



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**



Tesis de Licenciatura

**“ESTUDIO CLÍNICO DE LAS MODIFICACIONES EN EL FENOTIPO DE LIPOPROTEÍNAS EN PACIENTES CON ALTO Y BAJO RIESGO METABÓLICO”**

Presenta

**pQ.F.B Ana Guadalupe Fragoso Armenta**

Para obtener el título de

**Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Lugar de realización

**Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas**

Director

**D.C. Samuel Treviño Mora**

**Junio 2017**

# ÍNDICE

1. Marco Teórico.....	3
1.1 Obesidad en México.....	3
1.2 Sobre-nutrición en el metabolismo.....	3
1.3 Absorción de nutrientes.....	5
1.4 Regulación hepática.....	6
1.5 Lipogénesis.....	7
1.5.1 Regulación de lipogénesis.....	9
1.6 Metabolismo lipídico.....	10
1.6.1 Subfracciones lipoproteicas.....	13
1.7 Dislipidemias.....	16
1.7.1 Dislipidemias y riesgo metabólico.....	17
1.7.2 Guías para el manejo de dislipidemias.....	18
1.8 Técnicas para la evaluación de lípidos.....	20
2. Definición del problema.....	22
3. Justificación.....	23
4. Objetivos.....	24
4.1 Objetivo general:.....	24
4.1.2 Objetivos específicos.....	24
5. Hipótesis.....	25
5.1 Hipótesis Nula.....	25
5.2 Hipótesis Alternativa.....	25
7. Material y métodos.....	27
8. Resultados.....	29
9. Discusión de resultados.....	38
10. Conclusiones.....	59
11. Bibliografía.....	60
12. Anexos.....	70

## **1. Marco Teórico**

### **1.1 Obesidad en México.**

Una alimentación y nutrición correcta son algunos de los factores más importantes para un sano desarrollo en el ser humano. La base de una nutrición equilibrada consiste en el consumo de calorías, así como de los macro y micronutrientes, como proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, todos ellos sin exceder los requerimientos y necesidades energéticas.

En México 1.5 millones de niños padecen desnutrición crónica, siendo más prevalente en la región sur (19.2%) así como en las zonas con población indígena. Si bien en los últimos 20 años se ha observado una disminución en la desnutrición infantil, una nueva crisis nutricional ha surgido y esto es gracias al aumento en el consumo de alimentos hipercalóricos, ricos en grasas, sal y azúcar; pobres en vitaminas, minerales y fibra, asociado al descenso en la actividad física originado por la urbanización y sedentarismo de la población, desencadenando entonces sobrepeso y obesidad siendo definidos por la OMS como una acumulación anormal y excesiva de grasa (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2016). México y Estados Unidos tienen el mayor índice de obesidad mundial, según datos de la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud) uno de cada tres adolescentes de entre 12 y 19 años presenta sobrepeso u obesidad. (Levy S.T. et al., 2012) (OMS, 2016) (ENSANUT, 2012)

### **1.2 Sobre-nutrición en el metabolismo.**

De acuerdo con información de la Organización Mundial de la Salud con el aumento del Índice de Masa Corporal ( $IMC = \text{Peso}/\text{Talla}^2$ ) se incrementa la probabilidad de muerte asociada a enfermedades no transmisibles como diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2016)

Se ha reportado en estudios poblacionales que un consumo incrementado en carbohidratos está asociado al desarrollo de diabetes mellitus, resistencia a insulina e hipertrigliceridemia, y secundariamente modificaciones en las fracciones de colesterol con disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) así como un incremento de las fracciones VLDL (Very Low Density Lipoprotein, por sus siglas en inglés) (Jiménez Y. et al., 2010).

Estas alteraciones han sido tomadas por FID (Federación Internacional de Diabetes, 2006) como criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico, en los cuales es necesario demostrar primero obesidad abdominal y después la presencia de dos alteraciones más (hiperglucemia, dislipidemia o hipertensión arterial), para la FID este conjunto de factores aterogénicos, protrombóticos, proinflamatorios y metabólicos están impulsando las epidemias mundiales como Diabetes Mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

La mayoría de las personas con síndrome metabólico tiene anormalidades en presión arterial, lípidos y de glucosa, que apenas rebasan los puntos de corte que separan lo clínicamente sano de lo no sano. El diagnóstico oportuno de una anomalía en el metabolismo de glucosa (prediabetes) supera al de síndrome metabólico como factor de riesgo para enfermedad cardiovascular a futuro, aproximadamente 25% de los sujetos con prediabetes progresará a DM2 en los siguientes 5 años. La prediabetes es definida como un estado de homeostasis anormal de la glucosa por déficit o resistencia a la acción de la insulina e incluye a los pacientes que presentan glucemia basal alterada, diagnosticada cuando los niveles de glucosa en ayunas están entre 100-125 mg/dL y a los que tiene tolerancia anormal a la glucosa, quienes presentan puntos de corte entre 140-199 mg/dL, a las dos horas posteriores a la carga de glucosa estandarizada (DeFronzo et al, 2007) (ADA, 2014).

El diagnóstico oportuno de prediabetes mediante la detección selectiva por factores de riesgo tales como; obesidad, hipertensión >130/85 mmHg, HDL < 40 mg/dL para los hombres y < 50 mg/dL en mujeres, triglicéridos >150 mg/dL (FID, 2006), diabetes gestacional, antecedentes familiares de diabetes que aumentan

con la edad y estilos de vida tales como el sedentarismo, permiten implementar acciones tales como modificar la dieta, disminuyendo la cantidad de grasas y calorías, así como aumentar la actividad física. (FID, 2016).

### **1.3 Absorción de nutrientes.**

En el desarrollo de alteraciones metabólicas las rutas de síntesis así como las vías catabólicas de lípidos y carbohidratos se ven íntimamente asociadas, siendo la dieta uno de los principales reguladores en este proceso.

La ingesta diaria de lípidos en un adulto es alrededor de 80 - 130 g de los cuáles el 95% está formado por triglicéridos y el resto por fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol. Los lípidos tomados de la dieta deben ser hidrolizados para su absorción, esta acción es realizada por enzimas como la lipasa lingual, la lipasa gástrica, las sales biliares y lipasa pancreática que aunadas a acciones mecánicas como la masticación y la peristalsis favorecen la formación de micelas mixtas, compuestas por ácidos grasos libres (AGL), monoacilglicerol, colesterol y fosfolípidos. (Bauer R, 2004) (Jhones J.H et al, 2012)

La absorción del contenido de las micelas involucra a distintas proteínas transportadoras, siendo Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) quien permite el paso de colesterol, CD36 que también se encuentra en corazón, musculo y tejido adiposo transporta ácidos grasos para los cuáles también se ha descrito a la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP4 por sus siglas en inglés), ya en el citoplasma de los enterocitos la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP) se encarga de llevar los ácidos grasos de cadena larga al retículo endoplásmico liso en donde son re-esterificados para formar triglicéridos (TG). El colesterol es re-esterificado por Acil-CoA (ACAT) Los TG y el colesterol esterificado serán llevados desde el retículo endoplásmico hacia aparato de golgi mediante Coat Protein Complex II (COPII) para el ensamble de los quilomicrones (QM). El transporte de los quilomicrones hacía la circulación es vía linfática, los enterocitos están rodeados de pequeños vasos linfáticos llamados Lácteales que

poseen poros que a diferencia de los vasos sanguíneos cercanos por diferencia de tamaño permiten el paso de QM a circulación para llegar a células endoteliales las cuales hidrolizan los TG mediante la acción de la enzima lipoproteín-lipasa (LPL) para obtener ácidos grasos libres y glicerol. Los QM remanentes con elevado contenido de colesterol serán llevados al hígado (Williams J., 2008) (Abumrad N. et al., 2012) (Iqbal J. et al., 2009) (Randolph J. et al, 2014)

Por otro lado, la ingesta de carbohidratos está formada principalmente por polisacáridos 60%, sacarosa 30% y lactosa 10%. Para la digestión de los polisacáridos es necesario que estos sean hidrolizados, obteniendo los monosacáridos los cuales serán absorbidos y metabolizados. La hidrolisis comienza con la masticación y la acción de  $\alpha$ -amilasa que es secretada por las glándulas salivales, la hidrolisis continua en el duodeno por acción de la amilasa pancreática y finaliza con la acción de disacaridasas que se encuentran en los bordes membranales de los enterocitos en el intestino delgado, tales como maltasa, lactasa, isomaltasa y sacarasa que llevan a la obtención de monosacáridos. La difusión de los monosacáridos desde el lumen intestinal hacia los enterocitos requiere la acción del co-transportadores acoplados a sodio tipo 1 (SGLT1) para glucosa y galactosa; del transportador de glucosa tipo 5 (GLUT-5) para fructosa, posteriormente los GLUT-2 movilizan la glucosa desde el enterocito a la circulación plasmática (Keim L. et al, 2012)

#### **1.4 Regulación hepática.**

Con el incremento de glucosa circulante, el páncreas secreta insulina, que desempeña el papel de inicio para rutas metabólicas en tejidos periféricos. En primera instancia en hígado mediante su transportador GLUT-2 toma la glucosa y la almacena en forma de glucógeno, así como también lleva a cabo rutas de obtención energética como lo son la glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, sus intermediarios energéticos remanentes entran a rutas lipogénicas como la síntesis de triglicéridos los cuales serán empaquetados en sus lipoproteínas transportadoras VLDL (Very Low Density Lipoprotein, por sus siglas

en inglés) que transportan triglicéridos hacia tejido muscular y adiposo, principalmente. (Bechmann L.P. et al., 2012)

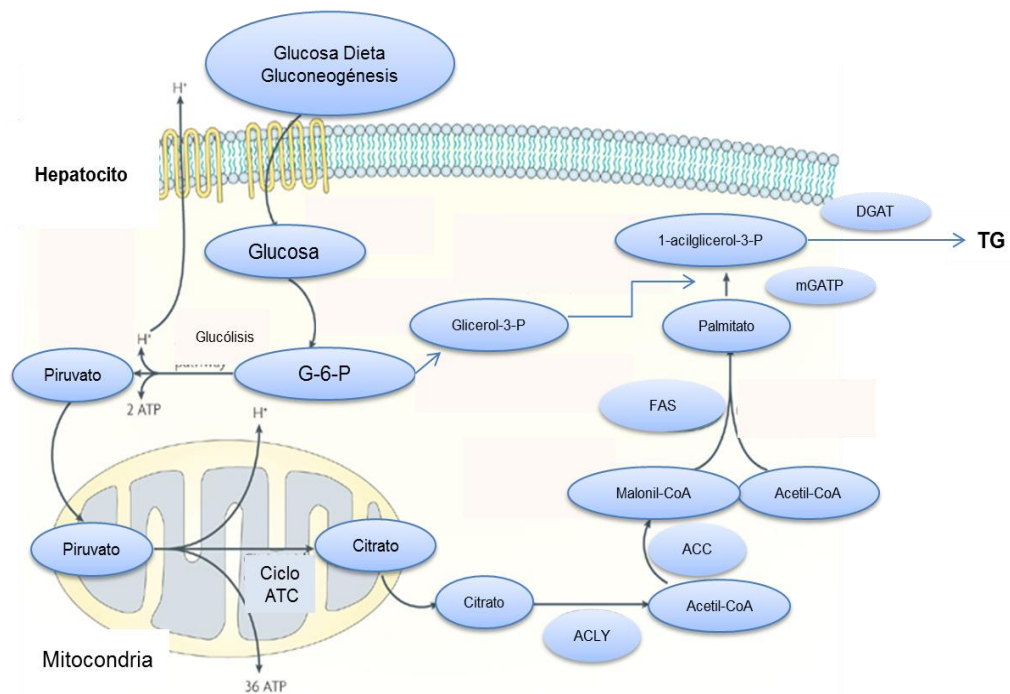
En estados de privación energética como el ayuno los nutrientes son movilizados desde sus reservas, AGL y glicerol provenientes de tejido adiposo mantienen la homeostasis energética. Como reguladores de nutrientes páncreas no solo libera insulina, sino que también libera glucagón, una hormona que en hígado provoca la biotransformación de AGL en glucosa (gluconeogénesis), activa la vía glucogenolítica y promueve la oxidación de ácidos grasos. (Bechmann L.P. et al., 2012) (Kabashima T. et al., 2002)

Como se mencionó anteriormente insulina inhibe la gluconeogénesis y promueve una síntesis de *novo* lipídica, sin embargo, en estados de síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) así como resistencia a insulina; que se reconoce como una menor eficiencia de su acción biológica en tejidos como músculo, hígado y adiposo, insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa hepática, pero mantiene la inducción de lipogénesis, contribuyendo a estados hiperglucémicos e hiperlipémicos. (Bechmann L.P. et al., 2012)

### **1.5 Lipogénesis.**

La lipogénesis hepática es un proceso fundamental en hígado que contribuye al almacenado y secreción de lípidos por los hepatocitos, en donde precursores no lipídicos como alcohol y carbohidratos propician sustratos, principalmente de la glucólisis para la síntesis de cadenas de ácidos grasos. Si bien la lipogénesis es un proceso que regula los niveles de glucosa en circulación, una dieta constante rica en carbohidratos sin un consumo energético proporcional genera una alteración en el metabolismo lipídico desencadenando efectos perjudiciales, elevando los niveles de TG séricos, incrementando los lípidos intrahepáticos (esteatosis) que conlleva a hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. (Attie AD et al, 2009) (Herman M et al, 2012).

La síntesis de cadenas de ácidos grasos durante lipogénesis de novo es a partir de subunidades acetil-CoA provenientes de glucólisis que podrán ser condensadas con glicerol posteriormente. La enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) es quien inicia la reacción con la producción de malonil-CoA a partir de acetil-CoA., posteriormente este malonil-CoA bajo la acción de del complejo multienzimático de la ácido graso sintasa tipo 1 (FAS) y un moléculas más de acetil-CoA producirán acil CoA. Así mismo como producto de la glucólisis gliceraldehído será fosforilado por trioquinasa para producir gliceraldehído 3-fosfato (G3P). G3P en el proceso será acilado para producir ácido lisofosfatídico al cual mediante una molécula más de acil CoA será acilado por acción de la acilglicerol-fosfato acil transferasa produciendo ácido fosfatídico. Finalmente el ácido fosfatídico por acción de la fosfatidato fosfatasa generará diacilglicerol (DG) que con la adición de una molécula de acil CoA mediante la enzima diacilglicerol acil transferasa (DGAT) dará paso a la formación de un triglicérido, el proceso se ilustra en la figura 1.



**Figura 1. Lipogénesis hepática.** La glucosa absorbida por la célula se convierte en piruvato mediante la glucólisis. El piruvato se convierte en acetil-CoA y entra al ciclo del ácido tricarboxílico (ATC). El exceso de acetil-CoA convertido en citrato puede salir de la mitocondria para ser sustrato de enzimas lipogénicas. Las principales enzimas implicadas incluyen la acetil-CoA Carboxilasa (ACC) y la Sintasa de ácidos grasos (FAS). Las principales enzimas implicadas en la esterificación y producción de TG incluye a la Glicerol-3-fosfato acil transferasa mitocondrial (mGPAT) y a la Diacil glicerol transferasa (DGAT). Tomado y modificado de Menendez et al., 2007.



### **1.5.1 Regulación de lipogénesis.**

Insulina estimula la lipogénesis y suprime la gluconeogénesis en pacientes sanos, sin embargo en estados de resistencia a insulina la gluconeogénesis no se ve suprimida en tanto que la lipogénesis continua siendo estimulada por lo que procesos de hiperinsulinemia conducen al aumento de lipogénesis, induciendo una mayor resistencia a insulina por la supresión de gluconeogénesis manteniendo niveles hiperglucemicos estimulando así la secreción de insulina. (Ruib L. 2014)

Por otro lado insulina mediante la interacción con su receptor y la activación de cinasas; fosfoinositol -3 quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (PKB) participan por una parte en la fosforilación de la proteína forkhead box O1 (FoxO1) para evitar su translocación al núcleo y así activar genes de gluconeogénesis así como también activan la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP1c) que participa en la transcripción de genes lipogénicos. (Sanders F. et al., 2016)

La activación de SREBP1c aunado a la activación de la proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos (ChREBP) igualmente por señalización insulínica y por niveles hiperglucemicos son parte importante en las vías de activación de lipogénesis. Insulina mediante la acción de PI3K/PKB promueve la fosforilación naciente de SREBP1c en el aparato de Golgi, lo que lleva a una acumulación de la forma madura en núcleo generando la transcripción de genes de enzimas lipogénicas como FAS y ACC. (Sanders F. et al., 2016)

La activación de genes para enzimas lipogénicas también es asociado a la activación de ChREBP mediante moléculas derivadas de la glucólisis, siendo la desfosforilación de la proteína quinasa A (PKA) que conduce a la disociación de la proteína y su translocación a núcleo uno de los mecanismos asociados, mediante esta vía se codifican genes para proteínas como FAS, ACC. (Sanders F. et al., 2016)

## 1.6 Metabolismo lipídico.

Las lipoproteínas son complejos de lípidos y proteínas específicas (apolipoproteínas) que se encargan del transporte de lípidos en un medio acuoso como lo es la sangre. En su estructura están compuestas por un núcleo, donde están los lípidos más hidrófobos y una corteza compuesta por los dominios polares de los fosfolípidos y el colesterol no esterificado, así como las fracciones polares de las apolipoproteínas (Apo). Las lipoproteínas son comúnmente en la clínica clasificadas en función a su densidad que está condicionada por su tamaño y la relación lípido-proteína. Las lipoproteínas menos densas son las más grandes y con mayor contenido de lípidos, teniendo así a los QM, a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), se han descrito subpoblaciones con diferentes tamaños y densidades de VLDL, LDL y HDL (Errico T. et al, 2013).

Los QM provenientes de la síntesis intestinal tienen en su estructura de forma mayoritaria en Apo B-48 y en circulación adquieren Apo C-II, Apo C-III y Apo E. La función de los QM es transportar triglicéridos a tejidos como adiposo, muscular y cardíaco en donde Apo C-II activa a la enzima LPL para la hidrólisis de TG. Los QM remanentes producto de la hidrólisis de TG con mayor contenido de colesterol son tomados por los hepatocitos mediante el receptor de las LDL (LDLR) que reconoce a Apo-E. (Nakajima K., 2014).

El hígado sintetiza continuamente TG desde dos vías; 1) Reesterificando los ácidos grasos libres de plasma con glicerol y 2) A partir de Acetil-CoA proveniente principalmente de glucólisis. Los TG producidos serán secretados en forma de VLDL nacientes, Apo B-100 es su principal apolipoproteína, sumada a Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo-E. En circulación las VLDL nacientes mediante la interacción con las HDL reciben Apo C-II para convertirlas en VLDL maduras siendo sustrato LPL de los tejidos extra-hepáticos, que hidroliza los TG contenido formando VLDL pequeñas y densas que en su mayoría serán tomadas por el

hígado por interacción con Apo-E, el resto de las VLDL remanentes continúan la hidrólisis perdiendo contenido de TG y apolipoproteínas, principalmente Apo C, formándose así las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que son las lipoproteínas minoritarias en circulación, en su estructura presentan Apo B-100 y Apo E, como parte de su catabolismo un porcentaje será tomado por el hígado y el resto dará paso a la formación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con la pérdida total de Apo E. (Mengxiao et al, 2014).

Las lipoproteínas de baja densidad son las responsables del transporte del colesterol esterificado principalmente hacia hepatocitos pero también a los tejidos periféricos. Apo B-100 es la responsable del reconocimiento mediante la interacción por endocitosis con el receptor de LDL (LDLR) quien toma aproximadamente 60-80% de estas lipoproteínas. La vesícula endocitada es atacada por enzimas hidrolíticas de los lisosomas, posteriormente el contenido proteico será degradado a aminoácidos mientras que el colesterol será utilizado para la síntesis de membranas celulares, pero también será regulador para la enzima 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoA-reductasa siendo esta enzima clave en la síntesis de colesterol, por otra parte activa la enzima Acil-CoA-Aciltransferasa (ACAT) que reesterifica el colesterol para su almacenamiento en forma de ésteres de colesterol y finalmente inhibe la síntesis de mas receptores para LDL. (Diffendenfer R. et al., 2014) (Jairam et al, 2012)

Por otra parte las lipoproteínas de alta densidad o HDL tienen como principal contenido los ésteres de colesterol, su síntesis es hepática e intestinal además de que pueden provenir del catabolismo de quilomicrones y VLDL, su principal apolipoproteína es denominada Apo-A1 de síntesis hepática. Las HDL son secretadas de hígado son descritas como discoidales compuestas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol libre que rodea a Apo-A1, Apo E, y Apo C. (Genest J et al, 2013).

Las HDL tienen distintas funciones, siendo la de mayor importancia el transporte de colesterol de los tejidos hacia el hígado, proceso conocido como transporte reverso del colesterol, además de participar activamente en el metabolismo de las VLDL en un intercambio lipídico donde HDL transfieren colesterol y las VLDL triglicéridos mediante la acción de la enzima transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Otras funciones descritas para HDL son la inhibición de la modificación oxidativa de las LDL mediante su contenido de enzimas antioxidativas como lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), paraoxonasa tipo 1 (PON 1) y la selenoperoxidasa glutatión reductasa, además HDL han demostrado tener capacidad antiinflamatoria por una parte modulando la transcripción del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), estudios in vitro han demostrado que HDL inhibe la expresión de moléculas de adhesión endotelial. HDL tiene la capacidad de promover la generación endotelial de óxido nítrico mejorando la función endotelial, finalmente estas lipoproteínas desarrollan funciones antitrombóticas inhibiendo la expresión del factor tisular, del factor X y favoreciendo la secreción del inhibidor de plasminógeno. (Genest J et al, 2013).

La función de las HDL depende por una parte de su contenido de ApoA1 la cual interacciona con transportadores tipo ATP—binding cassette A1 y G1 (ABCA1 y ABCG1) para facilitar la salida de fosfolípidos y colesterol intracelular y de su contenido lipídico. Las HDL además interaccionan con el receptor scavenger receptor B-I (SR-BI) en células periféricas. (Rosenson et al, 2013) (Errico T. et al, 2013).

### 1.6.1 Subfracciones lipoproteicas.

Las lipoproteínas comprenden un espectro de partículas que difieren en tamaño, densidad y composición tanto lipídica como de apolipoproteínas las cuales juegan roles distintos es el metabolismo lipídico. Estas subpoblaciones han sido caracterizadas por distintas técnicas desde 1954 Gofman et al mediante ultracentrifugación, así como en 1981 Blanche P.J. et al por electroforesis en gel y continúan siendo objeto de estudio mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear entre otras. En los últimos años estas subfracciones, en especial las descritas como cortas y densas han llamado el interés de los investigadores al mostrar su importancia en los desórdenes metabólicos he incluso han sido consideradas como factores emergentes de acuerdo a las guías de la National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) para las Prácticas en el Laboratorio Clínico. (Gofman W. et al, 1954) (Blanche P.J. et al, 1981) (Castany J et al, 2006) (Myers G et al, 2009).

En este sentido las VLDL presentan dos subfracciones mayoritarias VLDL<sub>1</sub> y VLDL<sub>2</sub>, se reconocen a las VLDL<sub>1</sub> como las subfracciones grandes, con un contenido mayoritario en triglicéridos; mientras que las VLDL<sub>2</sub> son reconocidas con un menor tamaño, una maduración hepática idónea y proporciones correspondientes o “normales” en su contenido de TG y colesterol. Estudios como los de Packard C. en 2000 han demostrado que el ensamble y secreción hepática de estas subpoblaciones es regulado de forma independiente, observaciones in vivo demostraron que la administración de estrógenos estimula la producción de VLDL<sub>1</sub> pero no la de VLDL<sub>2</sub>, por otra parte infusiones de insulina en individuos sanos mostraron una supresión de la producción de VLDL<sub>1</sub> pero no la de VLDL<sub>2</sub>, los mecanismo por los cuales hígado regula la producción de estas subfracciones aún no es conocido ampliamente. (Johansen R.F et al., 2016)

En tanto que las LDL mediante técnicas como la ultracentrifugación han separado al menos tres categorías; a) LDL grandes o LDL<sub>I</sub> (densidad 1.019 – 1.034 g/ml) b) LDL intermedias o LDL<sub>II</sub> (densidad 1.034 – 1.044 g/ml) y LDL cortas o LDL<sub>III</sub> (densidad 1.044 – 1.060 g/ml). Técnicas como la electroforesis en gel define subfracciones basada en el tamaño de partícula y carga y permite la identificación de las subfracciones LDL<sub>IIIA</sub>, LDL<sub>IIIB</sub>, LDL<sub>IVA</sub> y LDL<sub>IVB</sub> todas estas con un diámetro menor de 25nm. (Diffenderfer R. et al., 2014)

Si bien el contenido de las LDL es mayoritario para ésteres de colesterol, este tiende a disminuir conforme incrementa la densidad. El contenido de triglicéridos en los precursores de LDL es el mayor determinante en el tamaño de las LDL como producto de su lipólisis, la presencia de VLDL largas ricas en triglicéridos propician un incremento de las cortas y densas LDL y esto es explicado por el intercambio lipídico en el que VLDL transfiere TG hacia las LDL y estas a su vez transfieren ésteres de colesterol siendo CETP la enzima responsable de dicho proceso, formando LDL ricas en TG que serán sustrato para lipoproteína lipasa (LPL) y lipasa hepática (LH) para su hidrólisis. La presencia de las pequeñas y densas LDL son correlacionadas con el riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y esto en relación a una mayor filtración al sub-endotelio, disminución en la producción de óxido nítrico así como su susceptibilidad a la oxidación y el desarrollo de aterogénesis. (Rajman I. et al., 1999) (Williams P.T. et al., 2003).

Finalmente se han demostrado diferencias en tamaño, forma, densidad y composición de las partículas HDL, describiendo subfracciones de HDL mediante distintas técnicas. En 1954 *Gofman et al* mediante ultracentrifugación fueron los primeros en describir la heterogeneidad de las partículas HDL, identificando dos subclases; HDL<sub>2</sub> las menos densas (1.063–1.125 g/mL) y ricas en lípidos y por otra parte las HDL<sub>3</sub> siendo las más densas (1.125–1.21 g/mL) y ricas en proteínas. En 1986 *Nichols et al* describieron mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo a la movilidad según tamaño de partícula dos subpoblaciones de HDL<sub>2</sub>; HDL<sub>2a</sub> (8.8-9.7 nm) y HDL<sub>2b</sub> (9.7-12.0 nm) mientras que

de HDL<sub>3</sub> se describieron; HDL<sub>3a</sub> (8.2-8.8 nm), HDL<sub>3b</sub> (7.8-8.2 nm) y HDL<sub>3c</sub> (7.2-7.8 nm).

En el proceso de maduración, las HDL nacientes o discoidales mediante su interacción con el transportador de unión ATP tipo A1 (ABCA1) adquieren más fosfolípidos y colesterol libre provenientes de las células periféricas. La enzima LCAT esterifica el colesterol libre formando ésteres de colesterol que es llevado al núcleo de la partícula discoidal, dando paso a la formación de pequeñas HDL esféricas (HDL<sub>3</sub>). La interacción de estas pequeñas HDL con las células periféricas y su enriquecimiento en colesterol da paso a la formación de las fracciones largas de HDL (HDL<sub>2</sub>) que por la acción de CETP realizan un intercambio lipídico con las lipoproteínas ricas en Apo B. CETP y el intercambio lipídico contribuyen a la generación de las pequeñas HDL hacia las partículas HDL largas. (Kingwell A. et al., 2014).

Si bien los niveles plasmáticos de HDL han sido inversamente relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares existen evidencias que sugieren que la funcionalidad de HDL puede ser disminuida bajo ciertas condiciones fisiológicas. En pacientes con aterogénesis variaciones en los niveles de las subfracciones HDL fueron observados sugiriendo que las HDL largas (HDL<sub>2</sub>) son inversamente relacionadas mientras que las cortas HDL (HDL<sub>3</sub>) son positivamente asociadas con enfermedades cardiovasculares. (Pirillo A. et al., 2013)

En condiciones de dislipidemia, en donde existe un incremento de TG así como una disminución de los niveles plasmáticos de HDL se ha descrito la disminución de HDL<sub>2</sub> y un incremento de las subfracciones HDL<sub>3</sub>, estos cambios en la distribución sugieren que un estudio en los niveles de subpoblaciones HDL son un mayor predictor de enfermedades cardiovasculares que las concentraciones totales de HDL. (Pirillo A. et al., 2013).

## **1.7 Dislipidemias.**

Un balance positivo en el aporte calórico, un estilo de vida sedentario y la predisposición genética, generan desregulaciones en el tejido adiposo. Las dislipidemias son un conjunto de patologías que se caracterizan por alteraciones en las concentraciones de los lípidos sanguíneos así como en los componentes de las lipoproteínas y su concentración sanguínea. El 70% de las dislipidemias detectadas son secundarias a otras patologías mientras que el restante es de origen primario por desórdenes genéticos. (Brites et al, 2013).

La obesidad está asociada a la prevalencia de dislipidemia, caracterizada por el incremento de ácidos grasos libres, triglicéridos así como la disminución de HDL y una anormal composición de LDL. El exceso de ácidos grasos en el tejido adiposo incrementa la lipólisis que como consecuencia genera un mayor flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado aumentando la síntesis de VLDL e inhibiendo la lipólisis de Quilomicrones, promoviendo la hipertrigliceridemia que promueve la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) en circulación la cual promueve el intercambio de triglicéridos en las VLDL por colesterol de las LDL y HDL, aumentando así el contenido de triglicéridos en LDL que serán hidrolizadas por la lipasa hepática generando la formación de partículas LDL cortas y densas con características aterogénicas que aunado a la disminución de colesterol-HDL aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. (Jung J. et al, 2014) (Bays et al, 2013)

La hipertrigliceridemia es comúnmente expresada de forma secundaria ante resistencia a insulina, Diabetes Mellitus tipo 2 no controlada, hipotiroidismo no controlado, síndrome nefrótico, consumo crónico de alcohol (especialmente en personas con hígado graso) así como la exposición ante agentes terapéuticos como antiretrovirales, beta bloqueadores no selectivos, estrógenos orales, glucocorticoides y otros. (Bays et al, 2013)



Una desregulación más en el metabolismo de lípidos es el aumento de colesterol total sérico o hipercolesterolemia, siendo un factor de riesgo alto con concentraciones >200 mg/dL (ATPIII, 2004) . Siendo clasificadas por su origen en, hipercolesterolemia no familiar o poligénica, en donde los niveles elevados de colesterol están asociados a una dieta rica en lípidos saturados, colesterol y una escasa actividad física, se asocia con hipertensión arterial, obesidad y diabetes, desarrollando un mayor riesgo de aterosclerosis. Otra clasificación es la hipercolesterolemia secundaria, la cual está asociada a otras enfermedades tales como hipertiroidismo, síndrome nefrótico, Síndrome de Cushing, anorexia nerviosa, embarazo y al consumo de inmunosupresores y corticoesteroides. Finalmente la hipercolesterolemia familiar, que es un trastorno genético que se produce por mutaciones en el gen del receptor de LDL, aunque también se han descrito mutaciones del gen de la Apo B, causando aumento en los niveles de LDL, xantomas y enfermedad coronaria prematura. (Mata et al, 2013) (Errico T. et al, 2016) (Colletti A. et al, 2016) (ATPIII, 2004).

Una insuficiente esterificación de los ácidos grasos libres en triglicéridos por parte del tejido adiposo genera una retención de los ácidos grasos en el mismo desarrollando una hipertrofia adipocitaria que conlleva a la liberación de adipoquinas y citoquinas, induciendo a una resistencia local y sistémica a la insulina. Por otra parte se liberan ácidos grasos libres a circulación, los cuales serán tomados por el tejido hepático causando lipotoxicidad, estrés oxidativo, estrés en el retículo endoplásmico. (Sanyal , 2012) (Castro et al, 2015).

### **1.7.1 Dislipidemias y riesgo metabólico**

La desregulación en el metabolismo de lípidos, asociada a la anatomía y funcionabilidad del tejido adiposo es definida por Bays H. como adiposopatía y está asociada a diversas patologías. Con el incremento de ácidos grasos libres, producción anormal de adipocinas y factores inflamatorios así como en general una disfunción del tejido adiposo se generan desregulaciones en distintos órganos. (Bays H, 2011)

Dentro de las principales anormalidades asociadas son las del metabolismo en glucosa, en donde existe resistencia a Insulina en musculo esquelético e hígado así como disminución en la liberación de insulina en páncreas. La dislipidemia es un hallazgo frecuente en pacientes con diabetes presentando aumento de triglicéridos y VLDL, así como una disminución en la concentración de HDL y la presencia de LDL cortas y densas. La hipertensión también es generada en las adiposopatía por un incremento en la actividad de los mineralocorticoides y de las catecolaminas. Estas patologías en su conjunto derivan como factores de riesgo importante en la arteriosclerosis y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. (Bays et al, 2008)

La arteriosclerosis se produce por endurecimiento de las arterias, una enfermedad común de los vasos sanguíneos que se caracteriza por franjas de grasa a lo largo de las paredes arteriales, depósitos de colesterol y calcio. En la hipertrigliceridemia la formación de lipoproteínas LDL cortas y densas fácilmente oxidables aumentan el riesgo de formación de placa ateromatosa. Las LDL oxidadas son captadas por macrófagos provocando la formación de células espumosas y necrosis del tejido generando trombosis que desencadenan daños cardiovasculares. (Pérez G., 2007)

### **1.7.2 Guías para el manejo de dislipidemias.**

La dislipidemia se ha convertido en el principal factor de riesgo modificable para enfermedad vascular con el desarrollo de aterosclerosis. (Hendrani et al, 2016).

El manejo de dislipidemia consta de la modificación del estilo de vida, y farmacoterapia basada en la identificación de los grupos considerados de alto, medio o bajo riesgo de eventos vasculares. Organizaciones a nivel internacional han desarrollado directrices para la detección, tratamiento y seguimiento de las dislipidemias para mejorar la atención al paciente y disminuir los costos relacionados.

Una de las principales Guías para el tratamiento de las dislipidemias es creada por el Adult Treatment Panel III (ATP-III) con su más reciente modificación el año 2004, sus recomendaciones se basan principalmente en medir los niveles de lípidos, calcular el riesgo cardiovascular a 10 años según la puntuación de Framingham así como reducir los niveles de colesterol LDL (LDL-C) < 100 mg/dL, considerando que entre más alto el nivel basal de LDL-C el riesgo cardiovascular es mayor.

En pacientes con alto riesgo incluyendo pacientes con diabetes el objetivo es LDL-C <100 mg/dL, pero cuando el riesgo es muy alto la meta es LDL-C <70 mg/dL con opción terapéutica. Finalmente, en pacientes que presenten moderado o alto riesgo y que además presenten factores relacionados con el estilo de vida (obesidad, inactividad física, TG elevados, HDL bajo o síndrome metabólico) son candidatos para un cambio de estilo de vida terapéutico, independientemente del nivel de LDL. (Grundy S.M et al., 2004) (Hendrani A.D. et al., 2016).

En 2013 el Colegio Americano de Cardiología y las Asociación Americana de Corazón (ACC/AHA) (Jellinger S., 2012) publicaron nuevas directrices para el manejo del colesterol elevado, destacando como principal diferencia con ATP III que estas no fijan una meta específica para iniciar o mantener el tratamiento de LDL-C, recomienda el uso de estatinas como fármaco de elección en sus cuatro grupos de riesgo, además de utilizar modificaciones en el estilo de vida de todos los pacientes. Los cuatro grupos de riesgo considerados por esta guía son:

- Individuos con enfermedad cardiovascular aterosclerótica clínica.
- Individuos con niveles de colesterol LDL  $\geq$  190 mg/dl, tales como aquellos con hipercolesterolemia familiar.
- Individuos con diabetes de entre 40 a 75 años de edad con niveles de colesterol LDL entre 70 y 189 mg/dl y sin evidencia de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

- Individuos sin evidencia de enfermedad cardiovascular o diabetes, pero que tienen niveles de colesterol LDL entre 70 y 189 mg/dl y un riesgo a 10 años de enfermedad cardiovascular aterosclerótica  $\geq 7.5\%$ .

Además, recomiendan la terapia con estatinas de moderada o alta dosis según el riesgo. Existen además guías como la de Sociedad Europea de Cardiología 2011, la Sociedad Cardiovascular Canadiense 2009, la Sociedad Internacional de Aterosclerosis 2013 y la Asociación Nacional de Lípidos 2014 entre otras, cada una con ventajas y limitaciones dadas por una parte por sus poblaciones de estudio generando una subestimación del riesgo en otras.

### **1.8 Técnicas para la evaluación de lípidos.**

La cuantificación analítica de los lípidos transportados en sangre mediante las diferentes lipoproteínas constituye un perfil lipídico. Los resultados de éste junto con otros factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares permiten el desarrollo de un plan de tratamiento y seguimiento. Una variedad de factores biológicos pueden afectar los niveles de lípidos y lipoproteínas, como la edad ya que el colesterol aumenta con ella, la ingesta de lípidos saturados y colesterol, consumo de medicamentos como anticonceptivos orales, estrógenos y antihipertensivos, entre otros.

Para la cuantificación del colesterol contenido en HDL (HDL-C), y colesterol LDL (LDL-C) tradicionalmente existen los métodos de precipitación y ultracentrifugación, los cuales han desarrollado pruebas homogéneas (que no requieren de un pre-tratamiento) basadas en dos reacciones, la primera forma complejos estables con las lipoproteínas no deseadas, es decir, aquellas que puedan interferir en la medición y la segunda reacción corresponde a una medida enzimática. (Gómez et al, 2011).

En el estudio de la distribución de las subfracciones de las lipoproteínas y su asociación con padecimientos cardiovasculares se han desarrollado metodologías para un análisis más detallado.

La electroforesis en gel es uno de los métodos más antiguos que permite separar las lipoproteínas basándose en su tamaño y carga. Esta es una técnica cualitativa, siendo la electroforesis de tubo en gel de poliacrilamida aprobada por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) como un sistema viable para la detección de las subfracciones en donde el colesterol contenido y separado puede ser enzimáticamente medido. Si bien existen métodos más detallados, la electroforesis sigue siendo el método de primera línea para detectar desórdenes en las partículas de las lipoproteínas. (Wolska A. et al., 2017)

La ultracentrifugación por gradiente de densidad separa a las lipoproteínas de acuerdo a su densidad que depende del radio lípido/proteína contenido, este método ha sido utilizado para la nomenclatura de las subpoblaciones así como también es el método de referencia en la cuantificación de lipoproteínas. Sin embargo, la mayoría de los laboratorios clínicos no disponen de esta metodología dado a su alto costo. (Wolska A. et al., 2017)

Como parte del desarrollo de las tecnologías la resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) es una técnica cuali y cuantitativa que mide las señales en el espectro generadas por los grupos metilo-terminal de los lípidos. Esta técnica no requiere la separación de las lipoproteínas, más que únicamente la separación del plasma de las células rojas, esta técnica no requiere un proceso pre-analítico. La posición en el espectro de la resonancia magnética del grupo metilo-terminal de los lípidos es afectado por el tamaño de partícula de la lipoproteína. (Wolska A. et al., 2017)

## **2. Definición del problema.**

Las dislipidemias son junto a Diabetes Mellitus las alteraciones al metabolismo que actualmente afectan a la mayoría de los pacientes en nuestro país. Dichas condiciones son asociadas al desarrollo de SM y obesidad. Según datos de las ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud, 2012) 6.4 millones de adultos mexicanos son diagnosticados con diabetes. Las estimaciones de los costos de atención por cada uno de los pacientes van de 700 a 3 200 dólares anuales. (Rodríguez et al, 2010) lo que implica en 5 a 14% del gasto de salud son para la atención de esta enfermedad y sus complicaciones. (Hernández et al, 2013).

Estudios poblacionales han demostrado que las anomalías de los lípidos son los principales factores de riesgo para desarrollar padecimientos cardiacos, siendo estos la principal causa de muerte en México, según el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP, 2010). Datos del INSP 21% de los mexicanos presentan dislipidemia y un 48.3% hipertensión arterial, enfermedades que incrementado un 22% en los últimos 13 años (INSP, 2010).

Las dislipidemias se clasifican por síndromes que engloban diversas etiologías y distintos riesgos cardiovasculares. Se debe establecer su etiología y la probabilidad de que causen un evento cardiovascular. El diagnóstico clínico de estas se basa en los niveles séricos de las lipoproteínas y de sus lípidos o el depósito de ellos. El aumento en el porcentaje de incidencia de hipercolesterolemia en la población por el consumo de grasas saturadas, sedentarismo y otros factores de riesgo como tabaquismo, diabetes e hipertensión arterial tiene como tratamiento farmacoterapéutico la modificación de la concentración de LDL y HDL el cual define en gran parte el fenotipo lipídico posibles modificaciones en el metabolismo de los pacientes.

Lo que nos lleva a generar la siguiente pregunta científica:

**¿Existirán cambios en el fenotipo de transporte lipídico de las lipoproteínas HDL y LDL en pacientes con alto y bajo riesgo metabólico?**

### **3. Justificación.**

Las enfermedades crónicas no transmisibles son el problema de salud primario en México, siendo la enfermedad coronaria y diabetes las dos principales causas de muerte en México, seguido de los eventos vasculares cerebrales tromboembólicos. Estudios nacionales han mostrado que las anomalías de lípidos son los factores de riesgo más comunes en México. La detección y tratamiento de las alteraciones de los lípidos son clave para la prevención y manejo de enfermedades crónicas no transmisibles

Para la determinación de las dislipidemias se evalúan los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDL-C y LDL-C como técnicas de rutina; ya que de acuerdo a las concentraciones ya conocidas de cada uno de estos en el organismo se enfoca el tratamiento a seguir. Sin embargo, la cuantificación que se desarrolla en el Laboratorio Clínico actualmente no permite identificar las alteraciones recientemente descritas como en HDL quienes se encargan del transporte reverso del colesterol, pero que bajo ciertas condiciones se ha descrito que llegan a ser disfuncionales, llegando a participar tal y como lo hacen las LDL en la formación de placas ateromatosas, por lo que para la identificación de estas se requiere de técnicas especializadas y de altos costos a las que no todos los Laboratorios Clínicos tienen acceso como la electroforesis.

Es por ello que en el presente trabajo se propone realizar un estudio del lipidoma sérico de pacientes con dislipidemia y normolipemia mediante la modificación en las técnicas rutinarias de precipitación del Laboratorio Clínico que nos permitan identificar los cambios en el metabolismo de lípidos y de esta forma dar una pauta para un tratamiento acertado.

## **4. Objetivos.**

### **4.1 Objetivo general:**

Determinar las modificaciones en las lipoproteínas de acuerdo al contenido del lípidos y su distribución en pacientes con alto y bajo riesgo metabólico definido por las concentraciones de glucosa y triglicéridos.

#### **4.1.2 Objetivos específicos**

- Establecer los grupos de alto y bajo riesgo metabólico, de acuerdo a las concentraciones de glucosa y triglicéridos.
- Caracterizar la distribución de las subfracciones de lipoproteínas en pacientes de alto y bajo riesgo.
- Determinar el contenido de triglicéridos en LDL y HDL para los grupos de estudio, mediante modificaciones a las técnicas de precipitación.



## **5. Hipótesis**

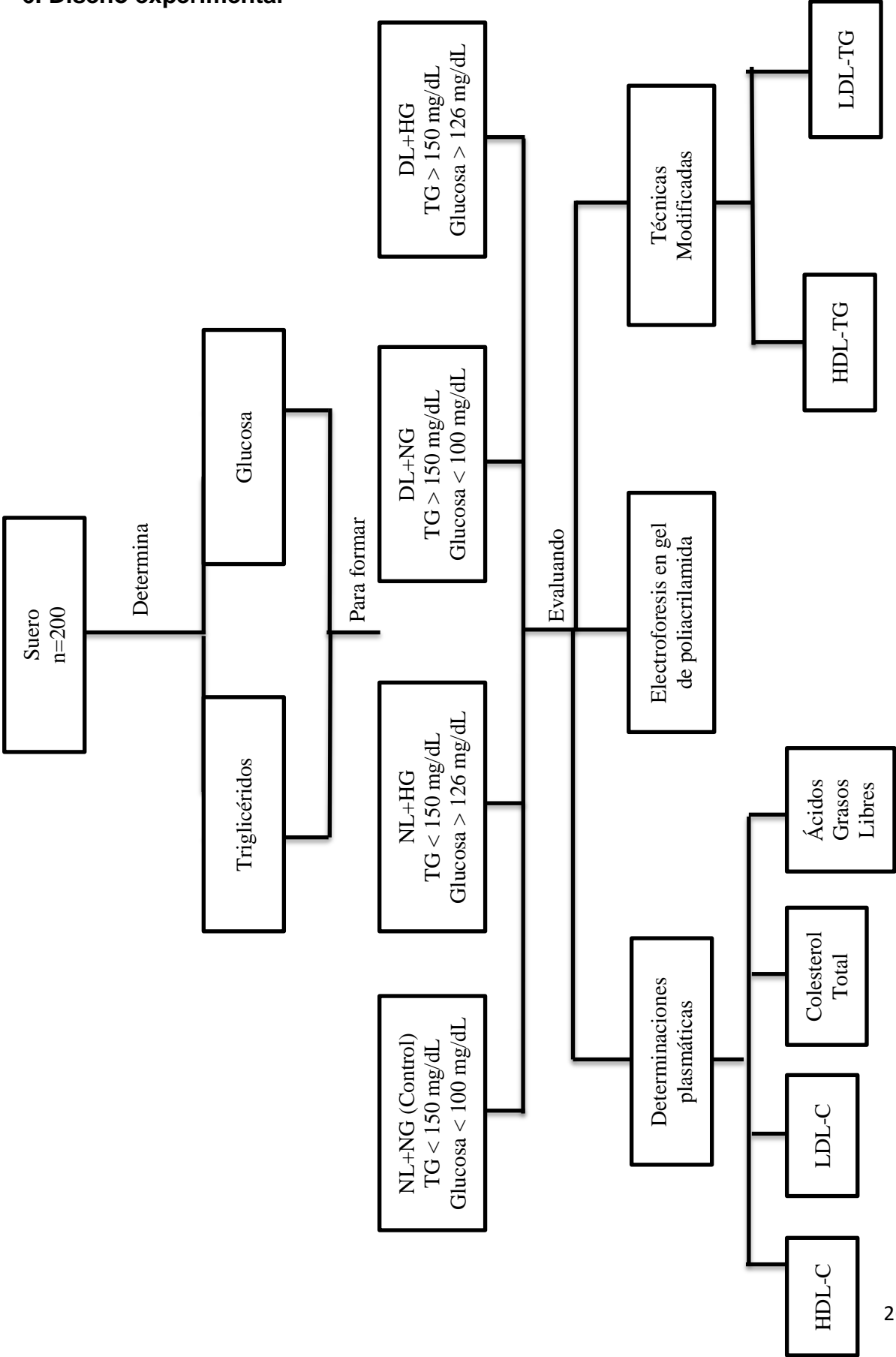
### **5.1 Hipótesis Nula.**

En pacientes de alto y bajo riesgo no se presentan cambios en su contenido lipídico asociado a colesterol y triglicéridos de HDL y LDL.

### **5.2 Hipótesis Alternativa.**

En pacientes de alto y bajo riesgo se presentan cambios en su contenido lipídico asociado a colesterol y triglicéridos de HDL y LDL.

6. Diseño experimental



## 7. Material y métodos

### Conformación de grupos

Del universo de estudio se realizó la cuantificación de glucosa y triglicéridos establecer los grupos de estudio. Se utilizó un espectrofotómetro automatizado AutoKemll con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones de la casa productora (Ver anexo 1 y 2). Las muestras con una concentración de triglicéridos < 150 mg/dL y glucosa < 100 mg/dL fueron consideradas como el grupo control (n=50). Para el grupo NL+HG las concentraciones de triglicéridos fueron las mismas en tanto que las de glucosa fue >126 mg/dL (n=50). Las muestras para el grupo DL+NG debían tener concentraciones de TG > 150 mg/dL pero glucosa < 100 mg/dL (n=50) y finalmente el grupo DL+HG que estuvo constituido por muestras con TG > 150 mg/dL y glucosa > 126 mg/dL (n=50).

### Determinaciones plasmáticas

Una vez que los grupos de estudio fueron establecidos se procedió a la cuantificación de colesterol total y sus fracciones HDL y LDL, fueron analizadas en un espectrofotómetro automatizado AutoKemll con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones de la casa productora. (Ver anexos 3-5)

La concentración de AGL se determinó de acuerdo con el método descrito por Brunk y Swanson en 1981 (Ver anexo 6) para la determinación se utilizó un espectrofotómetro modelo Lambda EZ150 PerkinElmer a una longitud de onda de 620 nm.

## Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los corrimientos electroforéticos fueron realizados bajo la técnica descrita por Frings S. y Lowell en 1970 y posteriormente bajo un análisis densitométrico se realizó un análisis detallado. (Ver anexo 7)

## Técnica modificada para la cuantificación de TG en HDL y LDL

Para la determinación de los TG contenidos en HDL se utilizó es reactivo de marca Spinreact para la determinación de HDL-C, bajo las mismas condiciones pero con la variación de tomar del sobrenadante 25  $\mu$ l de muestra y agregar un 1ml de reactivo Spinreact para TG, muestra se incubó 37° por 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura 505 nm en un espectrofotómetro automatizado AutoKemll. (Ver anexo 8).

Por otra parte para la determinación de TG en LDL la muestra se trató bajo las indicaciones del reactivo Biosystems para LDL-C, posterior a la centrifugación se tomaron 25  $\mu$ l del sobrenadante y se agregó 1 ml de reactivo Spinreact para TG, se incubó a 37° por 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura 505 nm en un espectrofotómetro automatizado AutoKemll. (Ver anexo 9).

## Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico fue realizado con ayuda de programa Prism 5 comparando al grupo control contra los grupos problema por medio del estadístico ANOVA de una vía y un pos hoc de Bonferroni, con un nivel de significancia menor del 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) fue considerado significativamente diferente.

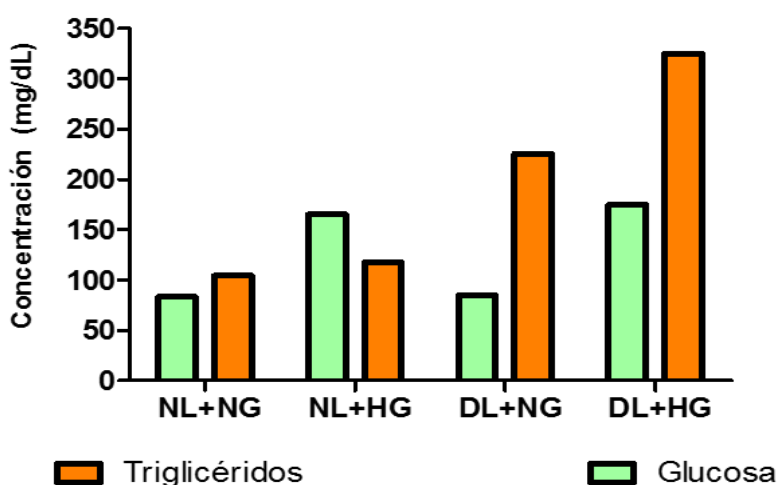
## 8. Resultados

Se estudiaron un total de 200 muestras biológicas de los pacientes que acudieron al laboratorio clínico “Los Ángeles”, las cuales cumplían con los criterios de estudio establecidos y de quienes aceptaron participar en el análisis. De acuerdo al diseño de estudio se realizó la siguiente clasificación en concordancia con el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III) para definir el riesgo metabólico.

NL+NG	NL+HG	DL+NG	DL+HG
Tg < 150 mg/dL	Tg < 150 mg/dL	Tg > 150 mg/dL	Tg > 150 mg/dL
Glucosa < 100 mg/dL	Glucosa > 126 mg/dL	Glucosa < 100 mg/dL	Glucosa > 126 mg/dL

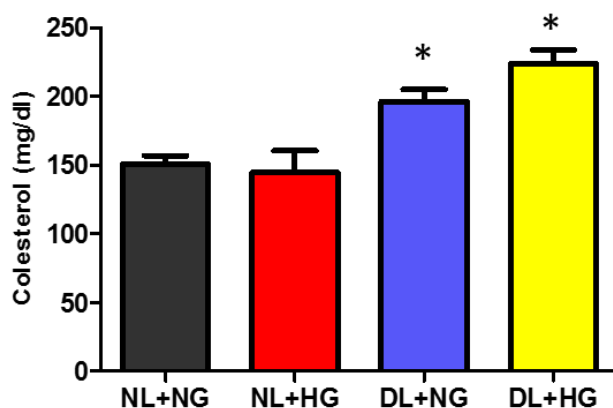
**Tabla 1.** Criterios para la clasificación de los grupos de estudio de acuerdo a la concentración de triglicéridos y glucosa que definen el riesgo metabólico de acuerdo a ATP-III.

De acuerdo a los criterios anteriores que definen el riesgo metabólico se realizó la determinación sérica de triglicéridos y glucosa de 200 muestras, formando grupos con una n=50 para su análisis.



**Figura 2.** Determinaciones séricas de triglicéridos y glucosa en las muestras analizadas, clasificadas de acuerdo a los criterios previamente establecidos.

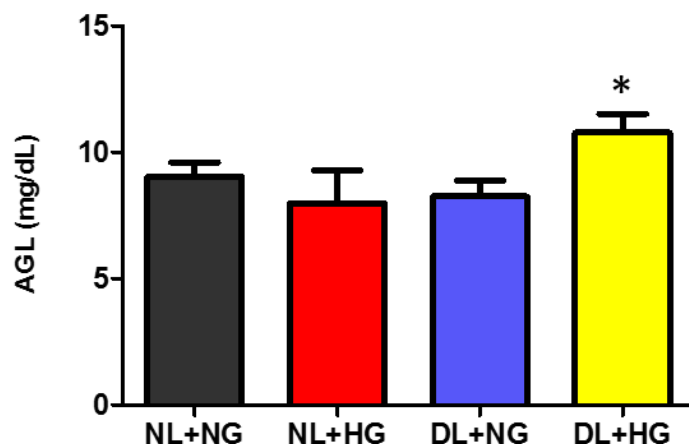
En el grupo control caracterizado por pacientes normolipídicos y normoglucémicos presentó una media de 104 mg/dL en la concentración de triglicéridos, y de 83 mg/dL para glucosa. El grupo NL+HG está descrito por concentraciones normolipídicas; con una media en triglicéridos de 117 mg/dL, e hiperglucémicas con una media 165 mg/dL. La alteración en la concentración de triglicéridos o dislipidemia es la característica del tercer grupo formado, presentando una media de 225 mg/dL y de 84 mg/dL respecto a glucosa. Finalmente, el cuarto grupo que presenta alteraciones en triglicéridos y glucosa presenta una media de 324 mg/dL y 174 mg/dL respectivamente.



**Figura 3.** Concentración plasmática de Colesterol. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). Se realizaron comparaciones entre grupos mediante una prueba ANOVA y una prueba de post hoc Bonferroni. (\*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control con  $P < 0.05$

Dentro de las guías generadas por el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol (NCEP) y el Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP), la concentración de Colesterol es uno de los principales criterios en la evaluación del riesgo metabólico, teniendo un alto impacto en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

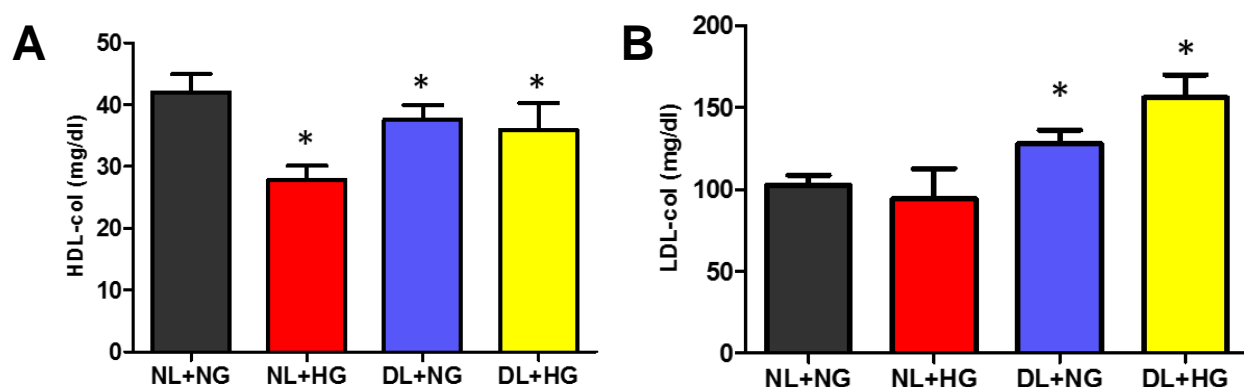
En la evaluación que se realizó de este analito el grupo control presentó una media de 151 mg/dL que en su comparación con NL+HG se observó una ligera disminución (5%) con una media de 144 mg/dL Mientras que para DL+NG y DL+HG se presentó un incremento estadísticamente significativo con concentraciones de 196 mg/dL y 223 mg/dL (30 % y 47%) respectivamente.



**Figura 4.** Comparación de la concentración plasmática de ácidos grasos libres. Los datos presentados son la media de los valores obtenidos  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). Se realizaron comparaciones entre grupos mediante una prueba ANOVA de una vía y prueba de post hoc Bonferroni (\*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control con  $P < 0.05$

En cuestiones dinámicas del metabolismo lipídico la concentración sérica de ácidos grasos libres es un valor importante ya que es el reflejo de imbalances en el gasto y resguardo energético, En el grupo control se observó una media de 9.1 mg/dL, mientras que para NL+HG la media fue de 7.9 mg/dL disminuyendo 12%, para DL+NG la media fue de 8.3mg/dL aumentando un 7.7% respecto al grupo control y finalmente el grupo DL+HG aumentó significativamente un 18% respecto a NL+NG con una media de 10.8 mg/dL.

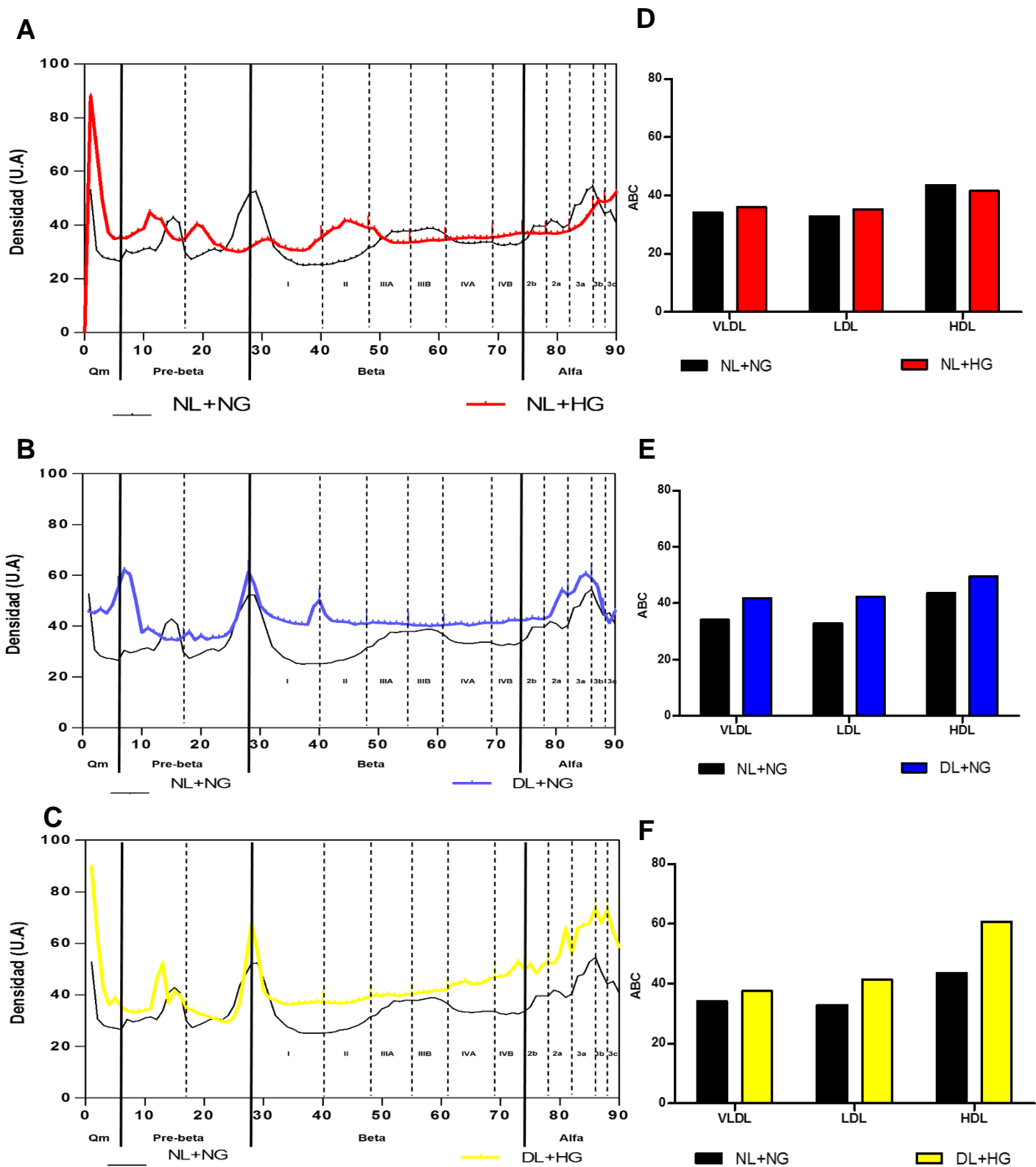
De acuerdo con el Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATP) la concentración de las lipoproteínas HDL y LDL son parte fundamental en la definición de riesgo metabólico, centrando el tratamiento farmacológico en la regulación de estas.



**Figura 5.** **A** Concentración plasmática de HDL-C, el grupo control (negro), grupo NL+HG (rojo), grupo DL+NG (azul), grupo DL+HG (amarillo). **B** Concentración plasmática de LDL-C, el grupo control (negro), grupo NL+HG (rojo), grupo DL+NG (azul), grupo DL+HG (amarillo). Los datos presentados son la media de los valores obtenidos  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). Se realizaron comparaciones entre grupos mediante una prueba ANOVA. (\*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control (1) con  $P < 0.05$

En los resultados respecto a HDL, el grupo NL+NG presentó una media de 42 mg/dL, NL+HG con una media de 27 mg/dL presentó una diferencia significativa respecto al grupo control disminuyendo 35%, mientras que DL+NG con una media de 38 mg/dL disminuyó un 11% y finalmente DL+HG que presentó una disminución del 16%, siendo significativa, con concentración media de 35 mg/dL. Por otra parte, en la evaluación de LDL, el grupo control tuvo una concentración media de 102 mg/dL, mientras que con una media de 95 mg/dL NL+HG presenta una disminución de 7.8 %, y DL+NG y DL+HG con medias de 128 md/dL y 156 mg/dL., presentaron un aumento significativo respecto al control 24 % y 51%, respectivamente,





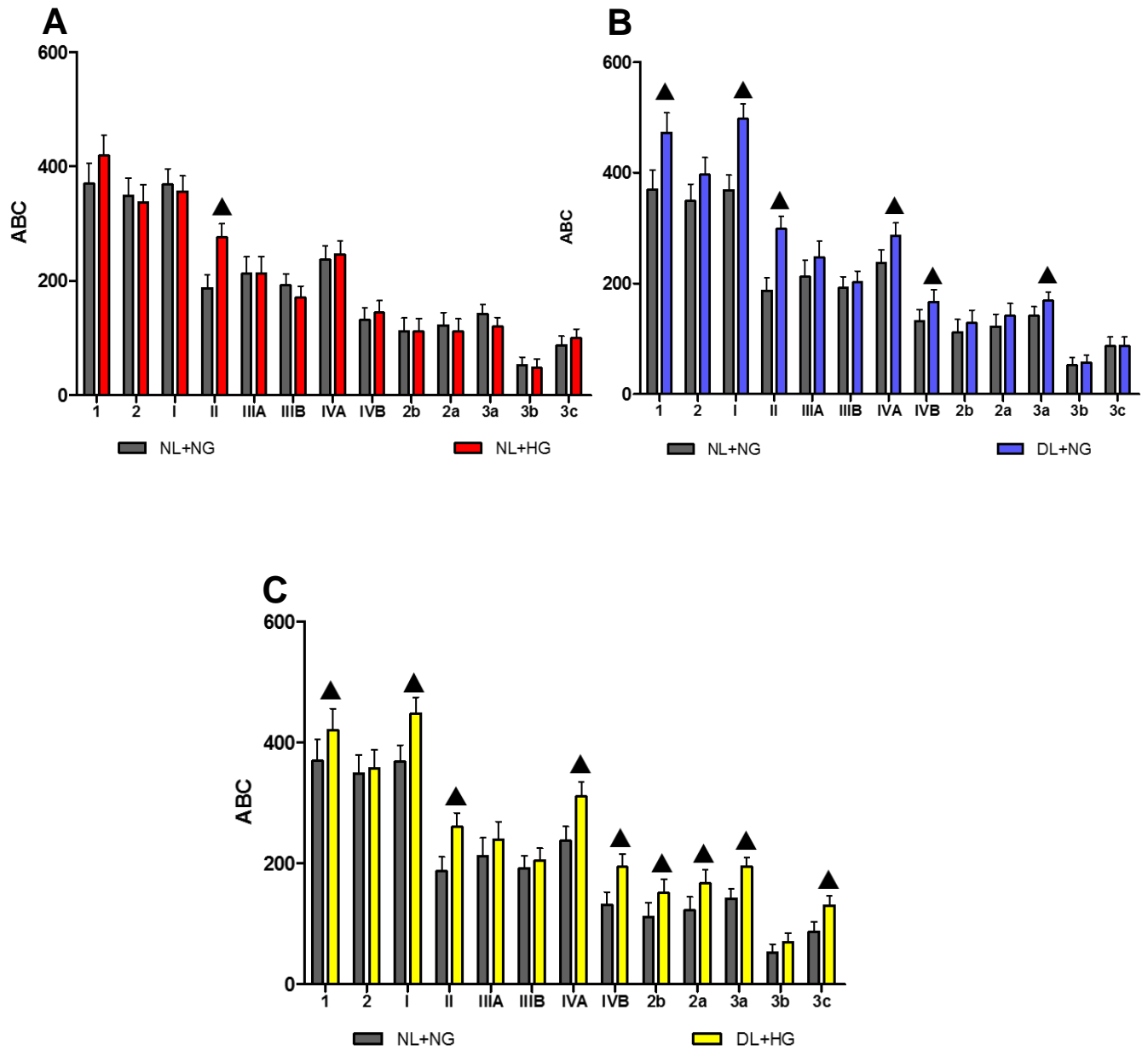
**Figura 6.** Comparación de electroferogramas obtenidos mediante análisis densitométrico de las lipoproteínas plasmáticas en gel de poliacrilamida. **(A)** grupo control (negro) y grupo NL+HG (rojo), **(B)** grupo control (negro) y grupo DL+NG (azul), **(C)** grupo control y grupo DL+HG (amarillo). **(D - F)** Análisis de área total bajo la curva de cada una de las regiones del corrimiento electroforético.

Las lipoproteínas comprenden un espectro de partículas que difieren en tamaño, densidad y composición tanto lipídica como de apolipoproteínas las cuales juegan roles distintos es el metabolismo lipídico por ello fueron evaluadas mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida que separa a las lipoproteínas de acuerdo a la movilidad electroforética y al tamaño de partícula. Esta técnica nos permite observar la presencia de subfracciones grandes y pequeñas para cada una de las lipoproteínas dividiéndolas en tres zonas, la zona pre-beta hace referencia a las VLDL, beta para LDL y alfa HDL.

En el electroferograma A se compara al grupo control NL+NG que presenta una distribución característica en las regiones prebeta, beta y alfa el grupo NL+HG el cual muestra una mayor distribución en VLDL, en la región beta se observa un aumento en la subfracción LDL-II y en menor grado en IVB. En tanto que en la distribución de la región alfa se observa una menor distribución en HDL-2a, 3a, 3b, así como un ligero incremento de las HDL-3c.

En la comparación del corrimiento electroforético del grupo control con el grupo DL+NG en el electroferograma B se puede observar una mayor distribución en la región de las VLDL, de la misma forma se observa para las LDL- I, II, IIIA, IVA, IVB y en menor grado para las IIIB. En las subfracciones HDL mostraron una mayor distribución 2b, 2a, 3a, 3b, y una ligera disminución en 3c.

Finalmente, en el electroferograma C que compara al grupo DL+HG con el control se muestra un ligero aumento en la distribución de la zona prebeta, respecto a la distribución de las LDL se observa un marcado incremento de las LDL-I, II, IVA, y IVB y en menor grado de IIIA y IIIB. En la distribución de la región alfa se muestra un incremento en 2b, 2a, 3a y de forma pronunciada en HDL<sub>3a, 3b y 3c</sub>.



**Figura 7.** Análisis del área bajo la curva. (A) grupo control (negro) y grupo NL+HG (rojo), (B) grupo control (negro) y grupo DL+NG (azul), (C) grupo control y grupo DL+HG (amarillo). Los datos presentados son la media de los valores obtenidos  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). Se realizaron comparaciones entre grupos mediante ANOVA de una vía, pos hoc Bonferroni.  $\blacktriangle$  Indica diferencia significativa respecto al grupo control (NL+NG) con  $P < 0.05$

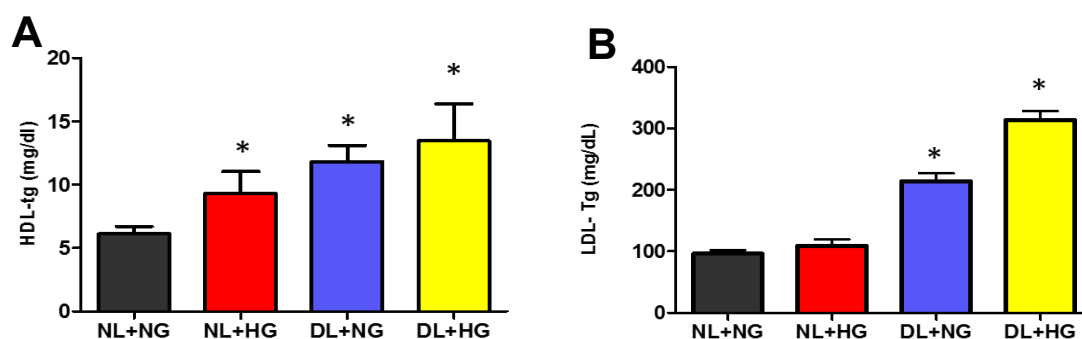
Para un análisis detallado, a partir de los lipoproteínogramas obtenidos se realizó el análisis total del área bajo la curva (ABC) de cada región y se comparó con el grupo control, como se observa en la figura 7.

En la figura A se compara el grupo NL+HG, donde en la zona pre-beta no se observaron cambios significativos sin embargo, se observa una tendencia con disminución de las fracciones cortas VLDL<sub>2</sub> y un incremento de la fracción larga VLDL<sub>1</sub>, mientras que la zona beta presenta un incremento significativo del 47% para la fracción LDL<sub>II</sub> mientras que para LDL<sub>III B</sub> existe un descenso del 11.15 %, finalmente para LDL<sub>IV A</sub> y LDL<sub>IV B</sub> existe un ligero incremento 4% y 10% respectivamente. En las subfracciones de la región alfa se observó una disminución del área; HDL<sub>2a</sub> ; 9%, HDL<sub>3a</sub> 16% y HDL<sub>3b</sub> del 8% por otra parte en la subfracción HDL<sub>3c</sub> existió un incremento del 14%.

En la comparación del grupo DL + NG en la figura B, la distribución de la zona VLDL mostró un incremento significativo del 35.2 % para la fracción VLDL<sub>1</sub>, se registró un incremento del área en todas las subfracciones de la región beta; LDL<sub>I</sub> 35%, LDL<sub>II</sub> 58%, LDL<sub>III A</sub> 17%, LDL<sub>III B</sub> 5%, LDL<sub>IV A</sub> 20% y LDL<sub>IV B</sub> 28%, siendo significativos para LDL<sub>I</sub>, LDL<sub>II</sub>, LDL<sub>IV A</sub> y LDL<sub>IV B</sub>. Para las subfracciones 2b, 2a, 3a y 3b de la región alfa se observó un incremento del 15%, 16 %, 19%, 11% respectivamente, siendo significativo para HDL<sub>3a</sub> no mostrando cambios para la fracción HDL<sub>3c</sub>.

Finalmente en el análisis del área bajo la curva del grupo DL + HG y su comparación con el grupo control se presentó una diferencia significativa en la fracción VLDL<sub>1</sub> aumentando un 20%, para la región LDL; en LDL<sub>I</sub> un incremento significativo de 22%, LDL<sub>II</sub> aumentó significativamente 37%, III A con 12.78 %, III B de 7.1 %, en las fracciones cortas LDL<sub>IV A</sub> y LDL<sub>IV B</sub> existió un incremento significativo de 31% y 47% respectivamente en tanto que en la región alfa se observó un incremento significativo en las subfracciones HDL<sub>2b</sub> de 35%, HDL<sub>2a</sub> de 36%, HDL<sub>3a</sub> con 15.07 % y finalmente para HDL<sub>3c</sub> con 47%.

A partir del incremento observado en electroforesis de las subfracciones descritas como cortas y densas de LDL y HDL caracterizadas por un contenido rico en triglicéridos que están asociadas con un mayor riesgo aterogénico, una fácil oxidación (LDL), así como la incapacidad de realizar el transporte reverso de colesterol y su disminución en sus funciones antioxidativas (HDL), se realizó la modificación en las técnicas convencionales de HDL-C y LDL-C para poder identificar dichas subfracciones a través de su contenido en triglicéridos, obteniendo los siguientes resultados.



**Figura 8.** Modificación a técnica convencional de HDL y LDL para la cuantificación de triglicéridos contenidos en estas lipoproteínas. **A** Concentración de triglicéridos en lipoproteínas HDL, el grupo control (negro), grupo NL+HG (rojo), grupo DL+NG (azul), grupo DL+HG (amarillo). **B** Concentración de triglicéridos en lipoproteínas LDL, el grupo control (negro), grupo NL+HG (rojo), grupo DL+NG (azul), grupo DL+HG (amarillo). Los datos presentados son la media de los valores obtenidos  $\pm$  EEM (Error Estándar de la Media). Se realizaron comparaciones entre grupos mediante una prueba ANOVA de una vía pos hoc Bonferroni. (\*) Indica diferencia significativa respecto al grupo control con  $P < 0.05$

El contenido de triglicéridos presente en lipoproteínas HDL en el grupo NL+NG arrojó una media de 6.1 mg/dL, por otra parte, NL+HG con una media de 9.2 mg/dL aumentó significativamente un 50% respecto al grupo control, de la misma forma DL+NG con una concentración media de 11.80 mg/dL aumentó significativamente un 93% y finalmente DL+HG con media de 13.45 presentó un aumento de 120%. En la evaluación del contenido de triglicéridos en LDL, NL+NG presentó una media de 96.24 mg/dL de la cual NL+HG aumentó un 12.6% (109 mg/dL), mientras que DL+NG aumentó significativamente (121%) con una concentración media de 214 mg/dL de igual forma con un incremento significativo (224%) DL+HG presentó una media de 313 mg/dL.

## 9. Discusión de resultados

El presente trabajo tuvo como objetivo principal describir las modificaciones en el contenido del lipidoma en pacientes con alto y bajo riesgo metabólico por lo que se abordó en relación a caracterizar en primera instancia a los pacientes de acuerdo a su riesgo metabólico, posteriormente se identificaron las alteraciones en la distribución de sus lipoproteínas y finalmente mediante modificaciones a técnicas estandarizadas se demostró la presencia de subfracciones HDL y LDL asociadas a alteraciones metabólicas, en relación a esto se puede mencionar que, los desórdenes metabólicos han sido caracterizados por distintas organizaciones internacionales de acuerdo a la desregulación de distintos parámetros bioquímicos como lo son lípidos y carbohidratos, los cuales están íntimamente asociados en el desarrollo de patologías como obesidad, resistencia a insulina, dislipidemia y diabetes mellitus. Los paneles de expertos contemplan alteraciones en la homeostasis de glucosa y lípidos, así como, a sus metabolitos quienes están involucrados en el balance y la distribución energética en el organismo, tomando en este sentido a la concentración de triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol total (CT), así como a sus lipoproteínas transportadoras VLDL, HDL y LDL. Los parámetros descritos se han asociado además con el desarrollo de alteraciones como diabetes mellitus (DM), resistencia a insulina y otros factores, que en conjunto ayudan al diagnóstico y evaluación del riesgo metabólico. (ATPIII, OMS, ADA).

En nuestro estudio, los criterios de clasificación para los grupos de trabajo fueron las concentraciones de TG y glucosa tomando como referencia los valores biológicos de decisión médica reportados en las guías de ATPIII, en su definición de bajo y alto riesgo metabólico.(ATPIII, 2001) Nuestros resultados mostraron que los valores de TG de bajo riesgo metabólico se relacionaron con la concentración sérica de CT posicionándose en los límites deseables (<199 mg/dL), mientras que los de alto riesgo metabólico mostraron un incremento significativo sin rebasar las concentraciones del límite alto referenciado (> 240 mg/dL) (ATPIII, 2001).

Aunque en alteraciones metabólicas existe la presencia de hipercolesterolemia, así como la desregulación de LDL y HDL, estudios como el de Klafke en 2015 demuestran que la presencia de concentraciones mayores a 150 mg/dL de TG son un potencial indicador de lipoproteínas aterogénicas comparándolo con hipercolesterolemia. En este mismo, sentido, Tchernof en 1996 demostró que la concentración de TG es un mayor predictor de la presencia de LDL cortas y densas al compararla con la presencia de hiperinsulinemia y obesidad visceral central en pacientes. (Klafke J.Z., et al, 2015) (Glueck J.C. et al, 2009) (Tchernof A. et al, 1996) (ATP III, 2001).

Si bien las rutas de síntesis de lípidos están asociadas al consumo dietético de estos, una exposición frecuente a carbohidratos sin un gasto energético equivalente, tiene efecto directo sobre vías lipídicas siendo insulina que favorece la captación de glucosa como metabolito energético en tejidos como músculo, adiposo e hígado un regulador en el metabolismo no solo de carbohidratos sino también lipídico. (Kersten S. 2001)

En hígado insulina inhibe la gluconeogénesis y fomenta la lipogénesis pero en el desarrollo de patologías como diabetes mellitus y resistencia a insulina la inhibición de la gluconeogénesis se ve disminuida y se mantiene la novo síntesis lipídica llevando a estados de hiperglucemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia. La hiperglucemia y la consecuente saturación de las vías glucolíticas generan intermediarios metabólicos como Acetil-CoA y gliceraldehído estimulando enzimas lipogénicas como ATP-citrato liasa, Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), sintasa de ácidos grasos (FAS) que llevan a un incremento en la síntesis de triglicéridos que aunado a la activación por ingesta de proteínas como la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP1c) mediante la interacción de insulina y su receptor, así como la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (ChREBP) que mediante la interacción con intermediarios glucolíticos favorecen la transcripción de genes lipogénicos que conllevan al incremento de triglicéridos hepáticos los cuales serán llevados a tejidos como adiposo para su resguardo. En tejido adiposo por otra parte la

saturación de las vías glucolíticas y la disminuida inhibición de lipólisis regulada por insulina así como el sobreflujo de TG hepáticos lleva al incremento la liberación de ácidos grasos que unidos a albúmina en plasma serán llevados a hígado para su oxidación y como sustrato en la síntesis de TG, convirtiéndose así en un círculo metabólico creciente. (Proenca A.R.G. et al, 2014) (Haugen F. et al, 2007) (Sanders W.B. et al., 2016)

Con base en esta asociación del metabolismo de triglicéridos y glucosa los grupos fueron clasificados, teniendo así un panorama con las principales alteraciones relacionadas en el metabolismo lipídico. Nuestros grupos de asociación a un bajo y alto riesgo metabólico (en relación a TG) se relacionaron con niveles de glucosa plasmática con alto y bajo riesgo metabólico como se ha definido por organismos como ADA.

Como se ha descrito por diversos estudios, un exceso en la ingesta alta de carbohidratos aunado a la ingesta de ácidos grasos saturados tienen un impacto sobre la concentración de colesterol (Tarino-Siri, et al.,2010); por lo que, como parte de la evaluación del riesgo metabólico en pacientes tal y como lo dictan las guías internacionales se realizó la cuantificación de este metabolito, encontrando que en los pacientes que sólo presentaban hiperglicemia (NL+HG) la concentración de colesterol se encontró dentro de los límites biológicos de referencia descrito como deseables (hasta 199 mg/dL, según el criterio ATP III). Asociaciones como la ADA (American Diabetes Association, por sus siglas en inglés) y otros estudios como los de Bierman et al., en 1973 y Dixir et al., en 2014, describen que en pacientes con diabetes mellitus la hipercolesterolemia es una característica asociada a la patología. (Tarino-Siri, et al.,2010) (Bierman E. et al., 1973) (Dixir K.A. et al., 2014)



En relación al desarrollo de niveles elevados de colesterol se han descrito distintos mecanismos reguladores en estos pacientes, moléculas intermediarias en el catabolismo de colesterol denominadas oxisteroles derivadas del incremento dietético son ligandos endógenos del receptor X hepático (LXR), que una vez activado promueve el flujo de colesterol en exceso hacia células periféricas, y además, propicia también la excreción hepática mediante la síntesis de ácidos biliares y finalmente inhibe la absorción intestinal de colesterol (Zhang et al.,2012). Este mismo receptor puede ser activado por glucosa y sus intermediarios cuando se activan rutas secundarias como la de las pentosas. Adicionalmente, a los efectos ya mencionados también se ha observado disminución en la gluconeogénesis hepática, mejora la sensibilidad a insulina en adipocitos al promover la transcripción del transportador de glucosa GLUT4 como lo han demostrado trabajos como los de Laffitte et al en 2003 en modelos animales. Por lo que es considerado un importante regulador en la homeostasis de glucosa y lípidos. (Bierman E. et al, 1973) (Dixir K.A. et al, 2014) (ADA, 2016) (Mitro N. et al, 2007) (Laffitte B. et al, 2003) (Zhang Y. et al.,2012).

Nuestros resultados mostraron que los pacientes con hipertrigliceridemia (DL+NG) presentan un incremento en la concentración sérica de colesterol sin exceder los límites referenciados como deseables, en este sentido estudios como Briones et al., en 1986 y de Miettinen et al., en 2000 , demostraron que en pacientes con triglicéridos mayores a 150 mg/dL, la absorción intestinal de colesterol se ve disminuida como mecanismo de regulación mediado por hormonas y neurotransmisores primordialmente; sin embargo, al inhibir la absorción de colesterol es activado un factor de transcripción denominado por sus siglas en inglés SREPB (Proteína de unión a elementos reguladores de esterol) el cual está implicado principalmente en la biosíntesis de TG, pero además regula la transcripción de enzimas como la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA), farnesil difosfato sintetasa y escualeno sintetasa, todas estas implicadas en la biosíntesis de colesterol, además de regular positivamente al receptor de LDL

(LDL-R) generando una mayor recaptura de colesterol en los tejidos periféricos. (Briones R. et al, 1986) (Brown S. et al, 1997), (Simonen P. et al, 2007) (Miettinen A.T.et al., 2000)

Los resultados de los pacientes con hiperglucemia e hipertrigliceridemia (DL+HG) mostraron un incremento significativo encontrándose el colesterol por encima del límite alto de los valores referenciados (200-239 mg/dL), presentándose como un factor de riesgo aterogénico y metabólico. Distintos son los procesos que pueden explicar este resultado, como se mencionó anteriormente la dieta es un factor importante, un incremento en el consumo de ácidos grasos saturados pueden incrementar los niveles séricos, por otro lado la regulación hepática en la biosíntesis de dicho metabolito como se explicó anteriormente está influenciada por las concentraciones tanto de glucosa como de triglicéridos, además existe una influencia de hormonas como insulina que mediante su interacción con su receptor hepático incrementa la actividad de HMG-CoA, favoreciendo la síntesis *de novo* tanto de triglicéridos como de colesterol. Finalmente, otra forma de elevar los niveles séricos de colesterol es por la remanencia y el retorno de las lipoproteínas transportadoras LDL y HDL, siendo esas las principales acarreadoras, ya que en condiciones normales presentan un alto contenido de colesterol, el cual corresponde al 46% y 20%, respectivamente, es estados de hipertrigliceridemia, estas lipoproteínas se ven afectadas y ellas la concentración total de colesterol. (Gylling H. et al, 2010) (Philip E., 2012).

Así mismo, las dislipidemias son caracterizadas frecuentemente por incremento en las concentraciones de ácidos grasos libres (AGL), estos cumplen distintas funciones, principalmente como moléculas de obtención energética por beta oxidación. En circulación unidos a albúmina son transportados a órganos como músculo e hígado, donde pueden interferir en el metabolismo de glucosa y en la ruta de señalización insulínica, en otros tejidos alteran las cascadas de señalización con lo que alteran la transcripción de genes; además son sustratos que al reesterificarse se asocian con la producción de lipoproteínas hepáticas; en concentraciones elevadas pueden producir grado de toxicidad celular e interferir

con algunas actividades celulares como en las células beta pancreáticas en las actúa sobre vía no canónicas de producción y liberación de insulina. (Duncan E. et al, 2007) (Soni K.G. et al, 2004).

Por lo que fueron evaluados los niveles de AGL, en nuestro estudio los resultados del grupo (NL+HG) si bien, son menores respecto al grupo control, se encuentran dentro de los valores normales (8-25 mg/dL). Pacientes diabéticos fueron evaluados en 1992 por el grupo de investigación del Dr. DeFronzo, los pacientes diabéticos también mostraron resistencia a insulina periférica, así como, un incremento de la lipólisis adipocitaria y por ende una elevación en los niveles plasmáticos de AGL. En asociación a esta desregulación, uno de los principales afectados por la elevación de AGL es músculo, que como lo describieron en 2014 Verma et al., bajo resistencia a insulina la recaptura y la oxidación de glucosa es disminuida, por lo que durante un incremento en la captura de ácidos grasos, estos son ocupados en procesos como  $\beta$ -oxidación, para una ganancia energética con lo que son aclarados los niveles plasmáticos de AGL. Secundariamente, los AGL también pueden presentar un flujo natural hacia hígado en donde son tomados y pueden ser utilizados en distintos procesos; como moléculas energéticas para  $\beta$ -oxidación, ser sustrato para procesos como gluconeogénesis inducida por mecanismos de resistencia a insulina y finalmente re-esterificados para producir triglicéridos. (DeFronzo et al, 1992) (Verma K.M. et al, 2014) (Arner P. et al, 2005).

En nuestros pacientes con hipertrigliceridemia (DL+NG) obtuvimos de la misma forma resultados referenciados dentro de los límites biológicos. Una redistribución de AGL en tejidos no adiposos estarían aclarando y compensando el incremento de lipólisis del tejido adiposo por la elevación del depósito de triglicéridos como lo describen Taube et al., en 2008 con una recaptura por parte de músculo, hígado, corazón y páncreas. Sin embargo, en este incremento de la recaptura de AGL se generan condiciones de lipotoxicidad que llevan a una disfunción celular, Verma et al en 2014 muestran como en músculo el sobre flujo de AGL condiciona la capacidad oxidativa con un incremento del depósito intracelular de lípidos, además

de la expresión de genes asociados con la síntesis de triglicéridos, fomentando así mayores niveles de estos tanto en circulación como depositados en diferentes tejidos. En páncreas, Itoh et al., en 2003 mostraron que una exposición aguda a AGL resulta en un incremento de la secreción de insulina mientras que ante una exposición crónica pueden generar una supresión en la secreción de esta. En hígado el incremento de AGL fomenta la hipertrigliceridemia con una sobreproducción de VLDL, además del desarrollo de hígado graso no alcohólico bajo estas condiciones como lo describen Alkhoury et al., en 2009. (Verma K.M. et al, 2014) (Alkhoury N. et al., 2009) (Itoh Y.. et al., 2003 )(Taube A. et al., 2008)

Todos estos procesos de desregulación celular en condiciones de lipotoxicidad, sumados al desbalance por incremento de ácidos grasos y adipocinas, en las que se destaca la disminución de adiponectina y sus funciones relacionadas en la oxidación de ácidos grasos, disminución de los niveles plasmáticos de triglicéridos y la recaptura de glucosa por sensibilización de insulina (Palomer et al, 2005); así mismo, la leptina que en pacientes diabéticos se ve incrementada generando estados de resistencia a dicha hormona, lo que conlleva a la pérdida gradual de la capacidad para inhibir la producción y secreción de insulina, favoreciendo niveles hiperinsulinémicos que llevan a la resistencia de esta otra hormona, generando en conjunto un ambiente con un sobre flujo de AGL plasmáticos, que si bien en los pacientes DL+HG no rebasa los límites de referencia el incremento significativo en comparación a los pacientes NL+NG nos indica un desajuste en el metabolismo de AGL poco compensado. (Palomer et al, 2005) (Pérez A. et al, 2008).

En consecuencias y de acuerdo a las guías establecidas por el Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos (ATPIII, 2001) las concentraciones de las fracciones de colesterol; HDL y LDL son fundamentales en la definición de riesgo metabólico. En dichas guías está descrito que en pacientes diabéticos existe una disminución en los niveles plasmáticos de HDL, que corresponden a valores < 40 mg/dL. Asociaciones como la ADA mencionan que los niveles disminuidos de HDL son un factor de riesgo metabólico independientemente de los valores de triglicéridos y estudios como el de Nerurkar

et al., en 1983 demuestran que en pacientes diabéticos normolipémicos la concentración de HDL se ve disminuida, coincidiendo con nuestros resultados para el grupo NL+DG quienes presentaron una concentración menor a 40 mg/dL, por lo que pueden ser clasificados como pacientes de alto riesgo según la ATP III. (Bitzur R et al, 2009) (Nerurkar SV et al, 1983).

Así mismo, los estados hiperglucémicos independientes a la progresión de dislipidemias, es decir pacientes hiperglucémicos y normolipémicos como los de nuestro estudio, en lo que no se encuentran alteradas las vías de lipogénesis se han descrito distintos mecanismos que llevan a la disminución de HDL. En modelos animales y cultivos celulares (Mooradian et al., 2009) demostraron que existe una disminución en la expresión de la principal apolipoproteína encargada de la maduración de las HDL, la Apo A-1; generando así HDL inmaduras pobres en contenido lipídico fácilmente oxidables con mayor susceptibilidad a la degradación. Por otra parte, la glicación no enzimática de ApoA-1 en hiperglicemia de igual manera genera lipoproteínas HDL fácilmente oxidables y susceptibles a la depuración, siendo filtradas por glomérulo y degradadas de los túbulos renales proximales. Finalmente, estudios en pacientes diabéticos han demostrado que insulina puede estimular el aclaramiento de lipoproteínas cortas y densas siendo este uno de los mecanismos que se puede asociar a la marcada disminución de HDL en los pacientes del grupo NL+DG (Duell P.B et al, 1991) (Ferratti G. et al, 2006) (Mooradian A.D et al., 2009)

En este sentido, estas modificaciones antes descritas no solo alteran las concentraciones plasmáticas, sino que también afectan el cumplimiento de sus funciones como lo describen Ferretti et al., 2006; Kontush et al., 2006, quienes asocian la glicación de las HDL a un ineficiente proceso en el transporte reverso del colesterol, además de también afectar a la función antioxidante por una disminución de enzimas implicadas como paraoxonasa-1 (PON1). Finalmente, la exposición de HDL a condiciones hiperglucémicas pueden contribuir a procesos aterogénicos en pacientes diabéticos. (Omeed et al, 2011) (Roseson et al, 2013) (Ferretti G. et al., 2006) (Kontush A. et al., 2006)

El riesgo metabólico en pacientes con disminución de HDL está asociado al incremento sérico de triglicéridos como se observó en los pacientes del grupo DL+NG con una concentración debajo de los límites recomendados (>60 mg/dL) por ATPIII. Estudios han demostrado que en la elevación de triglicéridos y la reducción de la concentración de HDL se vincula fuertemente con enzimas como la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y lipasa hepática (LH) tienen un incremento en su actividad. Mediante la acción de CETP se da el intercambio entre ésteres de colesterol desde las HDL y triglicéridos por parte de las VLDL, que en estados de hipertrigliceridemia se encuentran incrementadas generando HDL ricas en triglicéridos, estas lipoproteínas son más susceptibles a la acción de LH la cual convierte las HDL en cortas y densas incrementando así su catabolismo. El incremento de TG y la disminución de HDL están asociadas también en la reducción de la actividad de la lipoproteín lipasa (LPL) y de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) formando partículas HDL pequeñas e inmaduras, perdiendo así su función anti-aterogénica. En modelos animales se ha mostrado un incremento en el catabolismo renal de fracciones de Apo A1 asociado a hipertrigliceridemia con disminución en HDL. (Rashid S. et al, 2003) (Tian Li et al, 2011) (Avogaro P. et al, 1992) (Ginsberg H.N et al, 1996).

Asociaciones como la ADA y ATPIII identifican una serie de factores lipídicos que asociadas a hiperglucemia y resistencia a insulina presentan pacientes con riesgo metabólico elevando el riesgo de enfermedades cardiovasculares, estas alteraciones lipídicas están caracterizadas por un incremento en triglicéridos y disminución de HDL. Taskinen, 2002; Mooradian, 2009; Goldberg, 2001; han descrito estas alteraciones en pacientes y modelos animales denominándolas “dislipidemia diabética” la cual se observó en los resultados de nuestro grupo DL+HG, los cuales presentaron una disminución de HDL con valores descritos como de alto riesgo metabólico (<40 mg/dL) según la ATP III. (Mooradian A.D et al., 2009) (Goldberg J.I., 2001) (Taskinen M.R, 2002)

La asociación de los mecanismos descritos para los grupos anteriores y su regulación mediante la acción de insulina fomentan la disminución de HDL.

Verges, menciona que en pacientes con hipertrigliceridemia y diabetes mellitus existe un incremento de HDL pequeñas, así como una disminución de HDL grandes, este fenómeno es explicado por Golgberg J. quien menciona que ante el incremento de TG y el aumento en la actividad de CETP se producen HDL ricas en triglicéridos siendo entonces sustrato para LH aumentando así su catabolismo. Por otra parte Mooradian A.D. menciona que en estos pacientes otra forma de disminuir los niveles de HDL está en relación a la acción de insulina la cual se encarga de regular positivamente la producción de Apo-A1 esta actividad se ve disminuida en la resistencia a dicha hormona en este sentido la actividad de enzimas como LH y lipoproteín lipasa se ve modificada en resistencia a insulina, incrementando entonces el catabolismo de HDL. (Verges B., 2015)( Goldberg J.I., 2001)( Mooradian A.D., 2009).

Por otro lado, el incremento sobre las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es considerado como un factor independiente en el desarrollo de desregulaciones metabólicas, con impacto en padecimientos cardiovasculares. Sin embargo, diversos autores reportan que concentraciones dentro de los límites referenciados en pacientes con alteraciones metabólicas, destacan variaciones cualitativas de estas lipoproteínas con un incremento de las subfracciones cortas y densas, estos datos son similares a los resultados que obtuvimos en este estudio. (Taskinen M.R, 2002) (Verges B, 2009)

Para el grupo NL+HG se presentó una concentración definida por la ATP III como óptima (<95 mg/dL) siendo ligeramente menor a nuestro grupo control (103 mg/dL) y esto se puede asociar a las vías de síntesis y catabolismo de LDL. Por una parte, un paso necesario en su producción es la hidrólisis de su precursor VLDL por medio de la enzima lipoproteín lipasa (LPL), y si bien las vías lipogénicas para triglicéridos no están incrementadas, estudios en pacientes diabéticos (Goldberg, 2001) han descrito una baja actividad de LPL, explicando así, una disminución que puede ser compensada por mecanismos de su catabolismo en donde el receptor hepático para LDL (LDL-R) se ve disminuido en pacientes diabéticos por acción de insulina que favorece la expresión de la proproteína convertasa

subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) la cual se encarga de la degradación del receptor, estudios en pacientes diabéticos muestran que PCSK9 está incrementada (Miao J. et al, 2015)( Goldberg J.I., 2001)

En cambio, para nuestros pacientes del grupo DL+NG la concentración de LDL que de igual manera no rebasa los límites altos (según la ATP III), presentó un incremento significativo respecto a nuestro grupo control. La relación en primera instancia para este grupo, está en el incremento del precursor VLDL por incremento de TG, y secundariamente a una disminución en su catabolismo por la presencia de LDL pequeñas y densas, el incremento en la actividad de CETP, dando como resultado LDL ricas en triglicéridos, las cuales al ser sustratos de la LH genera LDL's cortas y densas, fácilmente oxidables, con menor afinidad a su receptor propiciando una mayor permanencia plasmática, y que además, pueden ser depuradas principalmente por macrófagos desarrollando la formación de células espumosas.(Subashini C., 2016).

Los mecanismos antes descritos que se correlacionan fuertemente con el daño endotelial, se complementan por una mayor afinidad de proteoglicanos de la capa íntima endotelial, lo que favorece su interacción y acceso en la pared arterial. En el desarrollo de procesos aterogénicos las LDL pequeñas y densas han demostrado promover una disfunción endotelial induciendo a un incremento en la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) y la molécula de adhesión vascular (VCAM1), además de estimular la producción de citosinas e interleucinas pro-inflamatorias. (Zeljko R., 2017) (Vergés, B., 2015) (Subashini C., 2016).

En estados de dislipidemia diabética como el que presenta el grupo DL+HG donde los pacientes presentaron una concentración de 156 mg/dL de LDL, estando en el borde alto de los valores designados por la ATP III (130-159 mg/dL). Este tipo de pacientes es fuertemente asociado con resistencia a insulina en primera instancia fomentando una mayor síntesis de VLDL. Los niveles hiperglucémicos como lo han demostrado Soran et al., fomentan la glicación de la principal apolipoproteína (Apo B-100) y se vuelven menos afines al reconocimiento con su receptor,



incrementando con ello el tiempo de estancia en plasma, estas desregulaciones aunadas a las descritas para los grupos anteriores incrementan el riesgo aterogénico, ante los probables cambios cualitativos para LDL. (Nikolic D. et al 2013) (Verges B., 2009)(Soran H. et al., 2011),

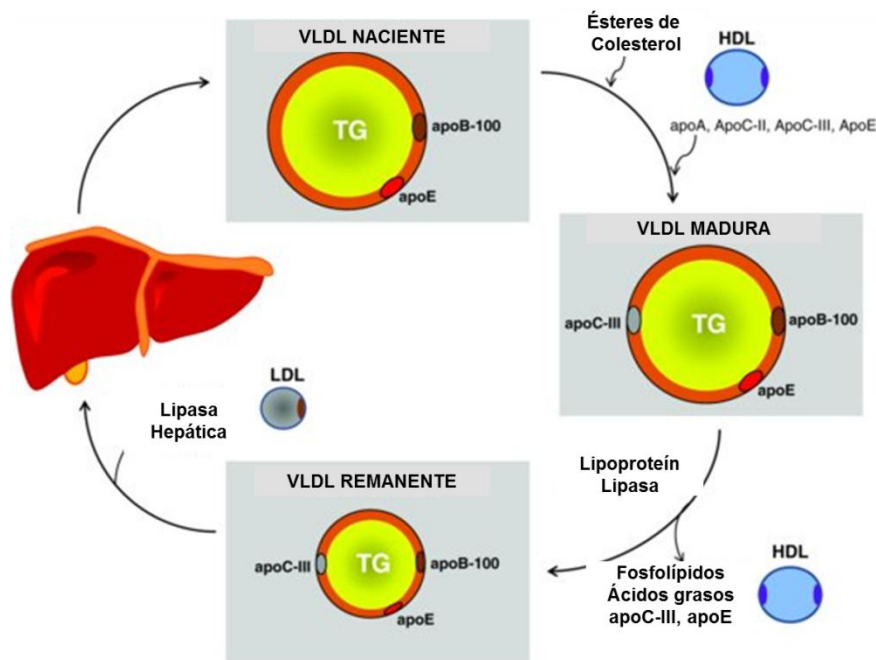
Para el estudio específico de las lipoproteínas, las cuales poseen sub-fracciones de características de peso, tamaño y composición, fue utilizada una técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida tri-zonal de tamaño de poro diferencial, el cual identifica las partículas pre-beta (VLDL), beta (LDL) y alfa (HDL). Esta técnica previamente descrita por Bautovich et al., en 1973 fue usada para la identificación de las subfracciones que comprenden cada una de las zonas antes descritas. (Bautovich G.J. et al., 1973) (Frings C.S. et al., 1971).

En la zona pre-beta, se ha descrito la presencia de dos subpoblaciones mayoritarias con esta técnica, las cuales corresponden a VLDL<sub>1</sub> y VLDL<sub>2</sub>, como se mencionó anteriormente esta técnica permite separar a las partículas de acuerdo a su tamaño, y en este sentido se reconocen a las VLDL<sub>1</sub> como las subfracciones grandes e inmaduras, con un contenido mayoritario en triglicéridos; mientras que las VLDL<sub>2</sub> son reconocidas con un menor tamaño, una maduración hepática idónea y proporciones correspondientes o “normales” en su contenido de TG y colesterol. En las rutas lipogénicas, se reconoce la importancia de VLDL<sub>1</sub> por el incremento en su síntesis como respuesta a la elevación de triglicéridos hepáticos, no así para las VLDL<sub>2</sub>, sin embargo, esta subfracción es asociada a LDL de características y composición normal. La síntesis de las subfracciones VLDL tiene lugar en los hepatocitos siendo la lipidación de su principal apolipoproteína (Apo-B100) el primer paso, esto se lleva a cabo en el retículo endoplasmático y la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP) es la encargada de este proceso, posteriormente estas VLDL nacientes son transportadas al aparato de Golgi mediante vesículas transportadoras de proteínas (PTV'S) para enriquecer el contenido lipídico en el núcleo de la lipoproteína. Así mismo, la síntesis de VLDL tiene mecanismos regulatorios, por una parte insulina la cual tiene un efecto negativo ya que puede inhibir la síntesis de MTP y aumentar la degradación de

Apo B estos mecanismos inhibitorios se ven disminuidos en estados de resistencia insulínica favoreciendo la hipertrigliceridemia según Gill et al., 2004, otro de los mecanismos limitantes en la síntesis de VLDL es la disponibilidad de TG que son provenientes de: **a)** flujo de AGL como producto de la lipólisis en tejido adiposo, **b)** *novo* síntesis hepática y **c)** retorno de quilomicrones remanentes. (Johansen R.F. et al, 2016) (Gill J.M et al, 2004) (Prillo A. et al, 2014)

En este sentido, en el análisis de los corrimientos electroforéticos fue posible observar como en los grupos dislipidémicos (DL+NG y DL+HG) el incremento de la fracción VLDL<sub>1</sub> fue significativo en comparación al grupo NL+NG coincidiendo con lo reportado por Sparks et al., en 2012 quienes demuestran como en pacientes con hipertrigliceridemia, existe una mayor distribución hacia esta subfracción siendo esta su principal transportadora, la resistencia a insulina, el sobre flujo de AGL hacia hígado y el incremento en la *novo* síntesis hepática son los principales mecanismos de este incremento, por otra parte Johansen et al., en 2016 mencionan que la fracción VLDL<sub>2</sub> no se ve igualmente alterada en estados de hipertrigliceridemia ya que el sobre flujo de TG ocurre principalmente en las VLDL largas, además de que el catabolismo de las VLDL<sub>2</sub> está regulado por LPL y LH mientras que las VLDL<sub>1</sub> solo por LPL.(Sparks J.D et al, 2012) (Johansen R.F. et al, 2016).

Como parte de su metabolismo las VLDL en plasma intercambian lípidos y proteínas, las VLDL nacientes constituidas principalmente por Apo B-100 y Apo E llegan a plasma y como parte de su maduración tiene una constante interacción con las HDL que les cede Apo C (específicamente Apo C-II) siendo esta el principal sustrato para la interacción con LPL que hidroliza los triglicéridos contenidos formando VLDL remanentes que pueden unirse a receptores específicos en hepatocitos mediante el reconocimiento de Apo E y ser endocitadas o bien, pueden continuar su catabolismo por acción de LH perdiendo TG y dando paso a la formación de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que posteriormente darán paso mediante su catabolismo a la formación de LDL, este proceso se resume en la figura 9 .

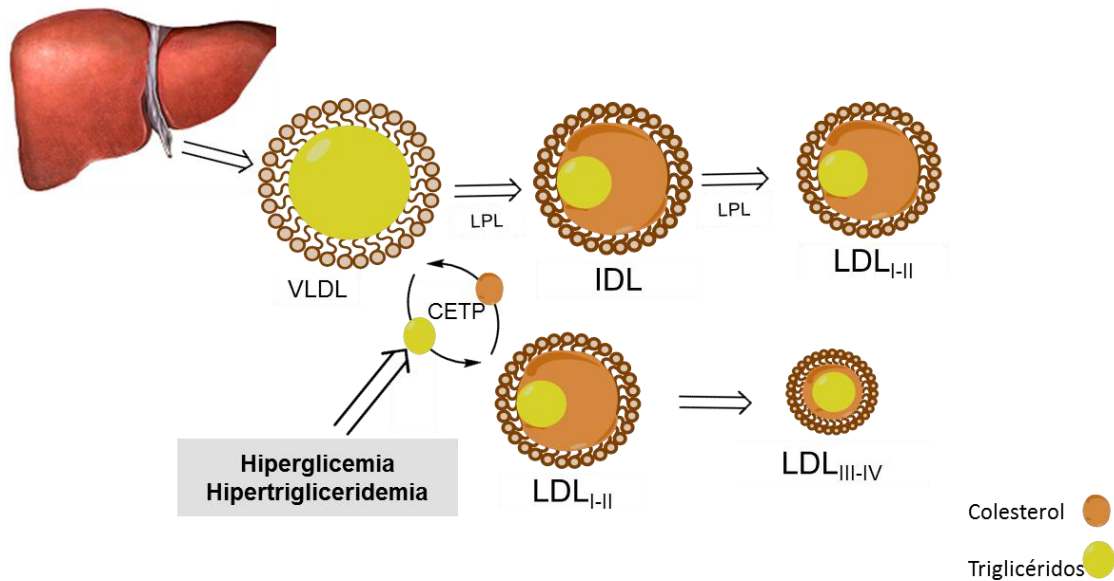


**Fig 9 . Metabolismo de VLDL.** El proceso comienza con la síntesis hepática, estas partículas contienen Apo-B100 y Apo E, el ensamble de estas implica la lipidación de Apo-B100, este paso es realizado por la proteína transferidora de triglicéridos. En plasma como parte del metabolismo de las VLDL estas son enriquecidas con ésteres de colesterol y apolipoproteínas provenientes del catabolismo de las HDL. En circulación el contacto con la lipoproteín lipasa y Apo CII resulta en la deslipidación de VLDL y la formación de VLDL remanentes que son ricas en Apo-B100 y Apo E cuyo destino es ser tomadas por su receptor hepático para la degradación o continuar su deslipidación principalmente por lipasa hepática formando las partículas ricas en Apo-B100 como IDL y posteriormente LDL. (Modificado de Wang et al., 2013)

Como lo mencionan Adiels et al., en 2008 el hígado tiene la capacidad de secretar pequeñas partículas de IDL y LDL, sin embargo, la mayor aportación de estas proviene del catabolismo de las VLDL, destacando que la regulación sobre la producción y el aclaramiento de estas es determinante en la distribución de las subfracciones de LDL. Packard et al., en 2000 estudió el comportamiento de las subfracciones VLDL para la formación de LDL encontrando que un incremento de las VLDL<sub>1</sub> es un factor importante en el incremento de las fracciones cortas de LDL (LDL<sub>III</sub> – LDL<sub>IV</sub>) por la interacción de CETP y el tiempo de aclaramiento. (Adiels M. et al., 2008) (Packard C.J. et al., 2000).

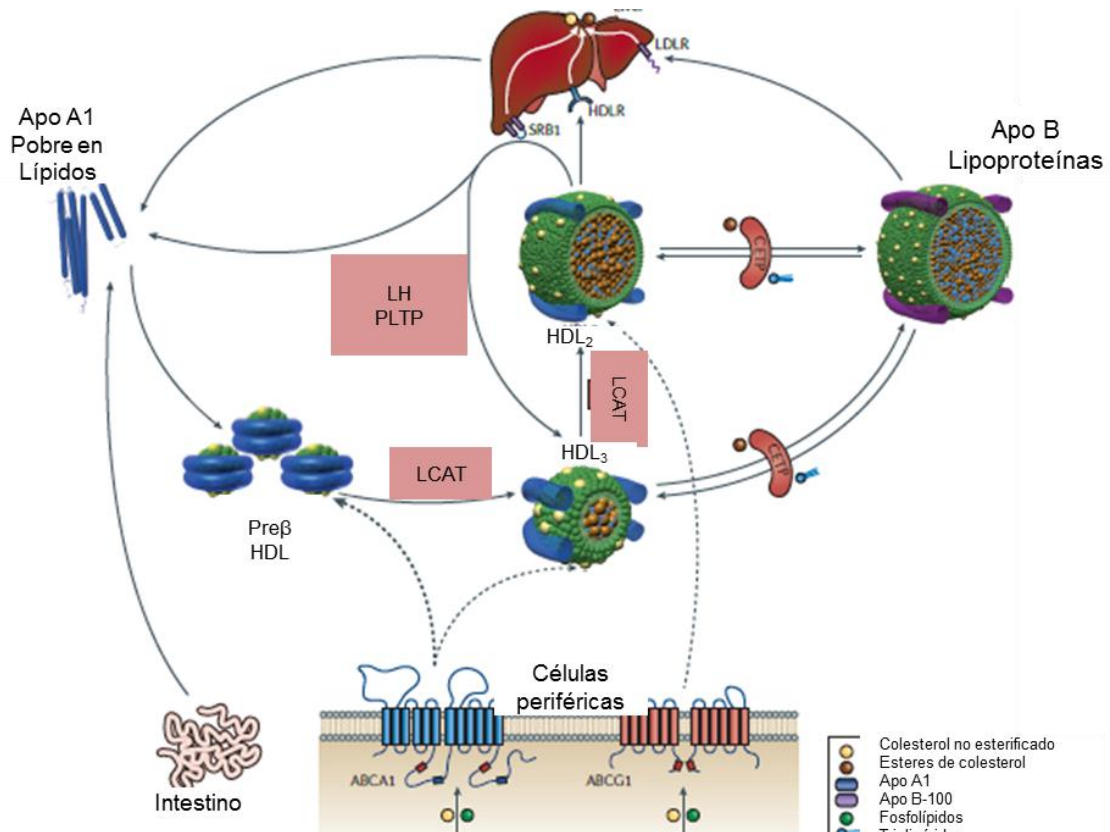
En los resultados de los corrimientos electroforéticos observamos como los grupos DL+NG y DL+HG que presentaron un incremento significativo en la fracción VLDL<sub>1</sub> en comparación a NL+NG existiendo una tendencia con incremento de las fracciones cortas de LDL, siendo significativa para el grupo DL+NG la fracción LDL<sub>IVA</sub> y para DL+HG las fracciones LDL<sub>IVA</sub> y LDL<sub>IVB</sub>, estos resultados concuerdan con los reportados por Gardner et al., en 1996 que describen un incremento de las fracciones cortas (LDL<sub>III</sub> – LDL<sub>IV</sub>) en conjunto con una elevación de TG y una disminución de HDL. (Gardner D et al., 1996).

Si bien el contenido lipídico de LDL está caracterizado por la presencia de ésteres de colesterol esto es característico de las fracciones largas (LDL<sub>I</sub> – LDL<sub>II</sub>). En 2013 Nikolic et al., muestran como en pacientes con alteraciones en glucosa e hipertrigliceridemia las fracciones cortas son enriquecidas de triglicéridos esto como respuesta a un incremento en la actividad de CETP, este cambio de contenido las convierte en moléculas aterogénicas por distintos mecanismos, esto se resume en la figura 10 ; una disminución en el reconocimiento con su receptor (LDL-R) y por lo tanto un aclaramiento plasmático disminuido prolongando su permanencia en plasma, una mayor facilidad para llegar a la matriz sub-endotelial y adherirse siendo activadoras de macrófagos y finalmente siendo mayormente susceptibles a modificaciones como la oxidación y glicación incrementando así su reconocimiento por macrófagos. (Nikolic D. et al., 2013) (Cobble M. et al, 2014)



**Fig 10. Metabolismo de LDL.** En el catabolismo de las VLDL mediante la acción de la enzima lipoproteín lipasa se da paso a la formación de IDL y posteriormente a las LDL, las cuales de acuerdo al tamaño se han reconocido distintas subfracciones siendo las LDL<sub>I-II</sub> ricas en colesterol. En estados de hiperglucemia e hipertrigliceridemia el incremento de las VLDL y el incremento en la actividad de CETP favorece la interacción con las LDL, con un intercambio lipídico que lleva a la formación de fracciones cortas LDL ricas en triglicéridos.

Como se mencionó anteriormente las HDL forman parte importante del metabolismo de las VLDL por su intercambio lipídico y de apolipoproteínas, en este sentido se reconocen a las fracciones largas y maduras de HDL (HDL<sub>IIA</sub> y HDL<sub>IIB</sub>) en este intercambio mediante CETP, este mecanismo se sintetiza en la figura 11. La zona alfa presenta 5 subpoblaciones; HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HD<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> y si bien una de las principales funciones de HDL es descrita como ateroprotectiva estudios epidemiológicos han demostrado que bajo ciertas alteraciones metabólicas las subfracciones HDL no son igualmente ateroprotectoras (Tian L. et al, 2011) (Katz L.S et al, 2010).

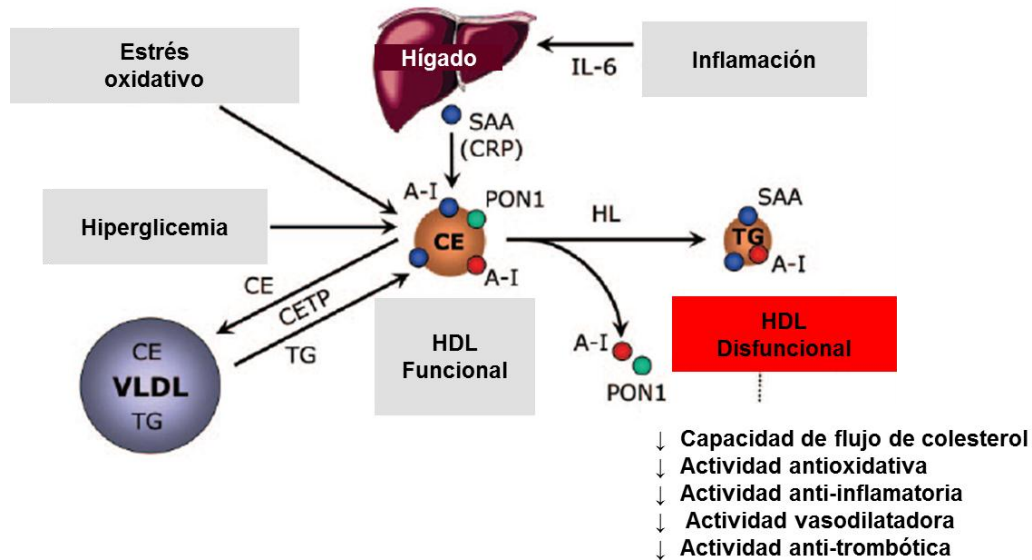


**Fig 11. Metabolismo de HDL.** Apo A-I es secretada desde hígado e intestino y su asociación con fosfolípidos y coolesterol libre da paso a la formación de las HDL discoidales que mediante su interacción con el transportador de unión ATP tipo A1 (ABCA1) adquieren mas fosfolípidos y coolesterol libre provenientes de las células periféricas. La enzima LCAT esterifica el coolesterol libre formando ésteres de coolesterol que es llevado al núcleo de la partícula discoidal, dando paso la formación de pequeñas HDL esféricas (HDL<sub>3</sub>). La interacción de estas pequeñas HDL con las células periféricas y su enriquecimiento en coolesterol da paso a la formación de las fracciones largas de HDL (HDL<sub>2</sub>) que por la acción de CETP realizan un intercambio lipídico con las lipoproteínas ricas en Apo B. CETP y el intercambio lipídico contribuyen a la generación de las pequeñas HDL hacia las partículas HDL largas. Tomado y modificado de (Kingwell A. et al., 2014)

Nuestros resultados en la distribución de las subfracciones para la zona alfa en el grupo NL+HG no mostraron diferencia significativa respecto al grupo NL+NG coincidiendo con lo reportado en 2011 por Tanaka et al., que sin encontrar cambios significativos con grupos normo-glicémicos de las fracciones HDL<sub>2</sub> mostraron una tendencia hacia la disminución. Por otra parte los grupos dislipidemicos; DL+NG y DL+HG mostraron un incremento significativo hacia las fracciones cortas (HDL<sub>3</sub>). El intercambio lipídico con VLDL así como las modificaciones de glicación y oxidación son los mecanismos principales asociados a este fenotipo que conlleva a disminuir sus funciones, donde las actividades antiinflamatorias, antioxidativas, antitrombóticas así como el transporte reverso de colesterol se ven afectadas, proceso descrito en la figura 11. Diversos estudios sugieren que los niveles de las subpoblaciones HDL con un mejor predictor de enfermedades coronarias que la concentración total de HDL, Zeljkovic A en 2009 menciona que los niveles de HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> están asociados con el incremento de riesgo isquémico. (Krauss M.R, 2004) (Zeljovic A. et al, 2009)

Asztalos et al en 2004 mencionan que en pacientes con alteraciones cardiovasculares existe una disminución de las fracciones grandes (HDL<sub>II</sub>) y una mayor distribución hacia las de menor tamaño (HDL<sub>3</sub>) asociando estados de hipertrigliceridemia y resistencia a insulina que generan HDL ricas en triglicéridos, que serán tomadas por LH quien formará HDL pequeñas y densas pobres en Apo-A1 la cuál será tomada por riñón. (Asztalos F.B. et al, 2004).

Así mismo Tabara et al., en 2017 han demostrado una relación inversa en el desarrollo de estados de resistencia a insulina con las HDL de tipo largas y no así para las HDL cortas, y esto es explicado por la fuerte asociación de triglicéridos con las HDL<sub>II</sub> que pueden ser convertidas en HDL<sub>3</sub> mediante el intercambio de triglicéridos y colesterol con las VLDL. (Tabara Y. et al., 2017).



**Fig . Metabolismo disfuncional y actividades biológicas deficientes de HDL en enfermedades metabólicas.** Una inflamación crónica característica de enfermedades metabólicas como diabetes y síndrome metabólico son asociadas con un incremento en plasma de las interleucina de tipo 6 y como resultado el hígado produce amiloide sérica A (SAA) la cual sustituye a Apo A1 y una paraoxonasa (PON). Estrés oxidativo, hiperglicemia y un incremento en la actividad de CETP son moduladores importantes de la función de HDL. Estrés oxidativo modifica aminoácidos específicos de Apo A1, hiperglicemia resulta en la glicación de Apo A1 y CETP intercambia colesterol y triglicéridos entre HDL y lipoproteínas ricas en triglicéridos y Apo B como las VLDL, generando HDL ricas en triglicéridos. Este enriquecimiento en TG incluye a cambios conformacionales en Apo A1 que la hace menos accesible a la interacción con otras lipoproteínas como las LDL y limitando su capacidad de eliminar lípidos oxidados de estas. Secundariamente la hidrólisis de HDL por lipasa hepática (HL) produce pequeñas y densas HDL ricas en TG y SAA que además llevan Apo A1 de incorrecta conformación, estas pequeñas HDL poseen actividades biológicas deficientes comparadas con HDL de composición normal. Tomado y modificado de (Kontush A. et al., 2006).



Si bien la presencia de las subfracciones pequeñas y densas son parte de los procesos de maduración hacia lipoproteínas grandes y funcionales, como se describió anteriormente estas partículas pueden cambiar su fenotipo siendo enriquecidas de triglicéridos en estados de hiperglicemia y dislipidemia. Dado que en las técnicas de rutina en el laboratorio clínico se limitan a la cuantificación total de colesterol tanto HDL como LDL, sin tomar en cuenta las modificaciones antes mencionadas realizamos modificaciones a las técnicas estandarizadas para LDL-C y HDL-C para medir la concentración de triglicéridos e identificar la presencia de estas partículas pequeñas y densas.

En nuestros resultados fue posible observar como en los grupos de estudio; NL+DG. DL+NG y DL+HG particularmente el contenido de triglicéridos en HDL se vio incrementado respecto a los pacientes normolipídicos normoglucémicos, siendo que en una relación porcentual el contenido fue mayor a lo referenciado (8%) de esta forma evidenciando la presencia de las HDL pequeñas y densas ricas en triglicéridos. De forma similar el contenido de triglicéridos se vio incrementado siendo mayor a lo referenciado para LDL (11 %) en los grupos DL+NG y DL+HG lo que nos confirma el incremento de las fracciones cortas y densas corroborando lo observado anteriormente en los corrimientos electroforéticos.

Si bien existen técnicas estandarizadas tales como la ultracentrifugación y la resonancia magnética nuclear para la cuantificación de las subfracciones de lipoproteínas, los altos costos y su elaborado proceso ha llevado a la búsqueda de técnicas mucho más accesibles para laboratorios de rutina. Hirano et al., en 2003 mediante la combinación de agentes precipitantes lograron la identificación de LDL cortas y densas, corroborando su técnica con electroforesis en gel de poli(acrilamida). (Hirano T. et al., 2003)

Los resultados que obtenidos mediante la técnica modificada comparados con los de los corrimientos electroforéticos nos confirman la presencia de partículas LDL y HDL pequeñas y densas enriquecidas de triglicéridos que como se describió

anteriormente tienen una relación positiva en el desarrollo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares perdiendo sus actividades biológicas principales.

Así bajos niveles de HDL que son asociados a un incremento en el riesgo del desarrollo de patologías cardiovasculares, altas concentraciones de HDL no son signo de ateroprotección y esto está en relación a la presencia de un conjunto de subfracciones que bajo alteraciones metabólicas como DM, resistencia a insulina y dislipidemia se ven modificadas en su composición, así finalmente disminuyendo sus funciones anti-aterogénicas, anti-trombóticas y anti-inflamatorias.

## 10. Conclusiones.

- Mediante el análisis sérico de lípidos y carbohidratos, se establecieron 3 grupos comprometidos metabólicamente, un grupo de bajo riesgo NL+HG, de riesgo intermedio DL+NG y uno de alto riesgo DL+HG.
- El riesgo metabólico en condiciones de dislipidemia genera fenotipos aterogénicos y condicionantes al desarrollo de lipotoxicidad, caracterizado por el incremento de las subfracciones LDL IV<sub>A-B</sub> y la disminución de las subfracciones de HDL 2<sub>a-b</sub> con incremento de 3<sub>a-c</sub>.
- La fracción HDL en todos los grupos de riesgo metabólico mostró incremento en el transporte de triglicéridos acrecentando el riesgo metabólico de los pacientes. Mientras que el incremento de triglicéridos en LDL sólo se presentó en los grupos con dislipidemia lo cual implica un mayor riesgo aterogénico y pro-inflamatorio.
- La técnica propuesta para la cuantificación de triglicéridos en las fracciones lipoproteicas LDL y HDL, mostró una relación consistente con las subfracciones del electroferograma, además de que puede ser realizada bajo las mismas condiciones que la cuantificación del colesterol, sin implicar costo extra de inversión y equipamiento; sin embargo, debe realizarse la validación del método para establecer su valor diagnóstico.

## 11. Bibliografía

- Abumrad A. N. (2012). Role of the Gut in Lipid Homeostasis. *Physiol Rev*; 92 (3): 1061–1085
- ADA (2014). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes, mellitus. *Diabetes Care*; 37 (Suppl. 1): S81–S90
- Alkhoury N (2009) Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are Created Equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*; 3(4): 445–451
- Arner P. (2005) Human fat cell lipolysis: Biochemistry, regulation and clinical role. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*; 19 (4); 471–482
- Avogaro P. (1992) Relationship of triglycerides and HDL cholesterol in hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*; 92: 79-86
- Azatalos F.B. (2004) High-Density Lipoprotein Subpopulation Profile and Coronary Heart Disease Prevalence in Male Participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ; 24: 2181-2187
- Bachorik S. P. (1995). Recommendations for Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. *CLIN. CHEM.* 41(10), 1414-1420
- Bauer R. (2004) Principles of Physiology of Lipid Digestion. *J. Anim. Sci*; 18 (2): 282-295
- Bays H.E. (2008) Is adiposopathy (sick fat) an endocrine disease?. *J. Clin Pract*; 62 (10): 1474-1483
- Bays H.E. (2011). Adiposopathy Is “Sick Fat” a Cardiovascular Disease?. *Journal of the American College of Cardiology*; 57 (25) 2462-2473

- Bechmann L.P. (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver disease. *Journal of Hepatology*. 56: 952-964
- Bierman E. (1973) Hyperlipidemia in Coronary Heart Disease. *The Journal of Clinical Investigation*; 52 :.1544-1568
- Bitzur R. (2009) Triglycerides and HDL Cholesterol. *DIABETES CARE*; 32 (2):s373-s377
- Blanche J. (1981) Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 665:408-419.
- Briones R. (1986) Sterol excretion and cholesterol absorption in diabetics and nondiabetics with and without hyperlipidemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 44: 353-361
- Brown S. (1997) The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell*; 89: 331–340,
- Castro. S. L (2015). Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, *Revista Médica Clínica Los Condes*; 26 (5): 600-12
- Colletti A. (2016) Retargeting the management of hypercholesterolemia – focus on evolocumab. *Ther Clin Risk Manag*; 12: 1365–1376.
- DeFronzo RA. (2007) Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care*; 30 (3) : 753-9ada
- Diffenderfer R. (2014). The composition and metabolism of large and small LDL. *Opin Lipidol* 25:221-226
- Dixit K.A. (2014) The prevalence of dyslipidemia in patients with diabetes mellitus of ayurveda Hospital. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*; 13:58
- Duell P.B. (1991) Potential role of insulin in the clearance of remnant lipoproteins in dysbetalipoproteinaemia. *Journal of Internal Medicine*; 229: 97-101

- Duncan E. (2007) Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu Rev Nutr*; 27: 79–101.
- Errico T. L. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clin Invest Arterioscl.* ;25 (2):98-103
- ENSANUT (2012). Encuesta Nacional de Salud, Resultados Nacionales. México DF: Instituto Nacional de Salud.
- Federación Internacional de Diabetes (2006). El Síndrome Metabólico. Bélgica; 51
- Ferratti G. (2006) Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis*; 184:1–7
- Fridewald W.T(1972) Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma ,Without Use of the Preparative Ultracentrifuge.*CLINICAL CHEMISTRY*; 18(6).
- Genest J. (2013) HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol*: 1-18
- Glueck J.C. (2009) Insulin Resistance and Triglycerides. *Journal of Investigative Medicine*; 57 (8): 874-881.
- Greenspan P. (1995) Advances in agarose gel electrophoresis of serum lipoproteins. *J Chromatogr A*; 698 (1-2):333-9.
- Grundy S.M. (2004) Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines.*Circulation*; 110(2):227-39.
- Goldberg J. (2001) Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 86 (3): 965-971

- Gofman W. (1954) Ischemic Heart Disease, Atherosclerosis, and Longevity. *Circulation*; 34:679-697
- Gómez G. J. A. (2012). Can apolipoprotein B be used for making decisions on cardiovascular risk prevention in patients with raised triglycerides?. *Revista del Laboratorio Clínico*.5:104-10
- Gylling H. (2010). Insulin sensitivity regulates cholesterol metabolism to a greater extent than obesity: lessons from the METSIM Study. *Journal of Lipid Research*; 51: 2422-2427
- Haugen F. (2007). The interplay between nutrients and the adipose tissue. *Nutrition Society*; 66: 171–182
- Hernández A. M. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública Mex*; 55(2) 129-136
- Hendrani A.D. (2016) Dyslipidemia management in primary prevention of cardiovascular disease: Current guidelines and strategies; 8(2): 201-10
- INSP (2010) Instituto Nacional de Salud Pública. Enfermedades Cardíacas, primera causa de muerte en México. México. Disponible en: <https://www.insp.mx/noticias/nutricion-y-salud/1372-enfermedades-cardiacas-primera-causa-de-muerthtml-en-mexico>.
- Itoh Y. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic b cells through GPR40. *Nature*; 422: 173-176
- Iqbal J. (2009) Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*; 296 (6): 1183-1194

- Jairam (2012) "Lipoproteins - Role in Health and Diseases" En: Frank Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. ISBN
- Jellinger S.P. (2012) American Association of Clinical Endocrinologists Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis.: 18 (Suppl 1)
- Jhones J.H.P (2012) Lipids, Sterols and Their Metabolites. En: Modern Nutrition in Health and Disease. 11<sup>th</sup> Edition Wolters Luwer.
- Johansen F. (2016) Basal and insulin-regulated VLDL1 and VLDL2 kinetics in men with type 2 diabetes. Diabetología 59: 833-843.
- Jung J. U. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int. J. Mol. Sci.15, 6184-6223
- Kabashima T. (2002) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated. Proceedings of the National Academy of Science. 100(9):5107-12
- Keim L. N. (2012) Carbohydrates. En: Modern Nutrition in Health and Disease. 11<sup>th</sup> Edition Wolters Luwer.
- Kersten S. (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. EMBO reports; 21(41) : 282-286
- Kido T. (2001).Lipoprotein analysis using agarose gel electrophoresis and differential staining of lipids. J Atheroscler Throm;8(1):7-13.



- Kingwell A. (2014) HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. Advance online publication.
- Klafke J.Z. (2015) Association between hypertriglyceridemia and protein oxidation and proinflammatory markers in normocholesterolemic and hypercholesterolemic individuals. *Clinica Chimica Acta* 448: 50–57
- Kontush A. (2006) Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 58:342–374
- Kontush A. (2010) Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Opin Lipidol* 21:312–318
- Laffitte B. (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *PNAS*; 100 (9): 5419–5424
- Levy S. T. (2015) Desnutrición y Obesidad doble carga en México. *Revista Digital Universitaria*; 16 (5). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art34/#>
- Lu. M. (2014). Aggregation and fusion of low-density lipoproteins in vivo and in vitro. *Biomol Concepts*; 4(5): 501–518.
- Mata P. (2015). Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia in Spain: Consensus document. *Atención Primaria*; 47 (1): 55-56
- Menendez A. (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature in Cancer*; (7) 763-777

- Miao J. (2015) The Role of Insulin in the Regulation of PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 35(7): 1589–1596
- Miettinen A.T. (2000) Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis*; 153: 241–248
- Mitro N. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*; 445:219-223
- Mooradian A.D. (2009) Obesity-related Changes in High-density Lipoprotein Metabolism. *Obesity*; 16: 1152–1160
- Myers G. (2009). Clinical issues in cholesterol testing. *J Med Assoc Ga* ;80:301–3.
- Nakajima K. (2014). Remnant Lipoproteins: A Subfraction of Plasma Triglyceride-Rich Lipoproteins Associated with Postprandial Hyperlipidemia *Clinical & Experimental thrombosis and hemostasis*; 1(2):45-53
- Nerurkar SV (1983) Lipid composition of plasma lipoproteins in treated diabetics. *Journal of Postgraduate Medicine*; 29 (4) : 201-211
- Nikolic D. (2013) Lipoprotein Subfractions in Metabolic Syndrome and Obesity: Clinical Significance and Therapeutic Approaches. *Nutrients*; 5, 928-948
- OMS (2016) Organización Mundial de la Salud. *Obesidad y Sobrepeso. Nota descriptiva N° 311*
- Pérez A. (2008) Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac Méd Méx.*; 144 (6): 535-542

- Pérez G. Y. (2007). Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*; 38 (1) 3-11
- Philip E. (2012). Minireview: Glucagon in the Pathogenesis of Hypoglycemia and Hyperglycemia in Diabetes. *Endocrinology*; 153(3):1039–1048
- Pirillo A. (2013) High-Density Lipoprotein Subfractions-What the Clinicians Need to Know. *Cardiology*; 124:116-125.
- Proenca A.R.G. (2014) New concepts in white adipose tissue physiology. *Journal of Medical and Biological Research*; 47(3): 192-205
- Rajman I. (1999) LDL particle size: an important drug target?. *J Clin Pharmacol*, 48, 125–133
- Randolph J. G. (2014) Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest*; 124 (3): 929-935
- Rashid S. (2003) Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clinical Biochemistry* 36 (2003) 421–429
- Rosei A. E. (2016). Management of Hypercholesterolemia, Appropriateness of Therapeutic Approaches and New Drugs in Patients with High Cardiovascular Risk. *High Blood Press Cardiovasc*; 23(3): 217–230.
- Rosenson S. (2011). HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. *Clinical Chemistry*; 57 (3): 392-410.

- Rui. L. (2014) Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*; 4(1) 177-197).
- Sanders W.B. (2016) De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*; 97: 452-468.
- Simonen P. (2007) The validity of serum squalene and non-cholesterol sterols as surrogate markers of cholesterol synthesis and absorption in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*; 197:883–888
- Soh J. (2011) Lipids and Dyslipoproteinemia. In: J Bernard Henry. *Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods*. 22th Edition WB Saunders Company Philadelphia
- Takisnen M.R. (2002) Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*; 46:733–749
- Tarino-Siri (2010) Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients. *Curr Atheroscler Rep*; 12:384–390
- Taube A. (2008) Role of lipid-derived mediators in skeletal muscle insulin resistance. *J. Physiol Endocrinol Metab* 297: E1004–E1012
- Tchernof A. (1996) The Dense LDL Phenotype. *Diabetes Care.* ; 19 (6): 629-637
- Tian L. (2011). The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids in Health and Disease*; 10:17
- Verges B. (2015) Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*; 58:886–899

- Verma K. M. (2014) Integrated analysis of chronic lipotoxicity on muscle metabolism and stress and its reversal by antioxidants. SpringerPlus; 3:251
- Veziņa C.A. (1988). Apolipoprotein distribution in human lipoproteins separated by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Journal of Lipid Research; 29: 573-585
- Warnick R. G. (2006). Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis of Lipoprotein Subclasses. 2006; 26 (4): 803-846.
- Williams J. K. (2008). Molecular processes that handle-and mishandle-dietary lipids. The Journal of Clinical Investigation; 118 (10): 3247-3259
- Williams P. T. (2003) Smallest LDL Particles Are Most Strongly Related to Coronary Disease Progression in Men. Arterioscler Thromb Vasc Biol;23:314-321
- Wolska A. (2017) Lipoprotein Subfractionation Analysis. Clinical Laboratory News.
- Zhang Y. (2012) Liver LXR $\alpha$  expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. The Journal of Clinical Investigation; 122(5): 1688-1699

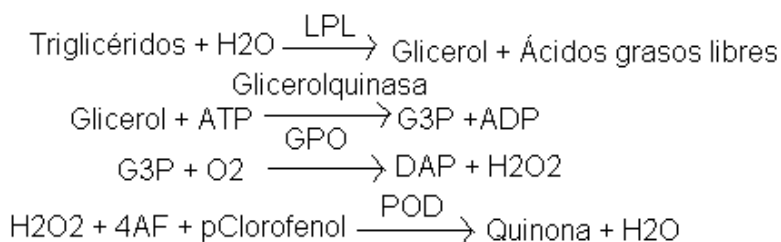
## 12. Anexos

### ANEXO 1

Determinación de la concentración de triglicéridos.

#### Fundamento

La determinación sérica de triglicéridos corresponde a una reacción enzimática la cual es evaluada por espectrofotometría. Los triglicéridos de la muestra interaccionan con una lipasa, obteniendo glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol reacciona con ATP del reactivo generando glicerol-3-fosfato y ADP. Posteriormente el glicerol-3-fosfato se oxida obteniendo dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno quienes reaccionan con una peroxidasa. El resultado es un compuesto colorimétrico de quinonaimina que es medido a una longitud de onda de 505 nm.



#### Método (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

1. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

2. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
3. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

## **CALCULOS.**

La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

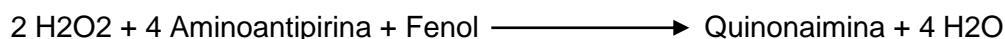
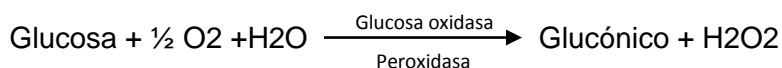
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

## Anexo 2

### Determinación de la concentración de glucosa sérica

#### Fundamento

La glucosa presente en la muestra reacciona con la enzima glucosa oxidasa, dando como resultado ácido glucónico y peróxido de hidrógeno el cual es detectado por un aceptor cromogénico en presencia de una peroxidasa. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa, el cual es medido por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.



#### Método (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa)

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patron (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 hrs.



### **Cálculos.**

La concentración de glucosa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

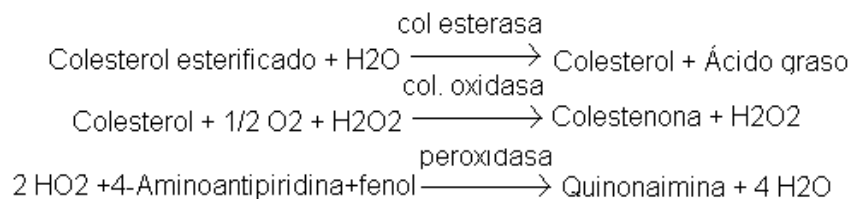
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

### Anexo 3

#### Determinación de Colesterol LDL reactivo precipitante

##### Fundamento

Las lipoproteínas no LDL presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil. El colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación



1.- Pipetear en un tubo

Muestra     0.4ml  
Reactivo    0.2 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	20 µL		
Patrón colesterol (S)		20 µL	
Sobrenadante muestra			20 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

### **Cálculos**

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente formula.

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ Sobrenadante}$$

## Anexo 4

### Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante

#### Fundamento

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las de baja densidad (LDL) presentes en la muestra se hacen precipitar con fosfotungstato en presencia de iones de magnesio. Después de la centrifugación el sobrenadante que contiene las HDL es cuantificado por método espectrofotométrico al hacerlo reaccionar con el reactivo de colesterol que contiene enzimas, como colesterol esterasa que hidrata el colesterol dando como resultados colesterol y ácidos grasos libres, posteriormente colesterol oxidasa favorece una semioxidación e hidratación que da como resultado una colestona y peróxido de hidrógeno y finalmente una peroxidasa arroja un compuesto coloreado de quinonaimina detectado a 505 nm.

#### Método

##### Precipitación

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	0.2 ML
Reactivo (COL HDL)	0.5 ml
	0.6

2.- Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 20 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

##### Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	100 µL		
Patrón colesterol hdl (S)		100 µL	
Sobrenadante muestra			100 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 30 min. a temperatura ambiente o durante 10 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

### **Cálculos**

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

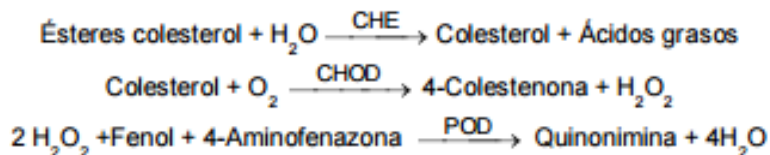
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de muestra} = C \text{ Muestra}$$

## Anexo 5

### Determinación de Colesterol total

#### Fundamento

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la siguiente reacción:



#### Método

1. Ajustar el espectrofotómetro a 505nm
2. Pipetear en cada cubeta

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Reactivo de colesterol (ml)	1.0	1.0	1.0
Patrón (ul)		10	
Muestra (ul)			10

3. Mezclar e incubar 5 min a 37°C o 10 min a 15-25°C
4. Leer la absorbancia (A) del patrón u la muestra, frente al blanco de reactivo.  
El color es estable como mínimo 60 minutos.

#### Cálculos

$$\frac{A \text{ muestra} \times C. \text{ del patrón}}{A \text{ patrón}} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

## Anexo 6

### Determinación de Ácidos grasos libres

#### **Reactivos**

- Cloroformo
- Reactivo de cobre: Consiste en  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/litro (135,0 g/litro). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina, y diluir a 1 litro con agua destilada.
- Reactivo cuprizona. Este consiste de ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver el cuprizone en 10 ml de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 litro. esta solución es estable durante al menos tres meses a temperatura ambiente.
- Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

#### **Procedimiento**

1. Añadir 50  $\mu\text{L}$  de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50  $\mu\text{l}$  de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100  $\mu\text{l}$  de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos de añadir 150  $\mu\text{l}$  de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensaye cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500  $\mu\text{l}$  de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450  $\mu\text{l}$  de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50  $\mu\text{l}$  de solución de amoníaco, tapar y agite suavemente.

11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 mm después de agitar con la solución de amoníaco.

Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

### **Cálculos**

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

Concentración en mg/dl = (Abs muestra / Abs estándar) x 8.6 mg/dl



## Anexo 7

Separación de lipoproteínas plasmáticas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Frings. C. S. Foster, L. B. y Cohen, P. S. Clin, Chem, 17.111.1971

### **Fundamento**

Separación de las lipoproteínas dependiente de la movilidad electroforética y del tamaño de las partículas. La resolución electroforética de las muestras pre teñidas con sudan Negro, se efectúa en un sistema discontinuo de pH en tres geles de concentración.

Reactivos:

#### 1. Tris-N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED)

Disolver 36.6 g de tris y 0.23 mL de TEMED en aproximadamente 100 mL de agua destilada. Añadir 48 mL de HCl 1N y diluir a 200 mL con agua destilada. La solución adquiere un pH de 8.9. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.

#### 2. Tris-TEMED

Disolver 5.98 g de tris y 0.46 mL de TEMED en agua. Añadir 48 mL de HCl 1 N y diluir a 100 mL con agua. Conservar en una botella ámbar, esta solución es estable durante 3 meses.

#### 3. Acrilamida Bisacrilamida

Disolver 15 g de acrilamida y 0.4 g de bisacrilamida en agua y completar a 100 mL. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, ésta solución es estable durante 3 meses.

#### 4. Sacarosa

Disolver 200 g de sacarosa en agua y diluir a 500 mL

#### 5. Persulfato de Amonio

Disolver 0.14g de persulfato amónico en agua y completar a 100 mL.  
Estable durante una semana a 4 °C en frasco ámbar

#### 6. Solución colorante

Añadir 250 mg de Negro Sudán a 30 mL de etanol absoluto. Mezclar bien.  
Diluir a 100 mL con agua. Conservar en un frasco ámbar. Estable 1 mes a temperatura ambiente.

#### 7. Gel inferior

Mezclar las soluciones 1, 3 y 7 a razón 1:1:2 (V/V). Preparar aproximadamente 1.2 mL por cada gel a separar.

#### 8. Gel medio

Mezclar las soluciones 2, 4, 7 y 6 a razón 1:2:1:4 (V/V), respectivamente.  
Conservar en frasco ámbar. Estable durante un mes a 4 °C.

#### 9. Gel superior

Añadir 8 volúmenes de gel medio a dos volúmenes de colorante, mezclar suavemente por inversión. Preparar este gel inmediatamente antes de su empleo.

#### 10. Solución tampón

Disolver 6 g de tris y 28.8 de glicina en aproximadamente 850 mL de agua. Si hace falta, ajustar el pH a 8.3 con tris o con glicina. Diluir con agua hasta 1 litro.

#### **Material:**

Equipo electroforético apto para usar tubos 7 X 75 mm

Densitómetro

**Procedimiento:**

1. Añadir 1 mL de gel inferior recientemente preparado a cada tubo. Añadir cuidadosamente suficiente agua a la parte alta del tubo para evitar la formación de un menisco cuando polimerice el gel. Completada la polimerización, invertir los tubos y secar sobre papel absorbente.
2. Añadir 0.1 mL de gel medio a cada tubo y recubrir cuidadosamente con agua, dejar polimerizar.
3. Completada la polimerización, invertir los tubos y secar sobre un papel absorbente.
4. Depositar 70  $\mu$ L de suero o plasma y 0.1 mL de gel superior en cada tubo.
5. Mezclar cada tubo por inversión y depositar una capa de tampón.
6. Disponer los tubos en la cámara electroforética.
7. Añadir alrededor de 200 mL a los compartimientos superior e inferior de la cámara respectivamente.
8. Dejar efectuar la migración electroforética durante 35 minutos 5mA por tubo de gel.

## Anexo 8

### Determinación de triglicéridos en HDL

#### Fundamento

Si bien las lipoproteínas HDL son caracterizadas por un contenido de colesterol, un porcentaje en su contenido es atribuible a triglicéridos, y el incremento en este tipo de contenidos vuelve disfuncionales a este tipo de lipoproteínas.

#### Procedimiento

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	200 µL
Reactivo (COL HDL)	25 µl

2.- Agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 20 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

#### Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	100 µL		
Patrón colesterol HDL (S)		100 µL	
Sobrenadante muestra			25 µL
Reactivo de triglicéridos(A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 5 min. a 37°C

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco.

#### Cálculos

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ de Triglicéridos en sobrenadante}$$

## Anexo 9

### Determinación de triglicéridos en LDL

#### **Fundamento**

En el contenido porcentual de las LDL el contenido de triglicéridos es minoritario, sin embargo en alteraciones metabólicas se ha descrito el enriquecimiento en triglicéridos en estas lipoproteínas, convirtiéndolas en partículas aterogénicas y disfuncionales. Las lipoproteínas no LDL presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil. Los triglicéridos se cuantifican espectrofotométricamente

#### **Procedimiento.**

Pipetear en un tubo

Muestra	0.4ml
Reactivo	0.2 ml

- 1.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.
- 3.- Recoger con cuidado el sobrenadante
- 4.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	20 µL		
Patrón colesterol (S)		20 µL	
Sobrenadante muestra			25 µL
Reactivo de triglicéridos(A)	1.0 mL	1.0 mL	1 mL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco.

### **Cálculos**

La concentración de triglicéridos en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente formula.

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ de Triglicéridos en Sobrenadante}$$