



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE  
HDL POR SU CONTENIDO DE LÍPIDOS EN UNA  
POBLACIÓN PEDIÁTRICA DE SUJETOS CON  
OBESIDAD Y ASMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**FLORES CASTILLO CRISTÓBAL**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. OSCAR A. PÉREZ MÉNDEZ**

**ASESORA DE TESIS**

**DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ**



**MÉXICO D.F., ABRIL 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

VOCAL: Dr. Oscar A. Pérez Méndez

SECRETARIO: M. en C. Araceli García Del Valle

SUPLENTE: M en C. Ángel García Sánchez

SUPLENTE: Q.F.B. Alicia Cabrera Aguilar

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Metabolismo de Lípidos, Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo la dirección del Dr. Oscar A. Pérez Méndez y la asesoría de la Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez.

---

Dr. Oscar A. Pérez Méndez  
Director de tesis

---

Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez  
Asesora de tesis

---

Cristóbal Flores Castillo  
Sustentante

## **Dedicatoria**

A las personas más importantes en mi vida:

Mi Familia: Silvia, Cristóbal, Marisol, Hugo, Cintli, Elías, Oscar, Valeria, Maricarmen, Julieta.

A mi madre Silvia y a mi padre Cristóbal por ser mi ejemplo a seguir, por creer en mí, gracias por su apoyo incondicional, me faltan letras para expresar todo mi agradecimiento.

A mis hermanos: Marisol, Hugo, Cintli, Elías, no tengo manera de agradecerles toda la ayuda que me han brindado para desbloquear este logro.

Gracias por todo, los Amo.

Achievement unlocked!

$$A + B \rightleftharpoons C$$

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la excelente formación académica que recibí. Es un orgullo ser parte de la Máxima Casa de Estudios.

Al Dr. Oscar Pérez por aceptarme como su alumno, gracias por su asesoría, dirección y por permitirme ser parte de su laboratorio. Gracias por compartir su experiencia y sabiduría. Por la paciencia y confianza, por todo el apoyo que me ha brindado y me sigue brindando, gracias totales.

A la Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez, por la asesoría de este trabajo, por su tiempo y conocimientos transmitidos.

A la Dra. J Elizabeth Carreón Torres, gracias Eli por toda la ayuda que me brindaste en la realización de TODO este trabajo (eres mi madre académica, aunque me niegues), gracias por tu amistad, gracias por todos tus consejos, sugerencias, revisiones, tiempo, por compartir tu experiencia y conocimientos conmigo. Me quedo corto con este agradecimiento, muchas gracias.

A mis compañeras del laboratorio metabolismo de lípidos realmente me la he pasado muy bien, gracias por permitirme ser parte de este laboratorio.

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por facilitarme las instalaciones, el equipo y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

Al Centro Médico Veterinario Argos, a todos los que forman parte de este gran proyecto, gracias por la paciencia y todo el apoyo que me han brindado.

A mis sinodales gracias por su ayuda en la revisión y corrección de este trabajo.

A todas las personas que han formado parte de mi desarrollo profesional y personal, a mis profesores, amigos, compañeros y a la FES ZARAGOZA.

“México, Pumas, Universidad”

## Contenido

Resumen.....	1
Marco Teórico.....	2
Lipoproteínas.....	2
Clasificación de las lipoproteínas.....	3
Lipoproteínas de alta densidad.....	3
Metabolismo intravascular de las HDL: el transporte reverso de colesterol .....	7
Actividad antiinflamatoria de las HDL.....	9
Obesidad .....	11
Subpoblaciones de HDL en la obesidad.....	11
Asma .....	12
Relación obesidad y asma .....	13
Justificación .....	14
Hipótesis.....	15
Objetivo.....	16
Objetivos particulares .....	16
Material y métodos.....	17
Muestras.....	17
Criterios de selección de las muestras .....	17
Criterios de inclusión.....	17
Criterios de exclusión: .....	18
Toma de muestra .....	18
Análisis de laboratorio.....	18
Validación del método para determinar la distribución de subpoblaciones de HDL.....	19
Linealidad del método y determinación del volumen óptimo de plasma.....	19
Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL por su contenido de colesterol utilizando plasma y HDL aisladas .....	20
Aislamiento de HDL .....	20

Electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas .....	20
Análisis densitométrico .....	21
Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad y asma .....	21
Análisis estadístico .....	25
Resultados .....	26
Linealidad del método y determinación del volumen óptimo de plasma.....	26
Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL por su contenido de colesterol utilizando plasma y HDL aisladas .....	28
Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad .....	30
Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad y asma .....	36
Discusión de Resultados.....	41
Referencias.....	48
Anexos.....	53
Anexo 1. Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	53
Anexo 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas .....	54
Anexo 3. Tinción para la determinación de la distribución de lípidos en gel de poliacrilamida .....	55

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura general de las lipoproteínas.. .....	2
Figura 2. Transporte reverso de colesterol.. .....	8
Figura 3. Secuencia de reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol total. ....	22
Figura 4. Secuencia de reacciones enzimática para la determinación de triglicéridos.....	23
Figura 5. Secuencia de reacciones enzimáticas para la determinación de fosfolípidos. ....	24
Figura 6. Curva de densidad óptica vs concentración de C-HDL.....	26
Figura 7. Curva de densidad óptica máxima vs concentración de C-HDL.. .....	27
Figura 8. Curvas de densitometría óptica.....	28
Figura 9. Distribución de subpoblaciones de HDL por colesterol. ....	32
Figura 10. Distribución de subpoblaciones de HDL por fosfolípidos.. .....	33
Figura 11. Cociente colesterol/ fosfolípidos entre grupos de sujetos con obesidad y eutróficos....	34
Figura 12. Cociente triglicéridos/ fosfolípidos entre grupos de sujetos con obesidad y eutróficos.	35
Figura 13. Cociente colesterol/ fosfolípidos entre grupos de sujetos eutróficos. ....	40



## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación y composición química de las lipoproteínas.....	3
Cuadro 2. Características fisicoquímicas de las apolipoproteínas.....	4
Cuadro 3. Enzimas, proteínas de transporte y de membrana que participan en el TRC .....	9
Cuadro 4. Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL utilizando plasma y HDL aisladas.....	29
Cuadro 5. Correlación entre distribución de subpoblaciones de HDL por tipo de muestra utilizada .....	29
Cuadro 6. Características antropométricas y clínicas de los sujetos de estudio. ....	30
Cuadro 7. Perfil bioquímico de los sujetos por grupo.....	31
Cuadro 8. Composición química de HDL por grupo. ....	31
Cuadro 9. Características antropométricas y clínicas de los grupos de estudio .....	36
Cuadro 10. Características bioquímicas de los grupos de estudio .....	37
Cuadro 11. Composición química de las HDL por grupo. ....	38
Cuadro 12. Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de colesterol. ....	38
Cuadro 13. Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de triglicéridos. ....	39
Cuadro 14. Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de fosfolípidos. ....	39

## Abreviaturas

ABCA-1	Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1
Apo	Apolipoproteína
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
CL	Colesterol libre
C-LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
ECA	Eutróficos con asma
ESA	Eutróficos sin asma
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IL	Interleucina
LCAT	Lecitina colesterol acilo-transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Lipasa hepática
LPL	Lipasa lipoproteica
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
OCA	Obesos con asma
OSA	Obesos sin asma
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Proteína C reactiva

PLTP	Proteína de transporte de fosfolípidos
PON	Paraoxonasa
PPS	Fosfolípidos
Qm	Quilomicrones
RMN	Resonancia magnética nuclear
SR-BI	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRC	Transporte reverso de colesterol
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

# Resumen

---

La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). En este sentido, es bien conocida la relación negativa que existe entre las concentraciones plasmáticas del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y el riesgo de desarrollar EAC.

Diversos investigadores han tratado de explicar esta relación inversa mediante el metabolismo intravascular de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), conocido como transporte reverso del colesterol (TRC). Durante su metabolismo las HDL modifican su estructura y composición, dando como resultado diversas subpoblaciones de HDL, con propiedades antiaterogénicas diferentes.

El asma y la obesidad son trastornos cada vez más frecuentes en nuestro país. Sin embargo, el estado inflamatorio sistémico que provoca la obesidad produce cambios metabólicos y alteraciones en las subpoblaciones de HDL, pero se desconoce si éste estado se complica cuando se combina con el asma.

En este trabajo se propuso que el estado inflamatorio de los sujetos asmáticos exagera las alteraciones en la distribución de subpoblaciones de HDL. Se caracterizaron las subpoblaciones de HDL por su contenido de lípidos utilizando plasma en la electroforesis de geles de poliacrilamida en gradiente 3-30% en condiciones nativas, en lugar de HDL aisladas como lo describe el método original.

Los resultados demuestran que la distribución de tamaños en sujetos eutróficos con asma se desplaza hacia partículas HDL grandes cuando se determinan por su contenido de fosfolípidos. Sin embargo, dicha distribución no se observa cuando se determina por su contenido de colesterol. En los sujetos con obesidad y asma, predominan anomalías en el contenido de colesterol y fosfolípidos de las subpoblaciones de HDL encontrándose disminuida la concentración de estos lípidos en las subpoblaciones HDL2b, 2a y 3c.

Nuestros resultados demuestran que no existen diferencias entre los sujetos con y sin asma en presencia de obesidad. Sin embargo, en los sujetos que solo presentan asma encontramos alteraciones en la distribución de subpoblaciones de HDL sugiriendo que el estado inflamatorio inherente al asma modifica las subpoblaciones de HDL.

# Marco Teórico

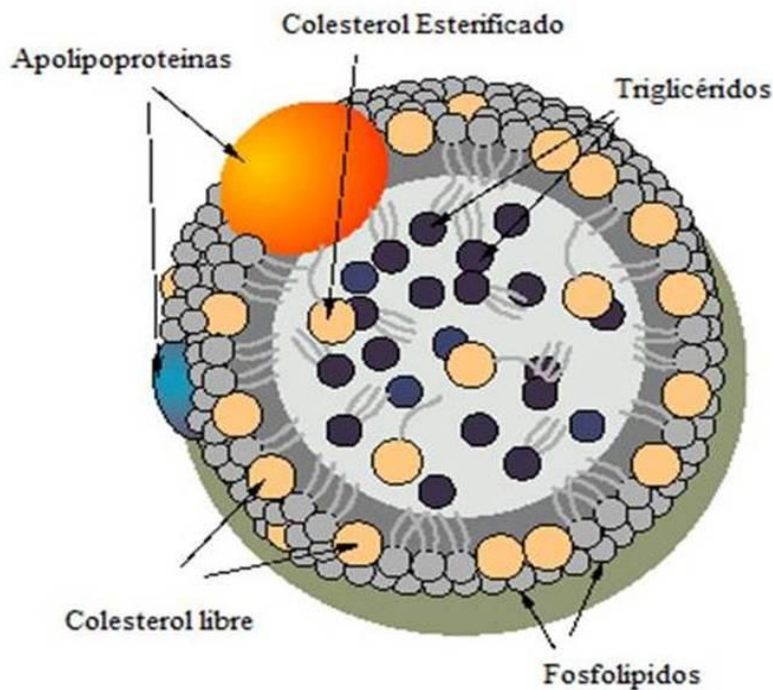
---

## Lipoproteínas

Los lípidos son un grupo diverso de compuestos, de origen celular, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos no polares. Desempeñan diversas funciones biológicas importantes, como componentes estructurales de las membranas, almacenamiento del combustible catabólico y segundos mensajeros entre otras.

Los lípidos necesitan ser transportados en la sangre por lo que se asocian de manera no covalente a proteínas formando a las lipoproteínas (Figura 1).

Las lipoproteínas son macromoléculas pseudomicelares constituidas por una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre) que tiene contacto con el medio acuoso, lípidos hidrofóbicos (ésteres de colesterol y triglicéridos) orientados al interior de la molécula para evitar el contacto con el medio acuoso, y para garantizar la estabilidad de la molécula en términos fisicoquímicos, integrando los componentes internos y los externos contienen estructuras proteínicas denominadas apolipoproteínas (apo) (1),(2).



**Figura 1.** Estructura general de las lipoproteínas. Muestra la estructura pseudomicelar, los lípidos anfipáticos de la superficie, los lípidos hidrofóbicos en el interior y las apolipoproteínas.

## Clasificación de las lipoproteínas

Las lipoproteínas del plasma humano son muy variables en cuanto a composición química, tamaño de la partícula, movilidad electroforética y densidad de flotación, que dependen de su origen de síntesis y metabolismo. Se pueden clasificar en cinco grupos de lipoproteínas según su densidad de flotación, siendo ésta la clasificación más aceptada (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Clasificación y composición química de las lipoproteínas.

	Qm	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/mL)	< 0.94	0.94- 1.006	1.006- 1.019	1.019- 1.063	1.063- 1.21
Movilidad electroforética	Origen	Pre- beta	Pre-beta beta	Beta	Alfa
Tamaño (nm)	>70	30- 70	20-30	18- 30	5- 12
Composición química					
Proteína (%)	1-2	6-10	20	18-22	45-55
Tg (%)	90- 95	45-65	35	4-8	2-7
Pps (%)	3-6	15-20	30	18-24	26-32
CL (%)	1-3	4-8	35	6-8	3-5
CE (%)	2-4	5		45-50	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, %: porcentaje peso seco, Tg: Triglicéridos, Pps: Fosfolípidos, CL: Colesterol libre, CE: Colesterol esterificado.

## Lipoproteínas de alta densidad

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL; por sus siglas en inglés, high density lipoprotein) son las lipoproteínas más pequeñas, de mayor densidad de flotación en comparación con el resto de las lipoproteínas, tienen diámetros hidrodinámicos que varían entre los 5 y 13 nm, son partículas esféricas o discoidales.

La fracción proteínica de las HDL puede estar compuesta por diversas apolipoproteínas (cuadro 2), la apo A-I, es la apolipoproteína más abundante en la partícula, representa hasta un 70% de su proteína constitutiva.

**Cuadro 2.** Características fisicoquímicas de las apolipoproteínas (3).

Apo	PM. (Daltons)	pl	Localización	SS	CP. (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibe la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III <sub>0,1,2</sub>	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E <sub>2,3,4</sub>	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Apo: Apolipoproteínas, P.M: Peso molecular, pl: Punto isoeléctrico, SS: Sitio de síntesis, C.P: Concentración plasmática, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, Lp: Lipoproteína, LCAT: Lecitina colesterol acilo-transferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática, Tg: Triglicéridos.

Las diferentes apolipoproteínas confieren estructura a las HDL, promueven la interacción con enzimas y proteínas extracelulares, así como la interacción con membranas por medio de receptores.

Diferencias cuantitativas y cualitativas en el contenido de lípidos, apolipoproteínas, enzimas y proteínas de transferencia de lípidos resultan en diferentes subpoblaciones de lipoproteínas de alta densidad, que son caracterizadas por forma, tamaño, densidad, y carga. La diferenciación de las HDL se presenta como

una necesidad porque su actividad biológica es dependiente de su tamaño y características fisicoquímicas (4).

En este contexto, se han desarrollado diferentes técnicas de separación de las subpoblaciones de HDL, pueden ser separadas mediante ultracentrifugación secuencial y zonal, métodos químicos de precipitación como el de heparina-manganeso, o electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en una o dos dimensiones. Asimismo, se pueden estimar por espectroscopia de resonancia magnética nuclear en plasma completo.

De acuerdo al método de separación de las HDL, se han descrito diferentes clasificaciones, que a continuación se describen:

**Ultracentrifugación.** Por este método las HDL se separan por su densidad, y se agrupan en dos subpoblaciones, las HDL2 con una densidad entre 1.063 y 1.125 g/mL y las HDL3 con una densidad entre 1.125 y 1.210 g/mL.

**Métodos químicos.** Se basan en precipitar selectivamente por interacción de poli-aniones, y cationes divalentes, a las lipoproteínas que contienen apo B para formar complejos insolubles que pueden ser sedimentados por centrifugación a baja velocidad, obteniendo una solución del sobrenadante con lipoproteínas que presentan apo A-I. El método puede ser selectivo y bajo ciertas condiciones de concentración del polianión y el ión divalente, permite la separación de HDL2 y HDL3.

**Resonancia magnética nuclear (RMN).** La determinación de tamaños de HDL se establece por el desplazamiento químico de los núcleos de iones hidrógeno de los grupos metilo terminales pertenecientes a las cadenas alifáticas de fosfolípidos y triglicéridos (0.7 a 0.9 ppm). El registro obtenido es analizado por integración del área bajo la curva en los intervalos establecidos experimentalmente para cada subpoblación después de una deconvolución matemática del pico correspondiente. El método por RMN se calibra con la electroforesis en condiciones nativas (5). Este método permite clasificar a las HDL en pequeñas (7.3 a 8.2 nm), medianas (8.2 a 8.8 nm) y grandes (8.8 a 13nm) (6, 7).

**Electroforesis.** Cuando una molécula con carga es sometida a un campo eléctrico, ésta migrará a una velocidad que dependerá del tamaño, carga neta, forma y viscosidad del medio en el cual se mueve (8). Para la separación de lipoproteínas el soporte más utilizado es una matriz polimerizada de acrilamida y N,N-metil-bis-acrilamida (PAGE), usando como iniciador de la reacción tetrametilenamida (TEMED) y como catalizador persulfato de amonio; este tipo de gel es mecánicamente fuerte, termoestable y



químicamente inerte. El efecto tamiz aumenta la resolución y puede graduarse fácilmente el tamaño del poro, modificando las cantidades de agente de soporte.

Existen varios tipos de electroforesis que se utilizan para la separación de HDL, por ejemplo:

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida en 2 dimensiones.** En este método la muestra es separada inicialmente en un gel de agarosa (primera dimensión). Al término de la separación, se colocan en un gel de gradiente 2-30% de poliacrilamida en condiciones nativas (segunda dimensión), separando a las HDL por su diámetro hidrodinámico. Este método permite la clasificación de las HDL en partículas pre-beta y partículas alfa.
- **Electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas.** Se utiliza un gel de poliacrilamida en gradiente 3-30%, en el que se separan las HDL por su tamaño de partícula. Una vez separadas, las lipoproteínas pueden ser identificadas por: a) su capacidad de captación de un colorante con especificidad media como el Negro Sudán o el Azul de Coomasie; b) el desarrollo de color mediante reacciones enzimáticas específicas.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente 3-30% en condiciones nativas (PAGE), permite una subclasificación de las partículas de HDL en HDL2b (10.58-12.36 nm), HDL2a (9.94-10.58 nm), HDL3a (8.98- 9.94 nm), HDL3b (8.45-8.98 nm), HDL3c (7.9-8.45 nm) en orden decreciente de tamaño (9, 10). La proporción relativa de cada subpoblación de HDL se puede determinar a través de densitometría óptica.

Los métodos existentes para la determinación de subpoblaciones de HDL son sumamente laboriosos o requieren de equipos altamente especializados y costosos que no justifican la inversión; ambos factores han hecho inviable la determinación de las subpoblaciones de HDL en la práctica clínica, a pesar de las bondades que tiene esta determinación en la evaluación del riesgo cardiovascular y de diabetes mellitus (DM) como se detalla más adelante.

El uso de la técnica anterior en combinación con el método enzimático previamente desarrollado en nuestro laboratorio (10), y el análisis densitométrico se ha empleado en la caracterización y estimación de cada una de las diferentes subpoblaciones de HDL en este trabajo.

## **Metabolismo intravascular de las HDL: el transporte reverso de colesterol**

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso de colesterol excedente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclamiento (figura 2).

La biosíntesis de las HDL inicia con la síntesis hepática y secreción de la apo A-I al sistema vascular, la cual se asocia fácilmente con fosfolípidos generando una estructura discoidal denominada partículas pre- $\beta$ 1 que son muy ávidas por el colesterol excedente de las células periféricas (11), primera etapa del transporte reverso de colesterol.

El siguiente paso en el TRC es el eflujo de colesterol de las células hacia las HDL, principalmente de tipo pre- $\beta$ 1; se lleva a cabo en mayor proporción por medio de una proteína de membrana denominada ABCA-1 (transportador de membrana dependiente de ATP clase A tipo 1), que utiliza ATP para bombear colesterol y fosfolípidos hacia las HDL ubicadas en el exterior de la célula (12).

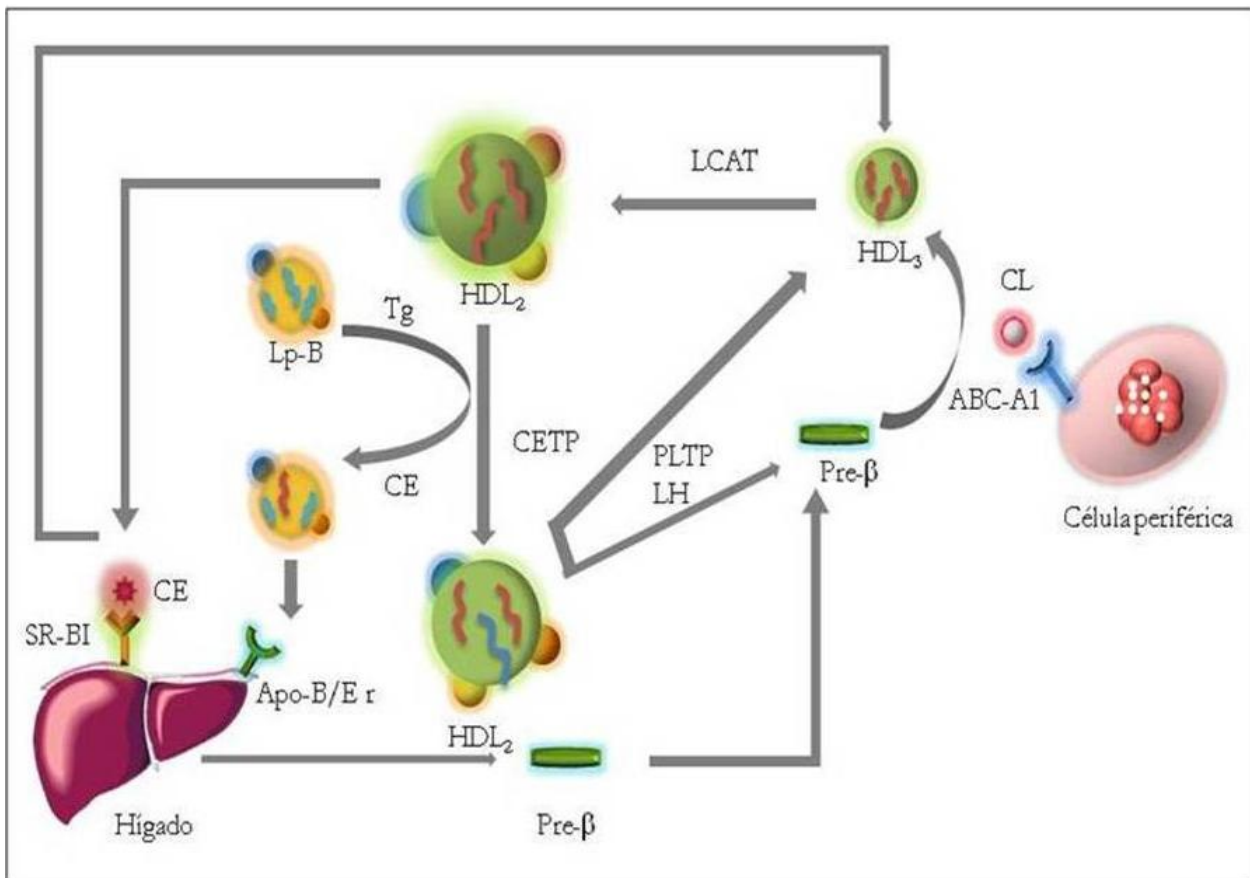
La apo A-I además de su función estructural es indispensable para el eflujo de colesterol de las células periféricas. La apo A-I también desempeña la función de factor proteínico para la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), enzima clave en el TRC (13).

Después del eflujo, el colesterol captado por las HDL tipo pre- $\beta$ 1 es esterificado por la enzima plasmática LCAT (cuadro 4). Esta esterificación provoca que el colesterol pierda su carácter anfipático, abandonando la superficie de la lipoproteína para situarse en el interior de la partícula, aumentando el tamaño de la misma.

Una vez esterificado el colesterol por la LCAT, éste puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen apo B, y estas lipoproteínas pueden ser eliminadas del compartimiento plasmático por medio del receptor apo B/E. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) (cuadro 4). Esta ruta de eliminación del colesterol se ha considerado como proaterogénica porque favorece la llegada de colesterol a las LDL. En contraste, existe otra alternativa para la eliminación de los ésteres de colesterol de las HDL, el receptor hepático SR-BI. Este receptor, capta e internaliza hacia el citoplasma a las partículas HDL, eliminando así los ésteres de colesterol y reciclando al exterior del hepatocito el resto de la partícula. La partícula reciclada es una HDL más pequeña (14).

Continuando con el TRC, los triglicéridos intercambiados a las HDL son hidrolizados por la lipasa hepática (LH). Esta hidrólisis, en sinergia con la actividad de la proteína de transporte de fosfolípidos (PLTP),

disminuye el tamaño de las HDL<sub>2</sub> transformándolas en HDL<sub>3</sub> y en partículas pre-β1 que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol.



**Figura 2.** Transporte reverso de colesterol. Muestra las enzimas y receptores participantes en el TRC. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL, Qm), Tg: Triglicéridos, CE: Colesterol esterificado, CL: Colesterol libre LCAT: Lecitina colesterol acilo-transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLPT: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger BI; Apo B/E r: receptor para lipoproteínas que contienen apo B/ E; ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1 (11).

**Cuadro 3.** Enzimas, proteínas de transporte y de membrana que participan en el TRC (15, 16)

Nombre	Función	Origen
<b>LCAT</b>	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre presente en las HDL y LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
<b>LH</b>	Hidroliza los Tg y Pps de HDL, IDL y LDL. Es cofactor del SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
<b>LPL</b>	Hidroliza los Tg de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón
<b>CETP</b>	Intercambia ésteres de colesterol por Tg entre las HDL <sub>2</sub> y lipoproteínas que contienen apo B.	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado
<b>PLPT</b>	Transferencia de Pps entre LRTG y HDL. Remodelación de las HDL.	Hígado y endotelio
<b>Receptores y proteínas de membrana</b>		
<b>SR-BI</b>	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células.	Hepatocitos, macrófagos
<b>ABCA-1</b>	Modula el eflujo de colesterol y Pps. Favorece la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos, intestino

LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoproteica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLPT: Proteína de transferencia de fosfolípidos; LRTG: Lipoproteínas ricas en triglicéridos; SR-BI: Receptor scavenger BI; ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1; Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Tg: Triglicéridos, Pps: Fosfolípidos.

### Actividad antiinflamatoria de las HDL

Varias proteínas y lípidos asociados a las HDL contribuyen con la actividad antiinflamatoria de estas partículas. Por ejemplo, la paraoxonasa (PON1) es capaz de prevenir la lipoperoxidación que inducen la liberación de moléculas proinflamatorias como la IL-8. (17). La apo A-I por su parte reduce también el efecto proinflamatorio de los lípidos oxidados (18), la lipoproteína en su conjunto también es capaz de secuestrar los productos de oxidación lipídica reduciendo su capacidad proinflamatoria (18). La capacidad antiinflamatoria relacionada con el poder antioxidante se ha atribuido principalmente a la subpoblación

de HDL pequeñas HDL3 (19). Por otra parte, se ha demostrado que las HDL son capaces de regular en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (20), moléculas involucradas en la interacción leucocito-endotelio característico de los procesos inflamatorios. Cuando se induce un proceso oxidativo en un cocultivo de células endoteliales y de músculo liso vascular, ambos tipos celulares secretan la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Dicho efecto, se inhibe casi en su totalidad por adición de HDL a las células (21).

Durante los procesos inflamatorios, la estructura de las HDL es anormal y pueden perder su capacidad protectora (18). En estas circunstancias, las HDL pueden asociarse con proteínas como la mieloperoxidasa que inhiben la capacidad de las HDL de promover el eflujo de colesterol y las transforma en moléculas proinflamatorias (17, 22-24). La transformación de las HDL en moléculas proinflamatorias, no se refleja en los niveles de colesterol-HDL (C-HDL) en plasma, ya que éstos permanecen constantes (25).

En este sentido, se ha demostrado que cuando se enriquecen las HDL con triglicéridos por infusión endovenosa de una emulsión de grasa, las HDL pierden la capacidad de regular la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 (26).

Como se describió previamente, las HDL tienen propiedades antiinflamatorias que pueden perder durante diversos procesos fisiopatológicos, afectando la estructura de estas lipoproteínas. Así, la distribución de tamaños de HDL también puede ser de utilidad en la evaluación de enfermedades inflamatorias con disfunción endotelial como la arteritis de Takayasu (27). Sin embargo, se desconoce si las HDL se afectan durante el asma, situación que se caracteriza por ser un desorden inflamatorio crónico en las vías aéreas.

A pesar de que la determinación de los tamaños de las HDL puede ser de gran utilidad en la evaluación precoz del riesgo cardiovascular, existe una controversia acerca de cuál subpoblación de las HDL es más antiaterogénica.

Se ha demostrado que cuando se induce un incremento en la tasa de producción de la apo A-I se generan HDL pequeñas tipo 3b y 3c (14, 28). No obstante, esta explicación no es aplicable a la presencia de HDL pequeñas características de la resistencia a la insulina, ya que se ha demostrado que en esta circunstancia fisiopatológica la síntesis de apo A-I no se incrementa (29, 30). Por lo anterior, proponemos

que la interpretación de los tamaños de las HDL debe ser acompañada de la etiología que da origen a una distribución de tamaños HDL anormal.

## **Obesidad**

La obesidad se define como el exceso de grasa acumulada en el organismo que afecta a la salud (31). La causa fundamental es un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, se relaciona con un estilo de vida sedentario donde hay una inadecuada alimentación y disminución de la actividad física. La obesidad se asocia a varias de las principales causas de muerte en el país, como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares entre otras, debido a esto la obesidad se asocia a casi 50,000 muertes anuales, constituyendo el principal riesgo de muerte prematura en la población mexicana (32).

En México, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT), la prevalencia de obesidad entre las edades de 5 a 11 años fue de 11.3% en niños y 10.3% en niñas (33). En general la prevalencia combinada de obesidad y sobrepeso es alta para población mexicana, se presenta en uno de cada cuatro niños (26%), mientras que uno de cada tres adolescentes la padece (31%). El sobrepeso y la obesidad han aumentado en todas las edades, regiones y grupos socioeconómicos, lo que ha llevado a nuestro país a ocupar el segundo lugar en obesidad en adultos y el primer lugar en obesidad infantil a nivel mundial (34).

La obesidad es un factor de riesgo para la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) (35), y se asocia con un perfil de lípidos aterogénico, esto es, concentraciones plasmáticas de colesterol de HDL (C-HDL) bajas y concentraciones plasmáticas de triglicéridos altas (36). En este contexto, diversos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación negativa entre el C-HDL y el desarrollo de enfermedad aterosclerosa coronaria (37). Esta relación causal entre la concentración plasmática de C-HDL y EAC ha sido explicada por el papel que juega en el TRC, así como por las propiedades potencialmente antiaterogénicas que presentan las HDL, tipo anti-oxidativas, anti-agregatorias, anti-coagulantes, profibrinolíticas y antiinflamatorias (38). Sin embargo, se ha sugerido que dichas propiedades antiaterogénicas dependen de la estructura de las HDL (6, 9, 11, 27, 29).

## **Subpoblaciones de HDL en la obesidad**

Diversos estudios han reportado alteraciones en la distribución de subpoblaciones de HDL que pueden ser utilizados como un mejor marcador de riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular que la

concentración plasmática de C-HDL. La mayoría de los trabajos en este ámbito se han realizado en adultos y muy pocos en población pediátrica, pero las alteraciones en los tamaños de HDL en los pacientes con obesidad se presentan desde la infancia. De esta manera la caracterización de subpoblaciones de HDL, en pacientes con alto riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) desde temprana edad, permitiría establecer una estrategia de prevención en pacientes que lo requieran.

Como ya se mencionó anteriormente la obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, así como para el desarrollo de DMT2. La caracterización de las subpoblaciones de HDL puede ser utilizada como un método de diagnóstico en la práctica clínica:

- A. En sujetos obesos se ha encontrado un cambio hacia HDL pequeñas cuando se incrementa el IMC y los triglicéridos (39).
- B. En mujeres obesas con diabetes, se ha encontrado una menor cantidad de partículas pequeñas de HDL y cantidades elevadas de partículas grandes de VLDL (40).
- C. Los pacientes prediabéticos, se caracterizan por tener una mayor cantidad de HDL pequeñas y una menor cantidad de HDL grandes. Las HDL pequeñas se han considerado un factor de riesgo independiente para el desarrollo de DMT2 (6).
- D. En nuestro laboratorio se han realizado estudios en pacientes pediátricos con DMT2 y síndrome metabólico confirmando las alteraciones encontradas en pacientes adultos; todos comparten el mismo perfil de tener una concentración plasmática baja de C-HDL, una menor cantidad de partículas grandes de HDL y una mayor cantidad de partículas pequeñas (29, 41).

## **Asma**

El asma es un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas con la participación de muchas células y elementos de ellas (células cebadas, eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T, macrófagos y células epiteliales) que originan episodios recurrentes de tos de predominio nocturno, sibilancias, dificultad respiratoria y sensación de opresión torácica. Estos síntomas se asocian generalmente con una extensa pero variable obstrucción bronquial, que es a menudo reversible espontáneamente o con tratamiento (42, 43). Con relación al asma en la edad pediátrica la prevalencia varía ampliamente a escala mundial; incluso en nuestro país, por ejemplo en Mérida, Tabasco y Ciudad Victoria, se presenta un alto porcentaje de

escolares (12%), mientras que en el norte del Distrito Federal se presenta en 9.9% de los adolescentes y en 8.5% de los escolares (43, 44).

## **Relación obesidad y asma**

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica y el incremento en la función del tejido adiposo en los sujetos obesos conlleva a un estado inflamatorio sistémico en el que las concentraciones séricas de citocinas, de fracciones solubles de sus receptores y de quimiocinas se encuentran aumentadas (45). La mayoría de estas sustancias son sintetizadas y secretadas por células del tejido adiposo y se les ha dado el nombre genérico de adipocinas; se incluyen en este grupo a la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-10 (IL-10), la eotaxina, el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1), la proteína C reactiva (PCR), la leptina y la adiponectina.

El TNF se encuentra en los adipocitos, se relaciona directamente con la grasa corporal, se eleva en el asma y está relacionado con la producción de citocinas de los linfocitos TH<sub>2</sub> (IL-4, IL-6) en el epitelio bronquial. Los niveles séricos de IL-6 están elevados en sujetos obesos y se asocian con la gravedad del asma (46).

La liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los adipocitos podría contribuir a incrementar la incidencia y prevalencia de la enfermedad asmática.

De esta manera, se puede postular que el estado inflamatorio inherente al paciente asmático agrave las alteraciones en la distribución de tamaños de las HDL que se han descrito previamente. Sin embargo, se desconoce si esta posible relación entre inflamación y alteraciones de las HDL existe en el paciente pediátrico con asma.



# Justificación

---

La encuesta nacional de salud del año 2006 mostró que en escolares de 5 a 12 años, el sobrepeso y la obesidad afectan al 26% de la población de esta edad. Lo anterior indica que la obesidad en niños y comorbilidades, como el asma, son un problema de salud en nuestro país. A pesar de que se ha demostrado que las subpoblaciones de HDL se modifican en un entorno de resistencia a la insulina, es posible que existan alteraciones estructurales de las HDL adicionales y características del proceso de asma.

La mayoría de los trabajos de caracterización de las subpoblaciones de HDL se han realizado en adultos y muy pocos en población pediátrica. Sin embargo, las alteraciones en los tamaños de HDL en los pacientes con obesidad se presentan desde la infancia, de ahí la importancia de la caracterización de subpoblaciones de HDL, en pacientes con alto riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) desde temprana edad, para poder establecer una estrategia de prevención en pacientes que lo requieran.

El presente trabajo incluye como población de estudio pacientes pediátricos con obesidad; para determinar si la presencia de las HDL pequeñas en pacientes con obesidad se altera con un proceso inflamatorio concurrente, lo que es fundamental para comprender el significado clínico de las subpoblaciones de HDL. Estas observaciones contribuirán a definir si la determinación de los tamaños de HDL puede ser una herramienta diagnóstica, incluso de mayor utilidad que la determinación del C-HDL plasmático como predictor de enfermedad cardiovascular.

# Hipótesis

---

Los pacientes que presentan un estado inflamatorio sistémico (obesidad) presentarán un desplazamiento de la distribución de las subpoblaciones de HDL hacia partículas pequeñas en comparación con los pacientes eutróficos, y tal desplazamiento será exacerbado por el asma.

# Objetivo

---

Caracterizar la distribución de las subpoblaciones de HDL por su contenido de lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) y la concentración plasmática de lípidos HDL en pacientes pediátricos que presentan un estado inflamatorio debido a la presencia de obesidad y/o asma.

## **Objetivos particulares**

- Comparar el método de determinación de las subpoblaciones de HDL utilizando lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación contra plasma total del mismo paciente, en una electroforesis en condiciones nativas en gel de poliacrilamida en gradiente.
- Caracterizar la distribución de tamaños de HDL, por colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en un grupo de pacientes pediátricos con diferentes características fisiopatológicas (obesos con asma, obesos sin asma, eutróficos con asma y eutróficos sin asma)

# Material y métodos

---

## Muestras

Este trabajo se realizó en dos etapas: en la primera se estandarizó el método de separación y caracterización de las subpoblaciones de HDL, utilizando plasma de sujetos sanos y patológicos (A) como muestra en lugar de HDL aisladas. Una vez establecidas las condiciones del método de trabajo, se realizó la caracterización de las subpoblaciones de HDL utilizando plasma de un segundo grupo de pacientes (B).

- A. El primer grupo incluye veinticinco sujetos con diversas alteraciones metabólicas. Se incluyeron diez pacientes pediátricos con diagnóstico de síndrome metabólico, cuatro pacientes pediátricos con obesidad y asma, seis pacientes con hipercolesterolemia familiar y cinco sujetos sanos. Las muestras de los pacientes pediátricos con síndrome metabólico se tomaron en la clínica de obesidad infantil ISSSTE, Hospital Regional Licenciado Adolfo López Mateos. Las muestras de los pacientes con hipercolesterolemia familiar se tomaron en el laboratorio Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
- B. El segundo grupo está conformado por ciento diecisiete pacientes pediátricos que fueron reclutados de la consulta de Alergia e Inmunología Clínica Pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y de escuelas secundarias aledañas a la zona del hospital. Se incluyeron a aquellos sujetos que cumplieran con los criterios de inclusión.

## Criterios de selección de las muestras

Se incluyeron en el estudio muestras sanguíneas de sujetos pediátricos con las siguientes características:

## Criterios de inclusión

- Firma del asentimiento y consentimiento bajo información
- Hombres y mujeres
- De 10 a 14 años de edad
- Sujetos pediátricos con obesidad (con un IMC  $\geq$  a la percentila 95 para su edad y género)
- Sujetos pediátricos eutróficos (con un IMC entre la percentila 5 y 84 para su edad y género)
- Sujetos con asma leve intermitente sin uso de esteroides inhalados

### **Criterios de exclusión:**

- Retardo mental, retraso en el desarrollo psicomotor.
- Alteraciones del sistema nervioso central (p.e. epilepsia).
- Enfermedad pulmonar (fibrosis quística, displasia broncopulmonar, tuberculosis pulmonar)
- Enfermedad cardíaca
- Endocrinopatías (hipotalámica, tiroidea, diabetes mellitus tipo 1 o 2)
- Dislipidemia: hipertrigliceridemia familiar (Tg > 300 mg/dL e historia familiar de esta) o hipercolesterolemia familiar.
- Síndrome de ovario poliquístico.
- Uso de medicamentos: vitaminas.
- Infecciones respiratorias cuatro semanas antes
- Pacientes que se encuentren bajo tratamiento de control de peso con medicamentos.
- Toxicomanías: alcoholismo, tabaquismo, o algún consumo de enervantes.

Los sujetos se clasificaron de acuerdo a la presencia de asma y a los valores de percentila de índice de masa corporal, de la siguiente manera: con percentila  $\geq 95$  pacientes con obesidad, sujetos con percentila < 85 se clasificaron como normopeso (eutróficos). Se utilizó como referencia las percentilas para niños de 5 a 17 años de edad de NHANES I (47). Según la clasificación anterior y la presencia de asma se integraron cuatro grupos de la siguiente manera: obesos con asma, obesos sin asma, eutróficos con asma y eutróficos sin asma.

### **Toma de muestra**

Se obtuvo una muestra de sangre venosa en tubos con EDTA (1.8 mg/dL) con un ayuno de 12 h, las muestras se centrifugaron a 4°C, el plasma fue separado y analizado o congelado en alícuotas a -80°C hasta su análisis.

### **Análisis de laboratorio**

La glucosa plasmática, el colesterol total y los triglicéridos fueron determinados por métodos enzimáticos colorimétricos disponibles comercialmente (Randox®, Reino Unido). Para la determinación

del colesterol-HDL, triglicéridos-HDL y fosfolípidos, se precipitó selectivamente a las lipoproteínas que contienen apo B en plasma con un reactivo de ácido fosfotúngstico/cloruro de magnesio (Randox®, Reino Unido), posteriormente en el sobrenadante, con métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Randox®, Reino Unido y Wako, Japón) se determinaron los diferentes lípidos. El colesterol LDL fue calculado por el método Friedewald modificado de DeLong.

$$\text{C-LDL} = \text{colesterol total mg/dL} - [\text{colesterol-HDL mg/dL} + (0.2 \times \text{triglicéridos mg/dL})] \quad (48).$$

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (Anexo 1). La insulina se determinó por radioinmuno análisis (RIA) con un estuche comercial (RIA Kit, Millipore, USA). La resistencia a la insulina se estimó mediante el índice HOMA (homeostasis model assessment)

$$\text{HOMA} = [(\text{glucosa en ayuno mmol/L}) \times (\text{insulina en ayuno } \mu\text{U/mL})] / 22.5 \quad (49).$$

El valor de corte utilizado para determinar la resistencia a la insulina fue de 3.8 (50).

## **Validación del método para determinar la distribución de subpoblaciones de HDL**

### **Linealidad del método y determinación del volumen óptimo de plasma**

Para determinar la cantidad óptima de plasma se probaron diferentes volúmenes de plasma con diferentes concentraciones de C-HDL. Las concentraciones que se utilizaron fueron 1, 13, 26 y 56 mg/dL y los volúmenes que se probaron fueron 5, 7, 8 y 10  $\mu\text{L}$ . Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente 3- 30% en condiciones nativas, posteriormente se construyeron las curvas de densidad óptica contra concentración de colesterol, y se determinó el volumen óptimo de plasma a utilizar en la electroforesis.

## **Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL por su contenido de colesterol utilizando plasma y HDL aisladas**

### **Aislamiento de HDL**

Las HDL se obtuvieron mediante ultracentrifugación secuencial (Beckman Optima TLX) a partir de plasma en tubos de policarbonato, ajustando la densidad a 1.063 g/mL con KBr sólido, ultracentrifugando por 2.5 h a 100000 r.p.m. con el fin de separar las lipoproteínas que contienen apo B. Al término el infranadante se ajustó nuevamente a una densidad de 1.21 g/mL con KBr sólido, se ultracentrifugó durante 3 h a 100000 r.p.m. para aislar las HDL, y por último se ajustó el sobrenadante a una densidad de 1.25 g/mL con KBr sólido y se ultracentrifugó por 3 h a 100000 r.p.m. Bajo estas condiciones se recuperó de 80 a 85% de la apo A-I total del plasma. Las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH 8.4 (solución amortiguadora TBE).

### **HDL aisladas**

Para las muestras de HDL se cuantificó la cantidad de 20 µg de proteína por el método de Lowry (anexo 1); a esta cantidad se le agregó amortiguador de muestra (sacarosa 50% -azul de bromofenol 0.05%, en solución TBE) en una relación 1 µL/ 10 µg de proteína.

### **Plasma**

Una vez establecida las condiciones óptimas para la electroforesis, las muestras se prepararon de la siguiente manera: 7 µL de plasma más 3 µL de amortiguador de muestra.

### **Electroforesis en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas**

Los geles de poliacrilamida se prepararon con un gradiente 3- 30% en condiciones nativas (anexo 2).

Las muestras se corrieron a 90 V durante 30 minutos posteriormente se aumentó el voltaje a 180 V durante 22 h. Al término del tiempo de la electroforesis los geles fueron teñidos por colesterol de acuerdo al método que se describe posteriormente.

Los geles fueron puestos en contacto con la mezcla de reacción (anexo 3) durante 30 minutos en oscuridad a 37 °C, posteriormente fue retirado el exceso de la mezcla de reacción, a continuación fueron

analizados por densitometría óptica en un densitómetro GS-670 BioRad (escaneo 1). Los geles fueron desteñidos con una mezcla metanol: ácido acético: agua (5: 2: 13: v: v: v; decolorante para geles), y posteriormente se volvieron a teñir para hacer evidente la proteína con una solución de colorante azul de Coomassie R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua destilada, y finalmente fueron analizados por segunda vez en el densitómetro GS-670 (escaneo 2).

### **Análisis densitométrico**

El diámetro hidrodinámico de las subpoblaciones de HDL se estimó usando como referencia proteínas globulares; tiroglobulina, 17nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.1 nm; y albumina, 7.1 nm; estuche de marcadores de alto peso molecular (GE healthcare, Reino Unido). De esta manera se determinó la proporción relativa de cada subpoblación de HDL mediante densitometría óptica (Molecular Analyst Software Versión 1.1 1994 BioRad), considerando los siguientes intervalos de tamaño: HDL3c, 7.9-8.45 nm; HDL3b, 8.45-8.98 nm; HDL3a, 8.98-9.94 nm; HDL2a, 9.94-10.58 nm; y HDL2b 10.58-12.36 nm (10). La proporción relativa de cada subpoblación de HDL se expresa como el porcentaje total de colesterol-HDL del área bajo la curva, integrado de 7.9 a 12.36 nm.

### **Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad y asma**

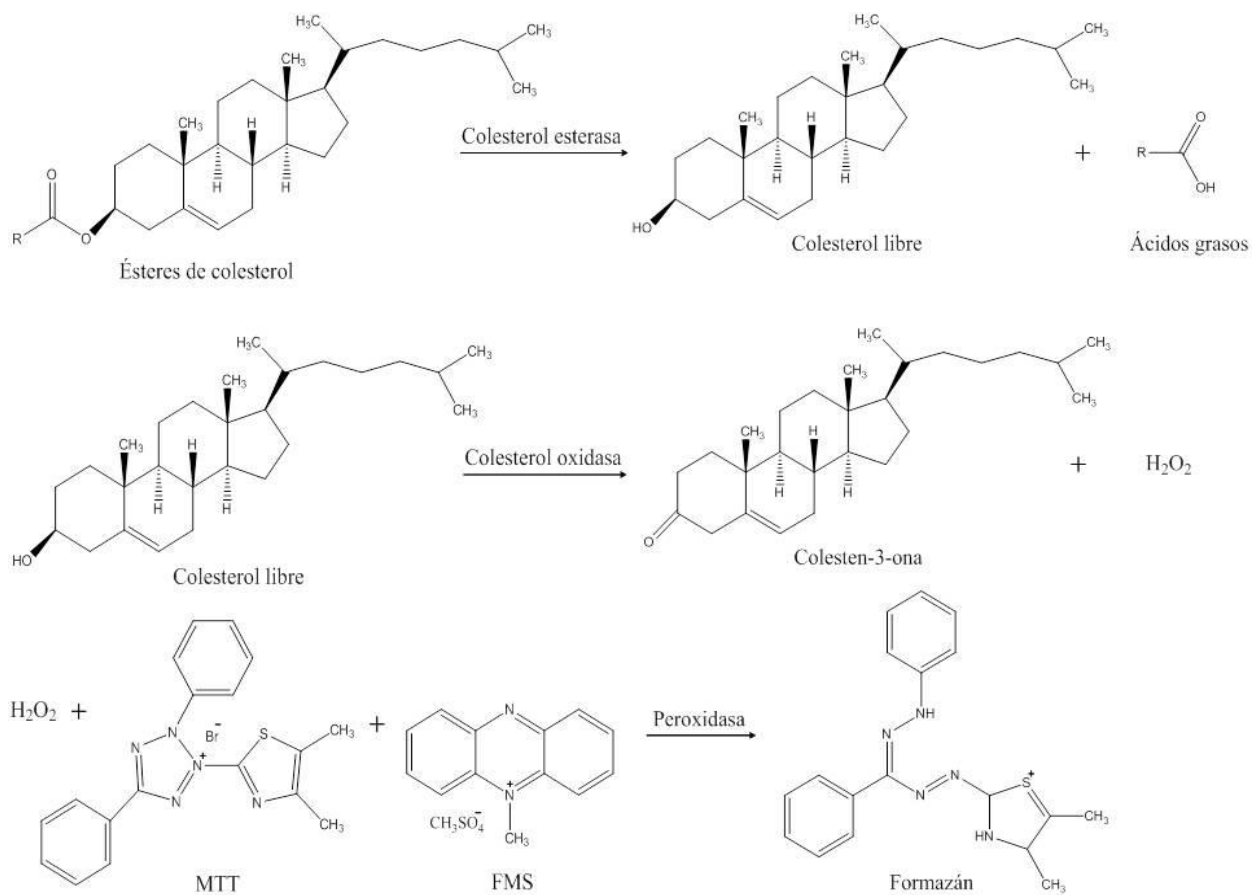
La caracterización de las subpoblaciones de HDL se realizó utilizando plasma en lugar de HDL aisladas como muestra en la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 3- 30% en condiciones nativas.

La electroforesis se realizó siguiendo el método descrito anteriormente, al término de la electroforesis los geles fueron teñidos por lípidos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) (Anexo 3), según el método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (10, 41); la tinción para cada uno de los lípidos utilizados se detalla a continuación:

Para la tinción de colesterol total se usó una mezcla enzimática que contiene colesterol oxidasa (0.05  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), peroxidasa (0.25  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), colesterol esterasa (0.075  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), colato de sodio (3mM) y Triton 100X (0.1%) para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas, carboximetilcelulosa como agente viscosante, en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4. El producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es estequiométricamente proporcional al colesterol total en la muestra, el peróxido reacciona con el azul de tetrazolium (MTT, 0.04 mM)

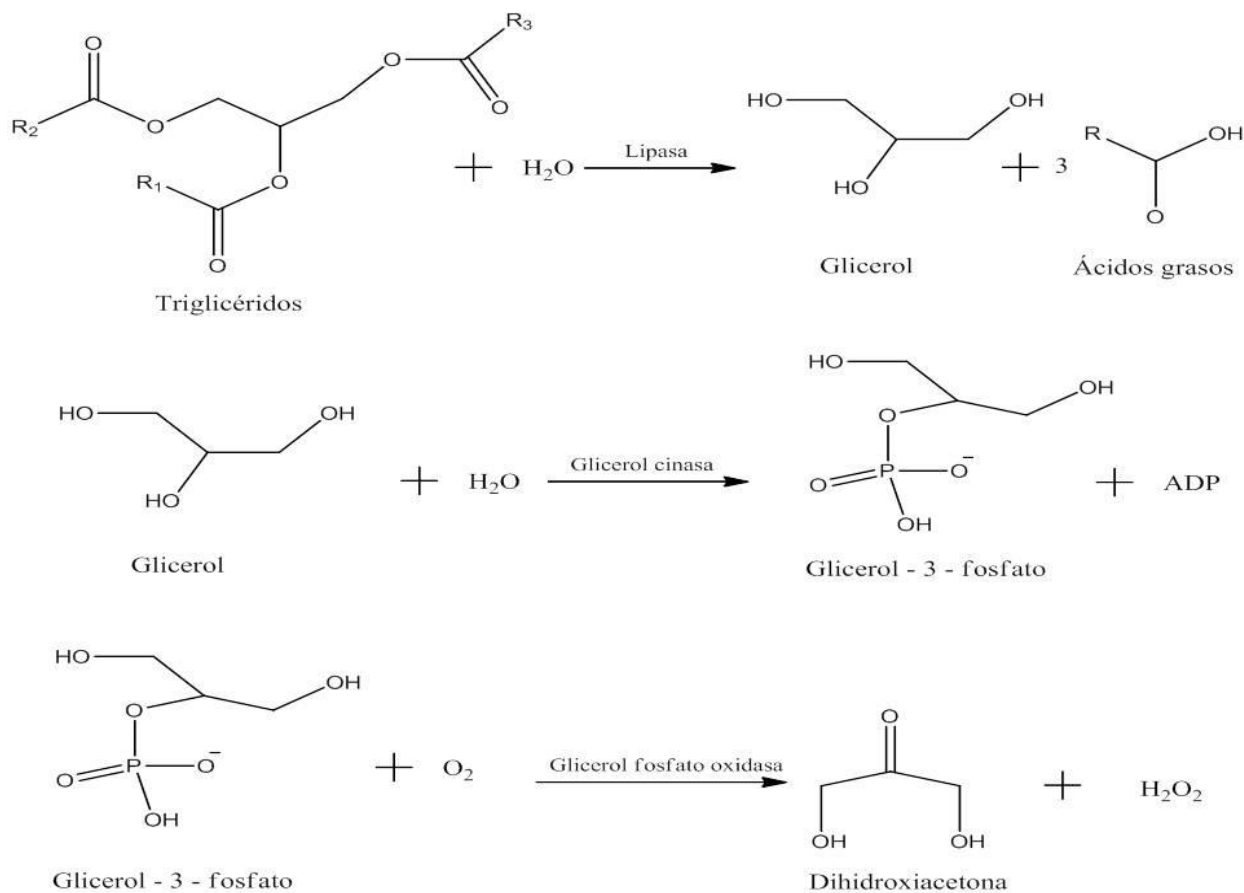


formando un producto soluble de color azul (formazán) en una reacción catalizada por la peroxidasa. El fenazin metasulfato (FMS, 0.04 mM) forma un complejo con el formazán (color azul) que precipita en el gel (51). La secuencia de reacciones se muestra en la figura 3.



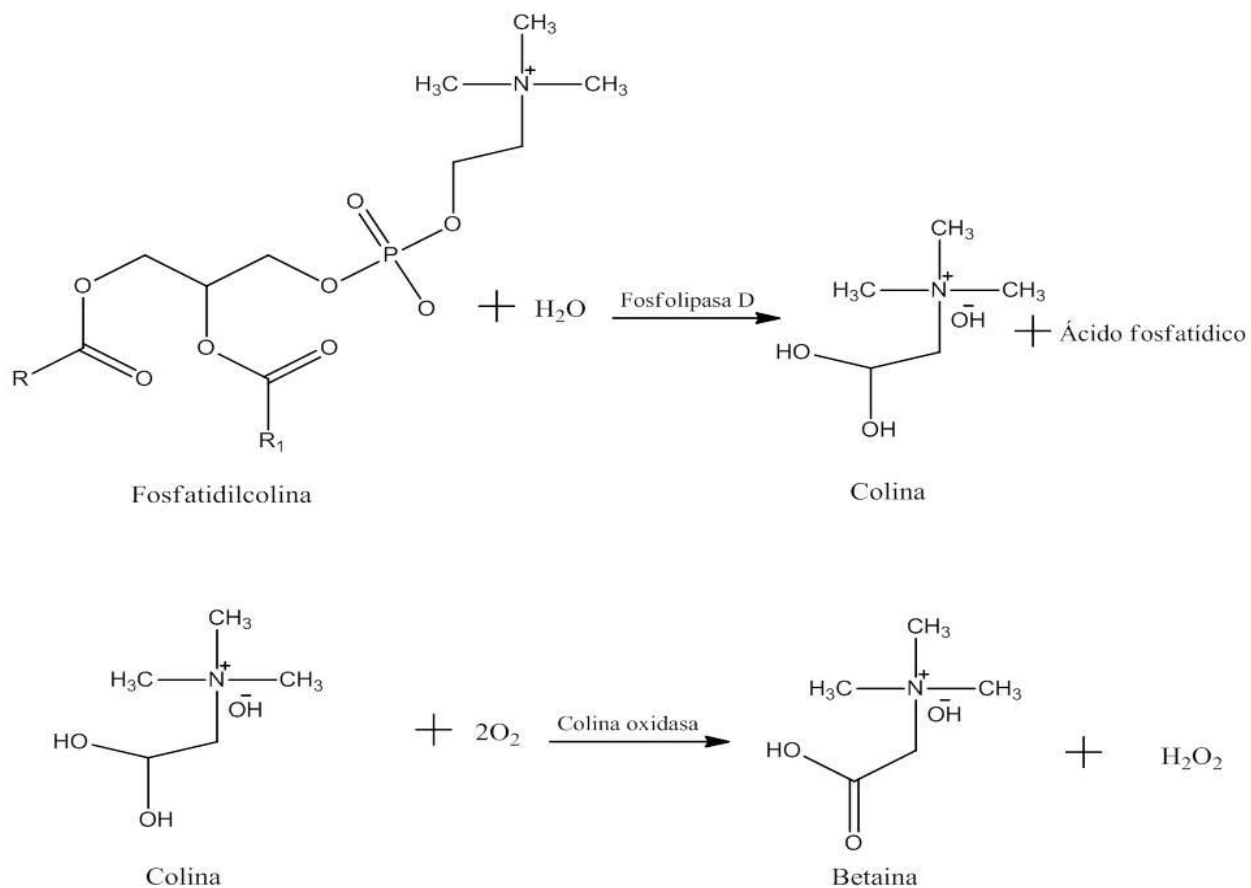
**Figura 3.** Secuencia de reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol total.

La mezcla enzimática para la tinción de triglicéridos contiene lipasa (37.5  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), glicerol cinasa (0.1  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), glicerol fosfato oxidasa (0.4  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) y peroxidasa (0.13  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4. Se agregó el agente viscosante para garantizar el contacto homogéneo de la mezcla con el gel. El producto final es puesto en evidencia al reaccionar con la peroxidasa, el MTT (0.04  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) y el FMS (0.04  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ) (52). La secuencia de reacciones se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Secuencia de reacciones enzimática para la determinación de triglicéridos.

El reactivo para la tinción de fosfatidilcolina es una mezcla enzimática que contiene fosfolipasa D (0.12  $\mu\text{U}/\text{MI}$ ), colina oxidasa (62  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), peroxidasa (1.1  $\mu\text{U}/\text{mL}$ ), en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4, colato de sodio (3mM) y Tritón 100X (0.1%), además del agente viscosante. El producto de la reacción se pone en evidencia con peroxidasa, MTT (0.04 mM) y FMS (0.04 mM) (51). La secuencia de reacciones se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Secuencia de reacciones enzimáticas para la determinación de fosfolípidos.

## **Análisis estadístico**

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc, versión 18 para Windows. Chicago Illinois). Los valores de las variables clínicas y bioquímicas se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) o mediana con rango intercuartilar (percentila 25 a la 75).

Para determinar la normalidad de los datos se realizó la prueba Smirnov- Kolmogorov. La comparación entre variables cuantitativas continuas con distribución normal se realizó mediante la prueba t pareada, y para la comparación entre grupos se realizó una ANOVA con análisis post hoc tipo DMS (Diferencia Mínima Significativa) para comparar más de dos grupos. Las variables con una distribución no normal fueron transformadas logarítmicamente para poder aplicarles las pruebas paramétricas correspondientes.

Para la comparación de variables con una distribución no normal se realizó la prueba no paramétrica correspondiente (Kruskall- Wallis, U de Mann Withney, correlación de Spearman).

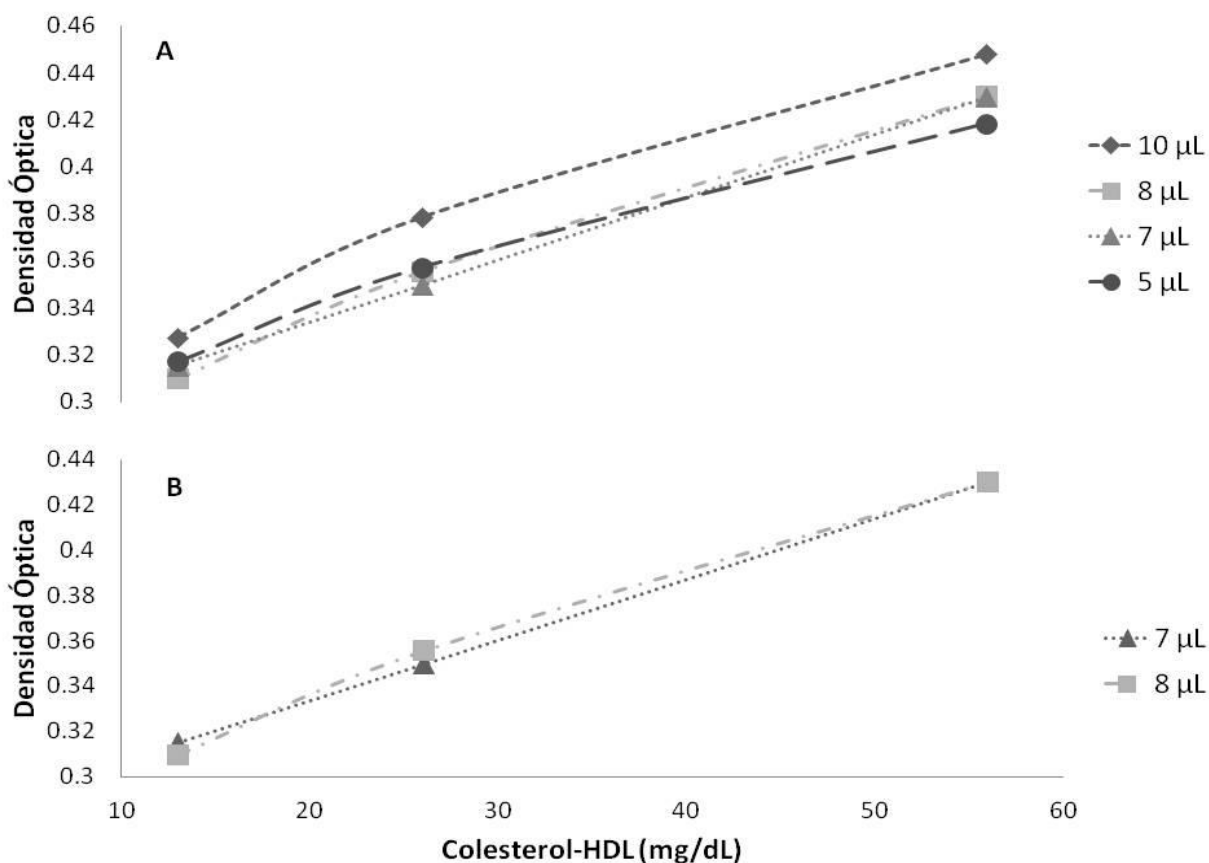
Se utilizó un análisis de correlación de Pearson para evaluar la similitud entre el tipo de muestra utilizado para el análisis de las subpoblaciones de HDL.

En todos los casos se consideró un valor de  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.

# Resultados

## Linealidad del método y determinación del volumen óptimo de plasma

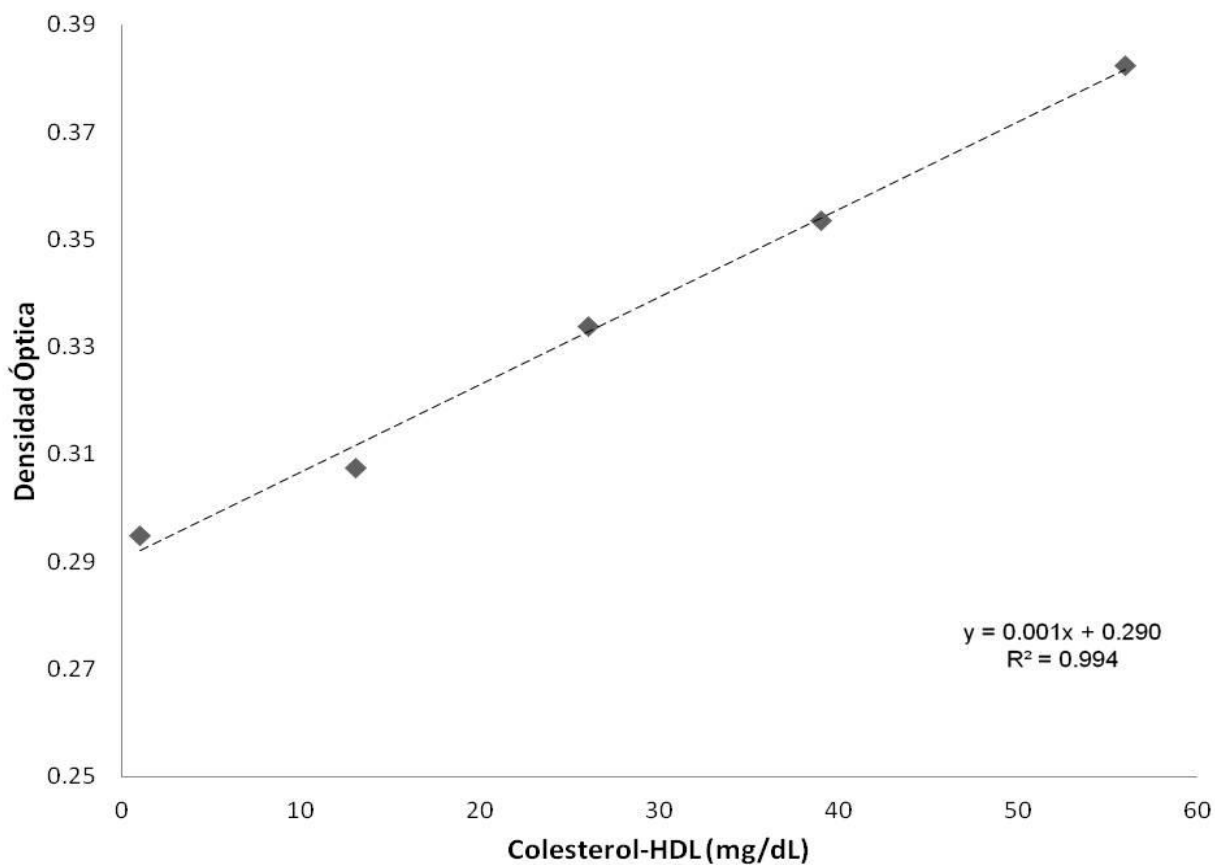
Se realizaron diferentes pruebas utilizando diferentes volúmenes de plasma en los geles para determinar la cantidad óptima de plasma. En la figura 6 se observa las curvas que se obtuvieron, siendo 7 y 8  $\mu\text{L}$  los volúmenes que muestran el comportamiento más lineal.



**Figura 6.** Curva de densidad óptica vs concentración de C-HDL. **A.** Muestra las curvas que se obtienen al utilizar  $\blacklozenge$  10  $\mu\text{L}$  de plasma,  $\blacksquare$  8  $\mu\text{L}$  de plasma,  $\blacktriangle$  7  $\mu\text{L}$  de plasma,  $\bullet$  5  $\mu\text{L}$  de plasma en concentraciones de 13, 26 y 56 mg/dL de colesterol. **B.** Muestra las curvas cuando se utiliza  $\blacktriangle$  7  $\mu\text{L}$  de plasma y  $\blacksquare$  8  $\mu\text{L}$  de plasma.

Por lo anterior, se consideró 7  $\mu\text{L}$  como el volumen óptimo de plasma a utilizar en los geles. Una vez establecida la cantidad de plasma a utilizar, se realizaron pruebas para determinar la linealidad del método; para ello se realizaron geles en los que se colocaban diferentes concentraciones de C-HDL y se graficó la densidad óptica vs concentración de C-HDL.

En la figura 7 se observa la curva que se obtiene al utilizar diferentes concentraciones de C-HDL.

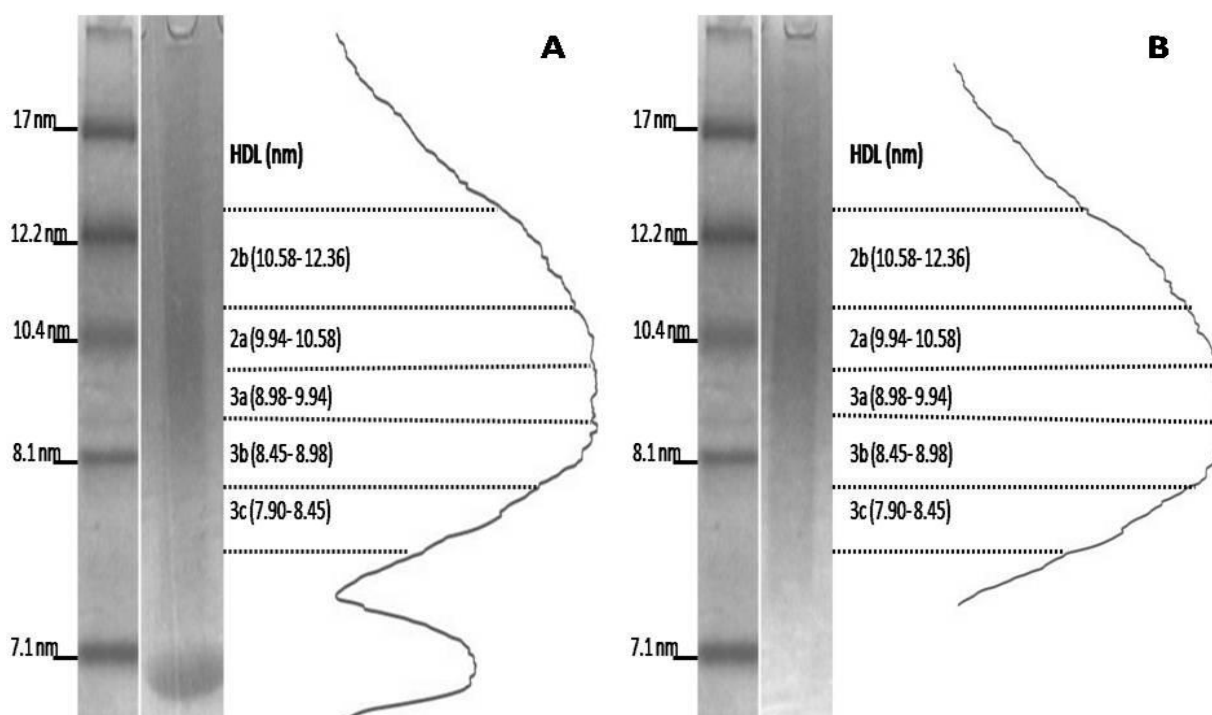


**Figura 7.** Curva de densidad óptica máxima vs concentración de C-HDL. ♦ Las concentraciones de C-HDL utilizadas fueron 1, 13, 26, 39 y 56 mg/dL.

Indicando que el método es lineal en el intervalo de concentración de 25 a 56 mg/dL de colesterol de HDL. Las muestras de los pacientes incluidos en este trabajo se encuentran en el intervalo de linealidad del método.

## Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL por su contenido de colesterol utilizando plasma y HDL aisladas

Posteriormente para evaluar si el plasma tiene el mismo comportamiento electroforético que las HDL aisladas, se realizaron geles de poliacrilamida de gradiente 3- 30% en condiciones nativas con las HDL aisladas y el plasma del mismo paciente y se obtuvieron los siguientes densitogramas (figura 8).



**Figura 8.** Curvas de densitometría óptica. **A.** Densitograma obtenido de una muestra de plasma, **B.** Densitograma obtenido de HDL aisladas, se muestran los intervalos de integración para cada subpoblación de HDL y el marcador de proteínas de alto peso molecular: tiroglobulina, apoferritina, catalasa, lactato deshidrogenasa y albumina en orden decreciente de tamaño.

La proporción relativa de la distribución de HDL según el tipo de muestra se expone en el cuadro 4. Al comparar los resultados obtenidos según el tipo de muestra utilizado, se encontró una diferencia en las HDL2b de 7.4% y en las HDL3c de 19.32%, mientras que para las subpoblaciones de 2a, 3a y 3b, no se encontraron diferencias que sean estadísticamente significativas.

**Cuadro 4.** Comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL utilizando plasma y HDL aisladas.

Subpoblación HDL	Plasma N = 25	HDL N = 25	<i>p</i>
2b (% C)	42.40 ± 12.55*	39.47 ± 10.88	0.001
2a (% C)	12.85 ± 2.83	12.74 ± 3.00	NS
3a (% C)	20.39 ± 3.68	20.20 ± 2.60	NS
3b (% C)	9.96 ± 3.87	10.41 ± 3.99	NS
3c (% C)	14.39 ± 8.39*	17.17 ± 8.90	0.005

Media ± DE. HDL= Lipoproteínas de alta densidad, C= Colesterol,  $p < 0.05$ , \* vs HDL aisladas, NS= no significativo, T de Student pareada.

El análisis de correlación de Pearson (cuadro 5), se realizó para establecer la equivalencia entre el tipo de muestra utilizada en la electroforesis. Para el caso de las HDL2b y 3b se observa una fuerte correlación positiva. En contraste, con las HDL2a, 3a y 3c tienen una correlación positiva pero inferior a las HDL2b y las HDL3b.

**Cuadro 5.** Correlación entre distribución de subpoblaciones de HDL por tipo de muestra utilizada

	HDL <sub>p</sub> 2b	HDL <sub>p</sub> 2a	HDL <sub>p</sub> 3a	HDL <sub>p</sub> 3b	HDL <sub>p</sub> 3c
	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>	<i>r</i>
HDL <sub>a</sub> 2b	0.951 <sup>†</sup>				
HDL <sub>a</sub> 2a		0.890 <sup>†</sup>			
HDL <sub>a</sub> 3a			0.773 <sup>†</sup>		
HDL <sub>a</sub> 3b				0.933 <sup>†</sup>	
HDL <sub>a</sub> 3c					0.885 <sup>†</sup>

HDL<sub>a</sub> = Subpoblaciones de lipoproteínas de alta densidad aislada por ultra centrifugación, HDL<sub>p</sub> = Subpoblaciones de lipoproteínas de alta densidad en plasma, *r*= coeficiente, <sup>†</sup>  $p < 0.001$  nivel de significado estadístico, correlación de pearson.



## Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad

Una vez establecidas las condiciones del método, se determinó la concentración plasmática de lípidos de HDL, se clasificaron a los sujetos en 2 grupos (obesos y eutróficos) para observar si existen alteraciones en la distribución de HDL por la presencia de obesidad.

Las características antropométricas y clínicas de los sujetos de estudio se presentan en el cuadro 6. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso con un aumento de 48.34%, el IMC con 47.61%, el perímetro abdominal con 28.95%, no se observan diferencias significativas en la talla, TAS y TAD entre los grupos.

**Cuadro 6.** Características antropométricas y clínicas de los sujetos de estudio.

	Obesos n= 59	Eutróficos n= 58	<i>p</i>
Peso (kg)	68.03 ± 16.38 <sup>a</sup>	45.86 ± 12.82	0.00
Talla (cm)	154.60 ± 10.48	152.77 ± 10.68	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.09 ± 4.00 <sup>a</sup>	19.30 ± 3.25	0.00
Perímetro abdominal (cm)	94.61 ± 13.03 <sup>a</sup>	73.37 ± 9.56	0.00
TAS* (mm/Hg)	110 (105-120)	106 (100-110)	NS
TAD* (mm/Hg)	70 (70-80)	70 (65.50-74.50)	NS

Media ± DE, o \* mediana (rango intercuartilar), IMC: Índice de masa corporal, TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica, *p* < 0.05, a vs eutróficos, NS: no significativo, ANOVA.

En cuanto al perfil bioquímico, la concentración de colesterol total en los sujetos con obesidad es de 8.61% más elevada que en los eutróficos. En los triglicéridos se observa un aumento considerable de 43.37% en los sujetos que presentan obesidad, la insulina en plasma de los mismos, tiene un aumento de 29.25% en comparación con los eutróficos (cuadro 7), mientras que la concentración de glucosa es similar entre ambos grupos.

**Cuadro 7.** Perfil bioquímico de los sujetos por grupo.

	Obesos n= 59	Eutróficos n= 58	<i>p</i>
Colesterol (mg/dL)	149.78 ± 32.07 <sup>a</sup>	137.90 ± 24.45	0.025
Triglicéridos (mg/dL)	131.46 ± 57.21 <sup>a</sup>	91.69 ± 38.90	0.00
Glucosa (mg/dL)	80.06 ± 13.25	80.85 ± 11.92	NS
Insulina (μU/mL)	19.00 ± 5.73 <sup>a</sup>	14.70 ± 5.88	0.00
C-LDL (mg/ dL)	87.34 ± 27.04 <sup>a</sup>	75.60 ± 22.69	0.012

Media ± DE, C-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad, *p* < 0.05, a vs eutróficos, NS: no significativo, ANOVA.

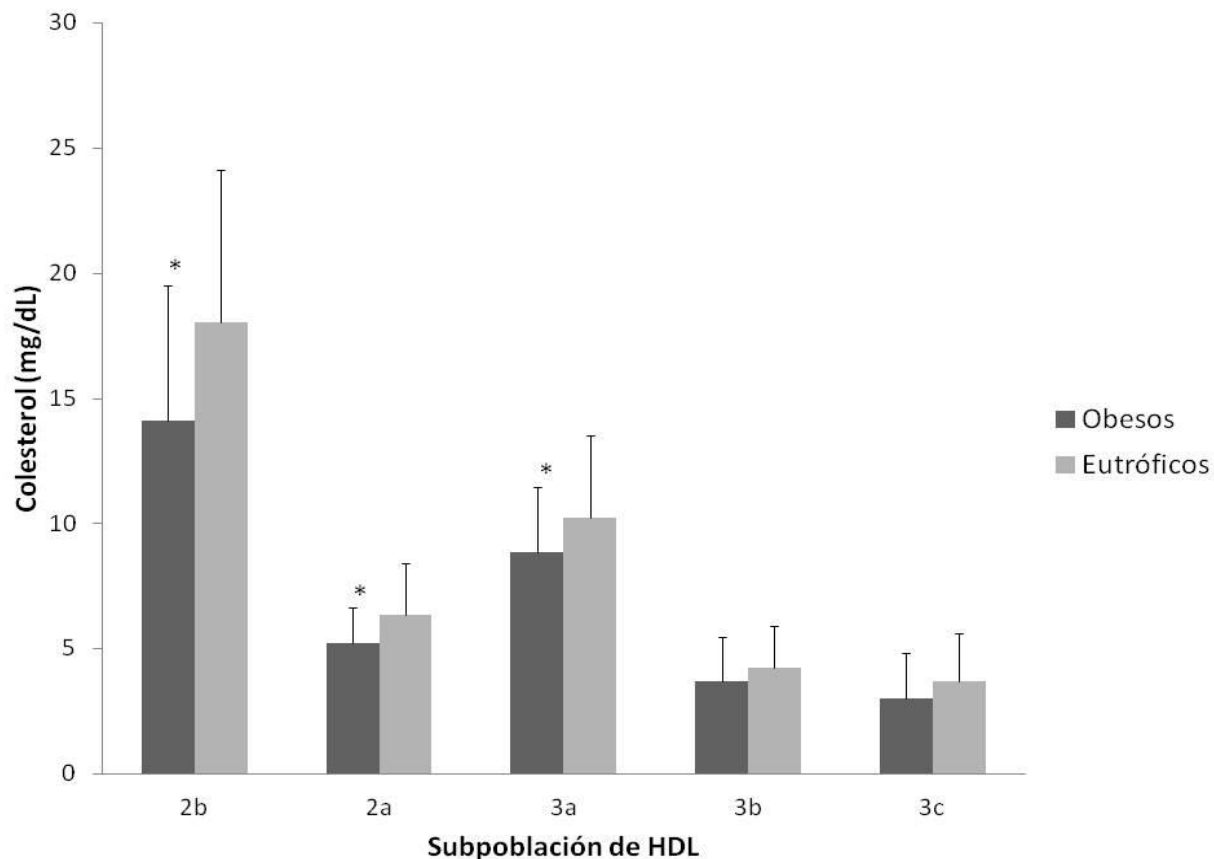
En la composición química de las HDL (cuadro 8) no hay diferencia significativa en la concentración de triglicéridos entre los dos grupos, mientras que la concentración de colesterol, fosfolípidos en los obesos se encuentra disminuida en un 17.79 y 13.98% respectivamente; el C-LDL se encuentra aumentado un 15.53% en los sujetos con obesidad.

**Cuadro 8.** Composición química de HDL por grupo.

	Obesos n= 59	Eutróficos n= 58	<i>p</i>
C (mg/ dL)	36.14 ± 8.46 <sup>a</sup>	43.96 ± 10.73	0.00
Tg (mg/ dL)	25.77 ± 9.06	24.43 ± 10.27	NS
Pps (mg/ dL)	83.26 ± 14.62 <sup>a</sup>	96.79 ± 18.34	0.00

Media ± DE, C: Colesterol, Tg: Triglicéridos, Pps: Fosfolípidos, *p* < 0.05, a vs eutróficos, NS: no significativo, ANOVA.

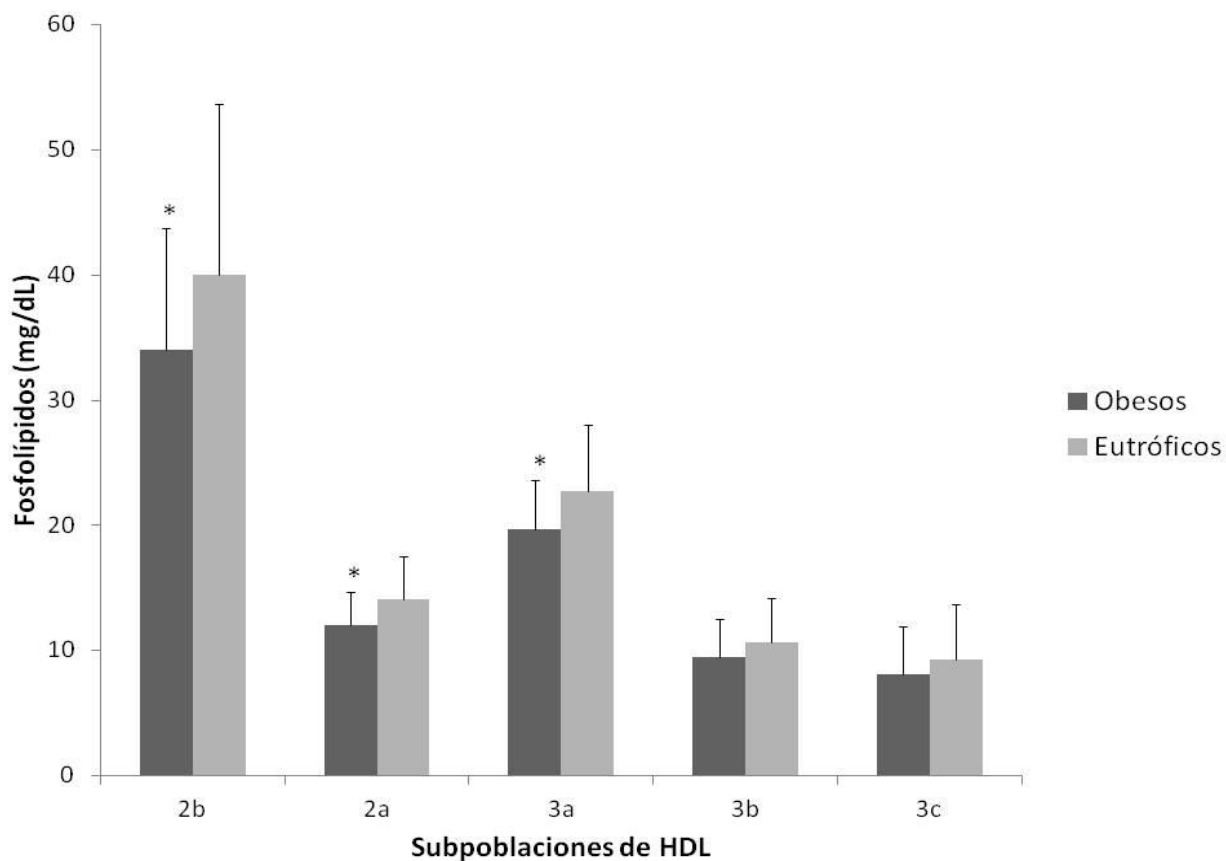
Por otra parte, en la distribución de subpoblaciones de HDL de los sujetos con obesidad, se observa una disminución en la concentración de colesterol (figura 9), la subpoblación 2b presenta una disminución de 21.76%, la 2a de 17.90% y la 3a de 13.57% con respecto a los eutróficos, no hay diferencia significativa en las subpoblaciones 3b y 3c.



**Figura 9.** Distribución de subpoblaciones de HDL por colesterol. Media  $\pm$  EE.  $p < 0.05$ , \* vs eutróficos, ANOVA.

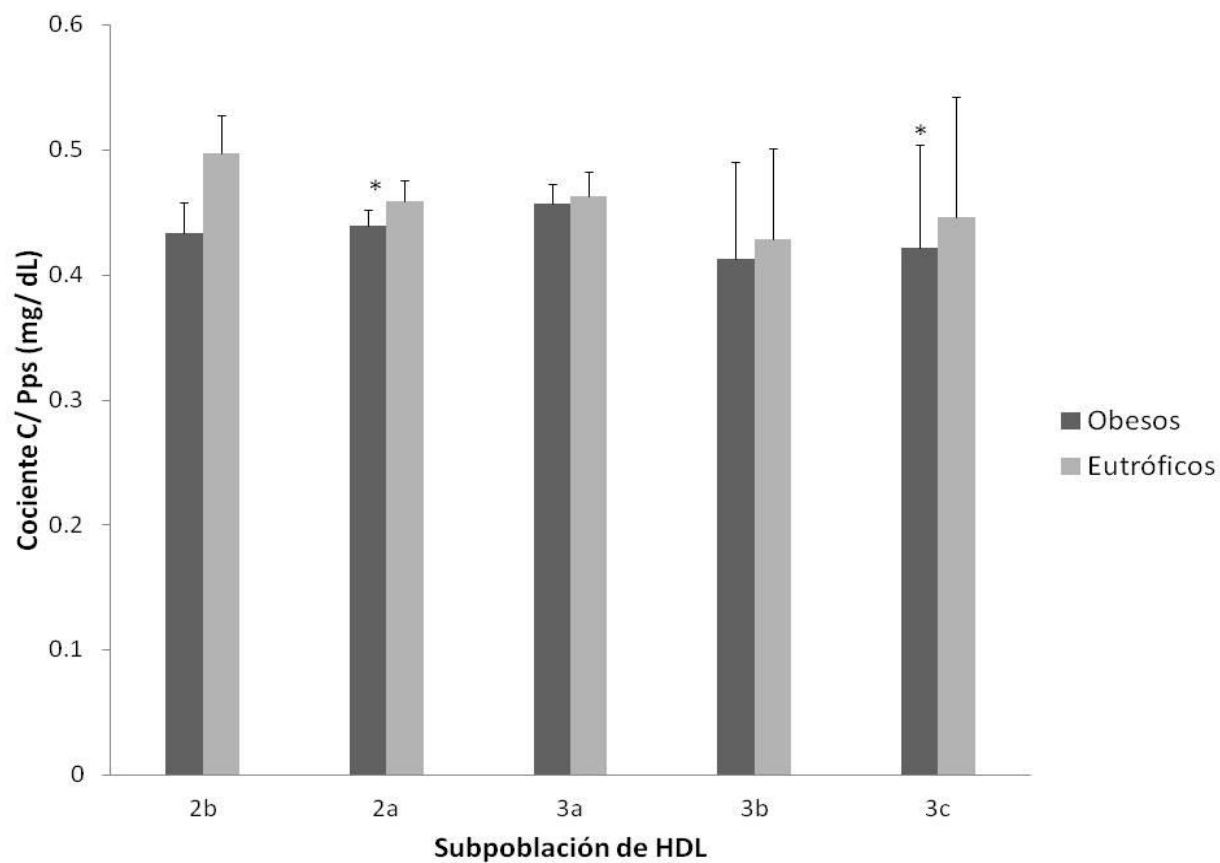
La distribución por fosfolípidos (figura 10) presenta un comportamiento similar a la distribución por colesterol, todas las subpoblaciones se encuentran disminuidas en los sujetos con obesidad; la subpoblación 2b presenta una disminución de 14.87%, la 2a un 14.73%, y la 3a 13.49%, con respecto a los eutróficos, en cuanto a la subpoblación 3b y 3c no hay cambios significativos.

La distribución de subpoblaciones de HDL por colesterol y fosfolípidos es diferente entre obesos y eutróficos, y se encuentran disminuidas las concentraciones de éstos en los sujetos que presentan obesidad.



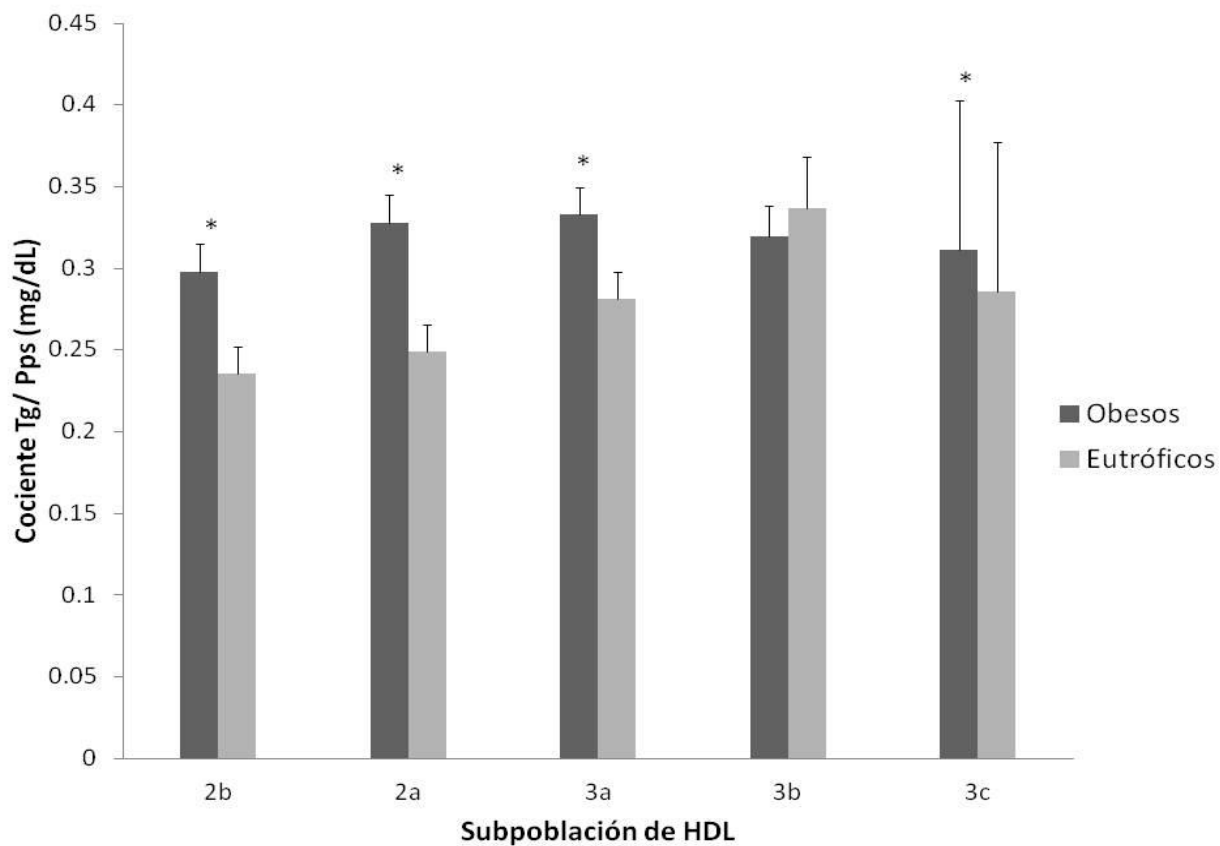
**Figura 10.** Distribución de subpoblaciones de HDL por fosfolípidos. Media  $\pm$  EE.  $p < 0.05$ , \* vs eutróficos, ANOVA.

Las concentraciones plasmáticas de los diferentes lípidos en las subpoblaciones de HDL disminuidas indican una composición anormal de las HDL probablemente a causa de la obesidad. Por lo que se calcularon los cocientes colesterol/ fosfolípidos (C/ Pps) y triglicéridos/ fosfolípidos (Tg/ Pps) para conocer la composición de las subpoblaciones de HDL en los sujetos con obesidad y los eutróficos.



**Figura 11.** Cociente colesterol/ fosfolípidos entre grupos de sujetos con obesidad y eutróficos. Media  $\pm$  EE.  $p < 0.05$ , \* vs eutróficos, ANOVA.

En el cociente C/ Pps, se observa una tendencia en los sujetos con obesidad a presentar partículas pobres en colesterol en las subpoblaciones de HDL; sin embargo solo alcanza significado estadístico en las subpoblaciones 2a y 3c.



**Figura 12.** Cociente triglicéridos/ fosfolípidos entre grupos de sujetos con obesidad y eutróficos. Media  $\pm$  EE,  $p > 0.05$ , \* vs eutróficos, ANOVA.

Para el cociente Tg/ Pps se observan cambios significativos en todas las subpoblaciones de HDL excepto en la subpoblación 3b en los obesos comparado con los eutróficos. En este caso los obesos presentan partículas enriquecidas en triglicéridos en comparación con los eutróficos que presentan partículas de HDL pobres en triglicéridos.

## Caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos en pacientes pediátricos con obesidad y asma

Para conocer si las alteraciones encontradas en la distribución de subpoblaciones de HDL en los pacientes con obesidad se exacerban cuando se combinan con la presencia de asma; se dividieron a los obesos y a los eutróficos en dos grupos, tomando como criterio la presencia de asma, de tal manera que se obtuvieron 4 grupos obesos con asma (OCA), obesos sin asma (OSA), eutróficos con asma (ECA) y eutróficos sin asma (ESA ó grupo control).

En las características antropométricas y clínicas no hay diferencias entre los grupos de pacientes que presentan obesidad con ó sin asma, para el caso de los eutróficos tampoco se observan diferencias entre ellos.

**Cuadro 9.** Características antropométricas y clínicas de los grupos de estudio

	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
Genero (M/F)	17/11	16/15	18/12	18/10	
Edad*(años)	12 (11-13)	11 (11-13)	12 (11-14)	12 (11-13)	NS
Peso (kg)	64.99 ± 12.79 <sup>a,b</sup>	70.87 ± 18.91 <sup>a,b</sup>	48.38 ± 13.36	43.03 ± 11.82	0.000
Talla (cm)	153.48 ± 10.13	155.65 ± 10.85	154.37 ± 10.62	150.98 ± 10.68	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.33 ± 2.73 <sup>a,b</sup>	28.79 ± 4.84 <sup>a,b</sup>	19.95 ± 3.48	18.58 ± 2.86	0.000
Perímetro abdominal (cm)	91.51 ± 13.05 <sup>a,b</sup>	97.52 ± 12.54 <sup>a,b</sup>	75.05 ± 11.31	71.56 ± 7.02	0.000
TAS* (mm/Hg)	110 (105.50-120)	110 (100-120)	105.50 (100-110)	110 (100-120)	NS
TAD* (mm/Hg)	70 (68-80)	70 (70-80)	70 (66-70)	70 (65-80)	NS

Media ± DE o \* mediana (rango intercuartilar), OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma, TAS: Tensión arterial sistólica, TAD: Tensión arterial diastólica, *p* < 0.05, a vs ECA, b vs ESA, ANOVA.

En cuanto a las características bioquímicas de los grupos de estudio se observa que la concentración de colesterol total en plasma del grupo OCA se encuentra aumentada un 13% con respecto al grupo control, la glucosa se encuentra disminuida 10% en el grupo ECA con respecto al grupo ESA, entre los grupos OCA- OSA y ECA- ESA no se presentan diferencias en la concentración de colesterol, triglicéridos, glucosa e insulina.

**Cuadro 10.** Características bioquímicas de los grupos de estudio

	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
C (mg/dL)	152.91 ± 36.00 <sup>b</sup>	146.94 ± 28.33	140.09 ± 25.12	135.55 ± 23.94	0.113
Tg (mg/ dL)	137.48 ± 65.28 <sup>a,b</sup>	126.00 ± 49.20 <sup>a,b</sup>	92.17 ± 45.20	91.17 ± 31.62	0.000
Glucosa (mg/ dL)	80.59 ± 15.33	79.57 ± 11.28	76.55 ± 8.65 <sup>b</sup>	85.46 ± 13.31	0.056
C-LDL (mg/dL)	87.20 ± 28.59 <sup>b</sup>	87.47 ± 26.01 <sup>b</sup>	78.00 ± 24.60	73.03 ± 20.58	0.076
Insulina (μU/ mL)	20.36 ± 6.00 <sup>a,b</sup>	17.39 ± 6.00 <sup>b</sup>	14.94 ± 6.86	14.49 ± 4.98	0.001

Media ± DE, OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma, C: Colesterol, Tg: Triglicéridos, C-LDL: Colesterol de lipoproteínas de baja densidad, *p* < 0.05, a vs ECA, b vs ESA, ANOVA.

El grupo de obesos con asma presenta las concentraciones más elevadas de colesterol total, triglicéridos e insulina comparado con los otros tres grupos.



**Cuadro 11.** Composición química de las HDL por grupo.

	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
C-HDL	38.22 ± 8.74 <sup>a,b</sup>	34.26 ± 7.86 <sup>a,b</sup>	43.65 ± 11.94	44.29 ± 9.48	0.000
Tg-HDL	24.43 ± 6.97	26.98 ± 10.57	25.03 ± 11.69	23.80 ± 8.73	NS
Pps-HDL	84.08 ± 14.08 <sup>a,b</sup>	82.52 ± 15.28 <sup>a,b</sup>	100.14 ± 17.98	93.21 ± 18.37	0.000

Media ± DE, OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma, C-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad, Tg-HDL: Triglicéridos de lipoproteínas de alta densidad, Pps-HDL: Fosfolípidos de lipoproteínas de alta densidad,  $p < 0.05$ , a vs ECA, b vs ESA, ANOVA.

La composición química de las HDL muestra diferencias significativas en la concentración de colesterol con una disminución de 13.7%, 22.6% en el grupo OCA y OSA respectivamente contra el grupo control, la concentración de fosfolípidos en el grupo OCA y OSA se encuentran disminuidas 9.8% y 11.5% respectivamente con respecto al grupo control, en el grupo ECA se encuentra aumentada 7.4% comparado con el grupo ESA sin alcanzar significado estadístico.

**Cuadro 12.** Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de colesterol.

C (mg/ dL)	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
HDL 2b	15.33 ± 6.45 <sup>b</sup>	13.12 ± 4.14 <sup>a,b</sup>	17.71 ± 7.10	18.43 ± 4.87	0.002
HDL 2a	5.52 ± 1.50 <sup>b</sup>	4.98 ± 1.29 <sup>a,b</sup>	6.09 ± 2.25	6.67 ± 1.78	0.002
HDL 3a	9.34 ± 2.85	8.44 ± 2.39 <sup>b</sup>	9.73 ± 3.67	10.79 ± 2.75	0.025
HDL 3b	3.75 ± 1.79	3.68 ± 1.72	4.31 ± 1.80	4.23 ± 1.54	0.571
HDL 3c	3.03 ± 1.80	3.01 ± 1.83	3.97 ± 2.18	3.46 ± 1.54	0.270

Media ± DE, C: Colesterol, OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma,  $p < 0.05$ , a vs ECA, b vs ESA, ANOVA.

En la distribución de subpoblaciones de HDL (cuadro 12) el grupo OCA presenta una disminución de 16.8% en el contenido de colesterol con respecto al grupo control, para el grupo de OSA la disminución es aún mayor con un 28.8% comparado con el control y un 26% con respecto a los ECA. La subpoblación 2a también presenta cambios entre los grupos con una disminución de 17.2% de colesterol en el grupo OCA con respecto a los controles, los sujetos del grupo OSA tienen un 25.3% menos que el grupo control y un 18.2% menos con respecto al grupo ECA. Para la subpoblación HDL3a encontramos que hay una disminución en el contenido de colesterol de 21.8% en el grupo OSA con respecto al grupo control. En las subpoblaciones 3b y 3c no se observan cambios entre los cuatro grupos.

Por otra parte en la distribución por triglicéridos (cuadro 13) no se observan cambios entre los grupos en ninguna subpoblación de HDL.

**Cuadro 13.** Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de triglicéridos.

Tg (mg/ dL)	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
HDL 2b	9.59 ± 3.53	9.40 ± 3.63	9.47 ± 5.88	8.32 ± 3.43	NS
HDL 2a	3.74 ± 1.26	3.80 ± 1.49	3.26 ± 1.56	3.42 ± 1.32	NS
HDL 3a	5.97 ± 1.81	6.70 ± 2.72	5.95 ± 2.48	6.23 ± 2.40	NS
HDL 3b	2.58 ± 1.25	3.23 ± 1.48	3.17 ± 1.52	3.11 ± 1.49	NS
HDL 3c	2.47 ± 1.30	2.84 ± 1.93	2.66 ± 1.30	2.72 ± 1.19	NS

Media ± DE, Tg: Triglicéridos, OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma, NS: no significativo, ANOVA.

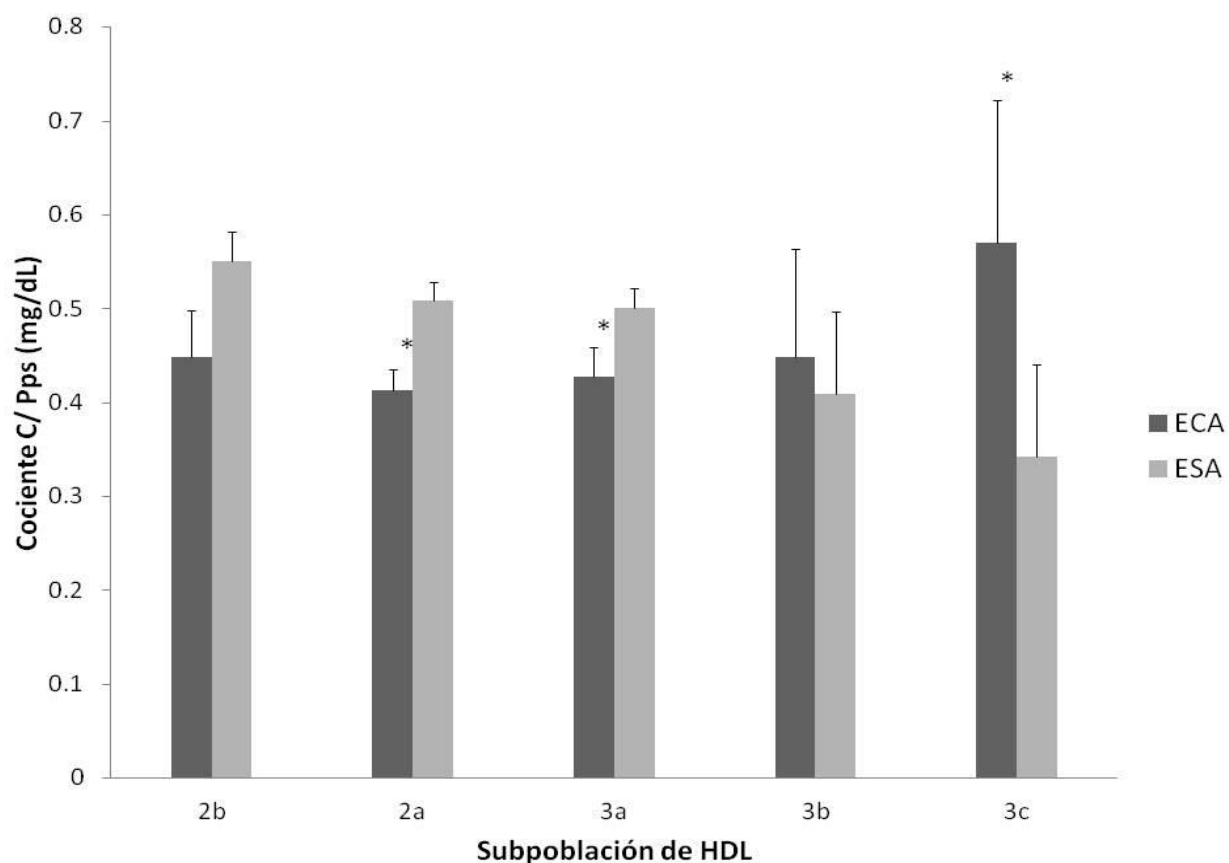
En el caso de la distribución de HDL por fosfolípidos encontramos que en el grupo ECA hay un incremento en la subpoblación 2b de 23.7% comparando con el grupo control. En cuanto al grupo OCA y OSA no hay cambios en las subpoblaciones de HDL, tipo 2b y 2a con respecto al grupo control, sin embargo, las diferencias se presentan cuando se compara el grupo ECA con el grupo ESA. Para la subpoblación 3a se observa una disminución de 12% en el contenido de fosfolípidos en el grupo OSA con respecto al control. En la subpoblación de HDL3c encontramos que el grupo control tiene mayor contenido de fosfolípidos, el grupo OCA tienen un 28.8% menos, para el grupo OSA un 25.3% y el grupo ECA presenta una disminución de 30.8% con respecto al grupo control.

**Cuadro 14.** Distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de fosfolípidos.

Pps (mg/ dL)	OCA n= 28	OSA n= 31	ECA n= 30	ESA n= 28	<i>p</i>
HDL 2b	35.02 ± 9.54 <sup>a</sup>	33.27 ± 9.84 <sup>a</sup>	44.10 ± 14.12 <sup>b</sup>	35.66 ± 11.87	0.002
HDL 2a	12.06 ± 2.06 <sup>a</sup>	12.01 ± 3.03 <sup>a</sup>	14.78 ± 2.97	13.42 ± 3.70	0.001
HDL 3a	20.03 ± 3.37 <sup>a</sup>	19.39 ± 4.33 <sup>a,b</sup>	23.42 ± 4.52	22.04 ± 6.01	0.004
HDL 3b	9.31 ± 3.30	9.61 ± 2.90	10.21 ± 3.42	11.07 ± 3.78	NS
HDL 3c	7.85 ± 4.51 <sup>b</sup>	8.23 ± 3.24 <sup>b</sup>	7.63 ± 3.45 <sup>b</sup>	11.02 ± 4.69	0.005

Media ± DE, Pps: Fosfolípidos, OCA: Obesos con asma, OSA: Obesos sin asma, ECA: Eutróficos con asma, ESA: Eutróficos sin asma, *p* < 0.05, a vs ECA, b vs ESA, NS: no significativo, ANOVA.

Para estimar la composición de las subpoblaciones de HDL, se calcularon los cocientes C/ Pps y Tg/ Pps. El cociente C/ Pps comparando a los eutróficos con y sin asma (figura 13), presenta diferencias en las subpoblaciones de HDL2a, 3a y 3c, indicando que los eutróficos con asma tienen partículas grandes pobres en colesterol y partículas pequeñas ricas en colesterol, por otra parte los eutróficos sin asma que tienen partículas grandes ricas en colesterol y partículas pequeñas pobres en colesterol. Con respecto a los cocientes C/ Pps y Tg/ Pps de los sujetos con obesidad no hay cambios en el contenido de colesterol y triglicéridos en las subpoblaciones de HDL.



**Figura 13.** Cociente colesterol/ fosfolípidos entre grupos de sujetos eutróficos. Media  $\pm$  EE,  $p > 0.05$ , \* vs Eutróficos sin asma, ANOVA.

# Discusión de Resultados

---

En el presente trabajo se caracterizaron las subpoblaciones de HDL por su contenido de lípidos de sujetos obesos y eutróficos con la característica de presentar o no asma. La caracterización se realizó utilizando plasma en la electroforesis de geles de poliacrilamida en gradiente 3-30% en condiciones nativas, en lugar de HDL aisladas como lo describe el método original (53). Al tratarse de un nuevo método de laboratorio, se realizó inicialmente la comparación de la distribución de subpoblaciones de HDL de la misma muestra utilizando plasma y HDL aisladas para establecer su utilidad y limitaciones. Una vez establecidos los parámetros adecuados y conocimos los alcances de nuestro método con plasma completo, caracterizamos a los diferentes grupos de pacientes. Nuestra hipótesis de trabajo establecía que la inflamación subyacente en los pacientes con asma tenía una influencia sobre la distribución de tamaños de las HDL. Los resultados demuestran que la distribución de tamaños en sujetos eutróficos con asma se desplaza hacia partículas HDL grandes cuando se determinan por su contenido de fosfolípidos. Esta distribución de tamaños no se observa cuando se determinan por su contenido de colesterol. Dicha distribución no se observa en los pacientes con obesidad y asma; en ellos predominan anomalías en el contenido de colesterol y fosfolípidos de las subpoblaciones de HDL encontrándose disminuida la concentración de estos lípidos en las subpoblaciones HDL2b, 2a y 3c.

La caracterización de las subpoblaciones de HDL puede ser de gran apoyo diagnóstico en la evaluación del riesgo cardiovascular y de enfermedades relacionadas. Como ya se mencionó anteriormente, se puede realizar mediante diferentes métodos, la ultracentrifugación en combinación con la electroforesis nativa es uno de los métodos más utilizados. El método de ultracentrifugación es considerado como el procedimiento de comparación para la separación y cuantificación de lipoproteínas, habitualmente es utilizado para la validación de otros métodos de separación de lipoproteínas (54). Sin embargo, todos los procesos de ultracentrifugación para la separación de lipoproteínas son relativamente caros por el costo del equipo y el tiempo de operador requerido, y por tanto son utilizados sólo en algunos laboratorios con fines de investigación y no como una herramienta de diagnóstico en la práctica clínica (54). Por lo anterior, decidimos hacer una modificación a la técnica de caracterización de subpoblaciones de HDL utilizando plasma directo; esta modificación tiene como objetivo optimizar la muestra de plasma de cada paciente, disminuir significativamente el tiempo de procesamiento de la muestra y disminuir el costo del mismo. El método original contempla el aislamiento de las HDL por ultracentrifugación secuencial (9, 53); este proceso toma tres días, incluyendo el tiempo de diálisis de las muestras. Además, está limitado al

número de muestras que se puedan procesar simultáneamente en la ultracentrífuga; en el caso de nuestro laboratorio se restringe a 10 muestras. Otra desventaja del proceso, consiste en que para el aislamiento de HDL se requiere de 1 mL de muestra de plasma que en muchos estudios no es posible coleccionar. Por esta razón al utilizar plasma, el número de muestras, que se pueden procesar por día, está solamente limitado por la capacidad que tenga el laboratorio para realizar la electroforesis. El método original requería el aislamiento previo de las HDL por ultracentrifugación porque no existía un procedimiento que permitiera la tinción selectiva de lípidos sobre el gel de electroforesis, y que al mismo tiempo permitiera visualizar los marcadores de diámetro molecular que son de naturaleza proteica. Nosotros aprovechamos un desarrollo tecnológico recientemente descrito en nuestro grupo de investigación que permite la tinción enzimática de lípidos sobre el gel de electroforesis (10, 41). Por esta razón, fuimos capaces de eliminar la etapa de ultracentrifugación en el proceso de cuantificación de las subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos.

En nuestros resultados se observa una fuerte correlación positiva entre las subpoblaciones determinadas usando plasma completo y HDL previamente aisladas por ultracentrifugación, sugiriendo una equivalencia muy aceptable entre ambos procedimientos. Sin embargo, observamos un menor porcentaje relativo de colesterol de la subpoblación 2b con HDL aisladas en comparación con el plasma del mismo sujeto. En contraste, el colesterol de la subpoblación 3c es significativamente mayor cuando se utilizan HDL aisladas que cuando se utiliza plasma. Para el resto de las subpoblaciones no se encontró ninguna diferencia significativa, sugiriendo que ambos métodos son equivalentes. De esta manera, las subpoblaciones de HDL que presentan diferencias al utilizar plasma completo en comparación con el método original que utiliza HDL aisladas, son las que se encuentran en los extremos del barrido electroforético.

Esta diferencia puede atribuirse a que la recuperación completa y reproducible después de la ultracentrifugación es difícil, además de que es a menudo inferior al 90%, y la fiabilidad del método depende de la habilidad técnica del operador. Además, la ultracentrifugación secuencial puede dar lugar a alteraciones estructurales de las HDL provocadas por artefactos durante el proceso (54, 55). De esta manera, es posible que las HDL recuperadas por ultracentrifugación pierdan su integridad, tanto las HDL de menor como las de mayor densidad, dando lugar a las discrepancias que observamos con las HDL2b y 3c al comparar ambos métodos.

Otra desventaja de la ultracentrifugación es que existen otras lipoproteínas, habitualmente minoritarias, como las HDL tipo I con intervalo de densidad de 1.055 a 1.115 g/mL o la lipoproteína (a) con intervalo

de densidad de 1.055 a 1.085 g/mL, que pueden aislarse con las HDL. Además, las elevadas concentraciones salinas utilizadas para los ajustes de densidad pueden alterar las características fisicoquímicas de las HDL (56), todos estos factores pueden modificar los porcentajes de las subpoblaciones de HDL.

Por lo tanto, al utilizar plasma en la electroforesis evitamos que la muestra se someta a procesos que puedan alterar las propiedades fisicoquímicas de las HDL antes de su separación en la electroforesis.

Una de las desventajas de nuestro método es que al tratarse de plasma completo la cantidad de proteínas que se colocan en el gel de electroforesis es muy grande y la migración puede resultar afectada por efecto iónico. Para reducir el efecto nocivo del exceso de proteína sobre la migración, definimos la cantidad mínima de plasma que permite una tinción adecuada de todos los lípidos.

En cuanto a la especificidad, se trabajó con un gel de poliacrilamida en gradiente 3-30% que tiene una resolución efectiva de las subpoblaciones de HDL (tamaño de partícula de 7 a 12 nm) y evita interferencias por partículas como las VLDL, LDL, IDL y otras lipoproteínas minoritarias que tienen un tamaño de 80 a 25 nm y por lo tanto no entran a la matriz del gel.

En resumen del aspecto metodológico del presente estudio, es factible la separación de las subpoblaciones de HDL por electroforesis a partir de plasma completo evitando así las desventajas que representa el aislamiento de las HDL por ultracentrifugación (p.e., afectaciones a la estructura, recuperación incompleta de las subpoblaciones, tiempos prolongados de procesamiento, altos costos y altos volúmenes de muestra). Los resultados que genera este procedimiento correlaciona con los obtenidos usando HDL aisladas, confirmando la utilidad del método para la determinación de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos. Este nuevo procedimiento tiene la particularidad de arrojar valores más elevados para el porcentaje de colesterol de las HDL 2b y menores para el de las 3c, una probable explicación a esto es que al utilizar HDL aisladas se trabaja con una cantidad de muestra constante y por lo tanto la concentración de colesterol que se utiliza se mantiene en un intervalo pequeño, al utilizar un volumen mínimo de plasma que permita la tinción adecuada de colesterol, el intervalo de concentración es más amplio, porque depende de la concentración plasmática de C-HDL en la muestra.

Una vez establecidas las características de nuestro método de separación caracterizamos las subpoblaciones de HDL en los diferentes grupos de estudio. Es bien conocida la relación inversa que existe entre la concentración de C-HDL el mayor riesgo de padecer EAC (57); estudios recientes han

sugerido que la caracterización de subpoblaciones de HDL puede mejorar la predicción de desarrollar la enfermedad (58). Sin embargo, existe la controversia de cual subpoblación de HDL tiene un mayor potencial antiaterogénico; por una parte se ha sugerido que las HDL grandes están asociadas a una disminución de la EAC (59) y que se encuentran en menor proporción en sujetos con EAC (60). Por otra parte, se ha demostrado que el incremento de las HDL pequeñas se presenta en situaciones de bajo riesgo cardiovascular (61), promueven el eflujo de colesterol y tienen un mayor potencial antioxidante (11). Una explicación a esta aparente paradoja, es que, cuando las HDL son separadas por tamaño, es posible que existan diferencias en el contenido de lípidos entre las subpoblaciones del mismo diámetro hidrodinámico resultado de distintas circunstancias fisiopatológicas (62).

Por lo tanto, la cuantificación del contenido de lípidos en las subpoblaciones de HDL puede proporcionar información acerca de la fracción con más potencial antiaterogénico y poder utilizar esta determinación como una herramienta adicional para establecer riesgo de desarrollar EAC en la práctica clínica.

En este sentido la caracterización de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos que realizamos en este trabajo muestra que los pacientes con obesidad tienden a tener menos colesterol en todas las subpoblaciones comparado con los eutróficos, aunque la diferencia no alcanza significado estadístico en la subpoblación 3b y 3c. En contraste la distribución por triglicéridos es comparable entre ambos grupos mientras que, la distribución por fosfolípidos muestra un comportamiento similar a la distribución de colesterol las subpoblaciones 2b, 2a y 3a. Estos resultados confirman las observaciones previamente reportadas en nuestro grupo en niños con síndrome metabólico que se realizaron usando HDL aisladas por ultracentrifugación (41), en el que se observa una menor cantidad de colesterol en las subpoblaciones de HDL de éstos. Así, las alteraciones que encontramos en la distribución de subpoblaciones de HDL en nuestros pacientes con obesidad son consistentes con lo reportado en otros estudios, dando validez a nuestro método (29, 39, 41).

Adicionalmente calculamos los cocientes C/ Pps y Tg/ Pps para conocer la composición de las HDL; la fosfatidilcolina puede ser un marcador de la cantidad de partículas de HDL ya que este lípido limita el tamaño de la partícula y por lo tanto está en una cantidad constante por partícula perteneciente a cada subpoblación (53, 63, 64). Por lo tanto, el incremento o la disminución en la concentración de fosfolípidos puede ser interpretado como un aumento o reducción, del número de partículas HDL.

El cociente C/ Pps presentó una disminución que alcanza significado estadístico en las subpoblaciones 2a y 3c de los sujetos con obesidad con respecto a los eutróficos indicando que estas subpoblaciones se encuentran empobrecidas en colesterol en los pacientes con obesidad.

En contraste, el cociente Tg/ Pps tiene una tendencia opuesta; nuestros resultados sugieren que las subpoblaciones de HDL en los sujetos con obesidad están enriquecidas con triglicéridos. En este contexto, algunos autores sugieren que las partículas de HDL enriquecidas en triglicéridos son disfuncionales en pacientes con síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y otras dislipidemias (64-67).

El asma y la obesidad son trastornos frecuentes, cada uno con un impacto importante en la salud pública y algunos investigadores sugieren que hay una asociación entre ellos (45, 68, 69). El estado inflamatorio sistémico que provoca la obesidad produce alteraciones metabólicas y cardiovasculares, pero aun es desconocido si este estado se complica cuando se combina con el asma. En este contexto, nuestros resultados no demuestran cambios en las características clínicas, antropométricas y bioquímicas entre los sujetos asmáticos con obesidad y no asmáticos con obesidad. La distribución de subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos tampoco presentan cambios, los cocientes C/ Pps y Tg/ Pps calculados permanecen constantes sin mostrar tendencia hacia partículas grandes o pequeñas, por lo tanto podemos descartar que las alteraciones encontradas en los sujetos con obesidad se agraven cuando se presenta un proceso asmático.

Así, nuestros resultados demuestran que no existen diferencias entre los sujetos con y sin asma en presencia de obesidad. Sin embargo, observamos que los sujetos eutróficos con asma son los que tienen una mayor cantidad de la mayoría de los lípidos-HDL en comparación con los otros tres grupos. También encontramos que los eutróficos que presentan asma tienen partículas pequeñas enriquecidas en colesterol y partículas grandes pobres en colesterol. Todos estos hallazgos sugieren que las alteraciones de las HDL están relacionadas con la inflamación subyacente en los sujetos con asma y que dichas características se enmascaran por el efecto predominante de la obesidad sobre las subpoblaciones de HDL previamente descritas (29, 41, 45, 68, 70). En efecto, algunos reportes indican que durante estados de inflamación aguda o crónica, el metabolismo de las HDL puede estar alterado, debido a que se producen cambios en las HDL; varias proteínas plasmáticas que son transportadas en las HDL se encuentran disminuidas incluyendo a la paraoxonasa-1, LCAT, CETP, PLTP, LH y apoA-I, modificando la estructura y función de las HDL (45, 68, 70, 71).

En estados de inflamación, las HDL se empobrecen en ésteres de colesterol, y se enriquecen en colesterol libre y triglicéridos dejando a las HDL disfuncionales porque no pueden realizar sus funciones antioxidante ni participar en el transporte reverso de colesterol (40, 41). Las HDL que se producen en



estos estados son menos efectivas que las HDL normales en cuanto a la remoción del colesterol de los macrófagos y transporte hacia los hepatocitos (71).

El cociente C/ Pps en los eutróficos con asma presenta cambios significativos en las subpoblaciones 2a, 3a y 3c. De igual manera el cociente Tg/ Pps (no mostrado) para estos grupos no alcanza significado estadístico pero muestra una tendencia hacia partículas pequeñas en los asmáticos, probablemente si los grupos fueran más grandes se confirmaría esta tendencia.

Para tratar de explicar estos cambios proponemos que el asma es un estado inflamatorio crónico que se asocia al estrés oxidativo (EO) definido como el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la producción y actividad de antioxidantes a favor de los primeros, lo que conduce a una mayor predisposición de daño y alteración de la homeostasis intracelular. El EO favorece el desarrollo de otros procesos fisiopatológicos incluyendo el daño endotelial y la aterosclerosis, por lo que se ha sugerido que los asmáticos tienen un riesgo adicional para presentar riesgo cardiovascular asociado a hipertensión, enfermedad cardiovascular y embolias (72, 73). Por otra parte, se ha reportado que los pacientes con DMT2 tienen un incremento en la proporción de partículas pequeñas de HDL (29, 74) como observamos en nuestros pacientes. En este sentido, las HDL pequeñas están asociadas con un catabolismo acelerado de apoA-I (14, 75, 76), sugiriendo que este tipo de partículas son catabolizadas más rápido que las partículas HDL de mayor tamaño (14, 75, 77).

Los resultados encontrados son novedosos ya que no se ha reportado con anterioridad la distribución de subpoblaciones de HDL en pacientes con obesidad y asma. A pesar de que hay una asociación creciente entre el asma y la obesidad que no está esclarecida, varios investigadores sugieren que la obesidad aumenta el riesgo de padecer asma y dificulta su control (45, 68). Es necesario reconocer que una limitante de este estudio es que se asume la persistencia del estado inflamatorio en los pacientes con asma, pero no se determinaron marcadores como PCR, IL-6 para demostrarlo.

En resumen no existen diferencias entre los sujetos con y sin asma en presencia de obesidad, pero los sujetos eutróficos con asma presentan un incremento hacia partículas grandes pobres en colesterol y partículas pequeñas enriquecidas en colesterol. La asociación entre estas anomalías de las HDL con el estado inflamatorio debe ser demostrada en estudios posteriores.

# Conclusión

---

En este trabajo caracterizamos las subpoblaciones de HDL por contenido de lípidos utilizando plasma en lugar de HDL aisladas. Nuestros resultados demuestran que el asma no exagera las alteraciones en la distribución de las subpoblaciones de HDL cuando se combina con la obesidad. Sin embargo, si se presentan alteraciones en la distribución de subpoblaciones de HDL cuando se determinan por su contenido de fosfolípidos en los sujetos que presentan asma en ausencia de obesidad desplazando la distribución hacia partículas grandes HDL2 empobrecidas en colesterol y partículas pequeñas HDL3 enriquecidas en colesterol.

# Referencias

---

1. Voet D, Voet J. Bioquímica. Tercera ed. Argentina: Editorial Medica Panamericana; 2006.
2. Lehninger AL, Nelson DDL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. Cuarta ed. U.S.A: W. H. Freeman; 2005.
3. Von EA, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:404-16.
4. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2011;17(10):594- 603.
5. Movva R, Rader D. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem*. 2008;54:788-800.
6. Festa A, Williams K, Hanley A, Otvos J, Goff D, Wagenknecht L, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2005;111:3465-72.
7. Jeyarajah E, Cromwell W, Otvos J. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med* 2006;26:847-70.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680.
9. Warnick G, McNamara J, Boggess C, Clendenen F, Williams P, Landolt C. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med* 2006;26:803-46.
10. Toledo-Ibelle P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreon-Torres E, Posada-Romero C, Vargas-Alarcón G, et al. Enzymatic assesment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res*. 2010;51:1610-7.
11. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*. 1992;31:11112-7.
12. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee S, Zhang L, Roomp K, Van-Dam M. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*. 1999;22:336-45.
13. Toledo-Ibelle P. Cuantificación comparativa en fase semisólida de las subpoblaciones de lipoproteínas de alta densidad por medio de la determinación de colesterol y proteínas. Efecto de las tiazolidinedionas y otras condiciones fisiopatológicas [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química; 2008.
14. Carreón-Torres E, Juárez-Meaveapeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis*. 2005;181:233-40.
15. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán 1989;2:22-8
16. Von EA, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:13-27.

17. Van L, B.J. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96:2758-67.
18. Navab M. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000;41:1495-508.
19. Kontush A, Chapman M. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21:312-8.
20. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009;50:S195-S200.
21. Navab M. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991;88:2039-46.
22. Undurti A. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem.* 2009;284:30825-35.
23. Watanabe J. Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with apoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2009;284:18292-301.
24. Van L, B.J. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. *Circulation.* 2001;103:2283-8.
25. McGillicuddy FC. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* 2009;119:1135-45.
26. Patel S, et al. Acute hypertriglyceridaemia in humans increases the triglyceride content and decreases the anti-inflammatory capacity of high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2009;204:424-8.
27. Pérez-Méndez O, Espinola-Zavaleta N, Soto-López M, Carreón-Torres E, Gamboa R, Huesca-Gómez C, et al. Altered flow mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activities, and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J.* 2008;Submitted.
28. Huesca-Gómez C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis.* 2004;5(suppl):64.
29. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posada-Romero C, Vidaure-Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007;376:17-22.
30. Pont F, Duvillard L, Florentin E, Gambert P, Vergès B. High-density lipoprotein apolipoprotein A-I kinetics in obese insulin resistant patients. An in vivo stable isotope study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1151-8.
31. Barlow S, Expert C. Expert committee recommendations regarding the prevention, assesment and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics.* 2007;120(suppl 4):S164-S92.
32. Secretaría-de-Salud. Salud México 2001- 2005. Información para la rendición de cuentas. México; 2006. p. 154.

33. Olaiz-Fernandez G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006.
34. Secretaría-de-Salud. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria Estrategia contra el sobrepeso y la obesidad. México; 2010.
35. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease: A 26- Year Follow-up on Participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67:968-77.
36. Bertiere MC, Fumerun F, Rigaud D, Malon D, Apfelbaum M, Girard-Globa A. Low high Density Lipoprotein-2 Concentrations in Obese Male Subjects. *Atherosclerosis*. 1998;73:57-61.
37. Assmann G, H S, von EA, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 1996;124:S11-S20.
38. Feing JE, Shamir R, Fisher EA. Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport. *Curr Drug Targets*. 2008;9:196-203.
39. Li Tian, Lianqun Jia, Mingde Fu, Ying Tian, Yanhua Xu, Haoming Tian, et al. Alterations of high density lipoprotein subclasses in obese subjects. *Lipids*. 2006;41:789- 96.
40. MacLean P S, Bower J F, S V, T G, Barakat H A. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans. *Obes Res*. 2000;8(1):62- 70.
41. García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meaveapeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2010. Epub doi:10.1016/j.cca.2010.10.021.
42. NAEPP, NHLBI, NIH. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. USA: US Department of Health and Human Services; 2007.
43. Del-Rio-Navarro B, Del-Rio-Chivardi JM, Berber A, Sienra-Monge JL, Rosas-Vargas MA, Baeza-Bacab M. Asthma prevalence in children living in north Mexico City and a comparison with other Latin American cities and world regions. *Allergy Asthma Proc*. 2006;27:334-40.
44. Mallol J, Solé D, Baeza-Bacab M, Aguirre-Camposano V, Soto-Quiros M, Baena-Cagnani C. Latin American ISAAC Group. Regional variation in asthma symptom prevalence in Latin American children. *J Asthma*. 2010;47:644-50.
45. Shore SA. Obesity and Asthma: cause for concern. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:230-6.
46. Dixon AE, Shade DM, Cohen RI, Skloot GS, Hoolbrook JT, Smith LT. Effect of obesity and clinical presentation and response to treatment in asthma. *J Asthma*. 2006;43:553-8.
47. Percentiles for body mass index in U.S. children 5 to 17 years of age. *J Pediatr*. 1998;132:2.
48. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low- density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *JAMA*. 1986;256:2372- 7.

49. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment insulin resistance and betacell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
50. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Cuantificación de la insulin resistencia mediante insulinemia plasmatica en ayunas e índice HOMA en una población no diabética. *Med clin (Barc)*. 2001;117:530-3.
51. Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, González L, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG. Renal Interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294:F84-F9.
52. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyl tranferase to HDL size distribution. *Endocrin Res*. 2004;30:403-15.
53. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1981;665:408-19.
54. Palacios M, Esteban M, Aguilar JÁ, Ortolá JB. Recomendaciones para la determinación de la concentración en suero del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. *Química Clínica*. 1999;18(1):33- 40.
55. Aguilar-Doreste JA, Vella-Ramírez JC. Actualización de los métodos para la medición de la concentración de colesterol HDL en suero. Documentos de la SEQC. diciembre 2011:6- 11.
56. Wiebe DA, Smith SJ. Six methods for isolating high density lipoprotein compared, with use of the reference method of cuantifying cholesterol in serum. *Clin Chem*. 1985;31:746- 50.
57. Gordon T, Castelli WP, Hjortland M, Kannel W, Dawbert T. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977;62:707-14.
58. Asztalos BF, Collins D, Cupples L, Demissie S, Horvath K, Bloomfield HE, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2185-91.
59. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, Shalaurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, et al. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation*. 2006;113:1556- 63.
60. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B. Associations of HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1098-105.
61. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, et al. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis*. 2000;148:317-25.
62. Pérez-Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Méx*. 2004;74(1):53-67.
63. Rye KA, Duong MN. Influence of phospholipid depletion on the size, structure, and remodeling of reconstituted high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 2000;41:1640-50.

64. Kontush A, Chapman M. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342- 74.
65. Hansel B, Giral P, Nobecourt E, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4963-71.
66. Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman M. A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis.* 2005;182:277-85.
67. Nobecourt E, Jacquemint S, Hansel B, et al. Defective antioxidative activity of small, dense HDL particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycemia. *Diabetologia.* 2005;48:529-38.
68. Beuther DA, Weiss ST, Sutherland ER. Obesity and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:112–9.
69. Del-Río-Navarro B, Velásquez-Monroy O, Sánchez-Castillo C. The high prevalence of overweight and obesity in Mexican children. *Obes Res.* 2004;12:215- 23.
70. Sierra-Vargas MP, Fenández-Vega M, Torres-Ramos YD, Hicks-Gómez JJ. Correlación directa entre FEF 25-75 y la actividad de la paraoxonasa plasmática en pacientes asmáticos adultos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2007;20(1):9- 14.
71. Hahn BH, Grossman J, Ansell BJ, Skaggs BJ, McMahon M. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2008;10(4):213-24.
72. Salako BL, Ajayi SO. Bronchial asthma: a risk factor for hypertension? *Afr J Med Sci.* 2000;29:47-50.
73. De Catherina R, Zampolli A. From asthma to Atherosclerosis 5-lipoxygenase, leukotrienes and inflammation. *N Engl J Med.* 2004;350(1):4-7.
74. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes.* 2003;52:453-642.
75. Elkhailil L, Majd Z, Bakir R, et al. Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism.* 1997;46:474-83.
76. Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 1998;47:1928-34.
77. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montaña LF, Massó F, Posada-Romero C, et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism.* 2002;51:443- 50.

# Anexos

---

## Anexo 1. Determinación de proteínas por el método de Lowry.

### Soluciones

- Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% en  $\text{H}_2\text{O}$
- Solución de tartrato de Na y K 1 g +  $\text{CuSO}_4$ : 0.5g
- Solución de NaOH 0.8N 16g en 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$
- Solución de SDS 10% en  $\text{H}_2\text{O}$
- Solución estándar de albumina 1 mg/mL

### Solución A preparar al momento

- 1 volumen de tartrato de Na y K
- 1 volumen de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- 2 volúmenes de NaOH
- 2 volúmenes de SDS
- 2 volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}$

### Técnica

#### Curva patrón

TUBO	1	2	3	4	5	6	MUESTRA
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1	
ST ( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	40	80	100	
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	100	90	80	60	20	0	95
MUESTRA ( $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	5
M E Z C L A R							
SOLUCIÓN A (mL)	1	1	1	1	1	1	1
INCUBAR 10 MINUTOS EN OSCURIDAD, A TEMPERATURA AMBIENTE							
REACTIVO FOLIN 1/6 ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500	500	500	500	500
INCUBAR 30 MINUTOS EN OSCURIDAD, A TEMPERATURA AMBIENTE							

### Lectura

Leer a una longitud de onda de 750 nm

### Resultados

Trazar una grafica de absorbancia contra concentración con los datos de la curva patrón. Interpolarse la absorbancia de las muestras en la grafica para determinar la concentración correspondiente tomando en cuenta el factor de dilución.



## Anexo 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

### SOLUCIONES

Solución amortiguadora de muestra

Sacarosa 50% + Azul de bromofenol al 0.05% c.b.p. 20 mL

A: Tris 0.09M + Ác. Bórico 0.08M + EDTA 3 mM pH 8.35

B: 48g acrilamida + 1.28g bisacrilamida c.b.p. 100 mL

C: persulfato de amonio 10%

Solución de Acrilamida	3 %	30 %
Volumen Total	5 mL	5 mL
Solución A	500 µL	500 µL
Solución B	300 µL	3 mL
H <sub>2</sub> O destilada	4.2 mL	750 µL
Glicerol	--	750 µL
TEMED	4 µL	4 µL
Solución C	20 µL	20 µL

Las soluciones de acrilamida se colocan en el formador de gradiente, se agrega el TEMED y la solución C para iniciar la reacción de polimerización. Las soluciones se colocan de tal manera que primero se vierta la solución de 30 %, en las placas para formar el gel, se agrega el TEMED y la solución C a las soluciones de 3 y 30%, manteniendo una agitación constante hasta formar el gel con un gradiente 3- 30%.

Una vez polimerizado el gel, se precorre 15 minutos a 90 V para estabilizarlo. Al término del tiempo establecido se cargan las muestras de la siguiente manera:

- I. Depositar un marcador de alto peso molecular en el primer carril.
- II. En el segundo carril depositar 10 µL de amortiguador de muestra.
- III. En el tercer carril depositar 7 µL de plasma/3 µL de amortiguador de muestra
- IV. Repetir el paso II y III hasta terminar los pozos del gel.

La electroforesis se realizó a 90 V durante 30 minutos para permitir la entrada de las muestras en el gel, posteriormente se aumento a 180 V durante 22 h.

Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda, se hidrata en solución PBS y se tiñe según el método seleccionado (Colesterol Total, Triglicéridos o Fosfolípidos).

### Anexo 3. Tinción para la determinación de la distribución de lípidos en gel de poliacrilamida

- Reactivo para Colesterol total

	Concentración
	Colesterol total
Solución salina isotónica (0.9%)	7470 $\mu\text{L}$
Solución Amortiguadora PBS 10X (100mM) pH= 7.4	1000 $\mu\text{L}$
Solución Stock [Colato de sodio 3mM/Triton 100X 0.1%]	500 $\mu\text{L}$
Carboximetilcelulosa	120 mg
Peroxidasa (0.25 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )	5 $\mu\text{L}$
Colesterol Esterasa (0.075 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )	15 $\mu\text{L}$
Colesterol Oxidasa (0.05 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )	10 $\mu\text{L}$
Mezclar hasta homogeneizar sin dejar grumos.	
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 $\mu\text{L}$
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	400 $\mu\text{L}$
Añadir 15 minutos antes de aplicar el reactivo en el gel.	

- Reactivo para Triglicéridos y Fosfolípidos

	Concentración	
	Triglicéridos	Fosfolípidos
Solución isotónica (0.9%)	5500 $\mu\text{L}$	5500
Solución amortiguadora PBS 10X (100 mM) pH= 7.4	1000 $\mu\text{L}$	1000
Carboximetilcelulosa	120 mg	120
Lipasa (37.5 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )	Reactivo comercial 2500 $\mu\text{L}$	
Glicerol Cinasa (0.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )		
Glicerol-3-fosfato oxidasa (0.4 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )		
Peroxidasa (0.13 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )		
ATP (0.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )		
Fosfolipasa D (0.12 $\mu\text{U}/\text{MI}$ )	Reactivo Comercial 2500 $\mu\text{L}$	
Colina Oxidasa (62 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )		
Peroxidasa (1.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$ )		
Aminopiridina (0.24 mmol/mL)		
N-etil-N-DAOS (0.77 mmol/mL)		
Mezclar hasta homogeneizar sin dejar grumos.		
Azul de Tetrazolium (MTT) 0.04 mM	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$
Fenazin metasulfato (FMS) 0.04 mM	600 $\mu\text{L}$	600 $\mu\text{L}$
Añadir 15 minutos antes de aplicar el reactivo en el gel.		

Colocar la mezcla sobre el gel, incubar durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad.