



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD**

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Ciencias Médicas

**Asociación de los tamaños y composición de las HDL con esteatosis hepática
en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestría en Ciencias Médicas**

Presenta:

José Antonio Orozco Morales

Tutor:

D.C. Patricia Guadalupe Medina Bravo

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2018



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.

INDICE

1.	RESUMEN.....	3
2.	INTRODUCCIÓN.....	4
3.	ANTECEDENTES.....	5
	Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica (EHGNA) y DM2.....	5
	Etiopatogénesis de la EHGNA.....	6
	Métodos de evaluación de la EHGNA.....	8
	Alteración en el metabolismo del colesterol HDL y DM2.....	11
	DM2, EHGNA y Alteración en HDL.....	15
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
5.	PREGUNTA A INVESTIGAR.....	18
6.	JUSTIFICACIÓN.....	18
7.	HIPÓTESIS.....	19
8.	OBJETIVOS.....	20
9.	MATERIAL Y MÉTODO.....	21
	Diseño de Estudio.....	21
	Clasificación de Variables.....	23
	Material y método.....	24
	Definición Operativa de las Variables.....	25
	Metodología.....	29
	Tamaño de la muestra.....	31
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
11.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	32
12.	RESULTADOS.....	33
13.	DISCUSIÓN.....	43
14.	CONCLUSIONES.....	46
15.	BIBLIOGRAFÍA.....	47
16.	ANEXO.....	55

RESUMEN

INTRODUCCIÓN La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad emergente en la población pediátrica. La asociación entre DM2 y enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) ha sido descrita, y se ha relacionado con un aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV). Se ha reportado que una alteración en las características fisicoquímicas y la capacidad funcional de las partículas de c-HDL más que la simple concentración, podrían tener un papel clave en la etiología de la aterosclerosis. Dado que existe una relación entre la EHGNA y el aumento de riesgo cardiovascular, es importante evaluar si en pacientes adolescentes con DM2 existe asociación entre los tamaños y la composición de las HDL con la presencia de esteatosis hepática (EH).

OBJETIVO Evaluar la asociación entre los tamaños y la composición de las HDL con esteatosis hepática (EH), en adolescentes con DM2.

MATERIAL Y MÉTODO Estudio observacional, transversal y comparativo que incluyó un total de 70 adolescentes, 47 adolescentes con DM2 que asisten a la Clínica de atención al niño diabético del Hospital Infantil de México Federico Gómez y 23 adolescentes sanos. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación (HIM/2017/013- SSA1379). A todos los participantes se les explicó las características del estudio; se solicitó carta de consentimiento informado a los padres y de asentimiento al adolescente; se realizó historia clínica completa, antropometría y examen físico. Por medio de resonancia magnética por espectroscopia (MRS) se determinó la presencia de EH. En una muestra de sangre venosa (con 12 horas de ayuno) se determinó glucosa, HbA1c, pruebas de función renal y hepática, perfil de lípidos, ApoA y ApoB. Las subpoblaciones de HDL fueron cuantificadas mediante el método de electroforesis en gradiente en gel de poliacrilamida (PAGE) y se determinó su composición química mediante ensayos enzimáticos en un analizador Hitachi 902.

RESULTADOS De los 47 adolescentes con DM2, 31 pacientes (66%) presentaron EH y 16 pacientes (34%) no tenían diagnóstico de EH por este método. Los adolescentes sanos fueron más jóvenes en comparación con el grupo de pacientes con DM2, observando una diferencia en el estadio del desarrollo de Tanner ($p=0.001$). No hubo diferencias en cuanto a sexo, talla o presión arterial sistólica entre los grupos; sin embargo, el peso ($p<0.001$), IMC ($p<0.001$), circunferencia de cintura ($p<0.001$) e índice cintura/talla ($p<0.001$) fueron mayores en el grupo de pacientes con DM2 al compararlos con el grupo sin DM2. Los valores de c-HDL fueron más elevados en el grupo de adolescentes sanos comparadas con los 2 grupos con DM2 ($p<0.001$). El análisis no ajustado mostró que los pacientes con DM2 y EH tenían una menor proporción de HDL grandes (HDL2b) y mayor proporción de HDL pequeñas (HDL3c), mostrando una tendencia a un menor tamaño promedio de las partículas de HDL. El grupo con DM2 y EH presentó menores proporciones de HDL2b ($p=0.040$), mayores de HDL3c ($p=0.035$), un menor contenido de colesterol libre ($p<0.001$), menor proporción de ésteres de colesterol ($p=0.002$) así como una mayor de TG dentro de las partículas ($p=0.032$) al compararlo con el grupo de adolescentes sanos. No se encontraron diferencias en el porcentaje de proteínas o fosfolípidos entre los tres grupos. Para evaluar el efecto de la presencia de EH sobre la distribución y composición de las HDL se realizó un análisis de correlación lineal simple en los pacientes con DM2; observando una correlación negativa y significativa entre el porcentaje de grasa hepática y la concentración de HDL2b ($p=0.026$), HDL2a ($p=0.013$) y el tamaño promedio de las partículas ($p=0.009$), así como una correlación positiva y significativa con los porcentajes de HDL3c ($p=0.011$). Asimismo, se encontró una asociación positiva con la fracción hepática grasa y la proporción de TG en las partículas ($p=0.007$), y una correlación negativa con la proporción de ésteres de colesterol ($p=0.010$) y colesterol libre ($p<0.001$) dentro de la partícula. Se realizaron modelos de regresión lineal múltiple para valorar la magnitud de estas asociaciones, demostrando que los pacientes con DM2 y niveles mayores de grasa hepática tenían una baja proporción de HDL2b ($p=0.004$), altas de HDL3c ($p=0.015$), un mayor porcentaje de TG ($p=0.013$) y bajas de EC ($p=0.030$) dentro de la partícula, independientemente de la edad, sexo, estadio de Tanner, IMC, niveles de HbA1c, dosis de insulina y tiempo de evolución de la enfermedad.

CONCLUSIONES En adolescentes con DM2, la presencia de EH se asocia con anomalías en la distribución de subpoblaciones de HDL (disminución de HDL2b, aumento de HDL3c y una tendencia a menor tamaño de las partículas de HDL), así como a una alteración en la composición lipídica de las partículas (aumento de TG y disminución de los ésteres de colesterol).

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por hiperglucemia crónica, resultado de un defecto en la secreción de la insulina, la acción de la misma, o ambas. La secreción de insulina inadecuada y/o respuestas disminuida de los tejidos diana a la acción de la hormona por diversas vías, conduce a anomalías en el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas (1).

La DM tipo 2 (DM2) se produce cuando la secreción de insulina es insuficiente para satisfacer la creciente demanda ocasionada por la resistencia a la insulina (RI), lo que conduce a una deficiencia relativa de insulina y por lo general se asocia con otras anomalías metabólicas, características de la resistencia a insulina, como dislipidemia, hipertensión, síndrome de ovarios poliquísticos y enfermedad hepática grasa no alcohólica EHGNA (2).

La DM2 es una enfermedad emergente a nivel mundial, en el caso de niños y adolescentes se ha convertido en un importante problema de salud pública. Actualmente se ha documentado que hasta el 30-45% de la diabetes diagnóstica en pacientes pediátricos, corresponde a DM2 (2). Esta enfermedad está asociada a la presencia de obesidad y resistencia a la acción de la insulina (RI), siendo esta última el mecanismo fisiopatológico relacionado con la alteración en el metabolismo de carbohidratos, la cual también se asocia al desarrollo de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Por algunos autores la EHGNA ha sido catalogada como la expresión hepática de esta enfermedad (2,3).

Así mismo, la DM2 se asocia a complicaciones crónicas a largo plazo, que provocan una morbilidad frecuente y disminución significativa de la esperanza de vida (4). Las complicaciones crónicas pueden dividirse en microangiopatías (nefropatía, retinopatía y neuropatía) y macroangiopatías, entre las que se incluyen la enfermedad arterial coronaria, vascular periférica y cerebrovascular.

La enfermedad cardiovascular (ECV) es de las primeras causas de morbilidad y mortalidad prematura a nivel mundial (5). En los pacientes adultos con DM2, la ECV es la principal complicación de la enfermedad (6), más del 60% de las personas con DM2 desarrolla ECV (7), una complicación más grave y costosa que la retinopatía, lo que implica un deterioro para la salud de una población en riesgo como los pacientes con DM2.

ANTECEDENTES

ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA (EHGNA) Y DM 2

Durante las últimas dos décadas, la EHGNA ha alcanzado proporciones epidémicas, convirtiéndose en una de las causas más frecuentes de enfermedad hepática crónica en todo el mundo (8); se estima que del 20-30% de los adultos y del 3-10% de los niños en los países occidentales son afectados por dicha enfermedad (9,10).

El aumento de la incidencia de EHGNA coincide con el incremento anual en el número de individuos que tienen sobrepeso u obesidad (11). En estudios recientes se ha reportado una prevalencia de EHGNA en población pediátrica con sobrepeso u obesidad en cifras de 60 - 80% en dichos pacientes, con una relación hombre: mujer de 2:1(10, 12)

El término EHGNA abarca un amplio espectro de diversas enfermedades hepáticas, relacionadas con el incremento del depósito de grasa en el hígado (13). Las características histológicas de la enfermedad varían de acumulación de grasa en >5% de los hepatocitos (esteatosis hepática simple, EH) a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) con necrosis e inflamación (a veces asociada a fibrosis), que a su vez puede progresar a cirrosis, falla hepática y carcinoma hepatocelular (14).

La DM2, la resistencia a la insulina (RI), la obesidad, el síndrome metabólico y la EHGNA están estrechamente relacionadas (15). La asociación entre la DM2 y la EHGNA ha sido descrita en diversos estudios epidemiológicos (16), y su prevalencia se ha reportado entre el 28% y el 70% en estudios previos en población adulta (16,17). Los pacientes con EHGNA y DM2 ahora son reconocidos como un subgrupo con mayor morbilidad (18), además de mayor mortalidad global relacionada a causa hepática (19, 20).

Se estima que de un 20-30% de la población adulta en los países occidentales tiene EHGNA (10, 12). Dicha cifra incrementa hasta en un 70 – 80% en pacientes adultos con DM2 (15). La EHGNA se presenta en todos los grupos étnicos, sin embargo la prevalencia es mayor en la población hispana (45%) (21). En México se reporta una incidencia de EHGNA en la población adulta del 14% (22).

Los pacientes adultos con DM2 tienen un riesgo incrementado para desarrollar EHGNA, y ello les confiere mayor riesgo de progresión a cirrosis y mortalidad que aquellos pacientes con EHGNA no diabéticos (20). En este caso, la RI parece ser un mecanismo mediador de la fibrosis hepática y podría explicar en parte la naturaleza más agresiva de la EHGNA en la DM2 (23).

ETIOPATOGENESIS DE LA EHGNA

Aunque inicialmente el origen de la EHGNA fue considerado como un proceso de dos “golpes”, actualmente se reconoce como una enfermedad de origen y progresión multifactorial (24,25). Al inicio de la enfermedad, la EHGNA se caracteriza por dos procesos principales: la presencia de >5% de contenido de grasa en el hígado, que se define como esteatosis hepática (EH); y la resistencia a la insulina (RI) (26).

Los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la EHGNA aún no están claros. Una importante cuestión sin resolver es si la enfermedad es una causa o una consecuencia de la RI, sin embargo, la interacción entre la EHGNA y la DM2 ha sido descrita ampliamente. Es probable que los pasos iniciales en el desarrollo de ambas enfermedades son comunes, tales como la influencia de los antecedentes genéticos (27), la programación epigenética (28), el medio ambiente intrauterino (29), y los factores ambientales (como el alto consumo de calorías y la inactividad física) (30).

Varios estudios realizados en los últimos años han reportado la existencia de diferentes polimorfismos asociados con el daño hepático en la edad pediátrica (fosfatidiletanolamina N-metiltransferasas, uridinadifosfato glucuroniltransferasa 1 [UGT1A1], adiponutrina, el sustrato 1 del receptor de insulina [IRS-1] y proteínas de la enzima superóxido dismutasa) (26). La susceptibilidad para EHGNA podría también ser correlacionada con variantes de genes que controlan el metabolismo de lípidos, la inflamación y el estrés oxidativo, encontrando un origen común con la dislipidemia y la DM2 (29, 31)

La esteatosis se desarrolla cuando los niveles de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) se elevan dentro del hepatocito; ya sea por absorción o síntesis ("entrada"), con la posterior esterificación de triglicéridos por medios enzimáticos; y una menor oxidación de ácidos grasos libres y secreción de los mismos ("salida"). Esto favorece la acumulación intrahepática y la RI (32).

Sin embargo, la etapa inicial del desarrollo de la EHGNA no se limita a la afectación hepática. Los tejidos y órganos extra-hepáticos, entre ellos el tejido adiposo, contribuyen a la producción y liberación de endotoxinas, adipocitocinas y citocinas pro-inflamatorias (33).

El tejido adiposo, originalmente visto como un tejido conectivo con capacidad de almacenamiento; actualmente se considera un órgano endocrino organizado, tanto vascularizado e inervado, con una anatomía clara y un alto grado de plasticidad para responder tanto a cambios corporales y ambientales (34,35). Los principales depósitos de tejido adiposo abdominal incluyen el tejido adiposo visceral (VAT),

localizado e incluido por el peritoneo en el centro; el tejido adiposo subcutáneo (SAT) situado directamente debajo de la piel; y finalmente el tejido adiposo ectópico, que consiste en depósitos de grasa en localidades no directamente asociado con el almacenamiento, como el hígado y el epicardio (36, 37).

La presencia de tejido adiposo ectópico a nivel hepático surge como resultado de una alteración en el metabolismo del tejido adiposo visceral. La hipótesis principal de esta alteración a nivel abdominal, es que estos depósitos ectópicos se producen como resultado de la incapacidad del SAT para almacenar el exceso de lípidos; en efecto, un "desbordamiento" de SAT al VAT y, finalmente, a otros órganos y tejidos como el hígado, llevando a EHGNA (37).

Estos factores contribuyen a la RI y a la acumulación de FFA en el hígado en forma de triglicéridos; formando una red de interacciones que conlleva a mayor estrés oxidativo y daño en el hígado (33). Por último, este complejo conjunto de elementos y sus interacciones produce alteraciones moleculares, cruciales tanto para activar las células estrelladas del hígado que conduce a fibrosis así como promover el daño multiorgánico grave que caracteriza a la EHGNA, la DM2 y la ECV (38, 39).

Debido a la complejidad de estos mecanismos y su interacción, actualmente la teoría más aceptada para explicar el desarrollo y la progresión de la EHGNA tanto en niños como en adultos es "la hipótesis de múltiples golpes" con un origen multifactorial. Sin embargo, todavía existe incertidumbre acerca de cuál de los factores antes mencionados es la causa primaria de la EHGNA y cuáles se producen como resultado de la enfermedad (26).

En una revisión de 2011, Cohen y colaboradores (40) proporcionan una visión general de los datos relevantes hasta ese momento de la patogénesis de la EHGNA. En dicho trabajo, se establecen el papel principal tanto de la RI intrahepática y la acumulación de grasa en el hígado. La RI induce la acumulación de triglicéridos en el hígado, lo que refuerza la hipótesis de que la EHGNA es la manifestación hepática del síndrome metabólico.

Una importante cuestión sin resolver es si la EHGNA es una causa o consecuencia de la RI. En la actualidad, no se conocen los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la EHGNA en los pacientes adolescentes con DM2, por lo que su etiología requiere de diversos estudios, así como de las relaciones con otros componentes de la enfermedad, dentro de ellos, la dislipidemia (26, 41).

MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA EHGNA

La histología hepática se considera el estándar de oro para el diagnóstico de EHGNA, dicho método es capaz de identificar además la esteatohepatitis y la presencia de fibrosis hepática, lo que tiene importantes implicaciones en el pronóstico del paciente (26, 40, 41). Se le considera el estudio con mayor sensibilidad, supera a los datos de laboratorio (ALT, AST, GGT) y a los métodos de imagen por varias razones, sin embargo, el procedimiento de la biopsia hepática es invasivo y en niños requiere sedación con riesgos potenciales, que incluyen dolor, sangrado e infección (40).

Teniendo en cuenta los riesgos de la biopsia hepática en el paciente pediátrico, un medio alternativo para la obtención de información, de diagnóstico y de vigilancia longitudinal de la grasa hepática en el hígado de niños y adolescentes a partir de modalidades de imágenes de una manera no invasiva y sin la necesidad de sedación es el método ideal (41). Esto es particularmente relevante para los niños con EHGNA, en los que es necesaria la vigilancia de la enfermedad durante meses o incluso años, actualmente con los avances en la tecnología se han reemplazado los métodos para el diagnóstico de EHGNA (42-44).

Un método para evaluar la EHGNA es el Ultrasonido (USG). La esteatosis hepática en el USG aparece como un aumento difuso de la ecogenicidad hepática referido como "hígado brillante", debido al aumento de la reflexión desde el parénquima hepático, que es causada por la acumulación intracelular de vacuolas de grasa. La gravedad se califica utilizando una escala de cuatro puntos, de la siguiente manera: normal (grado 0), leve (grado 1), moderado (grado 2) y grave (grado 3) (45-47).

La precisión del USG en la detección de EHGNA varía dependiendo de la gravedad de la enfermedad, nos ofrece un diagnóstico bastante preciso de la esteatosis hepática de moderada a grave (grado histológico $\geq 30\%$), con una sensibilidad informada que va desde 81.8% a 100% y una especificidad tan alta hasta el 98% (45, 48). Sin embargo, el diagnóstico de EHGNA no es tan exacto cuando se consideran todos los grados de esteatosis (es decir, $\geq 5\%$), con una sensibilidad que oscila entre el 53.3% y el 66.6% y una especificidad que va de 77% a 93.1% (45, 48).

La presencia de fibrosis hepática o la presencia de enfermedad hepática crónica subyacente pueden reducir la precisión de la ecografía en el diagnóstico de la EHGNA. El USG es un estudio operador dependiente (45); y es de naturaleza cualitativa. Por lo que aunque el USG es fácil de realizar y menos costoso que otros métodos por imagen para la valoración de pacientes con EHGNA; debido a

su baja precisión en la detección de la esteatosis leve, su dependencia del operador, y su naturaleza cualitativa, no parece ser una herramienta adecuada para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con EHGNA (48).

Los estudios de imagen como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (RM) son las técnicas más precisas para la medición de grasa hepática; sin embargo, siguen siendo costosos y tienen limitaciones en la práctica clínica.

La TAC utiliza rayos X, un estudio sin contraste asistido por ordenador que es capaz de medir la grasa abdominal, pero existe una alta exposición a la radiación, mientras que las imágenes de un segmento se utilizan a menudo en estudios de investigación para predecir los compartimentos de todo el cuerpo reduciendo costos y la exposición a la radiación; este diseño es menos preciso que el estudio multicorte (42, 44). Aunque se reporta que la precisión de la TAC en el diagnóstico de la EHGNA moderada a grave es bastante buena, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 82% (45, 47, 48); no es tan exacta para detectar la esteatosis leve, se reporta una especificidad del 91.3% y una sensibilidad del 72.7% (45, 48). Por otra parte, el peligro potencial de la radiación ionizante hace de la TAC un estudio inadecuado para su uso en niños, los estudios con TAC son limitados en los estudios de investigación y no se sugieren o no están permitidos por los comités de ética para poblaciones específicas, como la población pediátrica (48).

A diferencia de la TAC y el USG, que evalúan la esteatosis hepática a través de parámetros de aproximación, la RM mide de forma directa la cantidad de grasa hepática. Midiendo la fracción grasa por densidad de protones (PDFF), que se define como la cantidad de protones unidos a la grasa dividida por la cantidad de todos los protones en el hígado, incluyendo los que están unidos a la grasa y el agua. Además, la RM no utiliza rayos X, como tal, es segura y más aplicable para todas las poblaciones, incluidos los pacientes pediátricos (49).

La resonancia magnética se considera el estudio ideal para la medición total y regional de los depósitos de grasa a nivel abdominal (48). Nuevas técnicas se han desarrollado y continúa su validación; por ejemplo, la resonancia magnética por espectroscopia (RMS) con formación de imágenes y señales de agua y grasa separadas, mide los espectros con mayor contenido de protones, la mayoría de los picos identificables se derivan de agua y grasa, con agua que aparece como un solo pico a 4.7 ppm (partes por millón) y la grasa como múltiples picos, debido a la presencia de diversos enlaces químicos entre los protones y los átomos adyacentes en la grasa, por ejemplo, un grupo metileno (CH₂) con pico a 1.3 ppm y otros picos más pequeños en varios lugares (48).

Las intensidades de señal de los picos de grasa y agua se pueden cuantificar directamente por el trazado espectral de cada pico, y la PDFF se pueden calcular como la relación de la suma de las intensidades de señal de los picos derivadas de la grasa dividido por la suma de las intensidades de señal de todos los picos de grasa y agua. Para la cuantificación de grasa hepática, los datos se recogen desde un solo Voxel (típicamente de 2x2x2cm a 3x3x3cm de tamaño), colocados manualmente en el parénquima hepático (48).

Estudios anteriores han comparado la precisión de las técnicas de RM y otras modalidades de imagen en la evaluación de la EH, con el grado histológico como patrón de referencia. Dichos estudios demostraron que la RM supera a la TAC y el USG en el diagnóstico y clasificación de la EHGNA (45, 47).

La RM en la detección de la EHGNA con un porcentaje histológico $\geq 5\%$ tiene una sensibilidad de 76.7% a 90.0% y una especificidad de 87.1% a 91%. Al evaluar la precisión de la resonancia magnética por espectroscopia (RMS), la sensibilidad es de 80% a 91%, con una especificidad de 87% a 90.2% (45, 47, 48). Además de no exponer al paciente a radiación, la RM puede evaluar la esteatosis hepática en forma objetiva mediante un índice cuantitativo PDFF. Dicho valor también permite la clasificación de la EHGNA por medio de grados de severidad en 1, 2 y 3 (50, 51).

Estos resultados y las limitaciones inherentes de la biopsia hepática, incluyendo su capacidad de invasión y capacidad para obtener muestras muy pequeñas, sugieren que la RM es el método de elección, en estudios de investigación (52). En estudios de investigación clínica pediátrica, la RM supera a al USG, y tiene menos riesgo que la TAC para la medición no invasiva de la EHGNA (53).

ALTERACIÓN EN EL METABOLISMO DE c-HDL Y DM2

Los pacientes con DM2 tienen característicamente un perfil lipídico aterogénico, el cual se caracteriza por hipertrigliceridemia, c-HDL bajo, partículas de c-LDL pequeñas y densas, y concentraciones elevadas de apolipoproteína B100 (apoB) (54). Diversos estudios han demostrado que los valores bajos de c-HDL son un factor de riesgo independiente de enfermedad coronaria en pacientes con DM2; sin embargo, existen evidencias recientes que sugieren que la función de las partículas de colesterol HDL más que la concentración de c-HDL, podrían tener un papel clave en la patogenia de la aterosclerosis (55).

Características físico-químicas de las HDL

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas plasmáticas de forma esférica o discoidal, con alta densidad debido a su alto contenido de proteínas (>30%). Existen dos subclases principales de HDL, las partículas grandes ricas en lípidos o HDL2, y las partículas pequeñas con mayor contenido protéico o HDL3; dichas subpoblaciones han sido identificadas mediante ultracentrifugación (56).

Sin embargo, se han desarrollado otros métodos que separan las partículas de HDL por tamaño y carga o contenido de apolipoproteínas A-I y A-II. El análisis cuantitativo de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) permite la clasificación de las HDL en 5 subpoblaciones distintas de acuerdo a su tamaño (55), las HDL grandes (2b y 2a) y las HDL pequeñas (3a, 3b y 3c).

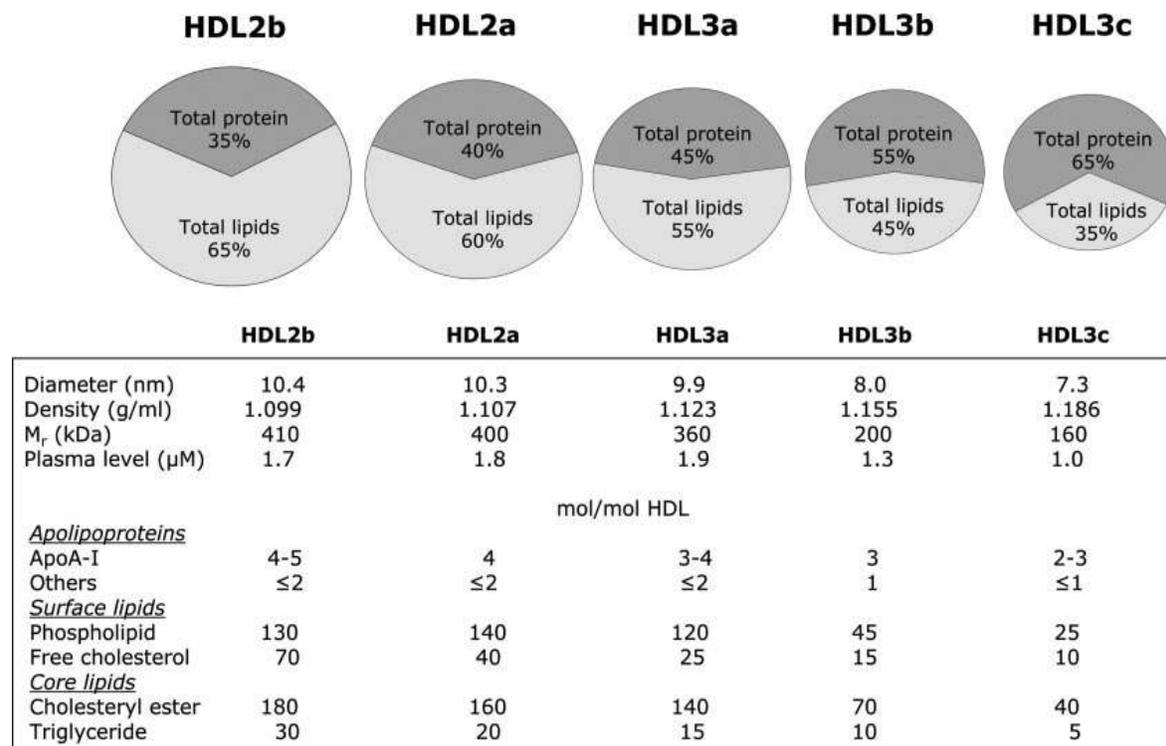


Fig.1 Heterogeneidad de las propiedades físico químicas de las HDL funcionales normales en sujetos sanos normolipidémicos. Kontush A, et al. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation and Atherosclerosis. Pharmacol Rev 2006; 58: 342-374 (55).

Mecanismo ateroprotectores de las HDL

El efecto ateroprotector de las HDL contra la aterosclerosis esta mediado por varios mecanismos, entre los que se encuentran:

1) Capacidad para promover el eflujo de colesterol

El eflujo de colesterol de las células periféricas hacia las HDL es el primer paso en el transporte reverso del colesterol (56). Mediante este proceso, el exceso de colesterol depositado en tejidos periféricos incluyendo los vasos sanguíneos, regresa al hígado donde es reutilizado o es excretado en la bilis. El mayor efecto protector de las HDL ha sido atribuido a su papel en el transporte reverso del colesterol (57):

2) Actividad antioxidante

El inicio y la progresión de la placa de ateroma en la pared arterial dependen de la peroxidación de las lipoproteínas mediada por radicales libres, en particular de las LDL (58). Parte del efecto anti-aterogénico de las HDL se debe a su capacidad antioxidante (59). Varios de los componentes de las partículas de HDL participan en esta propiedad, entre ellos sus apolipoproteínas (apoA-I y apoA-II) y algunas enzimas como la paraoxonasa 1 (PON1), lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT) y la acetil-hidrolasa del factor activador de plaquetas (PAFH), las cuales evitan la oxidación de las LDL y sus efectos adversos sobre la función endotelial (60).

3) Propiedades antiinflamatorias

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico. En el desarrollo de la placa aterosclerosa, la adhesión de leucocitos a las células endoteliales y su interacción con las células del músculo liso tienen un papel muy importante (61). La interacción de los leucocitos con las células endoteliales está mediada por moléculas de adhesión expresadas en la superficie del endotelio dañado. Tales moléculas incluyen a la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1), la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y la E-selectina (62). Las VCAM-1 y las ICAM-1 son mediadoras de la adhesión de linfocitos y monocitos circulantes, mientras que la E-selectina permite su anclaje en la superficie de las células endoteliales (63). Las partículas de HDL, principalmente las pequeñas inhiben la expresión de éstas moléculas de adhesión inducida por citocinas (64).

También se han descrito otros efectos ateroprotectores de las HDL, entre los que se encuentran: función vasodilatadora, acción antitrombótica y antiapoptótica, además de que mejoran la función endotelial (64).

Alteraciones de las HDL en la DM2.

Los pacientes con DM2 presentan una alteración en el metabolismo de los lípidos, donde la anormalidad central parece ser el aumento de la tasa de la síntesis hepática de triglicéridos y la producción de partículas VLDL por el hígado, lo que lleva a anomalías como disminución de los niveles de c-HDL sérico (65), así como modificaciones en la estructura y composición de las subpoblaciones de HDL y alteración de sus funciones biológicas (66).

La resistencia a la insulina juega un papel clave para ocasionar dislipidemia, aumentando la liberación de ácidos grasos libres y estimulando la producción hepática de triglicéridos (67). En adultos con DM2, se ha encontrado además una disminución de las HDL grandes y aumento de las HDL pequeñas; este patrón se asocia con un incremento en el riesgo cardiovascular (66).

En niños mexicanos, se ha reportado la distribución del tamaño de HDL mediante PAGE. En este estudio se encontró que los niños con DM2 tenían proporciones significativamente menores de HDL2b y HDL2a y mayores proporciones de HDL3b y HDL3c que los otros 3 grupos estudiados (68).

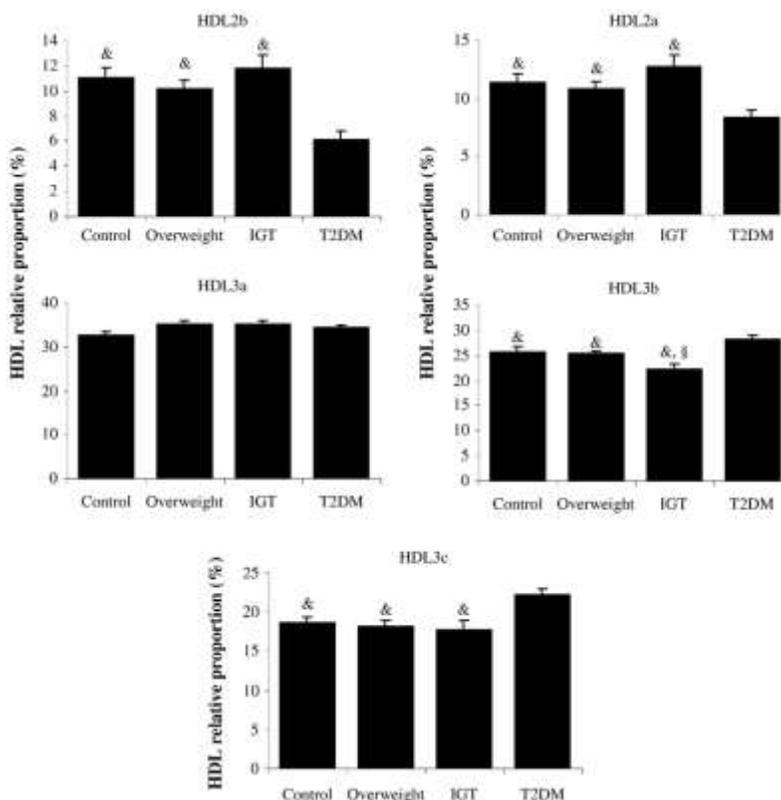


Fig.2 Subclases de HDL en los cuatro grupos estudiados. La altura de la barra indica la proporción de cada subclase de HDL expresado como un porcentaje relativo al total de la proteína HDL determinada por densitometría óptica \pm error estándar (68).

Además se encontró que los niños con obesidad mostraron distribuciones de tamaño de HDL similares a los de los controles; sin embargo, los niños que presentaban resistencia a la acción de la insulina tenían proporciones más bajas de HDL2b, y HDL2a y mayores proporciones de HDL3b en comparación con los sujetos con obesidad pero sin resistencia a la insulina. Este estudio mostró que la distribución del tamaño de HDL se desplaza hacia las partículas más pequeñas en pacientes pediátricos con DM2 y en niños con obesidad y resistencia a la acción de la insulina, independientemente de su estado de tolerancia a la glucosa. Este trabajo concluye que se necesitan más estudios para dilucidar el efecto de los tamaños de las HDL y su acción ateroprotectora; así como el cambio de la distribución del tamaño de las partículas HDL en niños con DM2 y su relación con ECV (68).

En otro estudio realizado en adolescentes normolipidémicos y con dislipidemia (hipertrigliceridemia y valores bajos de c-HDL), se observó un aumento de las HDL pequeñas y disminución de las HDL grandes en aquellos sujetos con dislipidemia comparados con adolescentes normolipidémicos (69).

La importancia de estos hallazgos radica en que una distribución anormal de subclases de HDL podría estar asociada a un transporte reverso de colesterol alterado, así como deterioro de los mecanismos ateroprotectores de las HDL, aumentando el riesgo de ECV en pacientes con DM2 (56, 57). Además, dado el papel establecido de la acumulación de lípidos y la inflamación en la patogénesis de la DM2, es posible que las acciones de transporte reverso de colesterol y acciones antiinflamatorias de las HDL en los tejidos metabólicos y células inmunes, contribuyan a mejorar la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa (66).

En adultos con DM2 se han encontrado alteraciones en la distribución de subpoblaciones de HDL relacionadas con el mal control glucémico (67) por lo que en niños con DM2 se requiere valorar los niveles de HbA1c al momento de estudiar la distribución de subpoblaciones de HDL.

En cuanto a las actividades anti-inflamatorias de las HDL, se ha documentado que los sujetos con c-HDL bajo y mayor riesgo de ECV, tienen concentraciones más altas de moléculas inflamatorias como E-selectina (70). Asimismo se ha observado una correlación inversa entre los niveles séricos de c-HDL y los valores de ICAM-1 y E-selectina en los sujetos con c-HDL bajo, pero no en los sujetos con valores normales o altos de c-HDL (71).

DM2, EHGNA Y ALTERACIÓN EN HDL.

La EHGNA está fuertemente asociada con obesidad, RI, hipertensión y dislipidemia, siendo una condición altamente aterogénica. (72). (72). La EHGNA es observada hasta en 80-85% de los pacientes adultos con DM2 y obesidad, observando además concentraciones plasmáticas de triglicéridos altas y una menor concentración de colesterol HDL (73).

La acumulación de grasa a nivel hepático tiene diversos efectos metabólicos, y se asocia con la presencia de DM2 tanto en adultos como en niños (15, 16, 74). Entre otras alteraciones metabólicas, un perfil de lípidos alterado acompaña a estas dos entidades (15, 66). En adultos con obesidad y DM2, se ha demostrado que la presencia de EHGNA eleva los niveles de triglicéridos, alteran el tamaño y la distribución de las subclases de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL, y disminuye los niveles séricos de c-HDL (75).

La obesidad es considerada un factor detonante en el desarrollo de EHGNA (40). En 2007 se publicó un estudio donde se determinaron los efectos de la EHGNA sobre el tamaño y la concentración de las lipoproteínas en 49 adolescentes (edad media 15.3 ± 0.3 años) con obesidad (IMC 35.7 ± 0.9 kg/m²) (76). En dicho estudio se encontró que en el grupo de niños con EHGNA (n=12 definido como la presencia de fracción grasa hepática >5.5% por IRM) había una alteración en los tamaños y la distribución de las subpoblaciones de las lipoproteínas, en comparación con el grupo de niños sin EHGNA (n=37 definido como la presencia de fracción grasa hepática <5.5% por IRM). Los niños con EHGNA tenían 88% mayor concentración de VLDL grandes en comparación con el grupo sin EHGNA ($p < 0.001$), concentraciones significativamente más altas de LDL pequeñas ($p < 0.007$) y concentraciones de triglicéridos significativamente más altas ($p < 0.001$) que el grupo sin esteatosis. En cuanto a las concentraciones de c-HDL, estas fueron significativamente más bajas en el grupo con fracción grasa hepática >5.5% ($p=0.006$). Aunque, no se observaron diferencias significativas entre la concentración total de partículas de colesterol HDL entre los dos grupos; el grupo con fracción de grasa hepática <5.5% (sin EHGNA) presentó concentraciones significativamente mayores de HDL grandes y concentraciones más bajas de partículas de HDL medianas en comparación con el grupo con fracción grasa hepática >5.5% ($p < 0.001$ y $p=0.005$, respectivamente). Este fenotipo pro-aterogénico estaba fuertemente relacionado con el contenido de lípidos intrahepáticos.

El hígado graso refleja un suministro hepático excesivo de lípidos, que perpetua un estado metabólico propicio para la dislipidemia en pacientes con DM2 (75). El aumento de la RI es un importante contribuyente indiscutible de la DM2 (2), EHGNA (77), y la dislipidemia (75). De hecho, el contenido de grasa en el hígado parece ser el mejor predictor de la resistencia a insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo, y el mismo hígado (77).

En otro estudio publicado en 2010, donde se estudió la asociación de la fracción de grasa hepática (HFF) y el tejido de grasa visceral (VAT) con la distribución de las concentraciones y tamaños de lipoproteínas en el plasma de adolescentes con obesidad y curva de tolerancia normal a la glucosa a las 2 horas (glucosa a las 2 horas <140 mg/dL) de tres diferentes grupos étnicos se encontraron los siguientes resultados (78):

De los 99 pacientes adolescentes (edad media 14.6 ± 2.2 años) con obesidad (33 caucásicos, 33 hispanos y 33 afroamericanos); el porcentaje de grasa corporal fue mayor en los jóvenes afroamericanos que en los blancos ($p=0.006$) o hispanos ($p=0.007$). A pesar de que se observó un mayor nivel de adiposidad total en adolescentes afroamericanos, el VAT fue significativamente menor en los afroamericanos que en los hispanos ($p<0.0001$) y los blancos ($p<0.0001$), mientras que la grasa subcutánea fue similar entre los grupos. La HFF fue significativamente menor en afroamericanos que en caucásicos ($p=0.001$) e hispanos ($p=0.001$). En cuanto a la concentración de partículas de colesterol HDL se encontró que los adolescentes obesos afroamericanos tenían concentraciones significativamente mayores de partículas grandes de HDL, en comparación con los adolescentes caucásicos obesos ($p=0.001$). Las concentraciones de HDL total, HDL media y HDL pequeño no tuvieron variaciones significativas respecto al grupo étnico. Sin embargo, con respecto a los tamaños de las partículas de colesterol HDL, los afroamericanos tuvieron tamaños significativamente mayores ($p=0.005$) en comparación con los otros dos grupos.

En pacientes adultos con DM2 la presencia de EHGNA se asocia a un aumento del riesgo de ECV (79, 80, 81). Estudios actuales han demostrado que la aterosclerosis es un proceso que comienza en la infancia temprana, observando estrías grasas en la aorta y las arterias coronarias y carótidas en niños y adolescentes (82). En adolescentes con DM2, la presencia de EHGNA podría ser aún más alarmante, ya que podrían estar representando un grupo con mayor riesgo de aterosclerosis en etapas tempranas, lo que conduciría a establecer una terapia más agresiva para evitar el desarrollo de ECV en esta población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM2 es una enfermedad emergente en la población pediátrica y un importante problema de salud pública a nivel mundial. La asociación entre la DM2 y la EHGNA ha sido descrita en diversos estudios; en adolescentes con DM2 la prevalencia EHGNA es de un 60-80%. Los pacientes adultos con DM2 y EH son reconocidos como un subgrupo con mayor morbilidad y mortalidad global relacionadas a causa hepática; debido a que la RI parece ser un mecanismo potenciador de la fibrosis hepática y podría explicar en parte la naturaleza más agresiva de la EHGNA en la DM2.

Estudios recientes sugieren que una alteración en las características fisicoquímicas y la capacidad funcional de las partículas de colesterol HDL más que la concentración de C-HDL, podrían tener un papel clave en la etiología de la aterosclerosis.

A pesar del incremento de riesgo cardiovascular que ocasionan estas alteraciones, en la actualidad son escasos los estudios en los que se han analizado las características fisicoquímicas de las HDL en adolescentes con DM2 y hasta el momento no existen estudios en los cuales se haya evaluado la asociación entre EH con la distribución y composición de las subpoblaciones de las HDL en adolescentes con DM2.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la asociación entre esteatosis hepática con los tamaños y la composición de las subpoblaciones de las HDL en adolescentes con DM2?

JUSTIFICACIÓN

La DM2 es una enfermedad crónica con complicaciones microvasculares y macrovasculares que provocan una morbilidad frecuente y son de las primeras causas de mortalidad prematura a nivel mundial.

Dado que la EH es una condición frecuente en los pacientes con DM2 y se asocia a una dislipidemia aterogénica, este estudio permitirá definir si los pacientes adolescentes con DM2 y EH podrían tener un mayor riesgo proaterogénico.

La alteración en el tamaño y la distribución de las partículas de HDL se relacionan con cambios en la funcionalidad de las mismas con reducción en sus funciones ateroprotectoras. En adolescentes con DM2 se han reportado alteraciones en la distribución de las subpoblaciones de HDL, asimismo en adolescentes con EH se han observado alteraciones en la distribución de dichas subpoblaciones; sin embargo, no se ha evaluado la relación entre estas dos condiciones en los adolescentes con DM2.

Evaluar la asociación entre EH y la alteración en el tamaño y la composición de las subpoblaciones de HDL en pacientes con DM2; nos permitirá conocer posibles mecanismos proaterogénicos en el paciente pediátrico con DM2.

Con los resultados de este estudio, en etapas posteriores, se podrá tratar de diseñar estrategias para llevar a cabo una terapia más efectiva y disminuir la presencia de eventos cardiovasculares tempranos en estos pacientes.

HIPÓTESIS

La presencia de esteatosis hepática se asocia con la proporción de subpoblaciones (disminución del 20% de las HDL2b y 2a y aumento del 20% de las HDL 3a y 3b) y la composición (aumento de los triglicéridos y disminución de los ésteres de colesterol) de las HDL en pacientes adolescentes con DM2.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la asociación entre los tamaños y la composición de las HDL con esteatosis hepática, en adolescentes con DM2.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar los tamaños y composición de las HDL en adolescentes con DM2 y esteatosis hepática, con las de adolescentes con DM2 sin esteatosis hepática.
- Comparar los tamaños y composición de las HDL en adolescentes con DM2, con las de adolescentes sanos.
- Evaluar la correlación entre la fracción de grasa hepática con los tamaños y la composición de las HDL en adolescentes con DM2

MATERIAL Y MÉTODO

DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio observacional, transversal y comparativo.

- ❖ De acuerdo a la imposición o no de una maniobra con fines de investigación.
Es un estudio: **Observacional**
- ❖ De acuerdo al seguimiento o no del paciente a través del tiempo.
Es un estudio: **Transversal**
- ❖ De acuerdo a la búsqueda o no de asociación entre dos variables.
Es un estudio: **Comparativo**

POBLACIÓN OBJETIVO

Adolescentes con DM tipo 2 y adolescentes sanos.

POBLACIÓN ELEGIBLE

Adolescentes con DM tipo 2 tratados en la clínica de diabetes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Y un grupo de adolescentes sanos de ambos sexos, en edades comprendidas entre los 10 y 18 años para el grupo de referencia.

CRITERIOS DE INCLUSION

GRUPO 1

1. Adolescentes de 10-18 años de edad.
2. Ambos sexos.
3. Estadios II- V Tanner.
4. Diagnóstico de DM 2, de al menos 6 meses de evolución, de acuerdo a los criterios de la American Diabetes Association (ADA) 2017 para DM y las guías de la ISPAD 2014 para niños y adolescentes con DM2.

GRUPO 2

1. Adolescentes de 10-18 años de edad.
2. Ambos sexos.
3. Estadios II- V Tanner.
4. Diagnóstico de DM 2, de al menos 6 meses de evolución, de acuerdo a los criterios de la American Diabetes Association (ADA) 2017 para DM y las guías de la ISPAD 2014 para niños y adolescentes con DM2.
5. Esteatosis hepática diagnosticada por estudio de RMS.

GRUPO 3 (GRUPO DE REFERENCIA)**

1. Adolescentes de 10-18 años de edad
2. Ambos sexos
3. Estadios II-V Tanner
4. Sin algún dato de patología al momento del estudio.
5. IMC normal (IMC entre p10 a la p85 para edad y sexo).

****El grupo de referencia tiene 3 objetivos en nuestro estudio:**

Se requieren como objetivo principal para **definir una la distribución normal de los tamaños y composición de las subpoblaciones de HDL en los pacientes adolescentes mexicanos.** Ya que no existe como tal un “valor puntal” o “punto de corte” (ejemplo: como en su caso la glucemia ≥ 200 mg/dl para el diagnóstico de DM) que nos indique que es normal o anormal en un paciente adolescente. Por lo cual se tomará en cuenta como un grupo de referencia para describir la distribución normal de los tamaños y composición de las subpoblaciones de HDL, se utilizará en estandarizar técnicas de laboratorio, así como en el análisis de los resultados.

CRITERIOS DE EXCLUSION EN LOS 3 GRUPOS

1. Alteración de la función tiroidea
2. Alteración en pruebas de función renal (creatinina sérica >1.2 mg/dl)
3. Hepatopatías, diferentes a enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA).
4. Procesos infecciosos al momento del estudio o 15 días antes del ingreso al estudio.
5. Tratamiento con medicamentos reguladores de lípidos (durante los 6 meses previos al estudio) entre ellos los derivados del ácido retinóico, estrógenos, esteroides, tiazidas.
6. Tratamiento con medicamentos que modifiquen los niveles de HDL (durante los 6 meses previos al estudio) entre ellos Estatinas, fibratos, derivados del ácido retinóico y esteroides.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Al ser un estudio transversal no se cuenta con criterios de eliminación.

CLASIFICACION DE LAS VARIABLES

	Nombre	Escala de Medición
Variable Independiente	Diabetes Mellitus tipo 2	Categórica
	Esteatosis Hepática	Categórica
Variable Dependiente	<u>Distribución de las subpoblaciones de HDL</u>	
	HDL2b	Numérica de razón o proporción
	HDL2a	Numérica de razón o proporción
	HDL3a	Numérica de razón o proporción
	HDL3b	Numérica de razón o proporción
	HDL3c	Numérica de razón o proporción
	<u>Composición de las subpoblaciones de HDL</u>	
	Colesterol Total	Numérica de razón o proporción
	Colesterol libre	Numérica de razón o proporción
	Triglicéridos	Numérica de razón o proporción
	Fosfolípidos	Numérica de razón o proporción
	Contenido de apolipoproteínas	Numérica de razón o proporción
Variable Confusora	Edad	Numérica Continua
	Sexo	Categórica
	Estadio de Tanner	Categórica
	IMC (Índice de masa corporal)	Numérica Continua
	Niveles de HbA1c	Numérica Continua
	Dosis de insulina	Numérica Continua
	Tiempo de evolución de la DM tipo 2	Numérica Discreta

MATERIAL Y METODO

Se incluyó 47 pacientes con DM tipo 2 diagnosticados de acuerdo a los criterios de la ADA 2017 y de la ISPAD 2014 que acuden a la consulta de endocrinología de la Clínica de Atención al Niño Diabético del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de ambos sexos, en edades comprendidas entre los 10 y 18 años. Así como un grupo de 23 adolescentes sanos, como grupo de referencia para estudiar la distribución y composición normal de las subpoblaciones de HDL en adolescentes sanos.

A todos los participantes se les explicaron las características del estudio y se les solicitó por escrito el consentimiento informado al padre o tutor y el asentimiento al niño. A todos se les realizó historia clínica completa, antropometría (peso, talla, IMC, circunferencia de cintura), examen físico y se aplicó un cuestionario para investigar antecedentes socio-demográficos.

Se citó a todos los pacientes para realizar estudio de resonancia magnética por espectroscopia (RMS) para determinar la presencia ó ausencia de de EHGNA. Para la cuantificación de los depósitos de grasa se utilizó la secuencia STEAM (Stimulated echo adquisición mode); secuencia multi-eco que utiliza pulsos de 90° - 90°-90°, con mayor sensibilidad para cuantificar la grasa hepática. Los estudios se realizar con técnica uni-vóxel. La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se calcularón sumando al área bajo la curva espectral de los lípidos hepáticos de (0.9 – 3.0 ppm [partes por millón]). Los resultados se muestran en forma de proporciones. Los valores obtenidos son en forma de fracción grasa, que es el porcentaje de la grasa del total del vóxel estudiado (agua y grasa):

$$\text{Fracción grasa} = \text{grasa} / (\text{grasa} + \text{Agua}) \times 100.$$

Todos los pacientes se citaron con ayuno de 12 horas para la extracción de una muestra de sangre venosa; se tomó una muestra de 30 mL colectada en tubo seco y en tubos con EDTA. El plasma se separó mediante centrifugación a 4° C a 2500 revoluciones por minuto durante 10 minutos, varias alícuotas se almacenarán a -70° C usando aprotinina y benzamidina como inhibidores de proteasas, para la determinación de subpoblaciones de HDL y composición química. En plasma fresco, se determinó glucosa, pruebas de función renal, pruebas de función hepática y tiroidea, colesterol total, c-HDL, c-LDL y triglicéridos. La muestra colectada se almacenó en una gradilla, el día mismo de su obtención se realizó la recolección de esas muestras por un transportista certificado IATA para entregarse al Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología para su análisis y procesamiento.

DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Edad

- Definición operacional: Tiempo transcurrido del nacimiento al momento de la inclusión al estudio.
- Escala de medición: cuantitativa, continua

Sexo

- Definición conceptual: hombre o mujer
- Escala de medición: nominal

Peso

- Definición operacional: se determinara mediante báscula de pie (precisión de 100 grs.); con el paciente en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas. La medida se realiza con el paciente en bata clínica y se registrará la décima de kilogramo más próxima (83).
- Escala de medición: cuantitativa, continua

Talla

- Definición operacional: distancia entre el vértex y el plano de sustentación; el paciente se coloca de pie, completamente estirado, con los talones juntos. Se coloca la cabeza del paciente en el plano de Frankfurt y se realiza una tracción de la cabeza a nivel de las apófisis mastoides. Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadiómetro hasta contactar con la cabeza del paciente, se obtendrá la talla máxima y se ajustará al centímetro más próximo (83).
- Escala de medición: cuantitativa, continua

Circunferencia de Cintura

- Definición operacional: es la circunferencia obtenida a la mitad de la distancia entre la décima costilla y la cresta iliaca, con el paciente en posición erecta y al final de una espiración normal. Se utilizará una cinta métrica flexible como instrumento de medición (precisión de 1 mm). Se ajustará al centímetro más próximo (83).
- Escala de medición: cuantitativa, continua

Índice de masa corporal (IMC)

- **Definición operacional:** medida de relación entre peso y talla. Se calculará utilizando la fórmula de Quetelet (84). (IMC = peso (kg) /estatura (m²)
- **Escala de medición:** cuantitativa, continua.

Tensión arterial

- **Definición operacional:** cada medición será realizada con el paciente sentado, en reposo; con un esfigmomanómetro de mercurio, con un brazalete que cubra los 2/3 del brazo realizada a la altura del corazón en el brazo derecho. Se realizaran 3 determinaciones con un intervalo de 5 minutos entre cada una, y el promedio de la segunda y tercera determinación será el valor de la tensión arterial. Se percentilaran de acuerdo a edad, sexo y talla, con la tablas establecidas en el reporte Task Force (85).
- **Escala de medición:** cuantitativa, continua

Dosis de insulina

- **Definición operacional:** unidades de insulina utilizadas en 24 horas y expresados en UI por kilogramo de peso corporal.
- **Escala de medición:** cuantitativa, continua.

Control Metabólico

- **Definición operacional:** Se medirán niveles de HbA1c. Para lograr el control glucémico en el paciente pediátrico con DM2, la AAP (Academia Americana de Pediatría) y la ADA recomiendan metas concentraciones de HbA1c menores del 7% (86,87).
- **Escala de medición:** cuantitativa, continua.

Esteatosis hepática

- **Definición operacional:** Se realizó estudio por RMS, los resultados se muestran en forma de proporciones como se describió anteriormente Los estudios se realizar con técnica uni-vóxel. La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se calcula sumando al área bajo la curva espectral de los lípidos hepáticos de (0.9 – 3.0 ppm [partes por millón]). Los valores obtenidos son en forma de fracción grasa, que es el porcentaje de la grasa del total del vóxel estudiado (agua y grasa):

- **Fracción grasa = $\text{grasa} / (\text{grasa} + \text{Agua}) \times 100$.**
- Escala de medición: dicotómica

Distribución de subpoblaciones de HDL

HDL 2b

- Definición operacional proporción relativa del total de las partículas de HDL según el siguiente intervalo de tamaño 10.58-12.36 nm (88, 89) determinado mediante electroforesis de gradiente en gel de poliacrilamida.
- Escala de medición: cuantitativa, de razón o proporción.

HDL 2a

- Definición operacional proporción relativa del total de las partículas de HDL según el siguiente intervalo de tamaño 9.94-10.58nm (88, 89) determinado mediante electroforesis de gradiente en gel de poliacrilamida.
- Escala de medición: cuantitativa, de razón o proporción.

HDL3a

- Definición operacional proporción relativa del total de las partículas de HDL según el siguiente intervalo de tamaño 8.98-9.94nm (88, 89) determinado mediante electroforesis de gradiente en gel de poliacrilamida.
- Escala de medición: cuantitativa, de razón o proporción.

HDL3b

- Definición operacional proporción relativa del total de las partículas de HDL según el siguiente intervalo de tamaño 8.45-8.98nm (85, 86) determinado mediante electroforesis de gradiente en gel de poliacrilamida.
- Escala de medición: cuantitativa, de razón o proporción.

HDL3c

- Definición operacional proporción relativa del total de las partículas de HDL según el siguiente intervalo de tamaño 7.9-8.45nm (88, 89) determinado mediante electroforesis de gradiente en gel de poliacrilamida.
- Escala de medición: cuantitativa, de razón o proporción.

Composición de las HDL

Contenido de proteínas totales de las HDL

- **Definición operacional:**, contenido total de proteínas en las partículas de las HDL serán determinados mediante ensayos enzimáticos (90)
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

Colesterol total

- **Definición operacional:** contenido total de colesterol en las partículas de las HDL determinado mediante ensayos enzimáticos (90)
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

Colesterol Libre

- **Definición operacional:**, contenido de colesterol libre en las partículas de las HDL determinado mediante ensayos enzimáticos (90)
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

Fosfolípidos

- **Definición operacional:** contenido de fosfolípidos en las partículas de las HDL que será determinado mediante ensayos enzimáticos (90)
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

Triglicéridos

- **Definición operacional:** contenido de triglicéridos en las partículas de las HDL que será determinado mediante ensayos enzimáticos (77)
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

Apolipoproteínas

- **Definición operacional:** contenido de apolipoproteínas (apoAI, apoAIV, Apo E y apo C) en las partículas de las HDL que será determinado de manera semicuantitativa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (90).
- **Escala de medición:** cuantitativa, de razón o proporción.

METODOLOGÍA

SUBPOBLACIONES DE HDL

Las HDL fueron aisladas mediante ultracentrifugación secuencial. Las subpoblaciones de HDL fueron cuantificadas mediante el método de electroforesis en gradiente en gel de poliacrilamida (PAGE). Las HDL por su densidad flotan a una densidad de 1.21mg/dl. El diámetro de las partículas de HDL es determinado mediante PAGE utilizando como referencia proteínas globulares con una densidad conocida (tiroglobulina 17nm, ferritina 12.2nm, catalasa 10.4nm, lactato deshidrogenasa 8.2nm y albúmina 7.1nm) .Los geles son teñidos con Azul de Coomasie 250 y las proporciones relativas de cada subpoblación de HDL son determinadas mediante densitometría óptica considerando los siguientes intervalos de tamaño:

- HDL3c (7.9-8.45nm)
- HDL3b (8.45-8.98nm)
- HDL3a (8.98-9.94nm)
- HDL2a (9.94-10.58nm)
- HDL 2b (10.58-12.36nm)

La proporción relativa de cada subpoblación de HDL se expresa como el total del área de HDL bajo la curva integrada de 7.9 a 12.36nm (88, 89).

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS HDL

El contenido de proteínas totales, colesterol total, colesterol libre, fosfolípidos y triglicéridos de las HDL son determinados mediante ensayos enzimáticos en un analizador Hitachi 902. Los esteres de colesterol son calculados multiplicando la diferencia de colesterol total-colesterol libre por 1.67. La cantidad total de lipoproteínas es calculada como la suma de proteínas totales, ésteres de colesterol, colesterol libre, fosfolípidos y triglicéridos. El contenido de apolipoproteínas (apo-AI, apoAIV, apoE y apoC) es determinado de manera semi-cuantitativa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (90,91).

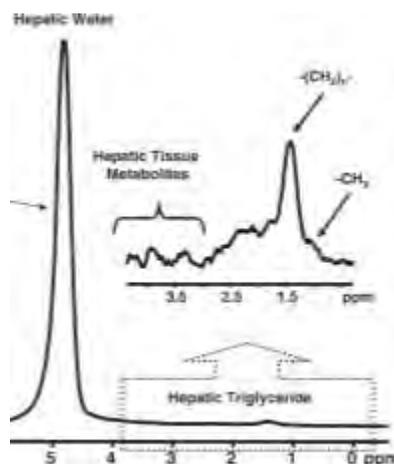
OTRAS DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

La medición del colesterol total, triglicéridos y c-HDL fueron realizados mediante métodos enzimáticos estandarizados en un analizador Hitachi 902. La precisión en el laboratorio fue sujeta a vigilancia periódica de los servicios preventivos de los CDC (Centers for Disease Control). El c-LDL es estimado utilizando la fórmula de Friedewald modificada por De Long y cols (92). Los niveles de apolipoproteína AI (apo-AI) fueron determinados mediante inmunofluorimetría en un nefelómetro Pro Spec (Dade Behring Marburg GmbH, Ge.)

ESTUDIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA POR ESPECTROSCOPIA (RMS)

Para la cuantificación de los depósitos de grasa se utilizó RMS, utilizando la secuencia STEAM (Stimulated echo adquisición mode); esta es una secuencia multi-eco que utiliza pulsos de $90^\circ - 90^\circ - 90^\circ$, con mayor sensibilidad para cuantificar la grasa hepática. Los estudios se realizarán con técnica uni-vóxel ($2 \times 2 \times 2$ cm). La cuantificación de los triglicéridos hepáticos se calcula sumando al área bajo la curva espectral de los lípidos hepáticos de (0.9 – 3.0 ppm). El agua aparece como un solo pico a 4.7 ppm y la grasa como múltiples picos debido a la presencia de diversos enlaces químicos entre los protones y los átomos adyacentes en la grasa. Los resultados se muestran en forma de proporciones.

$$\text{Fracción grasa} = \text{grasa} / (\text{grasa} + \text{Agua}) \times 100.$$



El diagnóstico de EH se realizó por medio de RMS, con la detección de una fracción de grasa $\geq 6.5\%$ (53). Teniendo en cuenta una sensibilidad de 90%, con una especificidad de 87% (45, 47, 48). Se utilizó dicho estudio ya que no expone al paciente a radiación, y se puede evaluar la esteatosis en forma objetiva mediante un índice cuantitativo de fracción de grasa de densidad de protones (PDF) el cual permite clasificar los grados de esteatosis (50, 51).

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra fue calculado en base a la diferencia de subpoblaciones de HDL2b en adultos con y sin EHGNA**. Con un valor de $\alpha=0.05$, un poder de 80% para una prueba de una cola, valor $Z = 1.96$. Se calculó un tamaño de muestra necesario de:

$$n = \frac{z^2 (PQ)}{d^2}$$

$$n = \frac{1.96^2 \cdot 0.60 \cdot 0.40}{0.20^2} = \frac{0.9216}{0.04} =$$

$$n=23$$

****Kantartzis K, et al.** Fatty liver s independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. Diabetes Care. 2008; 31 (2): 366-368(93)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión. Los datos se expresan como media \pm DE, o mediana (valor mínimo y máximo) si los datos no tenía una distribución semejante a la normal.

Se realizó prueba de ANOVA o Kruskal Wallis dependiendo de la distribución de la muestra para comparación de variables cuantitativas entre los tres grupos.

Se realizaron modelos de regresión lineal múltiple para determinar la dependencia de la asociación entre el esteatosis hepática y la distribución y composición de las subclases de HDL.

Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS20.

Se consideró significado estadístico con una $p \leq 0.05$.

CONSIDERACIONES ETICAS

Se siguieron los principios éticos emitidos en la Declaración de Helsinki 2013, el Informe Belmont y las pautas normadas por la Organización Mundial de la Salud. Se clasificó como un estudio categoría II por lo que se requirió de la firma de carta de consentimiento informado por parte de los padres y/o tutores y dado que participaron niños mayores de 8 años, una carta de asentimiento informado. **(Anexo).**

El protocolo se sometió a evaluación por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México Federico Gómez. El 30 de Abril de 2017 se recibió carta de APROBACIÓN por dichos comités con el registro:

HIM/2017/013

SSA. 1379

Se sometió a valoración para recibir financiamiento de recursos en el programa de Asignación de Fondos Federales del Hospital Infantil de México Federico Gómez para su realización. El cual fue aceptado como pre-propuesta beneficiaria en el área "Clínica" para recibir Fondos Federales en el 2017.

El 05 de Abril de 2017 el Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, aceptó participar en la colaboración del proyecto de Investigación.

RESULTADOS

Se incluyeron 70 adolescentes de ambos sexos, en edades comprendidas entre los 10 y 18 años (media 14.9 ± 2.2 años); en la muestra se incluyó a 47 adolescentes con DM2 de ambos sexos, en edades comprendidas entre los 10 y 18 años (media 15.6 ± 1.7 años) y un grupo de 23 pacientes adolescentes sanos eutróficos en edades comprendidas entre los 10 y 18 años (media 13.4 ± 2.4 años) que fue considerado como grupo de referencia.

El porcentaje de mujeres fue mayor en el grupo con DM2 y EH (81%) y en el grupo de pacientes con DM2 (63%), sin embargo en el grupo control la proporción fue similar a la de los hombres (52%). La prevalencia (66%) y los grados de EH observada en pacientes con DM2 se muestra en la **Figura 3** y **Figura 4**.

Las características clínicas y antropométricas de los 3 grupos se muestran en la **tabla 1**. Los valores de talla y presión arterial sistólica (PAS) fueron similares entre los grupos; sin embargo, el peso ($p < 0.001$), IMC ($p < 0.001$), circunferencia de cintura ($p < 0.001$), puntaje-z de IMC ($p = 0.015$) e índice cintura/talla ($p < 0.001$) fueron mayores en el grupo con DM2 al compararlos con el grupo sin DM2. La presión arterial diastólica (PAD) fue mayor en el grupo con DM2 y EH en comparación con el grupo control ($p = 0.011$). El porcentaje de adolescentes con un estadio de Tanner entre III y V fue mayor en el grupo con DM2 y EH (96%) y en el grupo de pacientes con DM2 (88%), al compararlo con el grupo de adolescentes sanos (74%) ($p = 0.001$).

La duración de la enfermedad ($p < 0.001$) y los niveles de HbA1c ($p = 0.032$) fueron mayores en el grupo de pacientes con DM2 y EH en comparación con los el grupo sin EH (**tabla 2**). Asimismo, los pacientes con DM2 y EH tenían valores más elevados de glucosa ($p < 0.001$), triglicéridos ($p = 0.001$), c-LDL ($p = 0.005$) y Apo B ($p = 0.001$) en comparación con los adolescentes no diabéticos. Los pacientes con DM2 sin EH tenían niveles de glucosa ($p < 0.001$), y Apo B ($p = 0.001$) más elevados al compararlos con el grupo de referencia. Los valores de c-HDL fueron más elevados en el grupo de adolescentes sanos comparadas con los 2 grupos con DM2 ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de transaminasas entre los grupos; sin embargo, los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) fueron mayores en el grupo de pacientes con DM2 y EH en comparación con el grupo sin DM2 ($p = 0.015$).

En cuanto al tratamiento de los pacientes con DM2, el 100% se encontraba en manejo con una biguanida (metformina) y el 64% de este grupo de pacientes requería de terapia con insulina durante el momento del estudio. Aunque no se encontraron diferencias en el porcentaje del uso de insulina en los 2 grupos con DM2, si se observó que aquellos que tenían DM2 y EH requerían de una mayor dosis por peso de insulina al día; en comparación con aquellos que no presentaron algún grado de esteatosis (0.64 ± 0.25 vs 0.42 ± 0.26 U/kg/día; $p = 0.028$).

En cuanto a la distribución y composición de las HDL; el análisis no ajustado (**Tabla 3**) mostró que los pacientes con DM2 y EH tenían una menor proporción de HDL grandes (HDL2b) y mayor proporción de HDL pequeñas (HDL3c), observando una tendencia a un menor tamaño promedio de las partículas de HDL. El grupo con DM2 y EH presentó menores niveles de HDL2b ($p=0.040$), mayores de HDL3c ($p=0.035$), un menor contenido de colesterol libre ($p<0.001$), menor proporción de ésteres de colesterol ($p=0.002$) así como una mayor de TG dentro de las partículas ($p=0.032$) al compararlo con el grupo de adolescentes sanos. No se encontraron diferencias en el porcentaje de proteínas o fosfolípidos entre los tres grupos.

Para evaluar el efecto de la presencia de EH sobre la distribución y composición de las HDL se realizó un análisis de correlación lineal simple en los pacientes con DM2 (**Tabla 4**); observando una correlación negativa y significativa entre el porcentaje de grasa hepática (PDFF) y la concentración de HDL2b ($p=0.026$), HDL2a ($p=0.013$) y el tamaño promedio de las partículas ($p=0.009$), así como una correlación positiva y significativa con los porcentajes de HDL3c ($p=0.011$). Asimismo, se encontró una asociación positiva con la fracción hepática grasa y la proporción de TG en las partículas ($p=0.007$), y una correlación negativa con la proporción de ésteres de colesterol ($p=0.010$) y colesterol libre ($p<0.001$) dentro de la partícula.

Para valorar la magnitud de estas asociaciones se realizaron modelos de regresión lineal múltiple, demostrando que en los pacientes con DM2 y altos niveles de grasa hepática tenían una baja proporción de HDL2b ($p=0.004$), altas de HDL3c ($p=0.015$) y una tendencia a un menor tamaño promedio de las partículas ($p=0.051$) independientemente de la edad, sexo, estadio de Tanner, IMC, niveles de HbA1c, dosis de insulina y tiempo de evolución de la enfermedad (**Tabla 5**).

Así mismo, se reportó una asociación positiva entre las concentraciones de grasa hepática (%PDFF) y el porcentaje de triglicéridos dentro de la partícula de HDL ($p=0.013$) y una asociación negativa con los niveles de ésteres de colesterol ($p=0.030$), independientemente de la edad, sexo, estadio de Tanner, IMC, niveles de HbA1c, dosis de insulina y tiempo de evolución de la enfermedad. Se reportó que el control de la enfermedad influye en la composición de las HDL, principalmente teniendo una correlación negativa en el nivel de colesterol libre dentro de la partícula (**Tabla 6**).

TABLA 1. Características clínicas y antropométricas en pacientes adolescentes sanos y con DM tipo 2.

	ADOLESCENTES SANOS n = 23	DM2 SIN ESTEATOSIS n = 16	DM2 CON ESTEATOSIS n = 31	Valor de p
Sexo (H/M)	11 / 12	6 / 10	6/ 25	0.080 [§]
Edad (años)	13.5 ± 2.5	15.1 ± 1.8	15.9 ± 1.6 ^β	<0.001*
Peso (kg)	51.7 ± 10.5	66.6 ± 15.3 ^α	64.6 ± 14.4 ^β	<0.001*
Talla (m)	1.58 ± 0.08	1.64 ± 0.12	1.58 ± 0.08	0.106*
IMC (Kg/m ²)	20.3 ± 2.9	24.1 ± 3.4 ^α	25.6 ± 5.0 ^β	<0.001*
IMC (puntaje z)	0.4 (-1.9 - 1.7)	1.1 (-1.2 - 2.1) ^α	1.2 (-1.0 - 4.1) ^β	0.015 ^δ
Cintura (cm)	71.2 ± 6.8	84.0 ± 10.5 ^α	86.6 ± 13.7 ^β	<0.001*
Indice cintura/talla	0.44 (0.37 - 0.50)	0.48 (0.40 - 0.61) ^α	0.66 (0.43 - 0.81) ^β	<0.001 ^δ
TAS (mmHg)	103.9 ± 6.0	102.5 ± 10.6	105.2 ± 9.0	0.617*
TAD (mmHg)	63.1 ± 3.1	65.5 ± 9.0	68.8 ± 7.3 ^β	0.011*
Tanner 3-5 (%)	74.00	88.00	96.00	0.046 [§]
Tiempo de evolución (meses)	N/A	40.0 ± 24.1	54.6 ± 28.6	0.001 ^μ

* ANOVA ^αP <0.05 o menos Control vs. DM2 sin EHGNA ^βP <0.05 o menos Control vs. DM2 con EHGNA (Test de Bonferroni-Dunn) [§]χ² ^δTest de Kruskal-Wallis para muestras independientes ^μU de Mann-Whitney
 Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE), mediana (valor mínimo y máximo) y frecuencias.
 IMC=índice de masa corporal. Cintura=circunferencia de cintura. TAS= tensión arterial sistólica TAD= tensión arterial diastólica N/A= no aplica.

TABLA 2. Características bioquímicas en adolescentes sanos y pacientes adolescentes con DM tipo 2.

	ADOLESCENTES SANOS n = 23	DM2 SIN ESTEATOSIS n = 16	DM2 CON ESTEATOSIS n = 31	Valor de p
HbA1c (%)	N/D	7.3 ± 1.0 ^γ	8.2 ± 2.2	0.032 ^ξ
Glucosa (mg/dl)	80.6 ± 4.4	190.0 ± 121.6 ^α	203.0 ± 97.0 ^β	<0.001 *
Colesterol total (mg/dl)	152.1 ± 20.4	168.7 ± 36.7	171.2 ± 45.5	0.157 *
Triglicéridos (mg/dl)	86.4 (43 - 184)	139.6 (47 - 317)	189.5 (55 - 1041) ^β	0.001 δ
C-HDL (mg/dl)	51.9 ± 10.9	43.3 ± 6.9 ^{α,γ}	38.5 ± 9.1 ^β	<0.001 *
C-LDL (mg/dl)	86.6 ± 18.0	103.0 ± 32.9	102.4 ± 26.9 ^β	0.005 *
ApoB (mg/dl)	78.5 ± 13.5	99.3 ± 28.1 ^α	107.0 ± 32.2 ^β	0.001 *
ApoA (mg/dl)	141.6 ± 25.5	136.0 ± 13.8	130.7 ± 19.4	0.160 *
Ácido Úrico (mg/dl)	5.3 (3 - 7.5)	5.5 (2.5 - 8.6)	4.3 (2.4 - 8.7) ^β	0.037 δ
Creatinina (mg/dl)	0.6 (0.4 - 1.1)	0.6 (0.4 - 1.0)	0.6 (0.4 - 0.8)	0.234 δ
TGO (U/L)	19.6 (13.2 - 28.5)	19.7 (9.0 - 40.5)	24.3 (9.2 - 115.1)	0.108 δ
TGP (U/L)	14.4 (6.5 - 30.8)	21.4 (7.1 - 73.3)	26.4 (3.8 - 143.4)	0.747 δ
FA (U/L)	207.7 (57.2 - 401.0)	139.6 (56.9 - 227.3)	132.0 (69.4 - 377.9)	0.070 δ
GGT (U/L)	16.1 (7.8 - 39.3)	27.4 (7.0 - 84.5)	34.0 (8.7 - 177.7) ^β	0.015 δ

* ANOVA ^δ Test de Kruskal-Wallis para muestras independientes ^ξ t de Student

^αP <0.05 o menos Control vs. DM2 sin EHGNA ^βP <0.05 o menos Control vs. DM2 con EHGNA, (Por Test de Bonferroni-Dunn)

^γP <0.05 o menos DM2 sin EHGNA vs. DM2 con EHGNA.

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE) y mediana (valor mínimo y máximo). HbA1c%=porcentaje de hemoglobina glucosilada, C-HDL= Niveles de Colesterol de HDL, C-LDL = Niveles de Colesterol de HDL, TGO=Transaminasa Glutámico Oxalacética (AST), TGP= Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALT), FA=Fosfatasa alcalina, GGT= Gamma Glutamyl Transpeptidasa. N/D= no determinada.

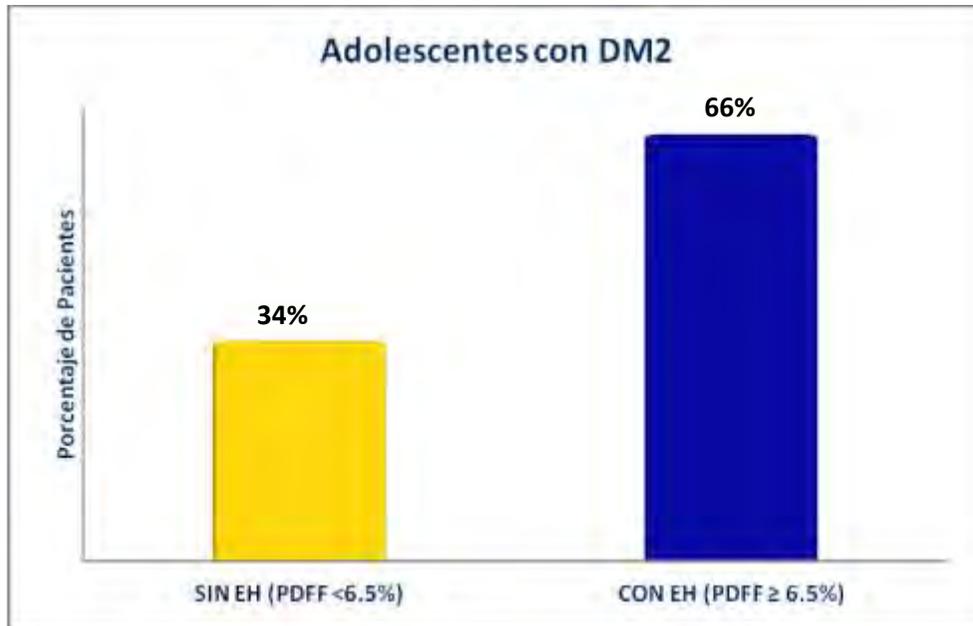


Fig.3 Prevalencia de esteatosis hepática (EH) en pacientes con DM2. Por medio de resonancia magnética por espectroscopia se determino la fracción grasa por densidad de protones (PDFF), considerando un valor 6.5% como punto de corte para diagnóstico de esteatosis hepática.

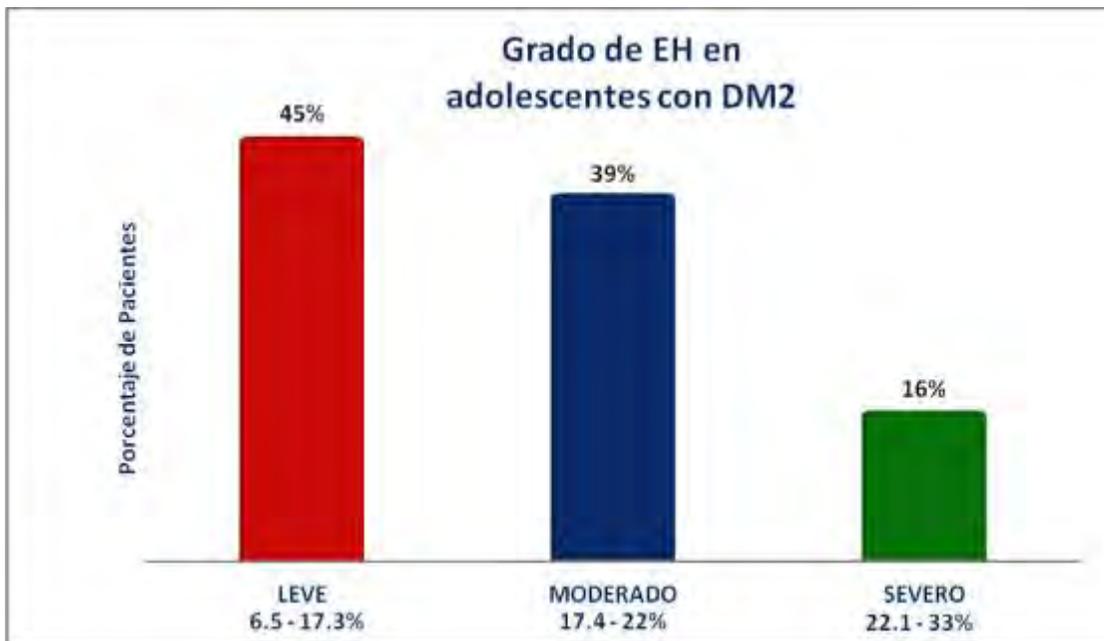


Fig.4 Grado de esteatosis hepática (EH) en pacientes con DM2. Por medio de resonancia magnética por espectroscopia se evaluó de forma objetiva el grado de EH mediante el índice cuantitativo de fracción de grasa por densidad de protones (PDFF).

TABLA 3. Distribución de subpoblaciones de HDL y composición química en pacientes adolescentes con DM2 sin EH, en adolescentes con DM2 con EH y en adolescentes sanos.

	ADOLESCENTES SANOS	DM2 SIN ESTEATOSIS	DM2 CON ESTEATOSIS	Valor de p
	n = 23	n = 15	n = 30	
<i>Distribución de subpoblaciones de HDL</i>				
HDL2b (%)	9.7 ± 3.6	7.5 ± 3.1	7.3 ± 3.4 ^β	0.040
HDL2a (%)	19.0 ± 5.5	17.4 ± 4.3	16.4 ± 5.0	0.184
HDL3a (%)	24.3 ± 2.6	23.0 ± 2.5	22.6 ± 3.9	0.178
HDL3b (%)	23.8 ± 2.9	25.2 ± 2.8	25.0 ± 2.6	0.227
HDL 3c (%)	23.0 ± 8.1	26.9 ± 5.7	28.5 ± 9.0 ^β	0.035
Tamaño de HDL (nm)	8.58 ± 0.23	8.49 ± 0.21	8.42 ± 0.23	0.051
<i>Composición de las HDL</i>				
Proteína total (%)	50.4 ± 3.2	52.9 ± 2.8	52.1 ± 4.3	0.085
Fosfolípidos (%)	19.5 ± 2.4	19.5 ± 2.6	19.7 ± 2.8	0.963
Triglicéridos (%)	4.2 ± 1.6	4.7 ± 1.5	5.7 ± 2.4 ^β	0.032
Esteres de colesterol (%)	22.5 ± 2.7	20.4 ± 2.0	19.3 ± 3.7 ^β	0.002
Colesterol libre (%)	3.1 ± 0.5	2.3 ± 0.4 ^α	2.1 ± 0.48 ^β	<0.001

* ANOVA

^αP <0.05 o menos Control vs. DM2 sin EHGNA ^βP <0.05 o menos Control vs. DM2 con EHGNA (Por Test de Bonferroni-Dunn)

^γP <0.05 o menos DM2 sin EHGNA vs. DM2 con EHGNA

TABLA 4. Análisis de correlación entre el porcentaje de grasa hepática (% PDFF) y la distribución de subpoblaciones de HDL y composición química en pacientes adolescentes con DM2.

FRACCIÓN DE GRASA HEPÁTICA (% PDFF)		
<i>n</i> = 45		
	r	Valor de p
<i>Subpoblaciones de HDL</i>		
HDL2b (%)	-0.237	0.026
HDL2a (%)	-0.269	0.013
HDL3a (%)	-0.169	0.084
HDL3b (%)	0.113	0.179
HDL 3c (%)	0.276	0.011
Tamaño de HDL (nm)	-0.285	0.009
<i>Composición de las HDL</i>		
Proteína total (%)	0.092	0.227
Fosfolípidos (%)	0.058	0.319
Triglicéridos (%)	0.299	0.007
Esteres de colesterol (%)	-0.281	0.010
Colesterol libre (%)	-0.372	<0.001

Los valores fueron estimados mediante análisis de correlación de Pearson.

TABLA 5. Efectos del porcentaje de grasa hepática (% PDFF) sobre la distribución de subpoblaciones de HDL en pacientes adolescentes con DM2.

	HDL 2b (%)		HDL 2a (%)		HDL 3a (%)		HDL 3b (%)		HDL 3c (%)		Tamaño HDL (nm)	
	R ² =0.307	p	R ² =0.443	p	R ² =0.305	p	R ² =0.245	p	R ² =0.212	p	R ² =0.356	p
Fracción de grasa hepática (%)	-0.341	0.004	-0.249	0.094	0.060	0.718	0.166	0.344	0.327	0.015	-0.327	0.051
Edad (años)	-0.076	0.645	0.086	0.636	-0.092	0.578	0.332	0.059	0.040	0.779	-0.115	0.469
Sexo (F)	0.104	0.504	0.221	0.094	0.213	0.176	0.119	0.465	-0.211	0.128	0.049	0.745
Estadio de Tanner	0.034	0.827	-0.079	0.652	-0.228	0.148	-0.113	0.489	0.135	0.999	0.025	0.865
IMC (Kg/m ²)	-0.025	0.880	-0.015	0.926	-0.270	0.085	0.349	0.053	0.046	0.756	-0.047	0.769
Niveles HbA1c (%)	-0.019	0.720	-0.215	0.181	-0.269	0.182	-0.041	0.842	0.220	0.213	-0.126	0.512
Dosis de insulina (U/Kg/día)	-0.072	0.697	-0.215	0.181	-0.088	0.637	-0.120	0.537	0.150	0.387	-0.084	0.637
Tiempo de evolución DM2 (meses)	-0.215	0.065	-0.562	0.051	0.064	0.433	0.235	0.127	0.239	0.071	-0.296	0.083

**Se considero un valor estadísticamente significativo con una P <0.05 o menos.*

Los valores fueron obtenidos mediante análisis de regresión lineal múltiple, ajustando por edad, sexo, estadio de Tanner, IMC, niveles de HbA1c y tiempo de evolución de la DM2.

Los coeficientes de regresión expresan cambios en la variable dependiente (distribución de subpoblaciones) en los pacientes con DM2.

TABLA 6. Efectos del porcentaje de grasa hepática (% PDFF) sobre la composición de subpoblaciones de HDL en pacientes adolescentes con DM2.

	Proteína Total (%)		Fosfolípidos (%)		Triglicéridos (%)		Ésteres de Colesterol (%)		Colesterol libre (%)	
	R ² =0.227	p	R ² =0.126	p	R ² =0.184	p	R ² =0.207	p	R ² =0.138	p
Fracción de grasa hepática (%)	0.044	0.804	-0.019	0.919	0.299	0.013	-0.265	0.030	-0.064	0.820
Edad (años)	0.014	0.988	0.106	0.567	-0.008	0.964	-0.076	0.665	-0.053	0.284
Sexo (F)	-0.017	0.917	0.078	0.655	0.105	0.535	-0.091	0.587	-0.155	0.278
Estadio de Tanner	-0.215	0.195	0.095	0.588	-0.100	0.475	0.246	0.117	0.185	0.486
IMC (Kg/m²)	-0.326	0.516	0.293	0.095	0.162	0.334	0.099	0.546	0.038	0.221
Niveles HbA1c (%)	0.008	0.284	-0.074	0.739	0.224	0.138	-0.138	0.517	-0.326	0.050
Dosis de insulina (U/Kg/día)	-0.009	0.965	-0.005	0.978	0.145	0.564	-0.130	0.204	-0.230	0.030
Tiempo de evolución DM2 (meses)	-0.202	0.193	-0.051	0.811	0.091	0.564	-0.199	0.220	-0.155	0.266

**Se considero un valor estadísticamente significativo con una P <0.05 o menos. Los valores fueron obtenidos mediante análisis de regresión lineal múltiple, ajustando por edad, sexo, estadio de Tanner, IMC, niveles de HbA1c y tiempo de evolución de la DM2.*

Los coeficientes de regresión expresan cambios en la variable dependiente (distribución de subpoblaciones) en los pacientes con DM2.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio mostró que la prevalencia de EH en este grupo de adolescentes con DM2 fue del 66%; coincidiendo con los reportes en población pediátrica, que estiman la prevalencia de EHGNA en cifras de un 60 - 80% (10,12).

En cuanto al perfil metabólico, en nuestro estudio se observó que los adolescentes con DM2 tenían niveles más bajos de c-HDL y elevados de ApoB en comparación con los adolescentes sanos. Sin embargo, este perfil proaterogénico fue más agravante en los pacientes con DM2 y con algún grado de EH, ya que no solamente tuvieron los niveles más bajos de c-HDL en comparación con los otros 2 grupos, sino que además presentaron valores más elevados de triglicéridos, c-LDL y ApoB en comparación con los adolescentes sin la enfermedad. Lo que nos permite identificar un grupo de mayor riesgo aterogénico, que requiere de una terapia más agresiva para evitar complicaciones a edades más tempranas.

Se conoce que las HDL experimentan modificaciones dramáticas en su estructura y composición en ciertos estados inflamatorios (55); alteraciones en la distribución de las subpoblaciones de HDL ya se han reportado previamente en adolescentes con DM2 (68). En nuestra población con DM2, la distribución se caracterizó por una disminución de las HDL grandes (HDL2b), un aumento de las HDL pequeñas (HDL3c) y una disminución del tamaño promedio de las partículas; este patrón se observa con mayor claridad en aquellos pacientes con DM2 y algún grado de EH. En población adulta con DM2, se ha reportado que una disminución en la proporción de las HDL grandes y aumento de las HDL pequeñas se asocia con un incremento en el riesgo de ECV (66).

La estrecha asociación entre la inflamación, el estrés oxidativo, la dislipidemia y la aterosclerosis sugiere que tales alteraciones del HDL podría jugar un papel significativo en la progresión de la enfermedad (55). En nuestro estudio, la presencia de una mayor fracción de grasa hepática, entendida como una mayor cantidad de lípidos intrahepáticos, provoca una alteración en los tamaños y distribución de las subpoblaciones de HDL en pacientes con DM2, lleva a menores concentraciones de HDL grandes (HDL2b) y mayores de partículas pequeñas (HDL3c), disminuyendo el tamaño promedio de las partículas. Este fenotipo proaterogénico de la distribución de las partículas en pacientes con DM2 y EH fue independientemente de otros factores en este grupo de pacientes, lo que podría llevarlos a presentar una mayor morbilidad en la edad adulta, entendiendo que si se alteran las funciones anti-aterogénicas de dichas partículas, podría propiciar el inicio de aterosclerosis temprana y elevar el riesgo de ECV (68).

El cambio hacia una menor proporción de HDL grandes en los pacientes con DM2 y EH, así como un menor tamaño promedio de las HDL; puede ser explicado por la mayor actividad de la actividad de la lipasa hepática (LH) en los pacientes con DM2 (94), así como un aumento en el catabolismo de las HDL (95). Nuestros resultados en adolescentes con DM2 y EH, confirman hallazgos similares en pacientes adultos, lo que demuestra que la presencia de EH se asocia con una menor proporción de HDL2b, mayor de HDL3c y un menor tamaño de las partículas de HDL (93). Por lo tanto, la esteatosis hepática se asocia a anomalías en las subclases de HDL en adolescentes con DM2.

La composición de los componentes de lípidos y apolipoproteínas es crítica para mantener el metabolismo y la función normal de las HDL (96). Aunque las apolipoproteínas y las enzimas son los principales determinantes de la función de las HDL, todo esto se encuentra considerablemente influenciado por los cambios en el contenido de lípidos en el interior de la partícula. El enriquecimiento del núcleo de HDL en triglicéridos (TG) con depleción de los esteres de colesterol (EC) es la anomalía más frecuente de la composición lipídica de las HDL (55).

En enfermedades metabólicas como la DM2, se ha observado la actividad de la enzima CETP (proteína de transferencia de esteres de colesterol) se encuentra elevada; dando como resultado una mayor transferencia EC desde las HDL a lipoproteínas ricas en TG; así como la transferencia recíproca de TG, produciendo HDL ricas en TG, lo que lleva a niveles bajos de c-HDL por aumento del metabolismo de la HDL (97). Bajo tales condiciones, los TG reemplazan EC en el núcleo de HDL, lo que resulta en una baja relación EC/TG y en una disminución en los niveles plasmáticos de c-HDL (98). Los hallazgos de nuestro estudio, de una mayor proporción de TG y menor de EC dentro de las partículas HDL en los adolescentes con DM2 y EH, son consistentes con los resultados de los estudios mencionados. Esta composición anormal de las HDL se puede atribuir a un aumento de la transferencia de EC desde las HDL a las lipoproteínas que contienen apoB, debido a un aumento de la actividad de CETP y un aumento de los TG en las HDL.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones potenciales. En primer lugar, por su naturaleza transversal no permite establecer una relación causal entre la esteatosis hepática y las anomalías en la distribución de subpoblaciones y la composición de las HDL. Se requiere la realización de estudios longitudinales para evaluar causalidad en la asociación fracción de grasa hepática - anomalías en las HDL.

En segundo lugar, la importancia biológica de estos hallazgos en términos de riesgo cardiovascular hasta el momento es incierta, ya que en nuestro estudio no evaluamos la función de las HDL, para valorar si existen cambios en la función ateroprotectora de las HDL.

La importancia de estos hallazgos radica en que es el primer estudio en población pediátrica con DM2 y EH que ha evaluado los tamaños y la composición de las HDL en esta población. Con los hallazgos obtenidos se piensa que una distribución anormal de subclases de HDL así como una alteración en su composición lipídica, podría estar asociada a una disminución del transporte reverso de colesterol, disminuyendo la capacidad de ateroprotección de las HDL, aumentando el riesgo de ECV en pacientes con DM2 y la presencia de esteatosis hepática.

CONCLUSIONES

En adolescentes con DM2, la presencia de EH se asocia con anomalías en la distribución de subpoblaciones de HDL (disminución de HDL2b, aumento de HDL3c y una tendencia a menor tamaño de las partículas de HDL).

Así como a una alteración en la composición lipídica de las partículas (aumento de TG y disminución de los ésteres de colesterol).

Se requiere evaluar la función de las HDL para demostrar si dichas anomalías ocasiona una alteración en la capacidad de eflujo de colesterol de las HDL, elevando así el riesgo de ECV en adolescentes con DM2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Craiga ME, Hattersleyb A, Donaghu ec KC: Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; 10;12:3–12.
2. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2016. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39;1:S13–S22.
3. Rosas J, Torres M, Calzada R, Sinay I, Costa J. Guía ALAD. Diagnóstico, control, prevención y tratamiento del síndrome metabólico en pediatría. *Rev ALAD* 2009; 17;1:16-31.
4. Donaghue KC, Wadwa RP, Dimeglio LA, et al; International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2014; 20:257-269.
5. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, et al. Mortality and Causes of Death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001; 44:S14-S21
6. van Dieren S, Beulens JW, van der Schouw YT, et al. The global burden of diabetes and its complications: an emerging pandemic. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2010; 17: S3–S8
7. Task Force Members, Rydén L, Grant PJ, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J*. 2013; 34 (39): 3035-3087.
8. Day, CP. Non-alcoholic fatty liver disease: a massive problem. *Clin Med (Lond)* 2011; 11:176–178.
9. Vernon G, Baranova A, Younossi Z. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274–285.
10. Alisi A, Manco M, Vania A, Nobili V. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease in 2009. *J Pediatr* 2009; 155:469–474.
11. Flegal K, Carroll M, Ogden C, Johnson L. Prevalance and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *JAMA* 2002; 288:1723–1727.

12. Mencin A, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14:151–157.
13. Asaoka Y, Teral S, Sakalda I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease *Dis Model Mech* 2013; 6(4):905-914
14. Brunt, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010; 7:195–203.
15. Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: The liver disease of our age?. *World J Gastroenterol.* 2014; 21; 20:9072–9089.
16. Leite N, Salles GF, Araujo A, et al. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Liver Int.* 2009; 29(1):113-9.
17. Hossain N, Afendy A, Sepanova M, et al. Independent Predictors of Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7:1224–9.
18. Shimada M, Kawahara H, Ozaki K et al. Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1931-1938.
19. Adams LA, Harmsen S, St Sauver JL, et al. Nonalcoholic fatty liver disease increases risk of death among patients with diabetes: a community-based cohort study. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1567–73.
20. Vernon G, Baranova A, Younossi AM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274–85
21. Dowman JK Tomlinson JW, Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 525–40
22. Carrillo R, Muciño J. Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. Conceptos actuales. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM.* 2011;54(3): 29-45
23. Casey SP, Kemp WW, McLean CA, et al. A prospective evaluation of the role of transient elastography for the detection of hepatic fibrosis in type 2 diabetes without overt liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2012; 47: 836–41
24. de Alwis NM, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* 2008; 48(1): S104–S112.

25. Day CP. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis* 2010; 28:255–260.
26. Alisi A, et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a multidisciplinary approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9:152-161.
27. Mencin A A, Lavine JE. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *Curr. Opin. Clin Nutr Metab Care* 2011; 14:151–157.
28. Bruce KD, Cagampang FR. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicol. Mech. Methods* 2011; 21:353–36.
29. Alisi A, Cianfarani S, Manco M, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in adolescents: pathogenetic role of genetic background and intrauterine environment. *Ann. Med* 2012; 44(1):29-40
30. Byrne CD. Fatty liver: role of inflammation and fatty acid nutrition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2010; 82:265–271.
31. Povel CM, Boer JM, Reiling E, et al. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obes. Rev* 2011; 12:952–967.
32. Cazanave SC, Gores GJ. Mechanisms and clinical implications of hepatocyte lipoapoptosis. *Clin. Lipidol* 2010; 5:71–85.
33. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, et al. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab. Pharmacokinet* 2011; 26:30–46.
34. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19:1252–63.
35. Giordano A, Frontini A, Barbatelli G, et al. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol* 2014; 10; 170(5):159-171.
36. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 2:697–738.
37. Britton KA, Fox CS. Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 124:e837–41.
38. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51:679–689.
39. Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, et al. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25:672–690.

40. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011; 332:1519–1523.
41. Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7(8):456-65.
42. Ellis KJ. Human body composition: in vivo methods. *Physiol Rev* 2000; 80:649–680.
43. Mattsson S, Thomas BJ. Development of methods for body composition studies. *Phys Med Biol* 2006; 51:R203–28.
44. Beechy L, Galpern J, Petrone A, Das SK. Assessment tools in obesity – psychological measures, diet, activity, and body composition. *Physiol Behav* 2012; 107:154–71.
45. Lee SS, Park SH, Kim HJ, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol* 2010; 52:579-585.
46. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002. 123:745-750.
- 47 van Werven JR, Marsman HA, Nederveen AJ, et al. Assessment of hepatic steatosis in patients undergoing liver resection: comparison of US, CT, T1-weighted dual-echo MR imaging, and pointresolved 1H MR spectroscopy. *Radiology* 2010; 256:159-168.
48. Lee SS, Park SH. Radiologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014. 21; 20(23):7392-7402.
49. Di Martino M, Koryukova K, Bezzi M et al. Imaging Features of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents. *Children* 2017; 4(8); 73: 1-8
50. Szczepaniak LS, Nurenberg P, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E462-E468.
51. Tang A, Tan J, Sun M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: MR imaging of liver proton density fat fraction to assess hepatic steatosis. *Radiology* 2013; 267:422-431.
52. Tang A, Desai A, Hamilton G, et al. Accuracy of MR imaging-estimated proton density fat fraction for classification of dichotomized histologic steatosis grades in nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* 2015;274:416-425.

53. Middleton MS, Van Natta ML, Heba ER, et al. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging hepatic proton density fat fraction in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2018;67(3):858-872.
54. Toledo F, Sniderman A, Kelley D. Influence of Hepatic Steatosis (Fatty Liver) on Severity and Composition of Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29 (8):1845-1850.
55. Kontush A, Chapman J. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58:342-374.
56. Asztalos BF. High-density lipoprotein Metabolism and Progression of Atherosclerosis: New Insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19:385-391.
57. Ikonen E. Mechanisms for Cellular Cholesterol Transport: Defects and Human Disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1237-1261.
58. Pérez Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis?. *Arch Cardiol Méx* 2004; 74:53-67
59. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, et al. The Oxidation Hypothesis of Atherogenesis: The Role of Oxidized Phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45: 993-1007.
60. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible paraoxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581-1590
61. Lüscher AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.
62. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95:764-772.
63. Calabresi L, Gomaschi M, Villa B, et al. Elevated Soluble Cellular Adhesion Molecules in Subjects with Low HDL-Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:656-661.
64. Calabresi L, Gomaschi G, Franceschini G. Endothelial Protection by High-density lipoproteins: from Bench to Beside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1724-1731.
65. Haffner SM. Lipoprotein Disorders Associated with Type 2 Diabetes Mellitus and Insulin Resistance. *American Journal of Cardiology* 2002; 90:55i– 61i.

66. 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; 52:453-462.
67. Drew B, Rye K, Duffy SJ, Barter P, Kingwell BA. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8:237-245.
68. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, et al. Abnormal HDL Subclasses Distribution in Overweight Children with Insulin Resistance or type 2 Diabetes Mellitus. *Clinica Chim Acta* 2007; 376:17-22.
69. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Martínez-Alvarado R, et al., High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and c-reactive protein. *Atherosclerosis* 2008; 201(2):392-397.
70. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96(12):4219-25.
71. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 170: 191-203.
72. Kotronen A, Yki-Jarvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:27-38.
73. Ortiz-Lopez C, et al. Prevalence of Prediabetes and Diabetes and Metabolic Profile of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Diabetes Care* 2012; 35(4): 873-878.
74. Nadeau KJ, Klingensmith G, Zeitler P. Type 2 Diabetes in children is frequently associated with elevated alanine aminotransferase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41:94 –98.
75. Toledo F, Sniderman A, Kelley D. Influence of Hepatic Steatosis (Fatty Liver) on Severity and Composition of Dyslipidemia in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29 (8):1845-1850.
76. Cali MG, Tosca LZ, et al. Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents. *Diabetes Care* 2007; 30(12): 3093-3098.
77. Akin L, Kurtoglu S, Yikilmaz A, et al. Fatty liver is a good indicator of subclinical atherosclerosis risk in obese children and adolescents regardless of liver enzyme elevation. *Acta Paediat* 2013. 102:e107-e113

78. D'Adamo E, Northrup V, Weiss R, et al. Ethnic differences in lipoprotein subclasses in obese adolescents: importance of liver and intraabdominal fat accretion. *Am J Clin Nutr* 2010; 92(3):500-508.
79. Brea A, Mosquera D, Martin E, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1045–1050, 2005.
80. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30:1212–1218.
81. Targher G, Bertolini L, Poli F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54:3541–3546.
82. Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1297S-1306S.
83. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Human Kinetics Books. Champaign III: 1998.
84. American Academy of Pediatrics. Prevention of Pediatric Overweight and Obesity. *Pediatrics* 2003; 112:424-430.
85. National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. Update on the 1987 Task Force report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: A working Group Report from the National High Blood Pressure Education Program. *Pediatrics* 1996; 98 (4):649-658.
86. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes 2016. Glycemic Targets. *Diabetes Care* 2016; 39; 1:S39–S46.
87. Copeland KC, Silverstein J, Moore KR, et al. Management of Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2013; 131(2):364-82.
88. Perusse M, Pascot A, Despres JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res* 2001; 42: 1331–1334.
89. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408–419.

90. Chapman MJ, et al. A Density Gradient Ultracentrifugal Procedure for the Isolation of the Major Lipoprotein Classes from Human Serum. *J Lipid Res* 1981; 22:339-58.
91. De la Llera Moya M, Atger V, Paul JL et al. A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 1056–1065.
92. De Long DM, De long 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 Clinic Prevalence Study. *JAMA* 1986. 256(17): 2372-2377.
93. Kantartzis K, et al. Fatty liver is independently associated with alterations in circulating HDL2 and HDL3 subfractions. *Diabetes Care* 2008; 31 (2):366-368.
94. Femlak M, Gluba-Brzózka A, Ciałkowska-Rysz A, et al. The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk. *Lipids Health Dis.* 2017; 16(207): 1-9.
95. Farbstein D, Levy A. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012 Mar; 10(3): 353–361.
96. Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A, et al. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2010 Aug;51(8):2341-51.
97. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther.* 2004 Jan;101(1):17-38.
98. Borggreve S, De Vries R, Dullaart R. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest.* 2003 Dec;33(12):1051-69.



Carta de Consentimiento para Participar en un Estudio de Investigación Consentimiento para el grupo de diabetes mellitus tipo 2



Ciudad de México a _____

Asociación de los tamaños y composición de las HDL con esteatosis hepática en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2

NÚMERO DE REGISTRO: HIM-2017-013

El propósito de esta carta de consentimiento es darle la información necesaria para que usted y su hijo(a) decidan la participación en el estudio de investigación titulado “Asociación de los tamaños y composición de las HDL con esteatosis hepática en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2”, cuyo investigador principal es el Dr. José Antonio Orozco Morales.

Propósito del estudio: Se le ha pedido a su hijo (a) participar en una investigación que se está realizando en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, en adolescentes con Diabetes Mellitus tipo 2. Para estudiar la asociación de los tamaños y composición de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) que es considerado como colesterol bueno, con esteatosis hepática en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2. El hígado es un órgano que tiene muchas funciones, una de ellas es ayudar en la regulación de azúcar en la sangre y que se ve dañado por muchas causas, una de ellas es la presencia de grasa en su interior. Los pacientes que tienen diabetes mellitus, tienen la posibilidad de presentar grasa acumulada en el hígado, que podría afectar su función en un tiempo, y considerando otros estudios, estamos buscando aquellos factores que puedan influir para que esto ocurra. Se analizará además la composición y función de las partículas que transportan el colesterol bueno, ya que su alteración puede contribuir al riesgo de presentar infartos cardíacos en etapas posteriores de la vida.

Procedimientos del estudio: Si su hijo decide participar, deberá:

A) Toma de muestra

Acudir a la consulta en la Clínica de Diabetes para que se tomen muestras de sangre en ayuno en la primera cita. Una extracción de sangre de 30ml (6 cucharadas) se obtendrá de una punción en la vena del antebrazo y será utilizada para medir las grasas en la sangre (colesterol, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de alta densidad, colesterol de lipoproteínas de baja densidad). Se realizarán además estudios especiales del funcionamiento de las partículas de C-HDL.

B) Aplicación de cuestionario y examen físico.

También será valorado por un médico, para que conteste algunas preguntas acerca de sus antecedentes familiares de importancia, su alimentación y sus actividades relacionadas con el ejercicio. Uno de los investigadores le realizará a su hijo un examen clínico y le tomará su peso, estatura, presión arterial y medición de su cintura y su cadera. Este procedimiento dura aproximadamente 45min.

C) Estudio de resonancia magnética.

Se le realizará un estudio de resonancia magnética a su hijo(a) que consiste en colocar a su hijo acostado sobre una mesa, que se mueve hasta que el abdomen de su hijo(a) quede dentro del equipo, no le generará ningún dolor. Usted debe estar con él en la misma habitación. No existe riesgo de radiación para su hijo (a) ni para usted. Se requiere que no

tenga objetos metálicos en el cuerpo. Con este estudio lograremos identificar si su hijo (a) tiene o no tiene grasa en el hígado.

Riesgos del estudio. Los riesgos de este estudio surgen de la necesidad de obtener muestras de sangre. Las punciones venosas pueden ser dolorosas, incomodidad local y posiblemente moretones. La extracción de muestras de sangre puede causar ligero mareo que se atenderá en el momento. La resonancia magnética es un estudio cuya principal molestia es estar acostado sin moverse por ese periodo de tiempo, y el sonido que genera el equipo. Se requiere que se le coloquen tapones en los oídos porque genera ruido intermitente, que puede ser molesto. A algunos pacientes el estar acostado en un espacio pequeño les puede generar mucha ansiedad, en caso de que a su hijo (a) le pase esto se suspenderá el estudio.

Beneficios del estudio: La participación de su hijo(a) en este estudio puede traer beneficios como la detección de alteraciones a nivel hepático (esteatosis), así como en las grasas de la sangre. La identificación de alguna de estas alteraciones servirá para que su hijo reciba un manejo adecuado y le permitirá a los médicos valorar el inicio de tratamiento para controlar y evitar que sigan evolucionando esas alteraciones.

Costos: La participación en este estudio no tiene ningún costo para usted y su hijo(a).

Compensación: Por participar en este estudio usted y su hijo(a) no recibirán ninguna compensación monetaria.

Confidencialidad: Los resultados de los estudios de las grasas en la sangre (colesterol total, triglicéridos, colesterol bueno y malo) realizados a su hijo les serán proporcionados cuatro semanas después de que sea extraída la muestra de sangre. Algunas determinaciones serán realizadas posteriormente y los resultados serán mantenidos en archivos confidenciales de los investigadores principales. Cuando termine el estudio escribiremos un reporte sobre los resultados obtenidos. En este reporte no aparecerá el nombre de su hijo (a) y nadie sabrá que participó en el estudio.

La participación es voluntaria: La participación de su hijo(a) en este estudio es voluntaria, usted es libre de decidir la participación de su hijo en el estudio, sin ser un obstáculo para ningún tratamiento que esté recibiendo o tenga que recibir, y no afectará sus consultas médicas actuales o futuras en los servicios que ofrece el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Pueden hacer cualquier pregunta relacionada con este estudio y tienen derecho a obtener respuestas adecuadas. Su hijo(a) puede abandonar o terminar este estudio en cualquier momento. Si su hijo(a) decide abandonar el estudio, ésto no será obstáculo para ningún tratamiento que esté recibiendo o tenga que recibir, y no afectará sus consultas médicas actuales o futuras en los servicios que ofrece el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Preguntas: Usted puede ponerse en contacto con el Dr. José Antonio Orozco Morales al teléfono 5228-9917 extensión 2076, de lunes a viernes de 9:00 a 14:00 si tiene alguna pregunta relacionada con la participación en esta investigación. También puede ponerse en contacto con el Comité de Investigación y Ética del Hospital que aprobó este proyecto de investigación si tuviera alguna pregunta sobre los derechos de su hijo(a) como participante de esta investigación. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez No. 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. Ciudad de México. Teléfono: (55) 52 28 99 17 ext. 9113. Correo electrónico: www.himfg.edu.mx

Después de haber leído esta carta y habiéndome explicado el Dr.(a) y/o los colaboradores todas mis dudas acerca de este estudio:

_____ **ACEPTO** la participación de mi hijo este estudio

_____ **NO ACEPTO** la participación de mi hijo este estudio

Nombre del paciente con letra de molde: _____

Nombre del padre o madre: _____

Documento con el que se identifica _____

Firma: _____

Fecha: _____

Madre (Padre)

Testigo no relacionado:

Nombre y firma

Fecha:

Testigo no relacionado:

Nombre y firma

Fecha:

Dr. José Antonio Orozco Morales _____ Fecha: _____

Hospital Infantil de México Federico Gómez
Dr. Márquez # 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. México DF.
Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 2076



Carta de Asentimiento para Participar en un Estudio de Investigación Asentimiento para el grupo de diabetes mellitus tipo 2



Fecha _____

Asociación de los tamaños y composición de las HDL con esteatosis hepática en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2.

NÚMERO DE REGISTRO: HIM-2017-013

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez estamos realizando un estudio de investigación en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2. El realizar estudios de investigación es una forma de aprender más sobre las enfermedades como la diabetes. Te estamos invitando a participar en este estudio, en el cual evaluaremos si existe relación entre la esteatosis hepática (grasa en el hígado) con los tamaños y composición de las HDL, que es considerado como el colesterol bueno. Además estudiaremos las características, composición y función de las partículas de HDL (lipoproteínas de alta densidad).

Procedimientos del estudio:

Si decides participar en el estudio, deberás asistir a la consulta externa de Endocrinología para que se te tome una muestra de sangre de 30ml (6 cucharadas) en ayuno en la primera cita. Una muestra de sangre será utilizada para medir las grasas en la sangre (colesterol, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de alta densidad y colesterol de lipoproteínas de baja densidad). Posteriormente durante un período de 45 minutos serás revisado por un médico, para que contestes algunas preguntas acerca de tus antecedentes familiares de importancia, alimentación y actividades relacionadas con el ejercicio; uno de los investigadores te realizará un examen físico y medirá tu peso, estatura, presión arterial y cintura. Posteriormente se te realizará un estudio de resonancia magnética, el cual consiste en acostarte sobre una mesa, que se mueve hasta que tu abdomen quede dentro del equipo, esto no es doloroso y estarás en compañía de tu padre (o madre); se requiere que no tengas objetos metálicos en el cuerpo. Con este estudio lograremos identificar si tienes o no tiene grasa en el hígado.

Los riesgos de este estudio están dados porque se necesita tomar muestras de sangre mediante la realización de una punción en la vena del antebrazo, lo cual puede ser doloroso o causarte moretones. La resonancia magnética es un estudio cuya principal molestia es estar acostado sin moverse por ese periodo de tiempo, y el sonido que genera el equipo. Se requiere que se te coloquen tapones en los oídos porque genera ruido intermitente, que puede ser molesto. A algunos pacientes el estar acostado en un espacio pequeño les puede generar mucha ansiedad, si esto sucediera, se suspenderá el estudio.

Los beneficios de realizar este estudio es que si identificamos alguna alteración en las grasas en tu sangre o grasa a nivel de tu hígado servirá para que recibas un manejo adecuado y valorar el inicio de tratamiento para controlar y evitar que sigan evolucionando esas alteraciones.

Cuando hayamos terminado el estudio escribiremos un reporte sobre los resultados y lo que hemos aprendido. En este reporte no aparecerá tu nombre y nadie sabrá que participaste en el estudio. Puedes preguntar todas las dudas que tengas en cualquier momento y eres libre de participar o no según sea tu deseo. Nosotros seguiremos dándote la atención con mucho gusto.

Después de haber leído esta carta y habiéndome explicado el Dr.(a) y/o los colaboradores todas mis dudas acerca de este estudio:

_____ **ACEPTO** la participación en este estudio

_____ **NO ACEPTO** la participación en este estudio

Si decides participar en el estudio escribe tu nombre y firma

Nombre con letra de molde: _____

Firma: _____

Fecha: _____

(Opcional)

Testigo 1

Nombre con letra de molde: _____

Documento con el que se identifica _____

Firma: _____

Fecha: _____

Testigo 2

Nombre con letra de molde: _____

Nombre con letra de molde: _____

Documento con el que se identifica _____

Firma: _____

Fecha: _____

Dr. José Antonio Orozco Morales _____ Fecha: _____

Hospital Infantil de México Federico Gómez Dr. Márquez # 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. México DF. Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 2076



Carta de Asentimiento para Participar en un Estudio de Investigación Asentimiento para el grupo de referencia



Fecha _____

Asociación de los tamaños y composición de las HDL con esteatosis hepática en adolescentes con diabetes mellitus tipo 2.

NÚMERO DE REGISTRO: HIM-2017-013

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez estamos realizando un estudio de investigación en adolescentes. El realizar estudios de investigación es una forma de aprender más sobre la salud y la enfermedad en los adolescentes. Te estamos invitando a participar en este estudio, en el cual evaluaremos si existe relación entre la esteatosis hepática (grasa en el hígado) con los tamaños y composición de las HDL, que es considerado como el colesterol bueno. Además estudiaremos las características, composición y función de las partículas de HDL (lipoproteínas de alta densidad).

Procedimientos del estudio:

Si decides participar en el estudio, deberás asistir a la consulta externa de Endocrinología para que se te tome una muestra de sangre de 30ml (6 cucharadas) en ayuno en la primera cita. Una muestra de sangre será utilizada para medir las grasas en la sangre (colesterol, triglicéridos, colesterol de lipoproteínas de alta densidad y colesterol de lipoproteínas de baja densidad). Posteriormente durante un período de 45 minutos serás revisado por un médico, para que contestes algunas preguntas acerca de tus antecedentes familiares de importancia, alimentación y actividades relacionadas con el ejercicio; uno de los investigadores te realizará un examen físico y medirá tu peso, estatura, presión arterial y cintura. Posteriormente se te realizará un estudio de resonancia magnética, el cual consiste en acostarte sobre una mesa, que se mueve hasta que tu abdomen quede dentro del equipo, esto no es doloroso y estarás en compañía de tu padre (o madre); se requiere que no tengas objetos metálicos en el cuerpo. Con este estudio lograremos identificar si tienes o no tiene grasa en el hígado.

Los riesgos de este estudio están dados porque se necesita tomar muestras de sangre mediante la realización de una punción en la vena del antebrazo, lo cual puede ser doloroso o causarte moretones. La resonancia magnética es un estudio cuya principal molestia es estar acostado sin moverse por ese periodo de tiempo, y el sonido que genera el equipo. Se requiere que se te coloquen tapones en los oídos porque genera ruido intermitente, que puede ser molesto. A algunos pacientes el estar acostado en un espacio pequeño les puede generar mucha ansiedad, si esto sucediera, se suspenderá el estudio.

Los beneficios de realizar este estudio es que si identificamos alguna alteración en las grasas en tu sangre o grasa a nivel de tu hígado servirá para que recibas un manejo adecuado y valorar el inicio de tratamiento para controlar y evitar que sigan evolucionando esas alteraciones.

Cuando hayamos terminado el estudio escribiremos un reporte sobre los resultados y lo que hemos aprendido. En este reporte no aparecerá tu nombre y nadie sabrá que participaste en el estudio. Puedes preguntar todas las dudas que tengas en cualquier momento y eres libre de participar o no según sea tu deseo. Nosotros seguiremos dándote la atención con mucho gusto.

Después de haber leído esta carta y habiéndome explicado el Dr.(a) y/o los colaboradores todas mis dudas acerca de este estudio:

_____ **ACEPTO** la participación en este estudio

_____ **NO ACEPTO** la participación en este estudio

Si decides participar en el estudio escribe tu nombre y firma

Nombre con letra de molde: _____

Firma: _____

Fecha: _____

(Opcional)

Testigo 1

Nombre con letra de molde: _____

Documento con el que se identifica _____

Firma: _____

Fecha: _____

Testigo 2

Nombre con letra de molde: _____

Nombre con letra de molde: _____

Documento con el que se identifica _____

Firma: _____

Fecha: _____

Dr. José Antonio Orozco Morales _____ Fecha: _____

Hospital Infantil de México Federico Gómez
Dr. Márquez # 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. México DF.
Teléfono: (55) 52 28 99 17 Ext. 2076