiares de primer grado del individuo afectado con la finalidad de demostrar la existencia de dos diferentes

alteraciones de lípidos en la familia. El diagnóstico es más probable si existe elevación de los niveles de apo B y enfermedad coronaria prematura (a una edad menor de 55 años en hombres y de 65 años en mujeres).

En el siguiente cuadro se enumeran los criterios propuestos para el diagnóstico de HFC:

Tabla 2. Criterios diagnósticos de hiperlipidemia familiar combinada
Primarios: <ol style="list-style-type: none">1) Hiperlipoproteinemia: nivel de colesterol LDL mayor a 160 mg/dl y/o de triglicéridos mayor a 200 mg/dl, más2) Variabilidad del fenotipo en el paciente y en por lo menos un miembro de la familia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ambas o fenotipo normal) evaluada por lo menos en 3 ocasiones.
Secundarios: <ol style="list-style-type: none">1) Elevación de apo B-1002) Presencia de partículas LDL pequeñas y densas3) Estudio genético para excluir otras dislipidemias primarias cuando esté indicado

Adaptado de: Gaddi A, Cicero AFG, Odoon FO, Poli A, Paoletti R. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vascular Health and Risk Management*. 2007; 3:877-86

Lipoproteínas en HFC

Las alteraciones en los niveles de lipoproteínas en plasma encontradas en la HFC son variables: aumento de los niveles de colesterol y/o triglicéridos acompañándose de aumento en los niveles de apo B. Este patrón está dado por el incremento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y/o colesterol LDL. Algunos individuos presentan disminución del colesterol HDL, lo cual usualmente está en relación inversa con la concentración de triglicéridos. Se han sugerido diversas alteraciones metabólicas que participan en la fisiopatología de esta dislipidemia.

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Durante el ayuno los triglicéridos se transportan en las VLDL producidas en el hígado. Cada partícula VLDL tiene una molécula de apo B. En la circulación las VLDL se convierten en remanentes de VLDL o IDL mediante la hidrólisis de sus triglicéridos por acción de la enzima LPL. Para que la LPL realice la hidrólisis de los triglicéridos se requiere la presencia del cofactor apo C-II. Por otra parte, la apo C-III inhibe a la LPL. Los remanentes de VLDL contienen apo E, la cual es un ligando del receptor de LDL. La unión de apo E con el receptor de LDL permite la internalización de estas partículas en el hígado. En condiciones fisiológicas esta unión se lleva a cabo en los receptores hepáticos en donde las lipoproteínas son degradadas y el colesterol eliminado mediante su excreción en la bilis.

En estado post-prandial, la mayor parte de los triglicéridos se transportan en los quilomicrones, producidos en el intestino. Cada quilomacrón contiene una partícula de apo B-48. Los quilomicrones son convertidos en remanentes de quilomicrones por acción de la LPL y se internalizan en el hígado mediante la unión de apo E con el receptor de LDL.

En la HFC hay una mayor síntesis de VLDL. Las vías para degradar las VLDL y quilomicrones se saturan existiendo acumulación de remanentes de VLDL y de quilomicrones. La vida media de estas lipoproteínas se prolonga propiciando su unión al endotelio y mayor adhesión de células inflamatorias, promoviendo el proceso de aterogénesis (10).

En individuos con HFC existen diversas alteraciones que pueden contribuir al aumento de la síntesis de VLDL. Se ha descrito tanto una disminución de la incorporación de ácidos grasos en triglicéridos como reducción de la eliminación de las VLDL asociada a mayor conversión a partículas LDL pequeñas y densas (10). En el estado post-prandial hay aumento del flujo de ácidos grasos libres no esterificados hacia el hígado y una sobreproducción de VLDL, perpetuando la alteración. Sin embargo, este hallazgo contrasta con otros reportes en los que se ha demostrado disminución de la eliminación de apo B de las VLDL y LDL, sin incremento en su producción (12). En otros reportes se han identificado defectos en las acciones de la LPL, LCAT y lipasa hepática (LH) como causa del incremento de las VLDL. Esto ilustra la heterogeneidad en las alteraciones metabólicas presentes en la HFC.

La LPL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de las VLDL y quilomicrones, liberando ácidos grasos que se dirigen a los tejidos. En entre 30 y 50% de individuos con HFC se ha demostrado reducción de la actividad de la LPL. Algunos de los mecanismos que pudieran explicar la disminución de la acción de la LPL incluyen:

- Mutaciones en el gen de esta enzima
- Presencia de ácidos grasos libres en plasma, que disminuyen la actividad de la LPL
- Resistencia a la insulina que disminuye la actividad de la LPL
- Incremento de los niveles de apo C-III, que inhibe directamente a la LPL

Los ácidos grasos libres liberados por la hidrólisis de los triglicéridos de las VLDL y de los quilomicrones se almacenan en los adipocitos en donde son reesterificados y convertidos nuevamente a triglicéridos mediante la acción de la proteína estimuladora de la acilación (ASP). Una vez en los adipocitos, los triglicéridos pueden ser hidrolizados nuevamente por la lipasa hormono sensible (LHS) para liberar ácidos grasos libres. La LHS es inhibida por la insulina. La ASP modula la velocidad a la cual los ácidos grasos son incorporados por los adipocitos y convertidos a triglicéridos e influencia la velocidad con la cual los ácidos grasos son liberados de los adipocitos. La resistencia del tejido adiposo a los efectos de la ASP y/o la alteración de su función pueden contribuir a la reducción de la captación de los ácidos libres en los adipocitos, ocasionando un

aumento del flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado y en consecuencia, un aumento en la síntesis de VLDL, hallazgo característico en la HFC (13).

En individuos con HFC pudiera existir un defecto combinado del almacenamiento de lípidos como resultado de la reducción de la acción de la ASP y de la resistencia a la acción de la insulina, con aumento de la lipólisis por actividad de la LHS. Esto ocasiona que los ácidos grasos libres sean desviados directamente hacia el hígado en donde se incrementa la síntesis de VLDL (14).

Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

En la HFC las partículas LDL son heterogéneas, con un predominio de partículas LDL pequeñas y densas, también llamado patrón "B" o aterogénico. Este patrón se caracteriza por la presencia de partículas LDL con poco colesterol, aumentando el índice apo B/colesterol. Estas partículas son más susceptibles a ser oxidadas. En un estudio realizado en individuos con HFC, se demostró una elevación de las partículas LDL pequeñas y densas independientemente del fenotipo de lípidos (15). Se ha evidenciado que el fenotipo de LDL pequeñas y densas tiene una fuerte asociación con un incremento en la concentración de triglicéridos en diferentes grupos: individuos con infarto del miocardio, individuos normales y con HFC. A pesar de esta asociación, en individuos con HFC, los cambios en los niveles de triglicéridos después de tratamiento médico no alteran el diámetro de las partículas LDL. Las LDL pequeñas y densas parecen ser un hallazgo persistente en individuos con HFC a pesar del tratamiento hipolipemiente (16).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

La disminución del colesterol HDL es un hallazgo frecuente en la HFC, que puede ser debido al enriquecimiento de las partículas HDL con triglicéridos y aumento de la actividad de la LH, que condiciona su degradación. Aunque la presencia hipoalfalipoproteinemia es frecuente en individuos con HFC, no es considerada como un criterio para el diagnóstico.

Apolipoproteína B (Apo B)

Cada partícula de LDL y VLDL contienen una molécula de apo B, por esta razón la concentración de apo B en plasma representa el número de partículas aterogénicas (17). El incremento en la concentración de apo B es un hallazgo consistente en los individuos con HFC y es uno de los parámetros más útiles para realizar el diagnóstico. El punto de corte para determinar un nivel elevado corresponde a la percentila 90 de cada población en particular. En sujetos mexicanos los datos de la Encuesta Nacional de Salud del 2000 mostraron una concentración promedio de apo B de 77.8 ± 25.9 mg/dl y 71 ± 22.8 , en hombres y mujeres respectivamente. La percentila 90 de apo B correspondió a 108 mg/dl en hombres y 99 mg/dl en mujeres (18).

Aterosclerosis en HFC

La HFC ha sido asociada con un riesgo incrementado para desarrollar enfermedad cardiovascular. Se ha demostrado aumento de aterogénesis asociado a los fenotipos de lipoproteínas que

caracterizan a esta entidad. La mortalidad cardiovascular promedio a 10 años asociada a la HFC es del 18% (riesgo relativo 1.7 con intervalo de confianza al 95% de 1.1 a 2.7%, $p= 0.0251$) (10). La presencia de partículas LDL pequeñas y densas es un factor de riesgo para enfermedad coronaria en estos individuos. Además, la activación de leucocitos y la estimulación crónica del endotelio son mecanismos que promueven la aterogénesis y que juegan un papel adicional en el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular prematura que caracteriza a la HFC. En un estudio se encontró que el riesgo de aterosclerosis asociado con la HFC estaba dado principalmente por la presencia concomitante de componentes del síndrome metabólico (19).

Síndrome metabólico, resistencia a la insulina e HFC

La HFC y el síndrome metabólico son dos entidades distintas, sin embargo, frecuentemente coexisten. En un estudio del National Heart, Lung and Blood Institute un 64.7% de los individuos con HFC tuvieron síndrome metabólico de acuerdo a los criterios del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III). En 102 sujetos mexicanos con HFC, 71.6% cumplieron con criterios para diagnóstico de síndrome metabólico (19).

Existen características en común en la HFC y en el síndrome metabólico: la presencia de hipertrigliceridemia, disminución de niveles de colesterol HDL, asociación con factores de riesgo cardiovascular como hipertensión arterial, obesidad abdominal e intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2 y aumento del riesgo cardiovascular. Por otra parte, las principales diferencias entre las dos entidades son: la elevación de los niveles de apo B, el fenotipo variable de lipoproteínas en el seguimiento, el papel relevante de la herencia y las manifestaciones clínicas y de laboratorio más tempranas presentes en los individuos con HFC.

Algunos estudios han demostrado mayor resistencia a la insulina en individuos con HFC al compararlos con individuos sin HFC. A pesar de la relación del fenotipo de lipoproteínas encontrado en la HFC con la presencia de obesidad visceral y/o resistencia a la insulina, estas dos alteraciones no explican por completo la elevación de los niveles de apo B y el aumento de LDL pequeñas y densas observadas en la HFC. Purnell y colaboradores demostraron que en individuos con HFC ni la resistencia a la insulina ni la obesidad intra-abdominal explican la elevación de los niveles de apo B. En este estudio, los niveles de apo B estuvieron elevados independientemente del grado de sensibilidad a la insulina en individuos con HFC. Así, si bien la obesidad visceral y la resistencia a la insulina pueden contribuir al fenotipo de lipoproteínas encontrado en la HFC, no explican la elevación de apo B en estos individuos (20).

En individuos mexicanos con HFC se identificó que la presencia de síndrome metabólico tuvo un efecto aditivo elevando los niveles de triglicéridos (201 ± 138 mg/dl vs. 309 ± 166 ; $P<0.001$) y disminuyendo los niveles de colesterol HDL (46.2 ± 15.7 vs. 37 ± 8.1 mg/dl). El efecto aditivo del síndrome metabólico fue significativo después del ajuste para edad, género y tabaquismo (5).

Esteatosis hepática e HFC

Las alteraciones del metabolismo de lipoproteínas presentes en la HFC, caracterizadas por una sobreproducción hepática de lipoproteínas y aumento de la concentración de ácidos grasos libres, se asocian con el desarrollo de hígado graso no alcohólico. De Bruin y colaboradores reportaron la presencia de esteatosis hepática no alcohólica diagnosticada por ultrasonido en 76% de 17 individuos con HFC en comparación con 10% (80/792) en un grupo de controles (21).

Genes asociados con HFC

Se ha sugerido que tanto factores genéticos como ambientales están implicados con la presencia de HFC y afectan el fenotipo de lipoproteínas en los individuos con esta dislipidemia. Inicialmente se consideró a la HFC como una enfermedad autosómica dominante, sin embargo, la evidencia actual señala que es una enfermedad oligogénica. Es probable que un número pequeño de genes contribuyan al desarrollo y fenotipo de lipoproteínas observado en la HFC. A continuación se mencionan algunas de las regiones cromosómicas que se han asociado con la HFC.

Cromosoma 1q21 (gen USF1)

Inicialmente en familias finlandesas se identificó un locus asociado con la presencia de HFC en el cromosoma 1q21-23 (22). Esta región codifica el factor de transcripción corriente arriba 1 (USF1). La asociación entre las variantes del gen que codifica para USF1 e HFC se ha replicado en otras poblaciones con HFC incluyendo familias chinas, alemanas, estadounidenses y mexicanas (23-25).

En 60 familias finlandesas con 721 individuos genotipificados se encontró una asociación fuerte en los hombres entre las variantes en el USF1 y niveles de triglicéridos. Además, se encontró asociación entre este locus y niveles de apo B, colesterol total y el tamaño de las partículas LDL (26). En 24 familias mexicanas se replicó esta asociación (25). En familias de Utah con muerte prematura debido a enfermedad cardiovascular, los polimorfismos de nucleótido único (SNP) del USF1 fueron asociados con la presencia de HFC, niveles de triglicéridos y de colesterol-LDL (27).

El USF1 es un factor de transcripción ampliamente expresado que forma homo y heterodímeros (con USF2) y reconoce un motivo CACGTG llamado caja E, lo cual resulta en la activación de la transcripción genética y aumento de la expresión de genes en respuesta a varios estímulos como glucosa e hidratos de carbono de la dieta (28). El USF1 regula la expresión de muchos genes que participan en el metabolismo de glucosa y lípidos como lo son el gen para apolipoproteína C-III (APOC3), apolipoproteína A2 (APOA2), apolipoproteína A-V (APOA5), apolipoproteína E (APOE), lipasa hormono sensible, sintasa de ácidos grasos, acetil CoA carboxilasa, renina, angiotensinógeno, receptor de glucagon, lipasa hepática y glucocinasa, entre otros (29). Los SNPs en el gen USF1 también han sido asociados con mayor riesgo de eventos cardiovasculares (30) y de diabetes mellitus tipo 2 (31).

En un modelo de ratón denominado HcB-19, que presenta un patrón de lípidos semejante al de la HFC (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y elevación de apolipoproteína B), se detectó una

mutación en el cromosoma 3, región que tiene sintenia (conservación del orden genético) con el cromosoma 1q21-q23 humano (32).

Conglomerado de genes APOA1/C3/A4/A5

Algunos estudios han destacado la importancia del conglomerado de genes APOA1/C3/A4 localizado en el cromosoma 11 como regulador de la concentración de triglicéridos, colesterol LDL y niveles de apo C-III. Existen diversos estudios que han confirmado su influencia en el fenotipo de lipoproteínas en individuos con HFC (33-36). Entre ellos destaca un estudio en familias holandesas con HFC en el cual el alelo de riesgo de un polimorfismo en este complejo se asoció con elevación de colesterol total, triglicéridos, colesterol-LDL, apo B y apo C-III, sin embargo, este hallazgo no fue replicado en familias finlandesas (37, 38).

Apo A-V reduce los niveles de triglicéridos inhibiendo la lipidación de apo B y de este modo reduce la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y estimula la eliminación de lipoproteínas ricas en triglicéridos mediante la acción de la LPL (39). El gen APOA5 ha sido agregado al complejo APOA1/C3/A4 (40) y las variantes de este conglomerado se han asociado con niveles elevados de triglicéridos en individuos con HFC (41, 42). En familias holandesas, APOA1/C3/A4/A5 mostró asociación con los niveles de triglicéridos y el tamaño de las partículas de colesterol LDL. La asociación más fuerte fue con los SNPs en APOA1 y APOA5 (42). Ribalta y colaboradores también asociaron un SNP del gen APOA5 con hipertrigliceridemia en individuos con HFC (43).

Genes de la lipasa lipoproteica y lipasa hepática

La LPL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de las VLDL y quilomicrones liberando ácidos grasos a los tejidos. Nevin y colaboradores identificaron variantes en el gen de la LPL en 6 de 20 pacientes con HFC (44). En forma semejante, Reymer y colaboradores describieron variantes en el gen de la LPL en pacientes con HFC y observaron una asociación entre los niveles de colesterol HDL y la actividad catalítica de la LPL (45). Estas variantes han sido asociadas con menores niveles de colesterol-HDL, concentración elevada de triglicéridos, apo B e insulina en pacientes con HFC en diversos estudios (46, 47). Además, Yang y colaboradores reportaron una variante en el promotor de la LPL en individuos con HFC asociada con disminución de la transcripción del gen (48, 49). Sin embargo, este no parece ser un hallazgo universal en individuos con HFC y otros estudios no han confirmado la asociación de las variantes en el gen la LPL con la presencia de HFC (50, 51).

El locus de la lipasa hepática se encontró asociado con elevación del colesterol total y apo B en familias holandesas con HFC (52). Este hallazgo no fue confirmado en familias finlandesas (50).

Gen HNF4A (factor nuclear de hepatocitos 4 alfa)

HNF4A es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y de lípidos. La región que lo codifica (20q12-q13) contiene el gen

involucrado en una de las variantes de la antes llamada diabetes MODY (maturity onset diabetes of the young). Este mismo gen se ha asociado con elevación de niveles de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL en familias con HFC (53, 54). En familias mexicanas y finlandesas las variantes del gen HNF4A fueron asociadas con elevación de los niveles de lípidos, síndrome metabólico y elevación de glucosa (55).

Los estudios de los genes candidatos y la evidencia obtenida de los mismos indican que las variaciones en la secuencia del DNA de los genes USF1, LPL, el conglomerado APOA1/C3/A4/A5 y el HNF4A confieren susceptibilidad para HFC. Sin embargo, ninguno de los genes candidatos investigados hasta ahora puede ser considerado como un componente genético único involucrado en el desarrollo de HFC.

Existen estudios epidemiológicos que han señalado que la población mexicana tiene predisposición a HFC y enfermedad coronaria prematura (56, 57), sin embargo, se conoce poco de los factores genéticos que pueden contribuir a esta mayor susceptibilidad.

En un estudio reciente se identificaron dos polimorfismos asociados con niveles de apo B en familias mexicanas con HFC. En este estudio se incluyeron 52 familias mexicanas (n= 567) reclutadas en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se realizó una búsqueda de asociación entre SNP con los niveles de apo B. Se analizaron 130 SNP en las regiones que resultaron asociadas con la concentración de apo B y se encontraron asociaciones significativas (después de ajustar por el número de pruebas realizadas) con dos SNPs: rs1424032 ($P= 6.07 \times 10^{-6}$) y rs1349411 ($P= 2.72 \times 10^{-4}$). Esta asociación fue replicada en 1446 individuos mexicanos con hipertrigliceridemia (triglicéridos > 200 mg/dl) y sin hipertrigliceridemia (triglicéridos < 150 mg/dl). Los mismos alelos de riesgo que los encontrados en las familias con HFC fueron asociados con los niveles de apo B en individuos no relacionados. En el caso del SNP rs1424032, el efecto en los niveles de apo B fue significativo después de ajustar para relación familiar, edad y género (58). La variante G del rs1424032, asociada con menores niveles de apo B y se encontró en el 26% de los individuos con HFC y en el 25% de la muestra de individuos con y sin hipertrigliceridemia.

El rs1424032 está localizado en el cromosoma 16q21. La región cercana (± 500 kb) no codifica algún gen conocido. Esta región está altamente conservada entre especies y se presume que pudiera funcionar como un elemento regulatorio. Además, ha sido asociada en estudios de ligamiento con la presencia de HFC y con niveles de colesterol-HDL. En un estudio realizado por Pajukanta y colaboradores en familias con HFC de origen finlandés y holandés identificaron que la región cromosómica 16q24.1 está asociada con niveles bajos de colesterol-HDL. Esta misma región se asoció con niveles de colesterol HDL en México-americanos (25, 59-61).

Definición del problema

La hiperlipidemia familiar combinada es una entidad oligogénica. Estudios de asociación para distintos genes candidatos han permitido identificar al menos 3 genes (USF1, APOA1/C3/A4/A5 y HNF4A) implicados en el desarrollo de esta patología en individuos de la población mestiza mexicana. La asociación entre las alteraciones genéticas y las alteraciones metabólicas que caracterizan a la HFC continúa en estudio.

Recientemente un estudio de ligamiento al genoma completo asoció a las variantes en el polimorfismo de nucleótido único rs1424032, en el cromosoma 16q21, con los niveles de apo B, tanto en familias con HFC como en sujetos no relacionados con y sin hipertrigliceridemia de la población mexicana. La variante rara (G), encontrada en el 26% de los individuos con HFC y en el 25% de la muestra de casos y controles, se asoció con menor concentración de apo B.

El efecto funcional de las diferentes variantes del polimorfismo en el metabolismo de lípidos o algún otro en desequilibrio de ligamiento y su asociación con un patrón fenotípico específico se desconoce.

Justificación

La hiperlipidemia familiar combinada es la dislipidemia primaria más común en México. Esta patología está asociada con riesgo incrementado de enfermedad coronaria y la mortalidad por enfermedad cardiovascular reportada se estima en 18% a 10 años.

Las variantes del polimorfismo rs1424032 recientemente fueron asociadas con los niveles de apolipoproteína B en individuos mexicanos con HFC. La variante G de este polimorfismo se asoció con niveles menores de apolipoproteína B. Este hallazgo fue replicado en individuos con y sin hipertrigliceridemia. La región en donde se localiza este polimorfismo no codifica ninguna proteína y se desconoce el papel funcional de las variantes.

El estudio de las concentraciones de lípidos, glucosa e insulina en estado basal y post-prandial en individuos mexicanos con HFC con las diferentes variantes del polimorfismo rs1424032 pretende identificar si las variantes del polimorfismo tienen un efecto funcional.

Los resultados de este estudio contribuirán a la identificación de mecanismos fisiopatológicos involucrados en la hiperlipidemia familiar combinada.

Pregunta de investigación

¿Existen diferencias en las concentraciones de lípidos en el estado basal y después de una carga de alimento mixto en individuos con HFC con las diferentes variantes (G y A) del polimorfismo de nucleótido único rs1424032?

Hipótesis

Los individuos con HFC con la variante G del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 tendrán concentraciones diferentes de lípidos en el estado basal y después de una carga de alimento mixto en comparación con individuos con la variante A.

Objetivo primario

Comparar la concentración de lípidos en el estado basal y después de una carga de alimento mixto en individuos con HFC con las diferentes variantes (A y G) del polimorfismo de nucleótido único rs1424032.

Objetivos específicos

1. Comparar en individuos con las diferentes variantes (A y G) del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 las concentraciones en el estado basal y después de una carga de alimento mixto de:
 - a. Colesterol total
 - b. Triglicéridos
 - c. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)
 - d. Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
 - e. Apolipoproteína B
 - f. Apolipoproteína B-48
 - g. Apolipoproteína A-V

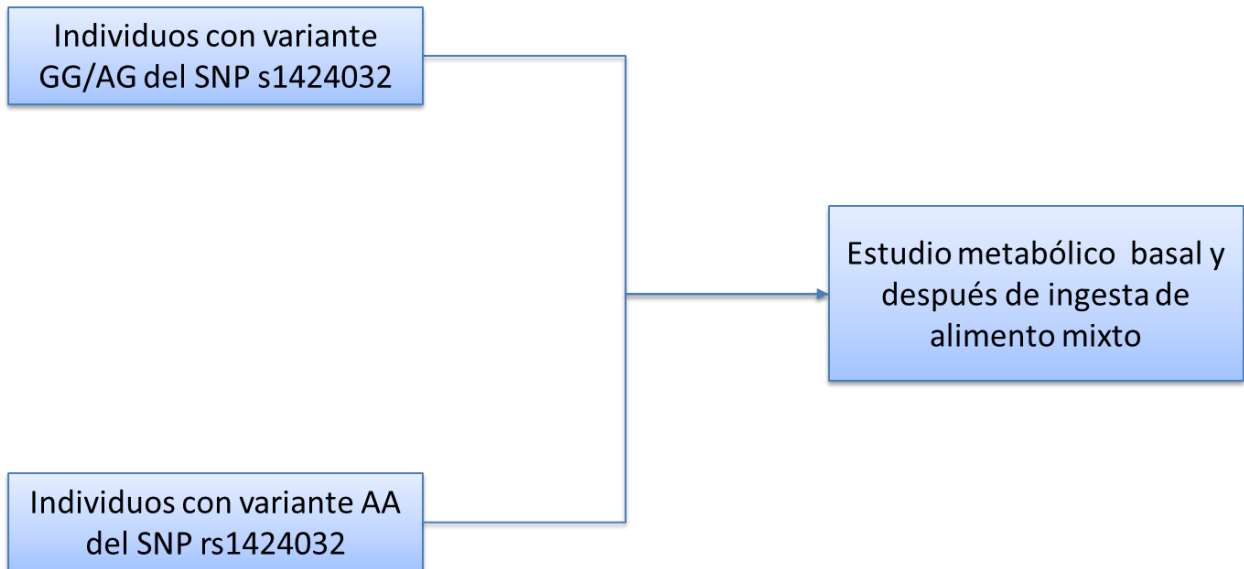
Objetivos secundarios

1. Comparar la concentración de glucosa en el estado basal y después de una carga de alimento mixto en individuos con HFC con la variante A del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 con individuos con la variante G.
2. Comparar la concentración de insulina en el estado basal y después de una carga de alimento mixto en individuos con HFC con la variante A del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 con individuos con la variante G.
3. Comparar la concentración de leptina en el estado basal en individuos con HFC con la variante A del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 con individuos con la variante G.
4. Comparar la concentración de adiponectina en el estado basal en individuos con HFC con la variante A del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 con individuos con la variante G.
5. Describir la prevalencia de síndrome metabólico en los individuos con HFC.
6. Describir la prevalencia de resistencia a la insulina en los individuos con HFC.

Pacientes y Métodos

Diseño del estudio

Estudio experimental, transversal y comparativo.



Población de estudio

La población de estudio estará formada por individuos mexicanos con diagnóstico de HFC con las variantes A y G del SNP rs1424032. Se definió como mestizos mexicanos a individuos con padres y abuelos nacidos en México. Se cuenta con al menos 52 familias (n= 567) genotipificadas de la Clínica de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) que fueron invitados a participar en el estudio. Se realizó genotipificación en el departamento de Medicina Genómica del INCMNSZ de los individuos en quienes no se contaba con esta información.

El proyecto fue registrado, evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Anexo 1).

Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres mestizos mexicanos
- Mayores de 18 años
- Con diagnóstico de HFC:
 - Elevación de triglicéridos \geq a 200 mg/dl y/o
 - Elevación de colesterol total \geq a 240 mg/dl
 - Elevación de apolipoproteína B \geq a la percentila 90 (108 mg/dl en hombres y 99 mg/dl en mujeres)

- Por lo menos un familiar de primer grado con fenotipo de colesterol total ≥ 240 mg/dl o triglicéridos ≥ 200 mg/dl

Criterios de exclusión

1. Enfermedad coronaria
2. Diabetes mellitus
3. Insuficiencia hepática
4. Insuficiencia renal
5. Disfunción tiroidea no controlada
6. Enfermedades crónicas o debilitantes con mal pronóstico a corto plazo (VIH, cáncer)
7. Consumo de más de 2 raciones de alcohol por día
8. Índice de masa corporal mayor o igual a 40 kg/m^2
9. Hospitalización o enfermedad grave 2 meses previos a la evaluación
10. Nivel basal de triglicéridos mayor a 600 mg/dl
11. Enfermedad aguda en las seis semanas previas
12. Uso de estatinas o fibratos
13. Embarazo o lactancia
14. Atletas de alto rendimiento

Tamaño de muestra

Se calculó el tamaño de muestra requerido tomando en consideración la comparación de promedios en dos grupos. En este caso la variable considerada fue el área bajo la curva incremental de triglicéridos como indicador de lipemia postprandial. Se consideró una hipótesis a dos colas. El promedio y desviación estándar del área bajo la curva incremental de triglicéridos consideradas en cada uno de los grupos fueron de 604.96 ± 324.18 mg/dl/h y 296.72 ± 339.23 , respectivamente. Estos datos fueron tomados de un estudio que incluyó individuos con enfermedad coronaria y controles a quienes se les realizó una prueba con alimento mixto (62). Se consideró un valor de $Z_{\alpha} = 1.96$, correspondiente a un error α de 0.05 y un valor de $Z_{\beta} = 1.65$, correspondiente a un valor de β de 0.10 (poder de 90%).

Para el cálculo del número de sujetos se utilizó la siguiente fórmula:

$$n_1 = \left(\sigma_1^2 + \sigma_2^2 k \right) \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

De acuerdo a esta fórmula se requiere un tamaño de muestra de 30 individuos por grupo.

Variables

Variable	Tipo	Metodología para medición	Unidades
Colesterol total	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman	mg/dl

		Synchron CX® (Anexo 2)	
Triglicéridos	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 3)	mg/dl
Colesterol de alta densidad (c-HDL)	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 4)	mg/dl
Colesterol de baja densidad (c-LDL)	Dimensional	Estimado con la fórmula de Friedewald (63) LDL = colesterol total – (colesterol HDL + triglicéridos/5)	mg/dl
Glucosa	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 5)	mg/dl
Aspartato aminotransferasa (AST)	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 6)	U/L
Alanina aminotransferasa (ALT)	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 7)	U/L
Gama glutamiltransferasa (GGT)	Dimensional	Ensayo automatizado enzimático Beckman Synchron CX® (Anexo 8)	U/L
Insulina	Dimensional	Enzimoinmunoanálisis de micropartículas (MEIA) AxSYM System Abbot® (Anexo 9)	μU/ml
Apolipoproteína B-48	Dimensional	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Anexo 10)	μU/ml
Apolipoproteína B	Dimensional	Nefelometría cinética Immage® (Anexo 11)	mg/dl
Apolipoproteína C-III	Dimensional	Milliplex Map Millipore® (Anexo 12)	mg/dl
Apolipoproteína A-V	Dimensional	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	ng/ml
Adiponectina	Dimensional	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Anexo 13)	μU/ml

Leptina	Dimensional	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Anexo 14)	ng/ml
Variante del SNP rs1424032	Categórica: - AA - GG - AG	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT) con uso de sondas Taqman (Anexo 15)	-
Peso	Dimensional	Báscula calibrada	Kilogramos
Circunferencia de cintura	Dimensional	Cinta métrica (Anexo 16)	Centímetros
Circunferencia de cadera	Dimensional	Cinta métrica (Anexo 16)	Centímetros
Estatura	Dimensional	Estadiómetro	Centímetros
Presión arterial	Dimensional	Esfigmomanómetro	Milímetros de mercurio
Tabaquismo	Categórica: - Nunca - Pasado - Actual	Interrogatorio	-
Consumo de alcohol	Categórica - No - Si	Interrogatorio	-
Actividad física	Categórica: - No - Si	Interrogatorio	-

Procedimientos

A cada sujeto se le proporcionó un consentimiento informado por escrito (Anexo 17), después de la firma del mismo se realizó historia clínica y exploración física incluyendo antropometría.

Prueba con alimento mixto

Los participantes asistieron con 12 horas de ayuno para realizar una prueba estandarizada con alimento mixto. Se les proporcionó un desayuno que consistió en una hamburguesa cuarto de libra con queso con una cucharada de mayonesa (5 gramos), papas a la francesa (71 gramos) y una taza de leche (250 ml). El contenido energético del desayuno es de 946 kilocalorías y contiene 75 gramos de hidratos de carbono (31% del valor energético total VET), 40 gramos de proteína (17% del VET) y 51 gramos de grasa (32% del VET).

Composición del alimento mixto								
	Tamaño	Kcal	Grasa (g)	Proteína (g)	H de C (g)	Kcal de grasa	Kcal de proteína	Kcal de H de C
Cuarto de	198 g	510	26	29	40	234	116	160

libra con queso								
Papas a la francesa pequeñas	71 g	230	11	3	23	99	12	92
Leche	250 ml	155.5	8.5	7.75	12	76.5	31	48
Cucharada de mayonesa	5 g	50.4	5.55	0.05	0.05	49.95	0.2	0.2
Total		945.9	51.0	39.8	75.05	459.45	159.2	300.2
Distribución (%)						48.57	16.83	31.74

Se canalizó una vena del antebrazo y se colocó un catéter para la obtención de sangre venosa a las 0, 3, 4, 5, 6 y 8 horas (volumen total de sangre 180 ml).

La sangre se recolectó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las muestras se mantuvieron en hielo y se centrifugaron a 3000 rpm, a temperatura de -4°C durante 20 minutos para la separación del plasma. En estas muestras se determinó la concentración de glucosa, insulina, colesterol total, triglicéridos, colesterol de HDL y colesterol de LDL. En las muestras basales se realizó medición de adiponectina y leptina.

Las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL se determinaron inmediatamente. Se almacenaron alícuotas a -70°C para la medición del resto de las variables.

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio del Departamento de Endocrinología y Metabolismo del INCMNSZ. El laboratorio está certificado por el Programa Externo de Evaluación Comparativa de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos.

Se envió una alícuota a un laboratorio en Finlandia con el cual se tiene una colaboración para la determinación de apo B-48, apo C-III y apo A-V.

Para estimar la sensibilidad a la insulina se calculó el índice HOMA (homeostasis model assessment) con la fórmula glucosa en ayuno (en mg/dl) x insulina en ayuno (en μ U/ml) /405.

Análisis estadístico

Las variables se expresan como media y desviación estándar, mediana e intervalo intercuartilar, proporciones o porcentajes; según sea apropiado. Para evaluar si la distribución de las variables fue normal se utilizó la prueba de Kolmogorov Smirnov. Para estimar las diferencias en las características basales entre los grupos con las diferentes variantes del SNP (A y G) se realizó prueba T de Student o U de Mann-Whitney (según fuera apropiado de acuerdo a la distribución). Para estimar el efecto del alimento en las concentraciones post-prandiales de lipoproteínas y de las variantes del SNP (A y G) se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para muestras repetidas ajustando por el índice cintura/cadera, el cual fue diferente entre los individuos con las diferentes variantes del SNP. Se calculó el área bajo la curva (AUC) total durante 8 horas después de la ingesta de alimento mixto y AUC incremental (restando el valor inicial) con el método trapezoide

utilizando el programa Excel y se compararon en los individuos con las diferentes variantes del SNP con prueba U de Mann-Whitney. Se realizaron correlaciones bivariadas utilizando coeficiente de correlación de Spearman. Se realizaron modelos de regresión lineal por pasos sucesivos para identificar las variables predictoras en forma independiente del AUC total e incremental de triglicéridos y de apo B-48 como indicadores de lipemia post-prandial. En el primer modelo la variable dependiente fue el AUC total de triglicéridos y las variables independientes incluidas fueron: concentración basal de triglicéridos, índice de masa corporal, variantes del SNP rs1424032, AUC total de glucosa, concentración basal de insulina, AUC total de insulina y HOMA. En el segundo modelo la variable independiente fue el AUC incremental de triglicéridos y como variables independientes se incluyeron: concentración basal de triglicéridos, índice de masa corporal, variante del SNP rs1424032, concentración basal de insulina, AUC incremental de insulina y HOMA. En el tercer modelo de regresión la variable dependiente fue el AUC total de apo B-48 y las variables independientes incluidas fueron el índice cintura/cadera, el AUC total de glucosa, el AUC total de insulina, la concentración de triglicéridos basal, el AUC total de triglicéridos, la concentración basal de apo B-48 y las variantes del SNP rs1424032. Finalmente, en el cuarto modelo la variable dependiente fue el AUC incremental de apo B-48 y como variables independientes el índice cintura/cadera, la concentración basal de insulina, el AUC incremental de insulina, la concentración basal de triglicéridos, el AUC incremental de triglicéridos, el AUC incremental de HDL y las variantes del SNP rs1424032.

Se consideró un valor de P con significancia estadística menor a 0.05. Se utilizó el programa SPSS versión 19.0 para la realización del análisis.

Resultados

Características basales

Aceptaron participar en el estudio 109 individuos de los cuales 6 fueron excluidos, 5 por no cumplir con los criterios para el diagnóstico de HFC y uno por diagnóstico de diabetes (glucosa en ayuno >126 mg/dl). De los 103 individuos incluidos 58 tuvieron la variante AA del SNP rs1424032 y 45 la variante GG o AG.

Las características antropométricas y bioquímicas basales de los sujetos con las diferentes variantes del SNP fueron semejantes, a excepción del índice cintura/cadera que fue mayor en los individuos con la variante AA.

Características basales de la población estudiada			
Variable	AA (n=58)	GG/AG (n=45)	P
Hombres/mujeres	22/36	13/32	0.337
Edad (años)	45.5±13.5	45.4±13.5	0.983
Peso (kg)	72.0±11.9	77.5±12.4	0.551
IMC (kg/m ²)	28.2±4.2	27.5±3.9	0.399
Cintura (cm)	91.2±10.0	87.2±10.8	0.052
Cintura/cadera	0.89±0.06	0.86±0.06	0.027
Presión arterial sistólica (mmHg)	119.5 [110.0-121.0]	120.0 [110.0-125.0]	0.954
Presión arterial diastólica (mmHg)	80.0 [70.0-82.5]	80.0 [70.0-80.0]	0.800
Tabaquismo actual/previo/nunca	15/3/39	18/1/26	0.287
Consumo de alcohol si/no	21/35	23/20	0.113
Actividad física si/no	16/32	17/22	0.327
Glucosa (mg/dl)	98.4±10.1	103.3±18.6	0.117
Insulina (μU/ml)	9.6 [7.2-14.4]	9.5 [5.7-12.1]	0.264
HOMA	2.3 [1.6-3.5]	2.4 [1.4-3.1]	0.458
Triglicéridos (mg/dl)	215.5 [145.0-335.0]	192.0 [131.0-312.0]	0.692
Colesterol total (mg/dl)	219.1±35.3	225.1±42.3	0.438
Colesterol HDL (mg/dl)	42.8±11.2	45.4±10.6	0.237
Colesterol LDL (mg/dl)	N=33 132.6±21.2	N=32 136.4±33.9	0.597
Apo B (mg/dl)	111.0 [98.5-129.0]	121.0 [96.8-134.0]	0.530
Apo B-48 (μg/ml)	5.6 [3.7-8.9]	5.6 [3.6-8.2]	0.868
Apo A-V (ng/ml)	N=26 359.5 [295.4-397.6]	N=18 298.3 [264.1-374.4]	0.489
Apo C-III (mg/dl)	N=9 156.8 [83.3-184.7]	N=5 96.2 [95.0-111.0]	0.205
Aspartato aminotransferasa (U/l)	26.0 [23.0-32.0]	27.0 [23.0-32.0]	0.890
Alanino aminotransferasa (U/l)	23.0 [18.0-37.0]	25.0 [17.0-34.0]	0.819

Gama glutamiltransferasa (U/l)	20.0 [15.0-35.0]	17.0 [25.0-37.0]	0.386
Leptina (ng/ml)	16.5 [8.9-31.0]	14.0 [6.7-21.3]	0.285
Adiponectina (µgdl)	8.6 [5.9-11.4]	8.6 [6.3-11.5]	0.756

IMC: índice de masa corporal (peso/talla²), HOMA: homeostasis model assessment (glucosa en ayuno en mg/dl x insulina en ayuno en µU/ml/405)

Parámetros post-prandiales

No se encontró efecto en las concentraciones de colesterol total de la ingesta de alimento mixto, del índice cintura/cadera o de las variantes del SNP rs1424032.

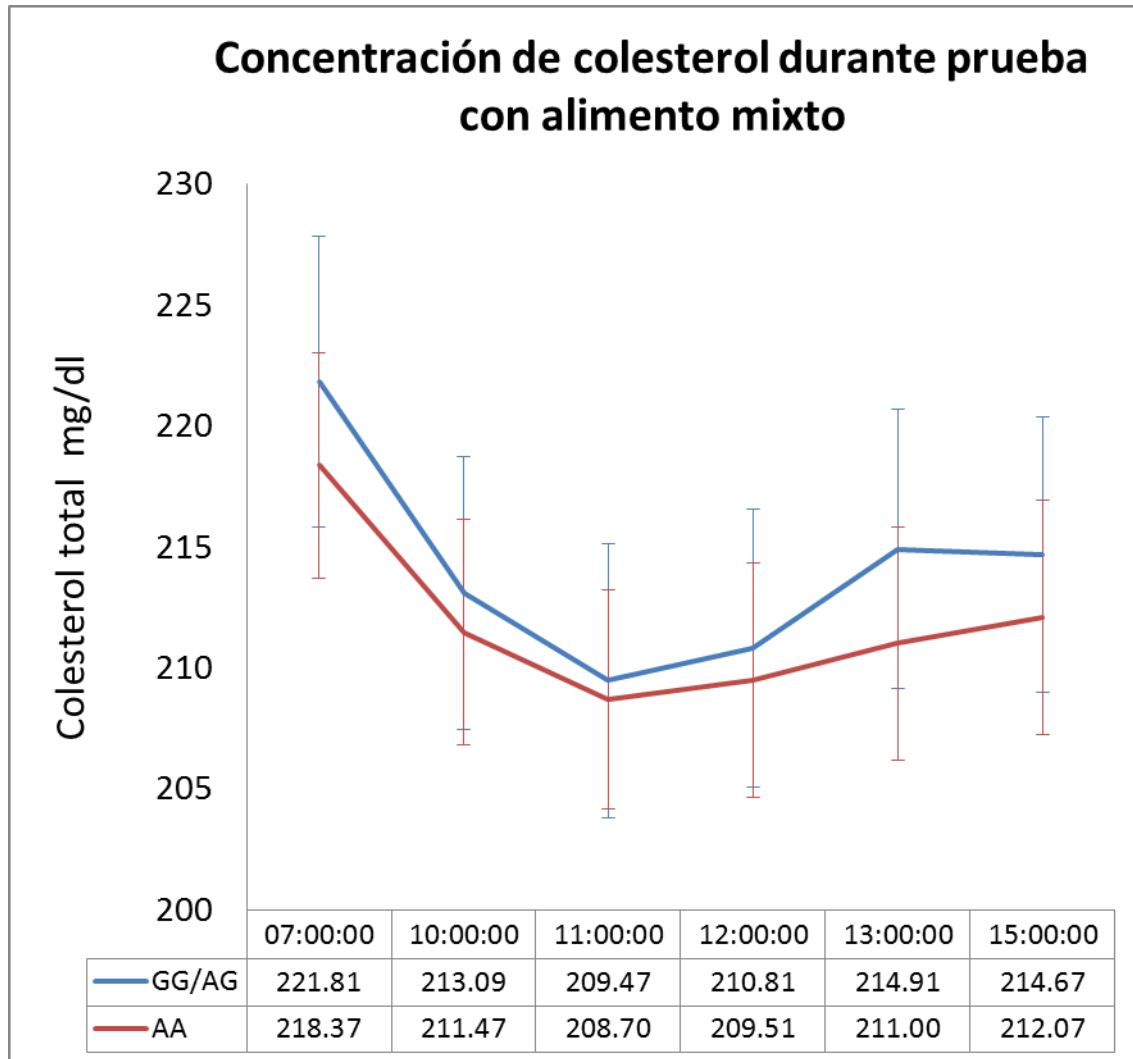


Figura 1. Concentración media \pm error estándar de la media (SEM) de colesterol total después del alimento mixto estandarizado en 103 individuos con HFC. Línea roja 58 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 45 individuos con la variante AG ó GG. P=0.110 para el efecto de la ingesta de alimento, P=0.246 para el efecto del índice cintura/cadera y P=0.683 para la interacción tiempo x variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas, ajustado para índice cintura/cadera.

No se observó un cambio significativo en las concentraciones de colesterol HDL después de la ingesta de alimento mixto, ni se identificaron efectos del índice cintura/cadera o de las variantes del SNP.

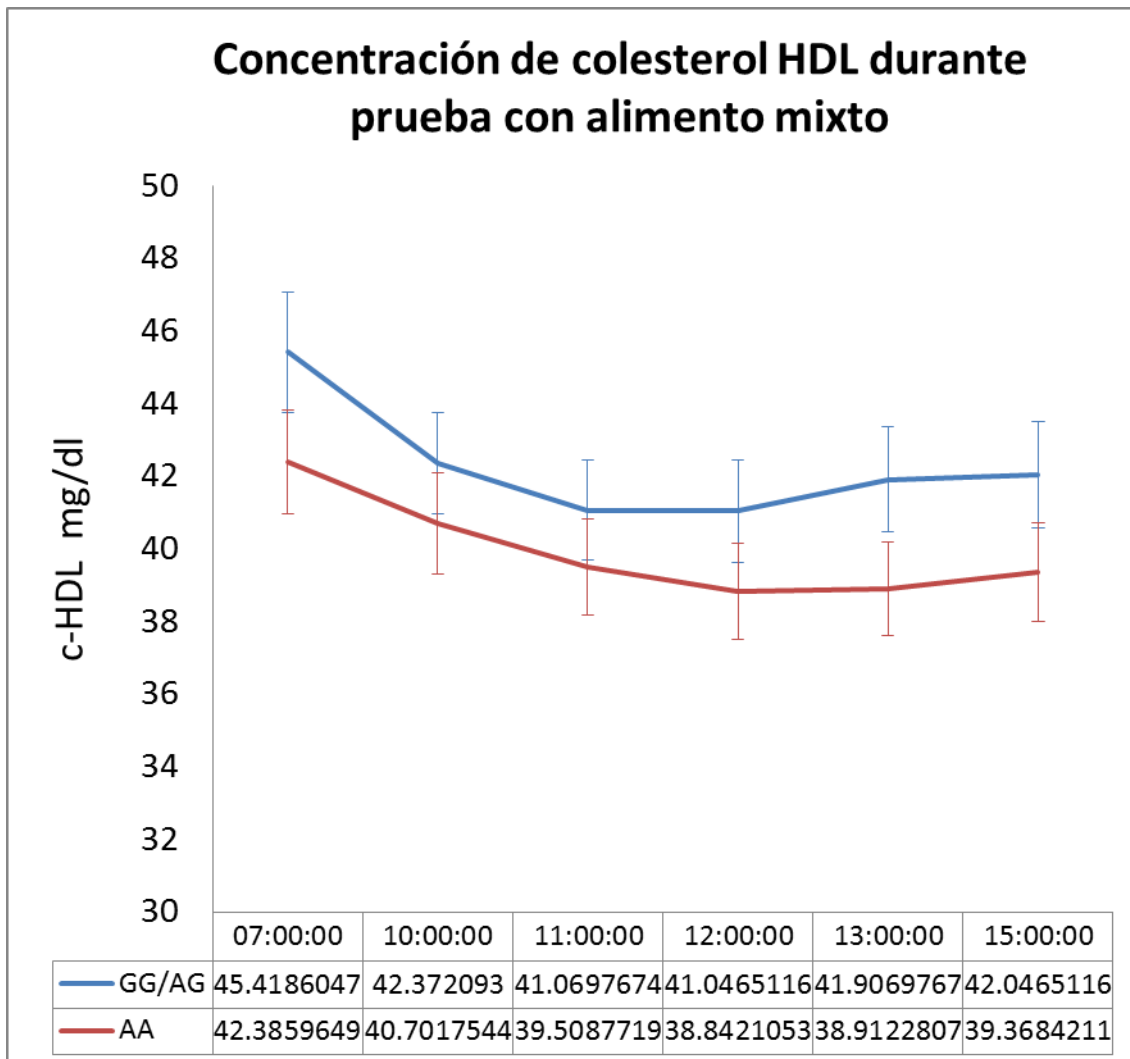


Figura 2. Concentración media \pm SEM de colesterol HDL después del alimento mixto estandarizado en 103 individuos con HFC. Línea roja 58 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 45 individuos con la variante AG ó GG. $P=0.328$ para el efecto de la ingesta del alimento, $P=0.329$ para el efecto del índice cintura/cadera y $P=0.140$ para la interacción tiempo x variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas, ajustado para índice cintura/cadera.

No se encontró cambio significativos en las concentraciones de triglicéridos después de la ingesta de alimento mixto, sin embargo hubo un efecto significativo del índice cintura/cadera y no hubo interacción con las variantes del SNP.

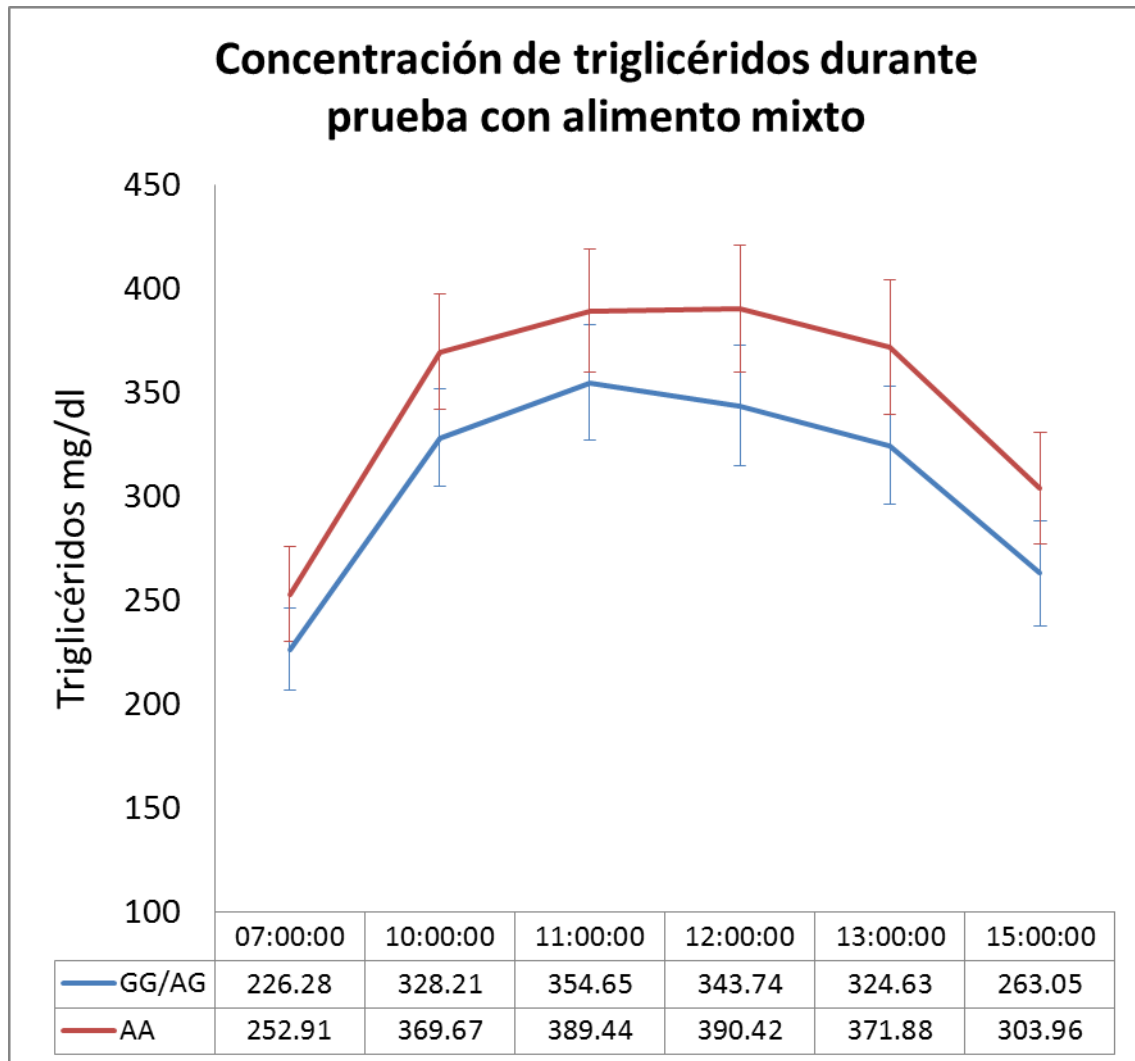


Figura 3. Concentración media \pm SEM de triglicéridos después del alimento mixto estandarizado en 103 individuos con HFC. Línea roja 58 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 45 individuos con la variante AG ó GG. $P=0.068$ para el efecto de la ingesta del alimento, $P=0.003$ para la interacción con el índice cintura/cadera y $P= 0.902$ para interacción tiempo x variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas ajustando para índice cintura/cadera.

No se demostró interacción con la ingesta del alimento mixto, ni con índice cintura/cadera o con variante del SNP rs1424032 en las concentraciones de apo B total.

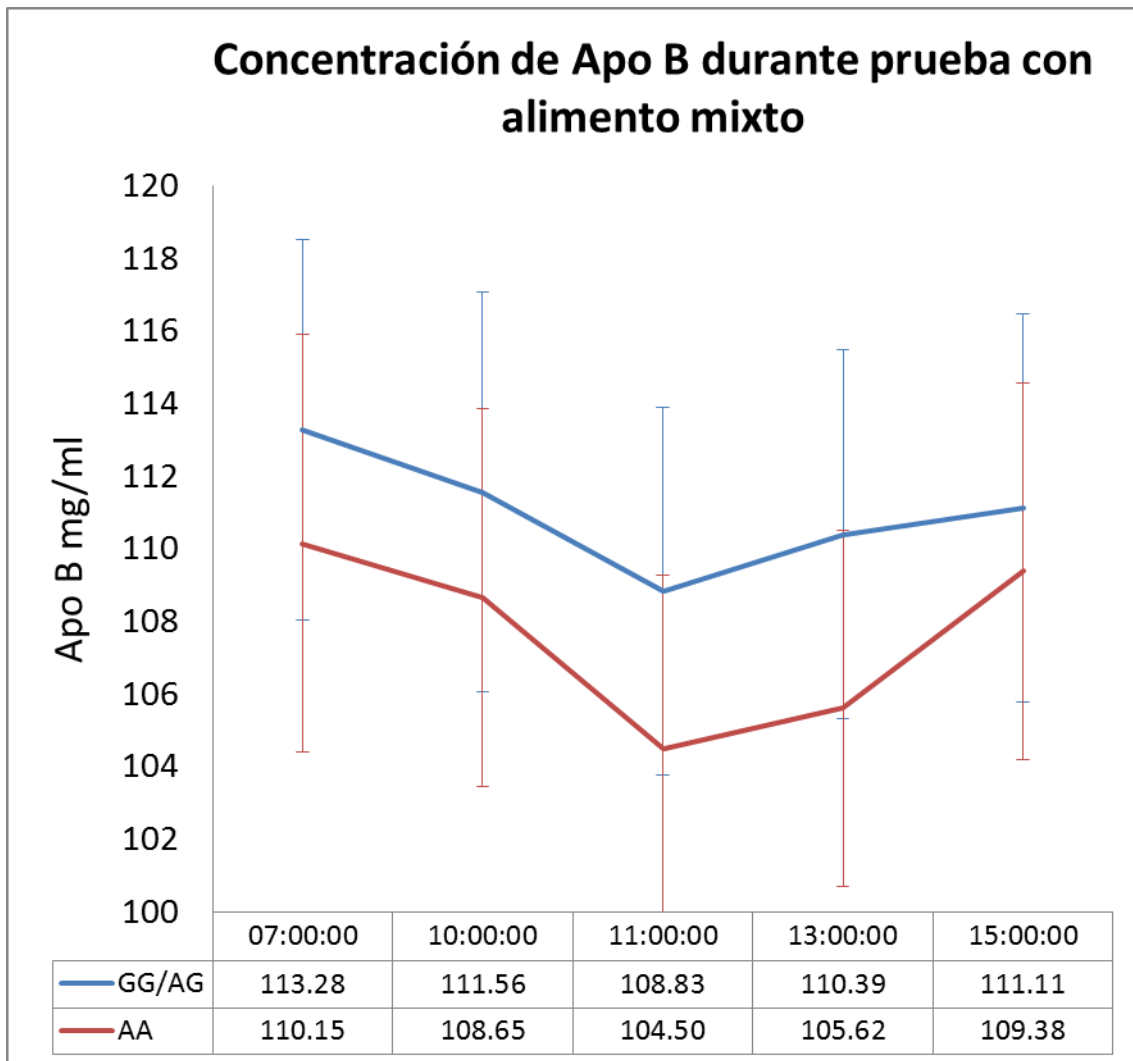


Figura 4. Concentración media \pm SEM de apo B después del alimento mixto estandarizado en 44 individuos con HFC. Línea roja 26 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 18 individuos con la variante AG ó GG. $P=0.984$ para el efecto del tiempo, $P=0.977$ para interacción con índice cintura/cadera y $P=0.584$ para interacción con la variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas ajustado para el índice cintura/cadera.

En contraste, se encontró un efecto significativo de la ingesta de alimento mixto y del índice cintura/cadera en la concentración de apo B-48 después del alimento mixto, sin encontrar un efecto de las variantes del SNP rs1424032.

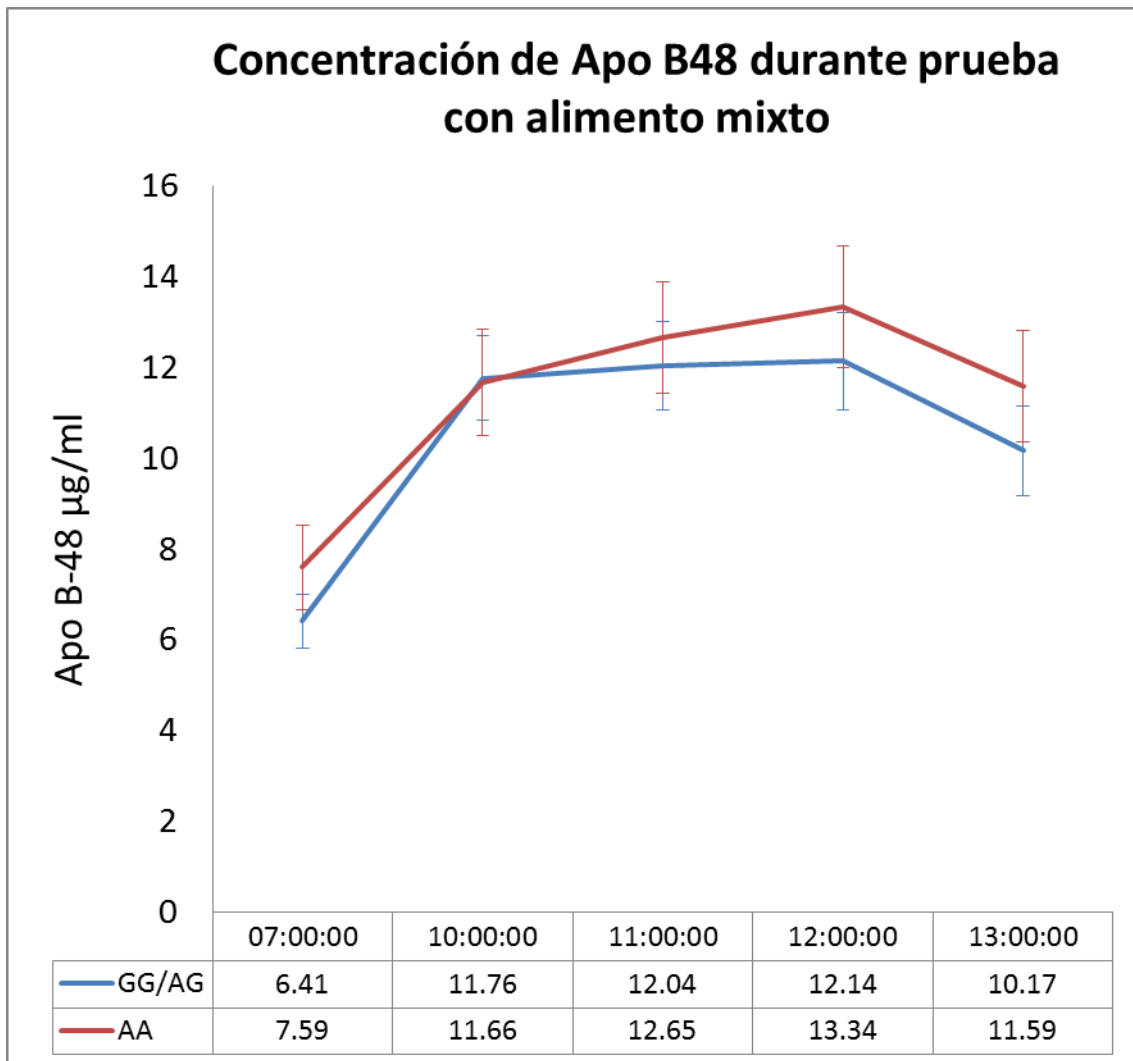


Figura 5. Concentración media \pm SEM de apo B-48 después del alimento mixto estandarizado en 93 individuos con HFC. Línea roja 54 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 39 individuos con la variante AG ó GG. **P=0.003** para el efecto del tiempo, **P<0.001** para interacción con el índice cintura/cadera y P=0.137 para la interacción con la variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas, ajustado para índice cintura/cadera.

La concentración de apo A-V no cambió significativamente después de la ingesta del alimento, sin embargo, se encontró un efecto significativo (P=0.042) del índice cintura cadera y no se encontró interacción con la variante del SNP.

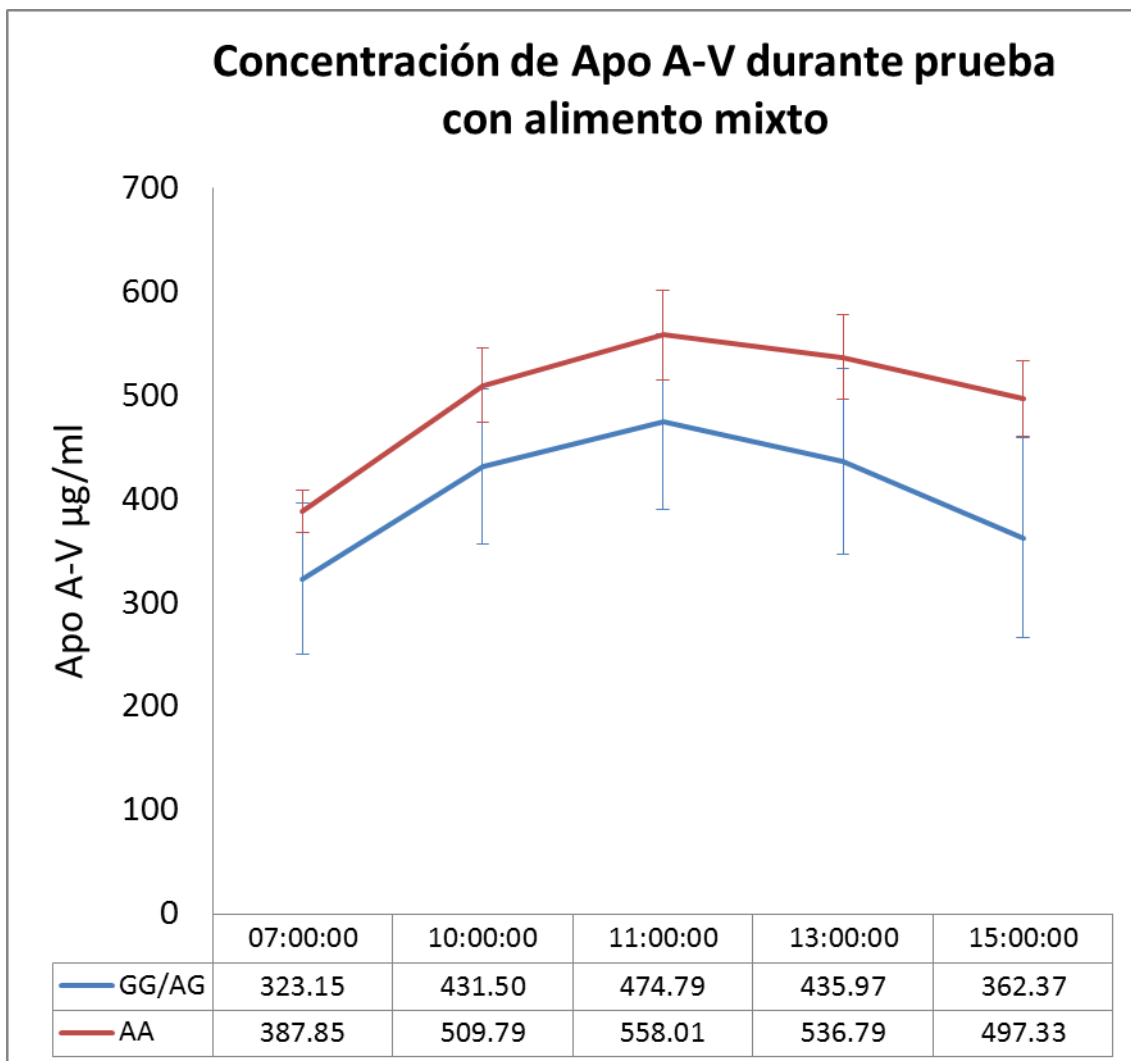


Figura 6. Concentración media \pm SEM de apo A-V después del alimento mixto estandarizado en 44 individuos con HFC. Línea roja 26 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 18 individuos con la variante AG ó GG. $P=0.118$ para el efecto del tiempo, **$P=0.042$** para la interacción con el índice cintura/cadera y $P=0.486$ para la interacción con la variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas, ajustado para índice cintura/cadera.

La concentración de glucosa cambió en forma significativa en el período de 8 horas después de la ingesta del alimento mixto y de acuerdo al índice cintura/cadera, sin encontrar un efecto de las variantes del SNP rs1424032 ($P<0.001$ para interacción con tiempo, $P<0.001$ para interacción con índice cintura/cadera y $P=0.077$ para la interacción tiempo x grupo de SNP con ANOVA para muestras repetidas ajustado para el índice cintura/cadera).

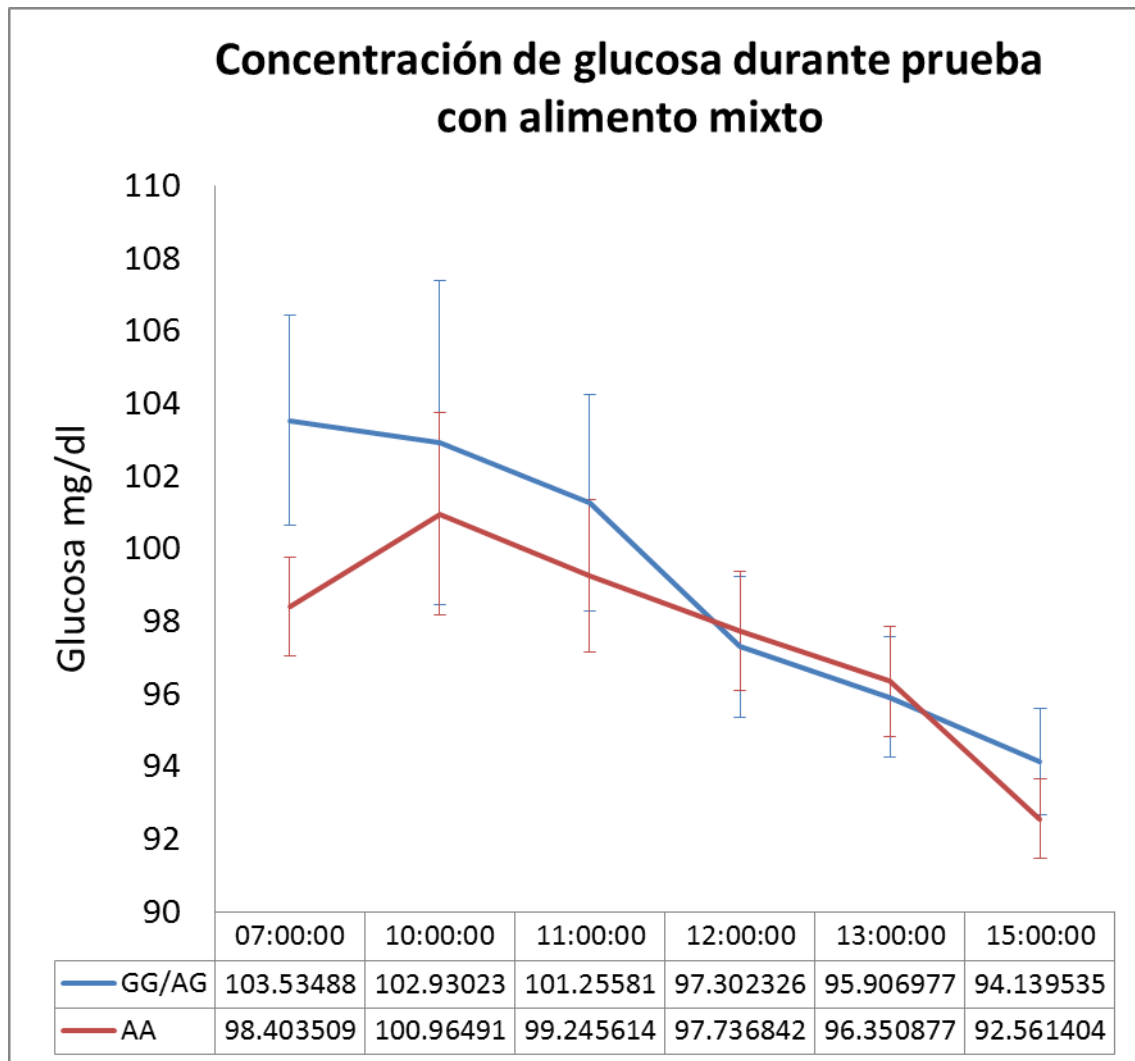


Figura 7. Concentración media \pm SEM de glucosa después del alimento mixto estandarizado en 103 individuos con HFC. Línea roja 58 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 45 individuos con la variante AG ó GG. **P<0.001** para interacción con la ingesta de alimento, **P<0.001** para la interacción con el índice cintura/cadera y P=0.077 para la interacción con la variante del SNP.

No se observaron cambios significativos en la concentración de insulina en el período de 8 horas después de la ingesta del alimento mixto, sin embargo, se encontró un efecto del índice cintura/cadera en las concentraciones de insulina, sin efecto de las diferentes variantes del SNP rs1424032 (P=0.185 para la interacción con ingesta de alimento, P=0.030 para la interacción con el índice cintura/cadera y P=0.690 para la interacción con la variante del SNP con ANOVA para muestras repetidas ajustado para índice cintura/cadera).

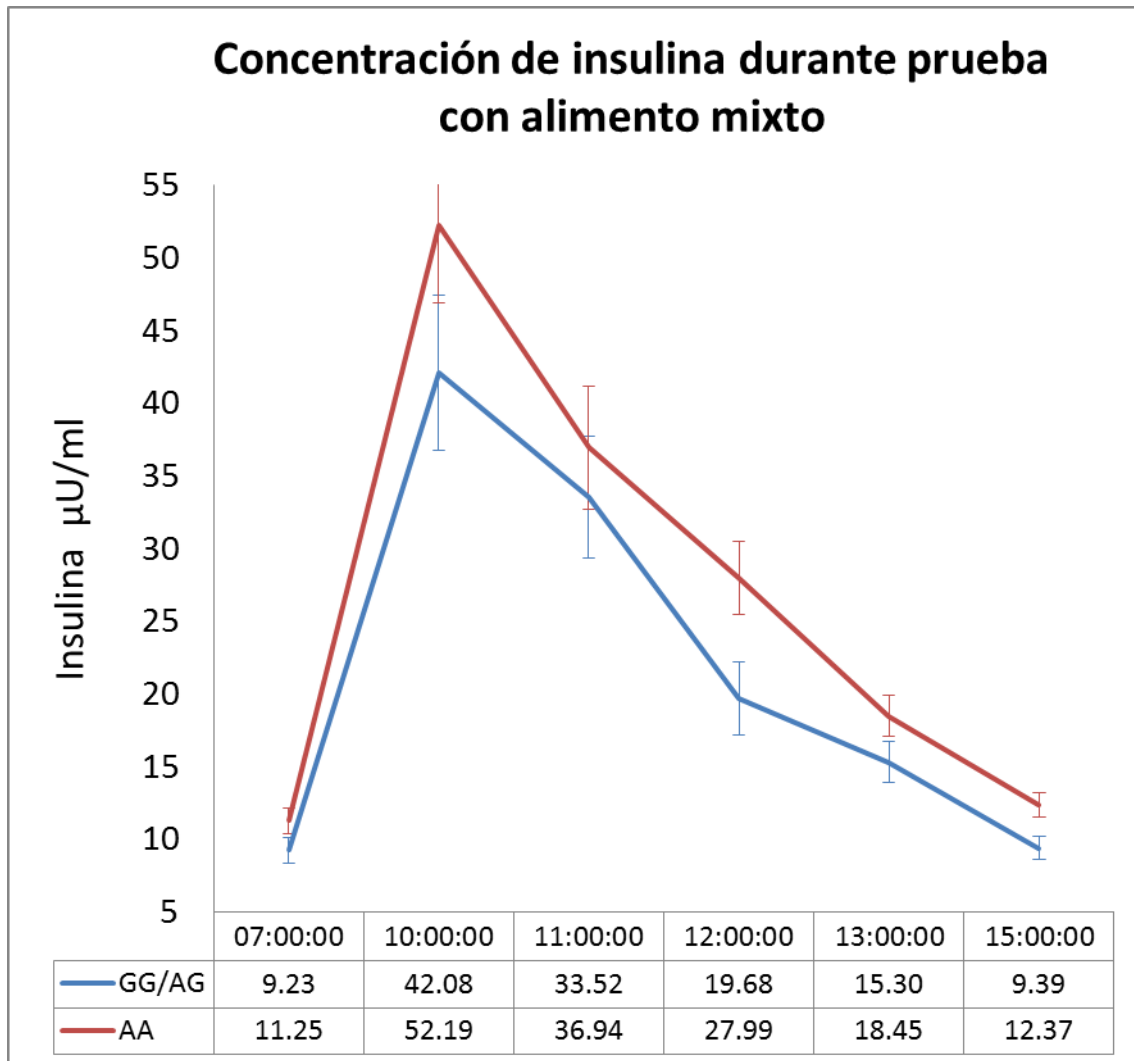


Figura 8. Concentración media \pm SEM de insulina después del alimento mixto estandarizado en 103 individuos con HFC. Línea roja 58 individuos con la variante AA del SNP rs1424032, línea azul 44 individuos con la variante AG ó GG. $P=0.185$ para la interacción con la ingesta del alimento, **$P=0.030$** para la interacción con el índice cintura/cadera y $P=0.690$ para la interacción con la variante del SNP.

Las áreas bajo la curva totales e incrementales de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, apo B, apo B-48 y apo A-V después de la ingesta del alimento mixto fueron semejantes en los individuos con la variante A y la variante G del SNP 1424032.

Área bajo la curva total e incremental durante 8 horas después de alimento mixto			
Variable	AA (n=58)	AG/GG (n=44)	P
AUC glucosa (mg/dl/h)	769.5 [733.5-841.0]	769.0 [719.0-838.0]	0.950
AUCi glucosa (mg/dl/h)	-5.5 [-58.5-33.5]	-26.5 [-60.5-12.0]	0.130

AUC insulina ($\mu\text{U/ml/h}$)	198.3 [141.4-278.5]	181.1 [115.2-234.4]	0.293
AUCi insulina ($\mu\text{U/ml/h}$)	119.2 [65.4-117.7]	100.2 [59.7-163.6]	0.388
AUC triglicéridos (mg/dl/h)	2736.5 [1643.5-3445.0]	2200 [1461.0-2954.7]	0.306
AUCi triglicéridos (mg/dl/h)	638.5 [416.5-916.0]	595.5 [283.2-978.2]	0.454
AUC colesterol total (mg/dl/h)	1680.5 [1494.0-1855.0]	1735.0 [1538.2-1899.7]	0.621
AUCi colesterol total (mg/dl/h)	-45.0 [-86.5- -1.5]	-41.0 [-103.0-13.5]	0.939
AUC colesterol HDL (mg/dl/h)	321.0 \pm 80.8	339.8 \pm 74.9	0.237
AUCi colesterol HDL (mg/dl/h)	-18.0 \pm 21.1	-23.4 \pm 3.7	0.237
AUC apo B-48 ($\mu\text{g/ml/h}$)	N=54 75.0 [47.9-104.6]	N=38 76.6 [55.0-117.3]	0.547
AUCi apo B-48 ($\mu\text{g/ml/h}$)	26.8 [11.4-40.0]	26.2 [17.8-52.2]	0.475
AUC apo B (mg/dl/h)	N=26 879.5 [727.0-1005.0]	N=18 940.7 [770.5-1025.0]	0.519
AUCi apo B (mg/dl/h)	-18.5 [-47.0-20.5]	-27.7 [-47.4- -1.5]	0.431
AUC apo AV (ng/ml/h)	N=26 3615 [2923.1-4080.1]	N=18 3010.1 [2427.0-4405.0]	0.364
AUCi apo AV (ng/ml/h)	-100.8 [-561.4-219.7]	-194.6 [-504.9-82.1]	0.793

AUC: área bajo la curva total, AUCi: área bajo la curva incremental

Análisis de regresión lineal

El área bajo la curva total de triglicéridos tuvo una correlación significativa con el índice de masa corporal, la concentración basal de triglicéridos, el área bajo la curva total de glucosa, la concentración basal de insulina, el área bajo la curva total de insulina y el HOMA.

Coeficientes de correlación de Spearman		
	AUC total de triglicéridos	P
Índice de masa corporal	0.348	<0.001
Concentración basal de triglicéridos	0.949	<0.001
AUC total de glucosa	0.305	0.002
Concentración basal de insulina	0.336	0.001
AUC total de insulina	0.314	0.001
HOMA	0.350	<0.001

En el modelo de regresión lineal por pasos sucesivos, las variables determinantes del área bajo la curva total de triglicéridos fueron la concentración basal de triglicéridos y el índice de masa corporal.

Variable	Coefficiente β	β estandarizado	t	P
Concentración basal de triglicéridos	9.085	0.936	31.459	<0.001
Índice de masa corporal	30.105	0.083	2.781	0.006

R^2 corregida= 0.915, F= 543.313, P< 0.001, variable dependiente: área bajo la curva total de triglicéridos, variables incluidas en el modelo: concentración basal de triglicéridos, índice de masa

corporal, AUC total de glucosa, concentración basal de insulina, AUC total de insulina, HOMA y variante del SNP rs1424032.

El área bajo la curva incremental de triglicéridos tuvo una correlación significativa con el índice de masa corporal, la concentración basal de triglicéridos, la concentración basal de insulina, el área bajo la curva incremental de insulina y el HOMA.

Coefficientes de correlación de Spearman		
	AUC incremental de triglicéridos	P
Índice de masa corporal	0.352	<0.001
Concentración basal de triglicéridos	0.453	<0.001
Concentración basal de insulina	0.284	0.004
AUC incremental de insulina	0.251	0.011
HOMA	0.263	0.007

En el modelo de regresión lineal por pasos sucesivos, las variables determinantes del área bajo la curva incremental de triglicéridos fueron la concentración basal de triglicéridos y el índice de masa corporal.

Variable	Coefficiente β	β estandarizado	t	P
Concentración basal de triglicéridos	1.085	0.342	3.757	<0.001
Índice de masa corporal	30.105	0.253	2.781	0.006

R^2 corregida= 0.203, F= 13.847, P< 0.001, variable dependiente: área bajo la curva incremental de triglicéridos, variables incluidas en el modelo: concentración basal de triglicéridos, índice de masa corporal, concentración basal de insulina, AUC incremental de insulina, HOMA y variante del SNP rs1424032.

El área bajo la curva total de apo B-48 tuvo una correlación significativa con el índice cintura/cadera, el área bajo la curva total de glucosa, el área bajo la curva total de insulina, la concentración basal de triglicéridos, el área bajo la curva total de triglicéridos y la concentración basal de apo B-48.

Coefficientes de correlación de Spearman		
	AUC total de apo B-48	P
Índice cintura/cadera	0.337	0.001
AUC total de glucosa	0.222	0.035
AUC total de insulina	0.254	0.015
Concentración basal de triglicéridos	0.605	<0.001
AUC total de triglicéridos	0.587	<0.001
Concentración basal de apo B-48	0.798	<0.001

En el modelo de regresión lineal por pasos sucesivos, las variables determinantes del área bajo la curva total de apo B-48 fueron la concentración basal de apo B-48, el índice cintura/cadera, la variante del SNP rs1424032 y el área bajo la curva total de insulina.

Variable	Coefficiente β	β estandarizado	t	P
Concentración basal de apo B-48	7.007	0.714	11.358	<0.001
Índice cintura/cadera	151.676	0.238	3.726	<0.001
Variante rs1424032	13.563	0.148	2.336	0.022
AUC total de insulina	0.050	0.129	2.038	0.045

R² corregida= 0.669, F= 46.448, P< 0.001, variable dependiente: área bajo la curva total de apo B-48, variables incluidas en el modelo: índice cintura/cadera, AUC total de glucosa, AUC total de insulina, concentración basal de triglicéridos, AUC total de triglicéridos, concentración basal de apo B-48 y variante del SNP rs1424032.

El área bajo la curva incremental de apo B-48 tuvo una correlación significativa con el índice cintura/cadera, la concentración basal de insulina, el área bajo la curva incremental de insulina, el área bajo la curva total de triglicéridos y el área bajo la curva incremental de HDL.

Coeficientes de correlación de Spearman		
	AUC incremental de apo B-48	P
Índice cintura/cadera	0.360	0.001
Concentración basal de insulina	0.277	0.008
AUC incremental de insulina	0.254	0.015
AUC incremental de triglicéridos	0.475	<0.001
AUC incremental de HDL	-0.263	0.012

En el modelo de regresión lineal por pasos sucesivos, las variables determinantes del área bajo la curva incremental de apo B-48 fueron el AUC incremental de triglicéridos, el índice cintura/cadera y la variante del SNP rs1424032.

Variable	Coefficiente β	β estandarizado	t	P
AUC incremental de triglicéridos	0.022	0.359	3.807	<0.001
Índice cintura/cadera	120.248	0.300	3.100	0.003
Variante rs1424032	13.222	0.229	2.412	0.018

R² corregida= 0.242, F= 10.582, P< 0.001, variable dependiente: área bajo la curva incremental de apo B-48, variables incluidas en el modelo: relación cintura/cadera, concentración basal de insulina, AUC incremental de insulina, concentración basal de triglicéridos, AUC incremental de triglicéridos, AUC incremental de HDL y variante del SNP rs1424032.

Resistencia a la insulina y síndrome metabólico

Se documentó resistencia a la insulina definida como HOMA \geq 2.5 en 49.5% de los individuos estudiados, 50% (n= 29) con la variante AA y 48.8% (n= 22) con la variante GG/AG (P= 0.911).

La prevalencia de síndrome metabólico de acuerdo a los criterios de la NCEP-ATP III en los individuos estudiados fue de 46.5%. Esta prevalencia fue mayor en los individuos con la variante A del SNP rs1424032 sin alcanzar significancia estadística (48.2%, n= 28 individuos con la variante A y 40%, n= 18 con la variante G, P= 0.421).

Al evaluar la prevalencia de los criterios individuales de síndrome metabólico tampoco se encontró una diferencia entre los individuos con las diferentes variantes del SNP:

Prevalencia de los criterios de síndrome metabólico en individuos con HFC y las diferentes variantes del SNP rs1424032				
Criterio	Total N (%)	AA N (%)	GG/AG N (%)	P
Glucosa de ayuno anormal (>100 mg/dl)	46 (44.7)	26 (44.8)	20 (44.4)	0.969
Hipertrigliceridemia (>150 mg/dl)	71 (68.9)	41 (70.7)	30 (66.7)	0.662
Hipoalfalipoproteinemia (<40 mg/dl en hombres y <50 mg/dl en mujeres)	60 (58.3)	36 (62.1)	24 (53.3)	0.373
Obesidad central (circunferencia de cintura >102 cm en hombres y >88 cm en mujeres)	35 (34)	20 (34.5)	15 (33.3)	0.742
Hipertensión arterial (presión arterial sistólica \geq 135 y/o diastólica \geq 80 mmHg)	35 (35.4)	22 (39.3)	13 (30.2)	0.350

Discusión

En este estudio se investigó el efecto de las variantes del polimorfismo de nucleótido único rs1424032 en individuos mexicanos con HFC en las concentraciones de lípidos en el estado basal y después de la ingesta de un alimento mixto estandarizado. No se encontraron diferencias en las concentraciones de lípidos, glucosa o insulina en el estado basal o en el período de ocho horas después de la ingesta del alimento mixto.

En el período post-prandial existe elevación de lipoproteínas en la circulación ricas en triglicéridos que incluyen quilomicrones, VLDL y sus remanentes. Los quilomicrones son sintetizados por los enterocitos, tienen un índice triglicéridos/colesterol elevado y contienen apo B-48 entre otras lipoproteínas. Por otra parte, las VLDL producidas en los hepatocitos contienen apo B-100. En el estado post-prandial tanto el hígado como el intestino secretan lipoproteínas ricas en triglicéridos que dependen de la acción de la lipasa lipoproteica para su eliminación.

En este estudio el origen de las partículas originadas en el intestino (quilomicrones y remanentes de quilomicrones) se evaluó determinando la concentración de apo B-48 tanto en el estado basal como en el período post-prandial de ocho horas después de la ingesta de un alimento mixto. Como medidas principales de la lipemia postprandial se estimaron áreas bajo la curva total e incremental de triglicéridos y de apo B-48.

En estudios realizados en individuos con hiperlipidemia familiar que han evaluado la lipemia post-prandial se ha descrito un retraso en la eliminación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en el estado post-prandial (64, 65) debido a que las vías catabólicas, que son comunes para la eliminación de las VLDL y quilomicrones, se saturan y como resultado hay acumulación de dichas lipoproteínas en la circulación.

En los individuos con HFC incluidos en este estudio se observó una elevación post-prandial de triglicéridos y de apo B-48, el componente principal de los quilomicrones y remanentes de quilomicrones. La concentración de apo B-48 permaneció elevada, sin regresar al valor basal después de 8 horas.

No se encontraron concentraciones diferentes de lipoproteínas, glucosa o insulina en los individuos con las diferentes variantes del polimorfismo de nucleótido único rs1424032, sin embargo, se encontró un efecto del índice cintura/cadera en la concentración post-prandial de triglicéridos, de apo B-48, apo A-V, glucosa e insulina. Este hallazgo es consistente con lo descrito previamente por Bartual y colaboradores quienes describieron un efecto negativo de la obesidad en individuos sanos e individuos con HFC en la lipemia post-prandial. (66)

Los individuos con la variante A tuvieron un índice cintura/cadera significativamente mayor, concentraciones post-prandiales más elevadas de insulina y triglicéridos y mayor prevalencia de síndrome metabólico (sin alcanzar una significancia estadística). Futuros estudios deberán evaluar la composición corporal (masa grasa, masa libre de grasa, tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo) y su efecto en el metabolismo post-prandial de lipoproteínas.

En los modelo de regresión lineal la variante del SNP fue una variable independiente determinante de la concentración post-prandial de apo B-48 (estimada como AUC total e incremental). Este SNP se localiza en el cromosoma 16 y no codifica para ningún gen conocido, sin embargo, es una región

altamente conservada entre especies y se postula que pudiera funcionar como un elemento regulador. Se requieren más estudios para confirmar que las variantes en esta región tengan un efecto funcional relacionado con el metabolismo de quilomicrones en el período post-prandial. Las limitantes del presente estudio incluyen la falta de separación de las diferentes sub-fracciones de lipoproteínas ricas en triglicéridos (sub-fracciones de VLDL), sin embargo, la evaluación específica de apo B-48 permitió estimar la concentración de quilomicrones y sus remanentes. Por otra parte el pequeño número de sujetos homocigotos para la variante G impidió la realización de un análisis evaluando por separado al grupo de heterocigotos (GA).

Conclusión

Los individuos mexicanos con HFC tuvieron elevación post-prandial de triglicéridos y quilomicrones. Las concentraciones de lipoproteínas, glucosa e insulina en los individuos con las diferentes variantes del SNP rs1424032 fueron similares en el estado basal y después de la ingesta de un alimento mixto estandarizado.

Lista de abreviaturas

ACAT: colesterol aciltransferasa
ALT: alanino aminotransferasa
ANOVA: análisis de varianza
Apo: apolipoproteína
ASP: proteína estimuladora de la acilación
AST: aspartato aminotransferasa
AUC: área bajo la curva total
AUCi: área bajo la curva incremental
CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol
c-HDL: colesterol de alta densidad
c-LDL: colesterol de baja densidad
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
GGT: gama glutamil transpeptidasa
HDL: lipoproteína de alta densidad
HFC: hiperlipidemia familiar combinada
HNF4A: factor nuclear de hepatocitos 4 alfa
HOMA: homeostasis model assessment
IDF: International Diabetes Federation
IDL: lipoproteína de densidad intermedia
IMC: índice de masa corporal
INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
LCAT: lecitin-colesterol aciltransferasa
LDL: lipoproteína de baja densidad
LH: lipasa hepática
LHS: lipasa hormono sensible
LPL: lipasa lipoproteica
LRP: proteína relacionada al receptor de LDL
MTP: proteína de transferencia microsomal
MODY: maturity onset diabetes of the young
NCEP-ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
SEM: error estándar de la media
SNP: polimorfismo de nucleótido único
USF1: factor de transcripción corriente arriba 1
VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

Bibliografía

1. Aguilar Salinas Carlos A, Gómez Díaz R, Gómez Perez F. Definición de una dislipidemia en Dislipidemias de lo clínico a lo molecular. 1ª edición. México, Intersistemas Editores, 2008, p. 1-51.
2. Malloy MJ, Kane JP. Disorders of lipoprotein metabolism en Greenspan's basic & clinical endocrinology. 8ª edición. Gardner DG, Shoback D. Editorial Mc Graw Hill, 2007, p. 770-95.
3. Vazquez MC, Rigotti A, Zanlungo S. Molecular mechanisms underlying the link between nuclear receptor function and cholesterol gallstone formation. *J Lipids*. 2012; 2012:547643.
4. Ayyobi AF, McGladdery SH, Mc Neely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1289-94.
5. Aguilar Salinas CA, Zamora M, Gómez-Díaz RA, Mehta R, Gómez-Pérez FJ, Rull JA. Familial combined hyperlipidemia: controversial aspects of its diagnosis and pathogenesis. *Semin Vasc Med*. 2004; 4:203-9.
6. Gaddi A, Cicero AFG, Odofo FO, Poli A, Paoletti R. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: an up-date. *Vascular Health and Risk Management*. 2007; 3:877-86.
7. Aguilar-Salinas CA, Tamez-Dávila R, Mehta R, Gómez-Pérez F. Las dislipidemias primarias son frecuentes en pacientes con diabetes tipo 2 que sobreviven a un evento coronario agudo. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2004; 12:42-5.
8. Grundy SM, Chait A, Brunzell JD. Familial Combined Hyperlipidemia Workshop. *Arteriosclerosis*. 1987; 7:203-7.
9. Sniderman AD, Castro-Cabezas M, Riblata J, et al. A proposal to redefine familial combined hyperlipidemia—third workshop on FCHL held in Barcelona from 3 to 5 May 2001, during the scientific sessions of European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32:71-73.
10. Castro Cabezas M. Postprandial lipemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31:1090-3.
11. Verseyden C, Meijssen S, Castro Cabezas M. Postprandial changes of apoB-100 and apoB-48 in TG rich lipoproteins in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2002; 43:274-80.
12. Aguilar-Salinas CA, Barrett HP, Pulai J, Zhu X, Schonfeld G. A familial combined hyperlipidemic kindred with impaired apolipoprotein B catabolism. Kinetics of apolipoprotein B during placebo and pravastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:72-82.
13. de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AF. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med*. 2002; 95:46-53.
14. Meijssen S, van Dijk H, Verseyden C, et al. Delayed and exaggerated postprandial complement component 3 response in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22:811-16.

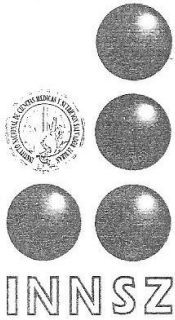
15. Ayyobi AF, McGladdery SH, Mc Neely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1289-94.
16. Hokanson JE, Austin MA, Zambon A, Brunzell JD. Plasma triglyceride and LDL heterogeneity in familial combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13:427-34.
17. Sveger T, Nordborg K. Apolipoprotein B as a marker of familial hyperlipoproteinemia. *J Atheroscler Thromb.* 2004; 11:286-92.
18. Valles V, Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rojas R, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepulveda J. Apolipoprotein B and A-I distribution in Mexican urban adults: results of a nationwide survey. *Metabolism.* 2002;51:560-8.
19. Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC, et. al. Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation.* 2003; 108:519-23.
20. Purnell J, Kahn S, Schwartz R, Brunzell R. Relationship of insulin sensitivity and apoB levels to intraabdominal fat in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:567-72.
21. de Bruin TW, Georgieva AM, Brouwers MC, et al. Radiological evidence of nonalcoholic fatty liver disease in familial combined hyperlipidemia. *Am J Med.* 2004; 116:847-9.
22. Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, et. al. Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet.* 1998; 18:369-73.
23. Allayee H, Krass KL, Pajukanta P, et. al. Locus for elevated apolipoproteína B levels on chromosome 1p31 in families with familial combined hiperlipidemia. *Cir Res.* 2002; 90:926-31.
24. Pei W, Baron H, Muller-Hyhsok B, et. al. Support for linkage of familial combined hiperlipidemia to chromosome 1q21-23 in Chinese and German families. *Clin Genet.* 2000; 57:29-34.
25. Huertas-Vazquez A, Aguilar-Salinas C, Lusi AJ, et. al. Familial combined hyperlipidemia in Mexicans: association with upstream transcription factor 1 and linkage on crhromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1985-91.
26. Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, et. al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004; 36:371-76.
27. Coon H, Xin Y, Hopkins PN, et. al. Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hiperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides. *Hum Genet.* 2005; 117:444-51.
28. Vallet VS, Casado M, Henrion AA, et. al. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem.* 1998; 273:20175-9.
29. Naukkarinen J, Gentile M, Soro-Paavonen A, et. al. USF1 and dyslipidemias: converging evidence for a functional intronic variant. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:2595-605.
30. Komulainen K, Alanne M, Auro K, et. al. Risk alleles of USF1-Gene predict cardiovascular disease of women in two prospective studies. *PLoS Genetics.* 2006; 2:e69.

31. Ng MC, Miyake K, So WY, et. al. The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population. *Diabetologia*. 2005; 48:2018-24.
32. Castellani LW, Weinreb A, Bodnar J, et. al. Mapping a gene for combined hyperlipidaemia in a mutant mouse strain. *Nat Genet*. 1998; 18:374-7.
33. Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, et. al. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-24. *Nature*. 1991; 349:161-4.
34. Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius, et. al. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hiperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res*. 1996; 37:136-47.
35. Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, et al. Complex genetic contribution of the apoAI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest*. 1997; 99:953–61.
36. Ribalta J, La Ville AE, Vallve JC, et al. A variation in the apolipoproteína C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hiperlipidemia. *J Lipid Res*. 1997; 38:1061-9.
37. Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius, et. al. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hiperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res*. 1996; 37:136-47.
38. Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, et al. Complex genetic contribution of the apoAI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest*. 1997; 99:953–61.
39. Schaap FC, Rensen PC, Voshol PJ, et. al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem*. 2004; 279:27941-7.
40. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et. al. An apolipoproteína influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001; 294:169-73.
41. Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, et. al. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:167-74.
42. Mar R, Pajukanta P, Allayee H, et. al. Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hiperlipidemia. *Circ Res*. 2004; 94:993-9.
43. Ribalta J, Figuera L, Fernandez-Ballart J, et. al. Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hiperlipidemia. *Clin Chem*. 2002; 48:1597-600.
44. Nevin DN, Brunzell JD, Deeb SS. The LPL gene in individuals with familial combined hiperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14:869-73.
45. Reymer PW, Gagne E, Groenemeyer BE, et. al. A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nat Genet*. 1995; 10: 28-34.

46. Samuels ME, Forbey KC, Reid JE, et. al. Identification of a common variant in the lipoprotein lipase gene in a large Utah kindred ascertained for coronary heart disease: the -93G/D9N variant predisposes to low HDL-C/high triglycerides. *Clin Genet.* 2001; 59:88-98.
47. Hoffer MJ, Bredie SJ, Boomsma DI, et. al. The lipoprotein lipase (Asn291 ->Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidaemia. *Atherosclerosis.* 1996; 119:159-67.
48. Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, et. al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hiperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res.* 1996; 37:2627-37.
49. Yang WS, Nevin DN, Peng R, et. al. A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hiperlipidemia and low LPL activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:4462-6.
50. Pajukanta P, Porkka KV, Antikainen M, et. al. No evidence of linkage between familial combined hiperlipidemia and genes encoding lipolytic enzymes in Finnish families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:841-50.
51. Gagne E, Genest J Jr, Zhang H, et. al. Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hiperlipidemia. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14:1250-7.
52. Hoffer MJ, Snieder H, Bredie SJ, et. al. The V73M mutation in the hepatic lipase gene is associated with elevated cholesterol level in four Dutch pedigrees with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2000; 151:443-50.
53. Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, et. al. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1453-63.
54. Lilja HE, Suviolahti E, Soro-Paavonen A, et. al. Locus for quantitative HDL-cholesterol on chromosome 10q in Finnish families with dyslipidemia. *J Lipid Res.* 2004; 45:1876-84.
55. Weissglas-Volkov D, Huertas-Vazquez A, Suviolahti E, et. al. Common hepatic nuclear factor 4 alpha variants are associated with high serum lipid levels and the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2006; 55:1970-7.
56. Meaney E, Lara-Esqueda A, Ceballos-Reyes GM, et. al. Cardiovascular risk factors in the urban Mexican population: the FRIMEX study. *Public Health.* 2007; 121:378-84.
57. Paramsothy P, Knopp R, Bertoni AG, et. al. Combined hyperlipidemia in relation to race/ethnicity, obesity, and insulin resistance in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Metabolism.* 2009; 58:212-9.
58. Weissglas-Volkov D, Plaisier CL, Hertas-Vazquez A, et. al. Identification of two common variants contributing to serum apolipoprotein B levels in Mexicans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:353-9.
59. Pajukanta P, Allayee H, Krass KL, et. al. Combined analysis of genome scans of Dutch and Finnish families reveals a susceptibility locus for highdensity lipoprotein cholesterol on chromosome 16q. *Am J Hum Genet.* 2003; 72:903-17.

60. Soro A, Pajukanta P, Lilja HE, et. al. Genome scans provide evidence for low-HDL-C loci on chromosomes 8q23, 16q24.1-24.2, and 20q13.11 in Finnish families. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:1333-40.
61. Mahaney MC, Almasy L, Rainwater DL, et. al. A quantitative trait locus on chromosome 16q influences variation in plasma HDL-C in Mexican Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:339-45.
62. Van Oostrom AJ, Alipour A, Sijmonsma TP, Verseyden C, Dallinga-Thie GM, Plikker HW, Castro Cabezas M. Comparison of different methods to investigate postprandial lipaemia. *Neth J. Med.* 2009; 67:13-20.
63. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.
64. Castro Cabezas M, de Bruin TW, Van Linde-Sibenius Trip M, Kock LA, Jansen H, Erkelens DW. Lipoprotein(a) plasma concentrations associated with lipolytic activities in eight kindreds with familial combined hyperlipidemia and normolipidemic subjects. *Metabolism.* 1993; 43:756-761.
65. Castro Cabezas M, Erkekens DW, Kock LA, De Bruin TW. Postprandial apolipoprotein B100 and B48 metabolism in familial combined hyperlipidaemia before and after reduction of fasting plasma triglycerides. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24:669-678.
66. Bartual A, González C, Martínez Hervás S, Real JT, García García AB, Castro Cabezas M, Chaves FJ, Priego MA, Ascaso JF, Carmena R. Effect of gender and obesity on postprandial lipemia in non-diabetic normolipidemic subjects and subjects with familial combined hiperlipidemia. *Rev Clin Esp.* 2006; 206:213-9.

Anexo 1. Carta de aprobación del comité de ética



"2010, Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución"

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

MÉXICO, D.F., A 16 DE JULIO DE 2010

DRA. PALOMA ALMEDA VALDES
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO DE LÍPIDOS
PRESENTE

Por este medio, me permito informarle que el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha **revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Alteraciones metabólicas en individuos mexicanos con hiperlipidemia familiar combinada y el alelo G del polimorfismo de nucleótido único rs1424032"
REF. 183

Así mismo se solicita que al terminar el estudio se deberá de enviar los resultados con resumen de todos los datos sobresalientes y conclusiones, un informe anual (si la duración del estudio es mayor de un año), donde comunique los avances y resultados parciales de su Investigación.

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE,

16 JUL 2010

DR. PATRICIO SANTILLÁN DOHERTY
COORDINADOR
COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS

Investigación *c.c.p. Dr. Rubén Lisker Y. Director de Investigación.*
Tradición Servicio *C.P. Martha Arredondo Urzúa. Jefe del Depto. C.F.E.I.*
Asistencia PSD *Asistencia*

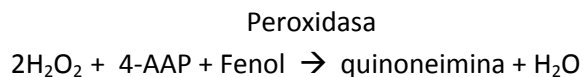
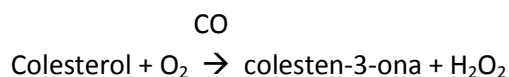
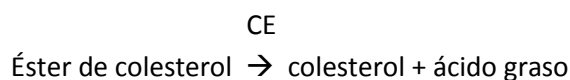
- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

Anexo 2. Medición de colesterol

En la reacción para medir la concentración de colesterol, la enzima colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno mediante la enzima colesterol oxidasa (CO). La peroxidasa cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina (4AAP) y fenol para producir un producto coloreado, la quinoneimina.

El sistema Synchron CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en la cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la actividad del colesterol en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de colesterol.

Esquema de la reacción química



Anexo 3. Medición de triglicéridos

Los triglicéridos en la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipasa. Una secuencia de tres pasos enzimáticos acoplados usando cinasa de glicerol (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa de rábano picante (HPO) causa el acoplamiento oxidante del ácido 3, 5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico (DHBS) con 4-aminoantipirina y forma un colorante rojo de quinoneimina.

El sistema Synchron CX dispensa en forma automática los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en una cubeta. La proporción es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de triglicéridos.

Esquema de la reacción química

Lipasa

Triglicéridos \rightarrow glicerol + ácidos grasos

GK

Glicerol + ATP \rightarrow glicerol-3-fosfato + ADP
Mg⁺⁺

GPO

Glicerol-3-fosfato + O₂ \rightarrow dihidroxiacetona + H₂O₂

HPO

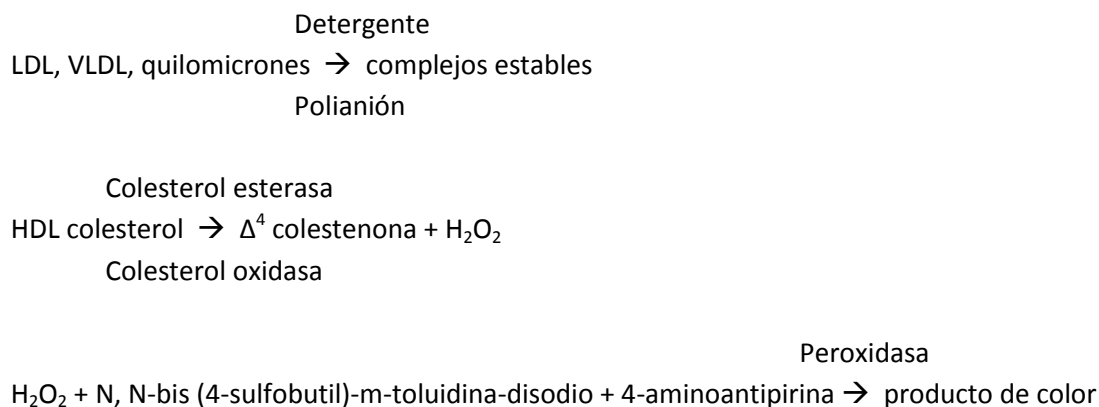
2H₂O₂ + 4-aminoantipirina + DHBS \rightarrow quinoneimina + HCl + 2H₂O

Anexo 4. Medición de colesterol HDL

El método directo del HDL colesterol depende de un detergente especial que solubiliza únicamente las partículas de lipoproteína HDL y libera HDL colesterol para que reaccione con la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en presencia de cromógenos para producir un producto de color. El mismo detergente también inhibe la reacción de las enzimas de colesterol con las lipoproteínas LDL, VLDL y los quilomicrones mediante la adsorción a sus superficies. Un polianión contenido en el reactivo mejora la selectividad del ensayo de HDL colesterol estableciendo enlaces con LDL, VLDL y quilomicrones.

El sistema Synchron CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra de HDL colesterol y de reactivo en una cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 93 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 560 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de HDL-colesterol.

Esquema de la reacción química



Anexo 5. Medición de glucosa

Para medir la concentración de glucosa se utiliza la hexocinasa (HK) que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del trifosfato de adenosina (ATP) a la glucosa para formar difosfato de adenosina y glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato luego se oxida a 6-fosfogluconato con la reducción concomitante de β -dinucleótido de adenina nicotinamida (NADH) por la acción catalítica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

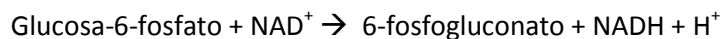
El sistema Synchron CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en la cubeta de reacción. La proporción usada es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de glucosa.

Esquema de la reacción química

HK



G6PDH

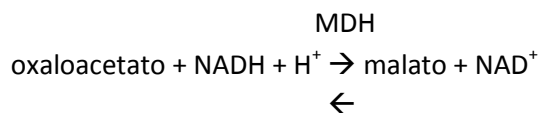
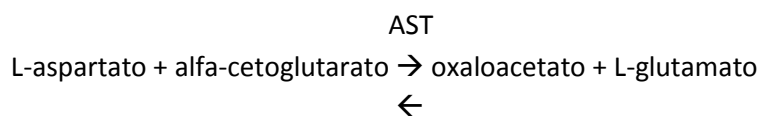


Anexo 6. Medición de aspartato aminotransferasa

El reactivo aspartato aminotransferasa (AST) se utiliza para la determinación cuantitativa de la actividad de aspartato aminotransferasa en suero o plasma mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la aspartato aminotransferasa cataliza la transaminación reversible de L-aspartato y alfa-cetoglutarato a oxaloacetato y L-glutamato. Luego se reduce el oxaloacetato a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) con la concurrente oxidación de beta-dinucleótido de adenina nicotinamida reducida (NADH) a beta-dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD).

El sistema Synchron CX dispensa una parte de muestra a 11 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la aspartato aminotransferasa en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la actividad de la aspartato aminotransferasa.

Esquema de la reacción química

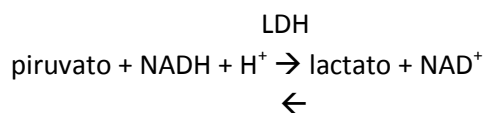
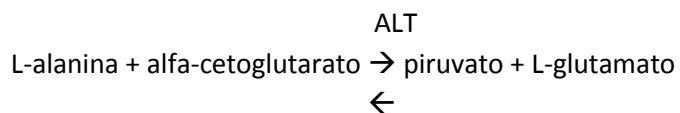


Anexo 7. Medición de alanina aminotransferasa

Se utiliza el reactivo alanina aminotransferasa (ALT) para medir en forma cuantitativa la actividad de alanina aminotransferasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la alanina aminotransferasa cataliza la transaminación reversible de L-alanina y alfa-cetoglutarato a piruvato y L-glutamato. A continuación, el piruvato se reduce a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) con la oxidación concurrente de beta-dinucleótido de nicotinamida adenina reducida (NADH) a beta-dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD).

El sistema dispensa una parte de muestra a 11 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la actividad de alanina aminotransferasa en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la actividad de la alanina aminotransferasa.

Esquema de la reacción química

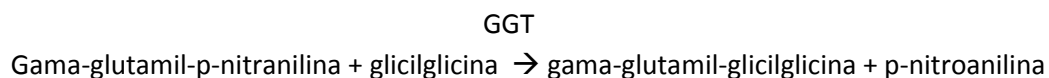


Anexo 8. Medición de gamaglutamiltransferasa

Se utiliza el reactivo gama-glutamiltransferasa (GGT) para medir la actividad de la gama-glutamiltransferasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la gama-glutamiltransferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamilo, del sustrato incoloro gama-glutamil-p-nitroanilina, al receptor glicilglicina, produciendo el producto coloreado p-nitroanilina.

La proporción usada por el sistema Synchron CX es una parte de muestra a 20 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 410 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la actividad de gama-glutamiltransferasa en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la actividad de gama-glutamiltransferasa.

Esquema de la reacción química



Anexo 9. Medición de insulina

La insulina es una hormona polipeptídica compuesta por dos cadenas desiguales, A y B, unidas entre si mediante 2 puentes disulfuros. La insulina se forma en las células beta del páncreas a partir de la proinsulina. En la proinsulina, las cadenas A y B están unidas por un péptido conector, llamado péptido C.

La expresión de insulina inmunorreactiva se emplea para denominar al componente de la insulina circulante y de la actividad biológica que se puede medir utilizando anticuerpos frente a la insulina. Debido a que tanto la proinsulina como la insulina contienen cadenas polipeptídicas A y B existe la posibilidad de que se produzca reactividad cruzada con los anticuerpos generados contra generados con la proinsulina (0.016% a una concentración de 10^6 pg/ml).

El ensayo se basa en la tecnología de enzimoimmunoanálisis de micropartículas (MEIA). La reacción tiene lugar de la forma siguiente:

- La muestra, las micropartículas recubiertas de anticuerpos (monoclonales de ratón) frente a la insulina y el tampón del ensayo se pipetea en uno de los pocillos de la cubeta de reacción. Durante la incubación de esta mezcla de reacción, la insulina presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas de anticuerpos frente a la insulina formándose un complejo anticuerpo-antígeno
- Una alícuota de la mezcla de reacción se transfiere a la celdilla con matriz, a cuyas fibras de vidrio se unen irreversiblemente las micropartículas
- La celdilla con matriz se lava para eliminar los materiales no unidos
- El conjugado de anticuerpos frente a la insulina se dispensa en la celdilla con matriz y se une al complejo antígeno-anticuerpo
- La celdilla con matriz se lava para eliminar los materiales no unidos
- Se añade el sustrato 4-metilumbeliferil fosfato a la celdilla con matriz y el sistema óptico MEIA mide la tasa de formación del producto fluorescente

Anexo 10. Medición de apolipoproteína B-48

Para la medición de Apo B-48 mediante ELISA los estándares o las muestras se incuban en celdillas cubiertas por anticuerpos monoclonales para capturar Apo B-48. Después de una hora de incubación y lavado, se añade un anticuerpo anti-Apo B-48 conjugado con biotina y se incuba una hora más para que se una con la Apo B-48 capturada. Después del lavado se añade peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina y se incuba durante 30 minutos. Después de lavar, la peroxidasa conjugada con avidina unida reacciona con un sustrato cromógeno (TMB) durante 20 minutos y la reacción se detiene al añadir una solución acídica. La absorbancia del producto amarillo se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La absorbancia es proporcional a la concentración de Apo B-48. La curva estándar se prepara graficando la absorbancia contra las concentraciones de Apo B-48. Las concentraciones de Apo B-48 en las muestras se determinan utilizando esta curva estándar.

Anexo 11. Medición de apolipoproteína B

El ensayo Image determina cuantitativamente la apolipoproteína B en suero humano por nefelometría cinética. El ensayo mide la tasa de incremento de la dispersión de la luz de partículas suspendidas en solución como resultado de complejos formados durante la reacción antígeno-anticuerpo.

Esquema de la reacción química

Apolipoproteína B (muestra) + anticuerpo → [apolipoproteína B-anticuerpo (agregados)]

Anexo 12. Medición de apolipoproteína C-III

La medición de apolipoproteína C-III se realizó con uso de un estuche Milliplex® MAP el cual se basa en la tecnología Luminex® MAP® que a continuación se describe:

- Luminex® utiliza técnicas para colorear micro-esferas con dos colorantes fluorescentes. Mediante concentraciones precisas de estos colorantes, pueden crearse hasta 100 cuentas diferentes, cada una de las cuales es cubierta con un anticuerpo de captura específico.
- Después de que un analito de una muestra se captura por la cuenta, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado.
- La mezcla de reacción se incuba con un conjugado de streptavidina-PE, la molécula reportera para completar la reacción en la superficie de cada micro-esfera.
- Las micro-esferas pasan rápidamente a través de un laser que excita los colorantes internos del conjunto de micro-esferas. Un segundo laser excita PE, el colorante fluorescente en la molécula reportera
- Finalmente, procesadores de alta velocidad con señal digital identifican cada micro-esfera individual y cuantifican el resultado de este bioensayo basado en señales de fluorescencia del reportero.

Anexo 13. Medición de adiponectina

El ensayo ELISA de sándwich para medir adiponectina se basa en:

- Captura de moléculas de adiponectina humana de las muestras a las celdillas de una placa cubierta con anticuerpos monoclonales anti-adiponectina humana y la unión de un segundo anticuerpo monoclonal con biotina anti-humano a las moléculas capturadas
- Lavado de los materiales no unidos de las muestras
- Unión de estreptavidina conjugada con peróxido de rábano a los anticuerpos con biotina inmovilizados
- Lavado del exceso de conjugados libres de enzima
- Cuantificación de los conjugados anticuerpo-enzima inmovilizados monitorizando la actividad de la peroxidasa de rábano en la presencia del sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. La actividad enzimática es medida espectrofotométricamente por el aumento de absorbancia a 450 nm – 590 nm después de la acidificación de los productos formados. Ya que la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de la adiponectina humana capturada en la muestra, la concentración se deriva mediante la interpolación de una curva de referencia generada en el mismo ensayo con estándares de referencia con concentración conocida de adiponectina humana.

Anexo 14. Medición de leptina

La medición de leptina se realiza con un ELISA sándwich basado en:

- Captura de la leptina humana por un anticuerpo policlonal de conejo anti-leptina humana inmovilizado en una placa de 96 celdas
- Lavado de los materiales no unidos
- Unión de un anticuerpo monoclonal con biotina a la leptina humana capturada
- Lavado de los materiales no unidos
- Unión de estreptavidina conjugada con peróxido de rábano al anticuerpo con biotina inmovilizado
- Lavado de los conjugados libres de enzima
- Cuantificación de la estreptavidina conjugada con peróxido de rábano con el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina. La actividad enzimática es medida espectrofotométricamente por aumento de la absorbancia a 450 nm – 590 nm después de la acidificación de los productos formados. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de leptina humana capturada en la muestra desconocida. La concentración se deriva por interpolación de una curva de referencia generada en el mismo ensayo con estándares de referencia con concentración conocida de leptina humana.

Anexo 15. PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Emplea un molde de ADN, por lo menos un par de cebadores, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable.

Un cebador, partidor, iniciador o primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Los desoxirribonucleótidos son los monómeros que constituyen al ADN y poseen la misma estructura que los nucleótidos: una base nitrogenada (un compuesto cíclico con átomos de nitrógeno), un grupo fosfato, una pentosa (monosacárido de cinco carbonos, en este caso la desoxirribosa).

Un tampón, buffer, solución amortiguadora o solución reguladora es la mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada. Tienen la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.

Las ADN polimerasas intervienen en la replicación del ADN para dar a cada célula hija una copia del ADN original en el proceso de la mitosis. Llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes del ADN molde. Los dNTP que se usen en la replicación del ADN contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y dependiendo de la base nitrogenada serán, dATP, dTTP, dCTP o dGTP. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo 3'-OH actúa como nucleófilo en el extremo 3' de la cadena que está en crecimiento. En ataque nucleofílico se produce sobre el fosfato α (el más próximo a la desoxirribosa) del desoxirribonucleósido 5' trifosfato que entra, liberándose pirofosfato inorgánico y alargándose el ADN (al formarse un nuevo enlace fosfodiéster).

A esta mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que en un termociclador con sensores para medir fluorescencia después de excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición se realiza después de cada ciclo de amplificación (PCR inmediata).

Anexo 16. Técnica para medición de circunferencia de cintura y cadera

Trazar una línea imaginaria que parta del hueco de la axila hasta la cresta iliaca. Sobre ésta, identificar el punto medio entre la última costilla y la parte superior de la cresta iliaca (cadera). En este punto se encuentra la cintura.

Colocar la cinta métrica en el perímetro del punto antes mencionado y proceder a la medición de esta circunferencia, con el individuo de pie y la cinta horizontal. Evitar que los dedos del examinador queden entre la cinta métrica y el cuerpo del paciente.

La circunferencia de cadera se mide a la altura del punto de máxima circunferencia sobre las nalgas.

Anexo 17. Consentimiento informado

HOJA DE INFORME PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El objetivo de este estudio es medir las alteraciones metabólicas después de una carga de alimento en un grupo de pacientes con hiperlipidemia familiar combinada. Los responsables de este proyecto son: Dra. Paloma Almeda Valdés y Dr. Carlos A. Aguilar Salinas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se puede comunicar con ellos en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo al 54870900 ext. 2405 ó 2407.

Usted ha sido invitado a participar en el estudio porque padece hiperlipidemia familiar combinada. Usted no podrá participar en el estudio si padece diabetes, ha sufrido un infarto del miocardio, una embolia, consume regularmente más de 10 copas por semana o cualquier enfermedad que ponga en peligro su vida a 2 años (ej. tumores malignos). Su participación incluye una única cita en la que se le pedirá que acuda con 12 horas de ayuno, se realizará una entrevista (con duración aproximada de 15 a 30 minutos), la medición de su peso, talla, perímetro de cintura, presión arterial y la realización de una prueba de tolerancia a una comida mixta. La prueba de tolerancia a una comida mixta consiste en un examen en el cual se comerá un desayuno proporcionado en el Departamento de Endocrinología y se tomarán muestras de sangre al inicio, dos, cuatro, seis y ocho horas después del desayuno para analizar los cambios en las grasas de su sangre. Deberá de permanecer en el Departamento de Endocrinología durante las ocho horas de su estudio. Durante la entrevista se preguntarán detalles de su historia médica, de sus hábitos de alimentación y de su actividad física. Sus datos serán confidenciales y no podrán ser empleados para ningún otro motivo distinto al estudio.

Los exámenes de sangre no tendrán costo alguno para usted. Se cuidará la confidencialidad de los resultados de todos los participantes de este estudio y estos serán utilizados *únicamente* para fines de investigación. Los resultados le serán entregados; usted podrá discutirlos con su médico y hacer las modificaciones que él le sugiera. Su participación en el estudio no le limita para seguir tratamiento alguno.

La participación del estudio es voluntaria. Si usted rechaza participar no tendrá implicaciones en la atención que recibe usted o su familiar en la escuela o en el centro de salud. La obtención de la muestra de sangre no implica ningún riesgo mayor para su salud. Puede sentir dolor leve con la punción; existe el riesgo de tener un moretón o una infección el sitio de la punción.

Es de mi conocimiento que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. Puede contactar a los investigadores o al Dr. Patricio Santillán Doherty (coordinador del Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos) al 54870900. Sé que la información que yo proporcione será completamente confidencial y para fines exclusivos de investigación. Los datos serán manejados únicamente por los investigadores de este estudio en el Instituto. Recibiré, si así lo solicito, los resultados obtenidos por mi participación y podré retirarme del estudio si así lo deseo, previo aviso a los investigadores.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del estudio: Alteraciones metabólicas en individuos mexicanos con hiperlipidemia familiar combinada y el alelo G del polimorfismo de nucleótido único rs1424032

Patrocinador del Estudio: Departamento de Endocrinología. INCMNSZ

Médico del Estudio: Dra. Paloma Almeda Valdés

Se le invita a participar en un estudio de investigación. El presente formato de consentimiento contiene información que le ayudará a decidir si desea participar en el estudio. Tome el tiempo que requiera para decidirse, lea cuidadosamente este formato y formule las preguntas que tenga al médico o personal del estudio.

Acerca de Este Estudio

El propósito de este estudio es:

Realizar un estudio metabólico en individuos mexicanos con diagnóstico de hiperlipidemia familiar combinada con diferentes variaciones genéticas para determinar su papel en esta enfermedad.

La hiperlipidemia familiar combinada es una enfermedad caracterizada por elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos en varios miembros de la familia. Esta enfermedad también se caracteriza por un riesgo elevado de tener eventos cardiovasculares, por ejemplo, infarto agudo del miocardio.

Este es un estudio de investigación para evaluar los niveles de grasas después de una carga de alimento mixto en individuos mexicanos con hiperlipidemia familiar combinada con diferentes variantes genéticas para evaluar su papel en esta enfermedad.

Puede haber razones por las cuales es posible que a usted no se le permita participar en este estudio. Algunas de estas razones incluyen:

Si usted padece alguna de las siguientes condiciones médicas:

- Diabetes mellitus
- Enfermedad hepática
- Insuficiencia renal
- Enfermedad tiroidea sin tratamiento o mal controlada
- Enfermedad crónica o debilitante (VIH, cáncer)
- Infección aguda o crónica

En caso de presentar cualquiera de las siguientes:

- Hospitalización o enfermedad grave en los dos meses previos
- Embarazo o lactancia
- Atletas de alto rendimiento

El médico o personal del estudio le hablará de éstas y algunas otras razones por las cuales usted no puede ingresar al estudio.

Alrededor de 80 personas participarán en el estudio.

¿Qué se le pedirá que haga?

Si usted participa en el estudio, deberá hacer lo siguiente:

- Ayunar por 12 horas antes de la visita del estudio
- Acudir al departamento de Endocrinología y Metabolismo a su cita en una sola ocasión y permanecer durante la duración de su estudio (8 horas)

¿Qué sucederá durante las visitas del estudio?

Cuando usted acuda a la visita del estudio, el médico o el personal le realizarán las siguientes acciones:

- Historia médica
- Examen médico
- Medición de signos vitales que incluyen presión arterial y frecuencia cardiaca
- Medición de su estatura, peso y cintura
- Ingerir un desayuno proporcionado en el departamento de Endocrinología y Metabolismo
- Obtener muestras de sangre al inicio, dos, cuatro, cinco, seis y ocho horas después de la ingesta del desayuno

¿Qué efectos le podrían ocasionar estas pruebas?

Probablemente usted sienta molestias durante algunas de estas pruebas y también puede estar expuesto a algunos riesgos, tales como los que se mencionan a continuación:

- Muestras de sangre: la extracción de sangre de su brazo puede causar dolor, moretones, mareos y, raras veces, infección
- Se le colocará un catéter para la extracción de muestras en forma repetida
- Permanecer en ayunas puede causar mareo, dolores de cabeza, malestar estomacal o desmayos

¿Qué beneficio podría esperar por participar en el estudio?

La información obtenida ayudará a generar mayor conocimiento sobre la hiperlipidemia familiar combinada en individuos mexicanos que ampliará el conocimiento sobre esta enfermedad y podrá aplicarse a otras personas en el futuro.

¿De qué manera se protegerá su privacidad?

Si usted decide participar en este estudio, el médico y el equipo de investigación del estudio utilizarán la información de su salud para conducir el presente estudio. Esta información puede incluir su historia médica e información recopilada en el estudio. Se cuidará la confidencialidad de los resultados de todos los participantes de este estudio y estos serán utilizados *únicamente* para fines de investigación. Cuando el estudio concluya, usted puede escribir al médico del estudio para solicitarle el acceso a la información sobre su salud que se recopiló durante el estudio.

¿Tendrá que pagar algo?

No se le cobrará por su participación en éste protocolo, el departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición absorberá los gastos de los procedimientos y exámenes de laboratorio descritos en el protocolo, así como los costos de la consulta médica a las que tenga que acudir, por lo tanto usted no tendrá que pagar nada de lo indicado en éste proyecto de investigación.

¿A quién debe llamar si tiene preguntas acerca de...?

- El estudio: Dra. Paloma Almeda Valdés al teléfono 54870900 extensión 2405 ó 2407
- Una lesión relacionada con el estudio: Dra. Paloma Almeda Valdés al teléfono 54870900 extensión 2405 ó 2407
- Mis derechos como participante en el estudio: Dr. Patricio Santillán Doherty al tel. 54870900 (Coordinador del Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos)

Al firmar a continuación, acepta que:

- Ha leído este formato de consentimiento
- Ha tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas
- Entiende que su participación en este estudio es voluntaria
- Da mi permiso para que se use y comparta la información referente a su salud, tal como se describe en este formato
- Puede elegir no participar en el estudio comunicándoselo al médico del estudio. No se le sancionará ni perderá ningún beneficio que, de otra manera, le corresponde
- Recibirá un duplicado firmado de este consentimiento.

México D.F.,

de

de 20

A quien corresponda:

Por medio de la presente, Yo (escriba su nombre) _____
acepto que he sido informado sobre el proyecto "Alteraciones metabólicas en individuos mexicanos con hiperlipidemia familiar combinada y el alelo G del polimorfismo de nucleótido único rs1424032". Se me han mencionado los fines de la investigación, los beneficios y riesgos potenciales para mi persona en caso de participar y la posibilidad de incluirme libremente en dicho estudio o de retirarme en caso de convenir a mis intereses, sin que esto afecte mi atención en el Instituto. Además, toda esta información se me ha proporcionado por escrito y la he leído.

De acuerdo con todo lo anterior, acepto participar en dicho estudio.

Atentamente,

Nombre y firma

Fecha

Nombre y firma del investigador

Fecha

Nombre y firma del testigo

Fecha

Nombre y firma del testigo

Fecha