

**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

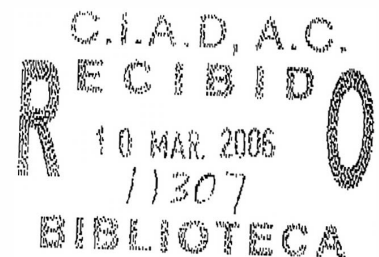
**EVALUACION DE LA RESPUESTA METABOLICA AL
COLESTEROL DIETARIO EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR**

Por

Martha Nydia Ballesteros Vasquez

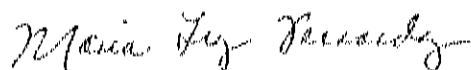
**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACION DE NUTRICION**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS**




APROBACION


Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Martha Nydia Ballesteros V. han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



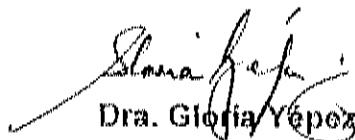
**Dra. María Luz Fernández
Directora de Tesis**



**Dra. Silvia Moya Camarena
Codirectora de Tesis**



Dra. María Isabel Ortega V.



Dra. Gloria Yépez



Dr. Mauro E. Valencia J.

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial ó total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de tesis.


Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

Invierno del 2005

Dedico este trabajo

A la Vida..... por que aún me dio chance

A fernando..... mi amoroso compañero en la vida

A mis Amores Viejitos...siempre estarán en mi corazón

*A la Familia que Dios me dio y a la que me dio
oportunidad de elegir..... por que son el núcleo que
sostiene mi pequeño universo*

*A los amigos..... les adeudó la ternura las palabras de
aliento y el abrazo. Los llevo en el alma*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y a lo que representa su esencia: investigadores, maestros, técnicos, estudiantes, compañeros y amigos, que juntos se esfuerzan cada día por hacer de esta institución un Centro de Educación de alta calidad.

Especialmente quiero darles las gracias al Dr. Juan Pedro Camou y a la Dra. Natalia González por su motivación en el inicio de esta meta, de igual manera a la Dra. Ana María Calderón de la Barca por apoyarme en la medida de sus posibilidades, también a Ana Isabel Escobedo y a Héctor Galindo por ser los cómplices más divertidos de todo este tiempo.

Mi agradecimiento al departamento de Nutrition Science en la Universidad de Connecticut por todo el apoyo brindado durante mi estancia en ese lugar. Especialmente a Ingrid Lofgren, Kristin L.Herron, Madhu Patalay, Tosea Zern, Kristin West y Dimple Aggarwal . a todos ellos muchas gracias por su ayuda y compañerismo

Mi reconocimiento, admiración, respeto y cariño a la Dra. María Luz Fernández, que la suerte quiso volver a cruzar en mi camino y que aceptó gustosa el reto de guiarme en esta área del conocimiento que tanto nos apasiona a las dos. Gracias por su paciencia y sabiduría y también por los momentos de solidaridad cuando las cosas no fueron bien.

Con infinito agradecimiento, respeto y mucha alegría convertida en cariño a la Dra. Silvia Moya, por ser parte importante en este trabajo y por ayudarme a develar una ventana del conocimiento que desconocía totalmente y que desde ya es y será parte de mi trabajo para siempre. Gracias por compartir sus conocimientos.

Con admiración y mucho cariño a la Dra. Gloria Yépez, por que 20 años no son nada ...y aún sigo aprendiendo a su lado, gracias por los tiempos compartidos, por los conocimientos nuevos que han sido un aire fresco para mí , por el gusto y el respeto al trabajo, pero sobre todo.....gracias por estar presente durante todo este tiempo.

Con una alegría confabulada de compartir una “sociedad” plerónica de cariño a la Dra. Ma. Isabel Ortega, quien tiene la virtud de motivarme a la discusión profunda de las cosas, lo mismo de ciencia, que de cualquier cosa de la vida....Gracias por tener siempre una palabra de aliento.

Con inmenso respeto, admiración y cariño al Dr. Mauro Valencia, quien ha sido mi Maestro a lo largo de muchos años. La Nutrición cobro sentido con sus clases y desde entonces como hasta ahora continúa compartiendo sus conocimientos con un entusiasmo que contagia. Gracias Mauro por tu ejemplo.

Mi agradecimiento incommensurable, cariño y afecto a la M.C. Rosa Ma Cabrera. Chaparrita para mí tu representas el alma de este trabajo (y no por chiquita) sino por hay muy pocos momentos de este trabajo en los que no estuviste presente trabajando incansable. Gracias por tus gestos de solidaridad y de cariño, cuando más lo necesite.

Con inmenso cariño, respeto y admiración a la M.S.P. Ma. del Socorro Sucedo (Coco) de quien siempre termine aprendiendo algo nuevo en el trabajo de campo. Gracias por formar parte importante del equipo, por tus aportaciones y también por hacer que en campo las cosas fluyan más tranquilamente.

A los hijos académicos: Pedro, Yezenia, Judith y Olivia

A todos los estudiantes y personas que se han cruzado en mi camino a través de los años y me han ayudado a aprender más de ellos que lo que ellos han aprendido de mí.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION GENERAL.....	x
I. REVISION DE LITERATURA.....	1
II. ELEVADAS INGESTAS DE GRASA SATURADA Y LA APARICION TEMPRANA DE BIOMARCADORES ESPECIFICOS PODRIAN EXPLICAR LA PREVALENCIA DE ENFERMEDADES CRONICAS EN EL NOROESTE DE MEXICO.....	23
III. EL COLESTEROL DIETARIO NO INCREMENTA LOS BIOMARCADORES DE ENFERMEDADES CRÓNICAS EN UNA POBLACIÓN PEDIATRICA EN EL NORTE DE MEXICO.....	44
IV. LOS NIÑOS CON HIPOSENSIBILIDAD AL COLESTEROL DIETARIO TIENEN LA CARACTERÍSTICA DE CONTAR CON MAYOR ABUNDANCIA DE mRNA DEL RECEPTOR LDL.....	73
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	88
PUBLICACIONES.....	99

RESUMEN

Estudios previos en población adulta en esta misma región, han mostrado consistentemente la presencia de más de un factor de riesgo de enfermedades crónicas, coincidiendo con la alta prevalencia de enfermedades coronarias y diabetes. El presente estudio demuestra que es posible detectar la presencia de biomarcadores distintivos de enfermedades crónicas desde temprana edad. Los niños evaluados se caracterizaron por tener niveles muy elevados de triglicéridos (percentil 95), bajas concentraciones de HDL-C (percentil 25) y altas concentraciones de insulina. Asimismo se determinó que el 69% pertenece al fenotipo B (mayor cantidad de LDL densas y pequeñas) lo que está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular. La presencia de estos biomarcadores respalda la alta prevalencia de diabetes tipo 2 en la población adulta.

El consumo de una ración alta en colesterol (518 mg adicionales/d) proveniente de tillevo durante 30 días por estos niños demostró que el 66% de ellos son hiposensibles al colesterol y 33% de ellos hipersensibles. Los niños hipersensibles experimentaron un aumento significativo en sus niveles de LDL-C y de HDL-C, sin embargo, la relación LDL-C/ HDL-C, un fuerte indicador de riesgo cardiovascular, se mantuvo. Asimismo, se observó que la subfracción densa y pequeña disminuyó, dando paso a la formación de subfracciones más grandes y menos aterogénicas. Los resultados sugieren que la carga de colesterol dietario proveniente de huevo reduce la aterogenicidad de LDL cambiando a algunos niños al patrón A.

El análisis del mRNA del receptor de LDL mostró que los niños hiposensibles presentan una mayor expresión de mRNA comparados con los niños hipersensibles. Lo que sugiere que posiblemente los niños hiposensibles

cuenten con mayor cantidad del receptor LDL y esto a su vez pudiera explicar por que no experimentan una elevación en los niveles de LDL sanguíneos.

En conjunto estos datos demuestran que en niños con biomarcadores distintivos de enfermedades cardiovasculares el colesterol del huevo no tiene un efecto negativo.

INTRODUCCION GENERAL

Las enfermedades del corazón (EC) son desde hace ya mucho tiempo un problema de salud pública a nivel mundial y en México ocupan la primera causa de muerte (1). El estudio realizado por Posadas et al, 1992 (2), destacó que los estados del norte y sureste del México presentan niveles más elevados de lípidos séricos que el resto del país. Estos datos fueron confirmados por la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas (ENEC, 1993) (3). Por su parte la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1999) (4) indicó que en México las enfermedades crónico degenerativas como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes ocupan las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el norte del país.

Dentro de las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis es la más frecuente y es además considerada la fase inicial de las enfermedades cardíacas más peligrosas. Se le considera una enfermedad silenciosa por que no presenta síntomas hasta etapas muy avanzadas y se tiene el conocimiento que inicia durante la niñez. Entre los factores de riesgo involucrados en su aparición se encuentran los niveles elevados de lípidos en sangre, la dieta alta en grasa (principalmente grasa saturada) y baja en vegetales, obesidad, hipertensión y diabetes.

El concepto de que el colesterol dietario contribuye a la hipercolesterolemia y éste a su vez al desarrollo de aterosclerosis ha sido parte fundamental de las políticas de salud pública y de recomendaciones dietarias a nivel mundial por más de 30 años. En los últimos 25 años se han realizado estudios extensivos a fin de evaluar dicha relación.

De los estudios con animales experimentales y epidemiológicos es de donde ha surgido la versión más fuerte de la existencia de una asociación

importante entre el colesterol dietario, colesterol del plasma y susceptibilidad a aterosclerosis. Sin embargo, los resultados de estos estudios no han podido probarlo contundentemente debido a que por un lado los animales no tienen un perfil lipoprotéico similar al humano, y por otro las asociaciones positivas de los estudios epidemiológicos no han tomado en cuenta otras variables confusoras (5). Los estudios de alimentación clínicos, repetidamente han observado que es difícil predecir exactamente el impacto del colesterol dietario en los niveles de colesterol en plasma, debido a que los individuos no experimentan una respuesta uniforme. La variabilidad puede ser debida a factores tales como etnicidad, estado hormonal, obesidad y desórdenes lipoprotéicos y predisposición genética (6, 7).

Los resultados de las investigaciones realizadas en este campo en los últimos años, han llevado a plantear un cuestionamiento serio acerca de si, efectivamente, el colesterol que se encuentra en los alimentos, al ser ingerido por el ser humano provoca una elevación tal en los niveles de colesterol en sangre que constituya un riesgo para las enfermedades del corazón. En este mismo contexto se cuestiona la validez de la recomendación de restringir el consumo de colesterol basado en las líneas de evidencia mencionadas anteriormente.

Para evitar elevaciones en el colesterol sanguíneo y reducir el riesgo de enfermedades coronarias, al público se le ha advertido de no consumir más de 300 mg/día de colesterol, así como de limitar el consumo de alimentos ricos en este nutrimento, entre los cuales se encuentra el huevo, el cual contiene aproximadamente 250 mg de colesterol por pieza. Sin embargo, el huevo es un alimento importante en la nutrición de los niños, que contiene algunos otros nutrimentos además de colesterol, incluyendo grasas insaturadas, aminoácidos esenciales, ácido fólico, vitamina E y otras vitaminas del complejo B, así como también luteína presente en la yema.

Por otro lado, el efecto del colesterol dietario en el metabolismo de lipoproteínas y el potencial antioxidante no ha sido revisado en niños. Considerando que en nuestra población el huevo (alimento con alto contenido de colesterol) es uno de los principales alimentos de la dieta y que además la niñez es la etapa de la vida donde inician las enfermedades cardiovasculares que tanto afectan a nuestra población, consideramos muy importante generar información sobre el impacto de su contenido de colesterol a nivel metabólico.

El principal objetivo de esta serie de estudios fue el de evaluar el efecto del colesterol dietario en el metabolismo lipídico de niños en edad escolar y determinar los mecanismos por los cuales se procesa el colesterol excedente para mantener la homeostasis del colesterol corporal.

El Capítulo I contiene información más detallada del conocimiento actual acerca de la relación entre el colesterol dietario y las enfermedades cardiovasculares. El Capítulo II describe el estudio realizado en un grupo de niños (hombres y mujeres) de 8 a 12 años de edad para determinar la presencia de biomarcadores distintivos de enfermedad cardiovascular. En el Capítulo III se describe un estudio de suplementación con huevo llevado a cabo en el mismo grupo de niños para determinar la respuesta del colesterol del plasma a la carga del colesterol del huevo. El Capítulo IV describe un ensayo llevado a cabo en células mononucleares para evaluar el efecto del colesterol del huevo sobre la acumulación de mRNA del gen del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL-R), así como del gen de la enzima 3 hidroxil-3 metil glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa. En el Capítulo V se presenta una discusión general de los resultados obtenidos.

Parte de este trabajo ha sido publicado ya y los impresos se encuentran incluidos en una sección especial en la presente tesis.

Ballesteros Martha Nydia, Rosa María Cabrera, María del Socorro Saucedo and María Luz Fernández.(2004). Dietary Cholesterol does not increase biomarkers for chronic disease in a pediatric population from northern Mexico. *Am J Clin Nutr.* 80: 855-61.

Martha Nydia Ballesteros, Rosa María Cabrera, María del Socorro Saucedo, Dimple Aggarwal, Neil S. Shacheter and María Luz Fernández. (2005) High Intake of saturated fat and early occurrence of specific biomarkers may explain. The prevalence of chronic disease in northern Mexico. *Journal of Nutrition* 135: 70-73.

Hipótesis

El consumo de huevo como alimento aportador de colesterol no resulta en un aumento de riesgo de enfermedades cardiovasculares en niños de edad escolar clasificados como hipo e hipersensibles.

Bibliografía

1. Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México. (2001). Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México. *Salud Pública de México* 43:1: 67-73.
2. Posadas RC, Sepúlveda J, Tapia CR, Magos C, Cardoso-Saldaña G, Zamora-González J, Lerma-Garber I. (1992). Valores de colesterol sérico en la población mexicana. *Salud Pública de México*. 34:2: 157-167.
3. Encuesta Nacional de Enfermedades crónico Degenerativas. (1993).
4. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (1999). Causas principales de mortalidad en la frontera México con estados Unidos. *Boletín Epidemiológico*. 20:21-22
5. McNamara DJ (2000) Dietary Cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica Bioph Acta*. 1529:310-320.
6. Beynen AC, Katan MB. Inter-individual variation in the cholesterolemic response to dietary cholesterol. in: *detection and Treatment of Lipid and Lipoprotein Disorders of Childhood*. Alan R Liss, Inc © (1985). págs 195-207.
7. Herron KL, Vega-López S, Conde K, Ramjiganesh T, Roy S, Shachter NS, Fernández ML. (2002). Pre-menopausal women, classified as hypo-or hyper responders, do not alter their LDL/HDL ratio following a high dietary cholesterol challenge. *J Am Coll Nutr*. 21:3:250-258.

CAPITULO I REVISION DE LITERATURA

Ateroesclerosis

Las enfermedades cardiovasculares (EC) constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial y en México desde la década de los 70's empezaron a tener un lugar importante como causa de muerte, ocupando en la actualidad el primer lugar (1). La ateroesclerosis es la más frecuente de las EC y es además considerada la parte inicial de las enfermedades cardíacas más peligrosas, se ha llamado la enfermedad silenciosa ya que no presenta síntomas hasta etapas muy avanzadas. Este es un padecimiento de la Intima de las arterias caracterizado por disfunción endotelial y depósitos de colesterol en macrófagos y células del músculo liso en la pared arterial, que resultan de una elevación de LDLs, lipoproteína (a), lipoproteínas remanentes y una disminución de HDL (2).

Las manifestaciones clínicas de la ateroesclerosis son el infarto al miocardio, infarto cerebral (trombo ateroesclerosis), aneurismas de aortas ateroescleróticas y enfermedad vascular periférica; generalmente ocurren en la edad media y en la vida adulta. Las primeras "estrias grasas" visibles consisten predominantemente de macrófagos derivados de monocitos llenos de colesterol proveniente de lipoproteínas. A medida que los depósitos ó placas ateroesclerosicas crecen, pueden algunas veces disparar la formación de

coágulos que bloquean el fluido de la sangre. Si un coágulo obstruye una de las estrechas arterias coronarias que nutren al corazón, el resultado es un infarto al miocardio ó ataque al corazón (3).

Estudios publicados a principio del siglo XX en Estados Unidos y Europa reconocieron la importancia del desarrollo temprano de la aterosclerosis en la aorta (4,5), pero no se contó con estudios cuantitativos sistémicos hasta los años 50's en los que Enos y Col (6) fueron los primeros en observar la presencia de estrías grasas en soldados jóvenes muertos en combate. Posteriormente, Holman y Col (7) cuestionaron acerca de si la aterosclerosis no era en realidad un problema pediátrico. En la actualidad, queda claro que este proceso puede empezar a ocurrir de manera transitoria durante el desarrollo fetal, que inicia claramente durante la niñez y se desarrolla en la adolescencia y en adultos jóvenes (8,9).

En el desarrollo de la aterosclerosis se han identificado algunos factores de riesgo llamados no modificables y modificables. Entre los no modificables se encuentra la herencia; los miembros de las familias con antecedentes de ataques cardiacos se encuentran en la categoría de riesgo más alto (10). El género es otro factor, hasta hace muy poco tiempo, únicamente el sexo masculino era considerado un factor de riesgo, sin embargo, ahora se sabe que mientras el hombre a una edad joven tiene un alto riesgo, en la mujer, el riesgo se incrementa en la menopausia (11) y en la post-menopausia se vuelve significativamente más alto con una elevación de los niveles de LDL-C, triglicéridos y apoproteína B. Este deterioro en el perfil de lípidos puede deberse a la carencia de estrógenos, los cuales proveen un papel protector en el mantenimiento de niveles deseables de LDL/HDL y bajos niveles de triglicéridos (12). Otro factor incluido en esta categoría es la edad; a medida que una persona envejece, aumenta el riesgo de muerte por una enfermedad coronaria, debido a los cambios en el sistema cardiovascular relacionados con

pérdida de elasticidad de la aorta, la reducción del gasto y frecuencia cardíaca entre otros.

Los factores modificables son parte del estilo de vida cuya característica principal es que pueden prevenirse, entre éstos se encuentran la obesidad, hipertensión arterial, niveles elevados de lípidos en sangre, la dieta, tabaquismo, y sedentarismo (13).

Obesidad

La obesidad es definida como un exceso de tejido adiposo en el organismo. En la vida adulta esta asociada con desórdenes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Un aumento de peso corporal, sobre todo en relación al aumento de la grasa abdominal, se asocia con resistencia a insulina, hiperinsulinemia, triglicéridos elevados, con un incremento en la síntesis y catabolismo de lipoproteínas de baja densidad (VLDL-C). Estudios epidemiológicos han indicado que la distribución de la grasa corporal tiene efectos considerables tanto en morbilidad como en mortalidad; así mismo, se le considera un factor independiente de riesgo de enfermedad cardiovascular dada su asociación con el desarrollo temprano de aterosclerosis (14,15). Algunos estudios clínicos prospectivos longitudinales han demostrado que la relación de la circunferencia cintura/cadera (C/C) usada como indicador de la distribución de grasa corporal, tiene una clara asociación de grasa abdominal con mortalidad general (16,17).

La prevalencia de obesidad en niños y adolescentes ha ido aumentando en años recientes tal y como está sucediendo en los adultos, emergiendo como una epidemia global que pudiera tener consecuencias de salud pública como una aparición temprana de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. El estudio de Salud y Nutrición en USA (NHANES II) (18) realizado entre los años de 1963 y 1991 encontró que el 11% de los niños y adolescentes entre 6 y 17 años de edad tenían sobrepeso. Un reporte más actual (NHANES, 2004) (19)

indica que la prevalencia aumentó a 13% en niños de 6 a 11 años y a 14% en el grupo de 12 a 19 años.

En México, La encuesta Nacional de Nutrición (ENSA, 2003) (20) que evaluó a 10,901 niños entre 5 y 11 años de edad indicó que la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de 19.5%. Asimismo se indica que las prevalencias más altas se encuentran en el norte de la república con un 25.6% así como en la Cd. de México con 26.6%.

Un estudio más reciente realizado en una población de niños y adolescentes de la región noroeste de México (21) encontró en ellos la presencia de algunos factores de riesgo para diabetes tipo 2 y observó que los sujetos con baja sensibilidad a insulina tienen valores más altos de peso corporal, IMC, porcentaje de grasa corporal, grasa abdominal, circunferencia de cintura, triglicéridos y presión sanguínea sistólica. Asimismo determinaron que el mejor predictor de la sensibilidad a insulina fue la grasa abdominal, triglicéridos y la historia familiar de diabetes tipo 2

Los estudios metabólicos han mostrado que la obesidad está asociada con un número de anormalidades en el metabolismo de colesterol y lipoproteínas que a su vez están relacionadas con hiperlipidemias. Por cada kilogramo de peso corporal en exceso, la síntesis de colesterol endógena aumenta en 20 mg/día. En este sentido, un sobrepeso de 10 Kg. resulta en un ingreso de colesterol de 200 mg/día que debe ser catabolizado, excretado ó almacenado (22). De manera similar en las personas obesas aumenta en la síntesis hepática de VLDLs lo cual está asociado con hipertrigliceridemia, disminución de HDL disminuidas y una aumento en la producción de LDL (22).

Hipertensión

La hipertensión es uno de los predictores más poderosos de las enfermedades coronarias, promueve el desarrollo de aterosclerosis al debilitar la pared arterial por la presión que ejerce en puntos sensibles, abriéndolos a la

invasión de lípidos y otros materiales. La elevación de la presión sanguínea en niños y una historia familiar de enfermedades cardiovasculares, pueden representar un riesgo para desarrollar hipertensión arterial durante la vida adulta. De acuerdo al programa de Educación de hipertensión para niños y adolescentes en estados Unidos (NNHLBI) (23), la hipertensión esta definida como el promedio de la presión diastólica y sistólica mayor ó igual al percentil 95 ajustado para la edad.

Lípidos en Sangre

Concentraciones elevadas de colesterol total, lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol) y de triglicéridos, así como bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol) están asociadas con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular.

De acuerdo al programa Nacional de Colesterol en Estados Unidos (NECP) (24), valores $>$ de 240 mg/dL de colesterol total; LDL \geq 160 mg/dL; HDL 40 mg/dL y triglicéridos \geq 200 mg/dL en adultos se considera de riesgo. En niños, las recomendaciones de niveles adecuados considerando el percentil 75 son de $<$ 170 mg/dL de colesterol total, $<$ 110 mg/dL de LDL-C, 50 para HDL-C mg/dL, y $<$ 70 mg/dL para triglicéridos (25,26).

Los niveles sanguíneos de colesterol total en población pediátrica varían geográficamente. En países tales como Japón, Tailandia, Italia, Ghana, donde la ingesta de ácidos grasos saturados es \leq del 10% y los niveles séricos en niños entre 8 y 9 años de edad se encuentran generalmente por debajo de 160 mg/dL. En niños de países como Holanda, Finlandia y Estados Unidos, la ingesta de grasa saturada varía de 13.5% a 17.7% de la energía total y sus niveles de colesterol sérico están generalmente por arriba de 160mg/dL (27,28).

En Estados Unidos (29) se ha observado que la población México - americana presenta valores elevados de triglicéridos y bajos de HDL-C (84.6 mg/dL, 47.6 mg/dL) con respecto a los Anglo-Americanos (70.7 mg/dL, 52

mg/dL). Asimismo, otro estudio ha indicado que los valores de colesterol total en población Latino-americana son superiores a 170 mg/dL (30). En México el estudio de Posadas a nivel nacional mostró que la población en general tiene valores superiores a 180 mg/dL (31).

Una revisión de datos colectados de cinco estudios poblacionales (32) realizados en Japón, Estados Unidos y Australia en niños de 7-18 años mostró que los niños japoneses tienen los valores de HDL-C más altos (62 mg/dL) en comparación con los niños norteamericanos (55 mg/dL) y los niños australianos (58.2 mg/dL).

Metabolismo de Lipoproteínas y Aterosclerosis

La LDL-C juega un papel vital en el transporte del colesterol del hígado hacia tejido periférico, mientras que la principal función de las HDL-C es el transporte de colesterol de las células periféricas hacia el tejido hepático para su degradación, proceso conocido como transporte en reversa del colesterol (33), por ello se les considera que ejercen un papel protector.

Bajos niveles de HDL-C son mejores predictores de enfermedad cardiovascular que el colesterol total ó LDL-C. Uno de los determinantes más fuertes de riesgo de enfermedad cardiovascular es la relación LDL: HDL la cual no debe ser mayor de 3.5 (ó bien una relación colesterol total: HDL-C >4.5 (21).

Las LDL-C del plasma son altamente heterogéneas con algunos subgrupos identificables en base a su densidad, tamaño y composición química. De acuerdo a su movilidad electroforética, se clasifican en, densas y pequeñas (patrón ó fenotipo B) y grandes y flotantes (patrón ó fenotipo A). Se ha estimado que el patrón B se encuentra presente en aproximadamente un 30 a 40% de la población adulta (34). Se ha propuesto que el fenotipo ó patrón B pudiera ser un marcador genético de riesgo de enfermedad coronaria (35). La elevación de LDL densas y pequeñas es asociada con un aumento en la progresión de la aterosclerosis debido a la manera tan fácil como penetran la

pared arterial ya que son muy susceptibles a oxidación. Esta oxidación provoca modificaciones que hace que sean altamente captadas por los macrófagos y consecuentemente se formen células espumosas que contribuyen al engrosamiento de las arterias (36). Hasta ahora se cuenta con pocos datos disponibles para niños saludables. Un estudio realizado en Australia (37) en 53 niños menores de 10 años mostró que existía un 7.5% de prevalencia de patrón B en niños y un 11% en los padres. Otro estudio realizado en Japón en niños y niñas de 7-13 años con diabetes tipo I mostró que la prevalencia del patrón B fue de 9.3% tanto en hombres como en mujeres.

Dieta y Aterosclerosis

Por muchos años la relación entre composición de la dieta y aterosclerosis ha sido tema de estudio, se ha encontrado una alta asociación entre enfermedad cardiovascular aterosclerótica y consumos de grasa total y grasa saturada. Estos constituyentes dietarios están también asociados con un aumento en el colesterol sérico y lipoproteínas de baja densidad (38).

En numerosos estudios en modelos animales (39,40), ensayos clínicos (41) y estudios epidemiológicos (42) se ha mostrado el efecto de los ácidos grasos en las concentraciones de LDL circulando. Mientras los ácidos grasos saturados (AGS) y los ácidos grasos Trans tienen un efecto negativo en los lípidos del plasma, los ácidos grasos polinsaturados (AGP) y los monoinsaturados (AGM), disminuyen las concentraciones de LDL-C.

Entre los AGS, el láurico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0) se consideran hipercolesteolémicos. Los AGS aumentan los niveles de LDL-C en plasma a través de promover la formación de estas lipoproteínas a nivel plasmático al mismo tiempo que disminuyen su recambio. Los AGP por su parte aumentan la síntesis de colesterol, el número de receptores de LDL hepáticos, así como también el recambio de LDL in vivo (43).

Colesterol Dietario y Aterosclerosis

Al colesterol de la dieta se le ha relacionado directamente con las enfermedades cardiovasculares, específicamente con la aterosclerosis. Este concepto ha prevalecido como parte fundamental de las políticas de salud pública y de recomendaciones dietarias a nivel mundial por más de 30 años. En los últimos 25 años se han realizado un gran número de estudios a fin de probar la relación entre el colesterol dietario y el colesterol sanguíneo y enfermedades cardiovasculares, de tal manera que en la actualidad existen tres líneas de investigación:

Estudios con Animales Experimentales. La respuesta plasmática al colesterol dietario es altamente variable entre y dentro las especies animales (40). Así, mientras el conejo es muy susceptible al colesterol dietario, las ratas y los perros muestran poco cambio en sus niveles plasmáticos, incluso a altas dosis de colesterol dietario. Por su parte, los primates no humanos tienen una respuesta altamente variable (44), y en algunas especies solo a dosis extremadamente altas de colesterol dietario (0,5-2 mg/kcal ó 1250-5000 mg/2500 kcal) es que se puede inducir hipercolesterolemia y aterosclerosis.

Una complicación de los estudios con animales es que muchas de las especies animales tienen un perfil de lipoproteínas significativamente diferente del perfil de lipoproteínas del humano. Mientras los humanos tienen la lipoproteína de baja densidad (LDL) como la lipoproteína predominante en plasma, muchos de los modelos animales tienen la lipoproteína de alta densidad (HDL) como la principal fracción (45). Las diferencias de las especies en las respuestas al colesterol dietario, el uso de dosis farmacológicas en algunos estudios y las diferencias en el perfil de lipoproteínas del plasma resulta en que sea muy difícil la extrapolación de los resultados con animales al ser humano.

Estudios Epidemiológicos. Históricamente los estudios epidemiológicos son los que han presentado la evidencia más fuerte de que el colesterol dietario está relacionado con los niveles de colesterol total en plasma y con enfermedades cardiovasculares. El estudio, de siete países (46), mostró una correlación positiva entre la ingesta promedio de colesterol y la tasa de mortalidad a 25 años por enfermedades coronarias. Resultados similares fueron obtenidos por Hegsted y Ausman (47) en un análisis de los datos dietarios del estudio de veinte países. Sin embargo, en muchas de estas investigaciones se ha observado que en el análisis de datos, rutinariamente se ha utilizado análisis de regresión lineal simple. Con el entendimiento actual de la relación entre los factores de riesgo y la enfermedad, resulta claro que existen variables confusoras que pueden estar impactando significativamente en la interpretación de estos datos epidemiológicos. Estudios epidemiológicos más recientes (48, 49, 50,51) han indicado que cuando se utiliza análisis de regresión simple, el colesterol dietario presenta una relación lineal significativa con las enfermedades cardiovasculares, asimismo, los reportes indican que cuando estos mismos datos son incluidos en un modelo de regresión múltiple, junto con otras variables tales como grasa saturada y fibra dietaria el colesterol dietario deja de tener significancia.

Estudios Clínicos. Resulta difícil predecir exactamente el impacto del colesterol dietario en los niveles de colesterol del plasma, debido a que las personas no experimentan una respuesta uniforme. La variación individual puede deberse a factores tales como etnicidad, estado hormonal, obesidad, desordenes lipoprotéicos, predisposición genética y niveles basales del plasma (52,53). Datos provenientes de estudios en los cuales se ha incluido alimentación con colesterol muestran que se puede predecir un aumento en el colesterol plasmático de 2.2 a 2.5 mg/dl por cada 100 mg adicionales de colesterol dietario al día con un cambio de 1.9 mg/dl de LDL-C y de 0.4 en HDL-

C. Los datos también indican que existe poco efecto en la relación LDL:HDL (21). Considerando lo anterior se puede clasificar la respuesta de los individuos al colesterol dietario como hiposensibles aquellos que experimenten un aumento en el colesterol total $< 1.9 \text{ mg/dl} / 100 \text{ mg}$ ($0.05 \text{ mmol/L}/100\text{mg}$) adicional de colesterol dietario consumido por día, y como hipersensibles aquellos que experimenten un aumento $\geq 2.5 \text{ mg/dL}$ (0.065mmol/L). Si bien la clasificación es precisa, los mecanismos que modulan el aumento del colesterol en plasma aún no son enteramente entendidos.

Una posible explicación del por que los individuos hiposensibles tienen la habilidad de mantener la homeostasis del colesterol pudiera ser la de que tienen una disminución de la síntesis, en la absorción ó en la excreción biliar, en cambio en el caso de los hipersensibles pudiera ser que absorban más colesterol ó que sean incapaces de suprimir efectivamente la síntesis endógena como mecanismo compensatorio en respuesta al exceso de colesterol (54,55).

En los estudios realizados en humanos en los cuales se ha incluido alimentación con colesterol, el consenso general ha sido que el colesterol dietario tiene un pequeño efecto significativo en los niveles de colesterol plasmático y que la respuesta es altamente variable, con un 75-80% de la población clasificada como hiposensible y un 15-20% como hipersensible (45,56,57). Hasta ahora los estudios conducidos han sido en adultos, y poco se sabe del efecto en niños. Considerando que la aterosclerosis inicia durante la niñez, se vuelve muy importante conocer la respuesta de estos al colesterol dietario.

A nivel poblacional, para evitar elevaciones en el colesterol sanguíneo y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, al público se le ha advertido de no consumir más de 300 mg/día de colesterol (24,26) y limitar el consumo de alimentos ricos en este nutriente, entre ellos se encuentra el huevo.

Sin embargo, algunos estudios enfocados a probar la relación entre el consumo de huevo y enfermedades cardiovasculares, no han encontrado asociación significativa (58,59, 60). Por otro lado, la idea de ser un alimento que puede provocar daño ha permanecido y por esta razón en muchas poblaciones del mundo el consumo de huevo ha disminuido. El huevo es un alimento importante en la nutrición de los niños, pues además de ser un buen aportador de proteínas de alta calidad, incluye también ácidos grasos insaturados, ácido fólico, vitamina E y otras vitaminas del complejo B, así como también luteína y zeaxantina presente en la yema.

Síndrome Metabólico

Durante mucho tiempo las investigaciones en el área clínica indicaron sobre el riesgo cardiovascular que implicaba tener dislipidemias (aumento de colesterol y/o triglicéridos en la sangre), obesidad, hipertensión e intolerancia a la glucosa, a lo cual se le llamaba el cuarteto de la muerte. Sin embargo fue hasta 1988 que Reaven (61) describió a la asociación entre hiperinsulinemia y enfermedad cardiovascular como síndrome metabólico (SM) ó síndrome X y el cual indicaba estaba caracterizado por un conjunto de alteraciones patológicas, destacando la intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, hipertensión arterial y una dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL-C.

En la actualidad se define como una condición patológica asociada a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que presenta un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Está identificado por la presencia de tres ó más de los siguientes componentes: obesidad central (en el hombre mayor de 102 cm y en

la mujer mayor de 88 cm), dislipidemia aterogénica (TGS \geq 150 mg /dL y HDL $<$ 40 mg/dL en hombres y $<$ 50 mg/dL en mujeres), presión sanguínea elevada (\geq 130/85 mmHg), glucosa en ayuno (100-125 mg/dL) y resistencia a la insulina (24).

La resistencia a insulina y la hiperinsulinemia, preceden por años a la aparición de la diabetes. El SM es comúnmente encontrado en personas obesas ó con sobrepeso y su aparición parece ser desde la adolescencia (62,63). Haffner et al (64) demostraron en el estudio de San Antonio que el 82.4% de los individuos que desarrollaron diabetes eran previamente insulino-resistentes. Mientras que en el estudio de Bruneck (65) se observó en el 60% de los hipertensos y en más del 80% de los individuos con aumento de triglicéridos y bajos niveles de HDL-C.

La dislipidemia, llamada aterogénica, se explica por un aumento de la síntesis hepática de triglicéridos (dada la mayor disponibilidad de ácidos grasos libres e hiperinsulinemia), mayor secreción de las lipoproteínas VLDL y mayor catabolismo de las HDL con aumento de la excreción renal de la apo A1. También hay un aumento en la enzima intravascular Proteína de Transferencia de Esteres de Colesterol (CETP), las VLDL reciben colesterol esterificado desde las LDL y HDL, transfiriéndoles a su vez triglicéridos. Ambas lipoproteínas enriquecidas con triglicéridos se vuelven sustrato de la lipasa intravascular hepática aumentando el catabolismo de las HDL, mientras las LDL se transforman en partículas más pequeñas y densas las cuales son más aterogénicas por que son más susceptibles a oxidación.

Estudios a Nivel Molecular

A nivel fisiológico, una gran cantidad de proteínas están involucradas en mantener la homeostasis del colesterol hepático, destacando entre éstas la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa que regula la síntesis de colesterol; el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) que constituye el principal mecanismo de remoción de colesterol del plasma; y la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa, que regula la ruta clásica de la síntesis de ácidos biliares (66).

Debido a la asociación de la lipoproteína LDL con las enfermedades del corazón, e infartos cerebrales, una buena cantidad de estudios se ha enfocado a determinar los mecanismos involucrados en la captación celular de las lipoproteínas LDL. Goldstein y Brown, 1984 (67) descubrieron la existencia del receptor proveyendo un marco conceptual para entender el mecanismo que controla a la LDL y estudios subsecuentes se enfocaron a la elucidación y su modo de acción en la célula y en el cuerpo (68,69). Estudios en hamsters han revelado que la captación mediada por receptor es responsable del 60 al 80% del aclaramiento de las LDL, mucho del cual ocurre en el hígado (70).

Cada una de las proteínas involucradas en la homeostasis del colesterol, mencionadas anteriormente, están bajo el control de factores de transcripción, incluyendo proteínas de enlace a elementos regulatorios de esteroides (SREBPs), receptores X del hígado (LXRs) y receptores X farnesoides (FXR).

La actividad del receptor está regulada a nivel transcripcional en respuesta a la concentración de colesterol libre celular. El promotor del gen del receptor de LDL contiene un elemento de respuesta a esteroides (SER) el cual es el sitio de enlace para los factores de transcripción SREBPs. Bajas concentraciones de colesterol celular inducen la liberación del factor de transcripción SREBP, resultando en la transactivación del gen del receptor de LDL (71). En contraste, cuando hay suficiente cantidad de colesterol en la

célula, colesterol y/o metabolitos de colesterol tales como los oxisteroles, evitan la liberación de SREBPs resultando en la inhibición de la expresión del gen del receptor (72).

De igual manera, bajas concentraciones de colesterol celular, liberan a SREBPs (vía rompimiento proteolítico); siendo transportados al núcleo donde se unen a SREs en las regiones promotoras de HMG-CoA reductasa, aumentando su transcripción. En contraste cuando hay suficiente cantidad de colesterol, los metabolitos de colesterol, evitan el rompimiento proteolítico de SREBPs resultando en la inhibición de la expresión del gen de la enzima (73).

Sorprendentemente se ha visto que los receptores nucleares PPARs (receptores activados por proliferadores de peroxisomas), LXR no únicamente influyen el metabolismo de lípidos a nivel sistémico, sino que también regulan la homeostasis de lípidos y la inflamación en macrófagos, células endoteliales y células del músculo liso dentro de la pared arterial (61).

Por último, los receptores LXR y FXR regulan la conversión de colesterol celular a ácidos biliares vía colesterol 7 α hidroxilasa. Debido a que la excreción de ácidos biliares representa la principal ruta de eliminación del colesterol del cuerpo, LXR y FXR son también instrumento de regulación en el recambio y balance del colesterol corporal (74). Todos los procesos son influenciados por la dieta, particularmente colesterol, ácidos grasos y fibra. Otros constituyentes dietarios pudieran impactar también el metabolismo del colesterol celular e indudablemente serán sujetos de futura investigación.

Bibliografía

1. Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México. 2001. Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, (1999). *Salud Pública de México*. 43(1):67-73.
2. Schaefer, E J. (2002). Lipoproteins, nutrition, and Heart disease. *Am J Clin Nutr* 75:191-212.
3. Lawn, M R. (1992). Lipoprotein (a) in Heart Disease. A remarkable protein that transport cholesterol and binds with blood Clots can rise the risk of a heart attack. Comparisons between it and other blood proteins may explain why. *Scientific American*, June; 54-60.
4. Klotz O, Manning MF: (1911) Fatty streaks in the intima of arteries *J Pathol Bacteriol* 16:211.
5. Zeek P. (1930). Juvenile arteriosclerosis. *Arch Pathol* 10: 417-446.
6. Enos WF Jr, Beyer JC, Holmes RH. (1955). Pathogenesis of coronary disease in American soldiers Killed in Korea. *JAMA* 158:912-914.
7. Holman RL, McGill, HC, Strong JP, Geer JC. (1958). The natural history of atherosclerosis. The early aortic lesions as seen in new Orleans in the middle of the 20th century. *am J Pathol* 34:209-235.
8. Li A C and Glass C K. (2004). PPAR-and LXR dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J lipid Res*. 45: 2161-2173.
9. Strong, J P., Malcolm G T., Newman W P., Oalman M C. (1992). Early lesions of atherosclerosis in Childhood and Youth: Natural History and Risk Factors. *J Am Coll Nutr*. 11:No S: 3S-7S.
10. Cardiovascular disease risk factors: new areas for research. Report of a WHO Scientific Group. WHO technical report series 841. World Health Organization, Geneva. 1994. págs 1-21

11. Do KA, Green JR, Guthrie EC, Dudley, H.G., Burger, L. Dennerstein. (2000). Longitudinal study of risk factors for coronary heart disease across the menopausal transition. *Am J Epidemiol* 151:584-593.
12. Stampfer MJ, Colditz GA. (1991). Estrogen replacement therapy and coronary disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence, *Prev Med* 20:47-63
13. McNamara DJ (1992). Dietary fatty acids, lipoproteins and cardiovascular disease. *Adv Food Nutr Res.* 36:253-361.
14. Zwiauer KFM, Pakosta R, Mueller T, Widhalm K. (1992). Cardiovascular risk factors in obese children in relation to weight and body fat distribution. *J Am Coll Nutr.* No S: 41S-50S.
15. Freedman DS, Dietz W, Srinivasan SR, Berenson GS (1999). The relation of overweight to cardiovascular risk-factors in person aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol* 70:851-858.
16. McGill Jr IIC, McMahan CA, Herderik EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. (2002). Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* 105:2712-2718.
17. Folsom AR, Prineas RJ, Kaye SA, Munger RG (1990). Incidence of hypertension and stroke in relation to body fat distribution and other risk factors in older women. *Stroke.* 21:701-706.
18. Freedman DS, Jacobsen SJ, Barboriak JJ, Sobociniski KA, Anderson AJ, Kissebah AH, Sasse EA, Gruchow HW (1990), Body fat distribution and male/female differences in lipids and lipoproteins. *Circulation* 81:1498-1506.
19. Troiano RP, Flegal KM, Kuczmarski RJ, Campbell Sm, Johnson CL. (1995). Overweight prevalence and trends for children and adolescents. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1963 to 1991. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 149:1085-1091.

20. Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults. (1994). The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA*;272: 205–11.
21. Cisneros-Tapia R., Navarrete F A., Gallegos A C., Robles-Sardin A E., Méndez R O., Valencia M E. (2005). Insulin sensitivity and associated risk factors in mexican children and adolescents. *Diabetes Care*, 28:10: 2546-2547.
22. Hernandez B., Cuevas-Nasau L., Shamah-Levy T., Monterurbio EA., Ramirez-Silva CI., Garcia Feregrino R Rivera JA., Sepulveda-Amor J. (2003). Factores asociados con sobrepeso y obesidad en niños mexicanos de edad escolar: resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999. *Salud Pública de México*. 45: suppl:4:S551-S557:
23. McNamara DJ. (Chapter 41) Coronary Heart Disease in Present Knowledge in Nutrition. 1990, págs 349-354.
24. National Heart, Lung and Blood Institute. Update on the Task Force Report (1987) on high Blood Pressure in children and Adolescents: a Working Group Report From the National High Blood Pressure Education program. NIH Publications No 96-3790. September 1996: National Institutes of Health United States, págs 1-13.
25. Third Report of National Cholesterol Education Program. (2001). Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Executive Summary. National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood institute. págs 1-25.
26. National Cholesterol Education Program by Expert Panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. (1991), *Nutrition Today* May/june36-45.
27. Williams CL, Hayman LL , Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S, Bazzarre T. (2002). AHA Scientific Statement. Cardiovascular Health in Childhood a statement for health professionals from the committee on atherosclerosis, hypertension, and obesity in the young (ahoy) of the council on

- cardiovascular disease in young. American heart association. *Circulation*. 106:143-160.
28. I. Rationale for attention to cholesterol levels in children and adolescents (1992). *Pediatrics* 89:3:528-536.
 29. Giovannini M, Bellu R, Ortisi MT, Ncerti P, Riva E. (1992). Cholesterol and lipoprotein levels in milanese children: relation to nutritional and familial factors. *J Am Coll Nutr*. 11:28S-31S.
 30. Reaven P, Nader PR, Berry C, Hoy T. (1998). Cardiovascular disease insulin risk in Mexican-American and Anglo-American children and mothers. *Pediatrics*. 1001: 1-7.
 31. Webber LS, Osganian V, Luepker RV, Feldman HA, Stone EJ, Elder JP, Perry CL, Nader PR, Parcel GS, Broyles SL, McKinlay SM. (1995). Cardiovascular risk factor among third Grade Children in four regions of the united States. *Am J of Epidemiol*. 141:5:428-439.
 32. Posadas-Romero C, Sepúlveda J, Tapia-Conyer R, Mangos C, Cardoso-Saldaña G, Zamora-Gonzales J, Lerman-Garber I. (1992). Valores de colesterol sérico en la población mexicana. *Salud Pública de Mexico*. 34:2: 157-167.
 33. Dawyer T, Iwane H, Dean K, Odagiri Y, Shimomitsu T, Blizzard L. (1997). Differences in HDL cholesterol concentration in Japanese, American, and Australian children. *Circulation*. 96:2830-2836.
 34. Fielding CJ and Fielding PE.(1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 36:211-228
 35. Clifton PM, Noakes M, Nestel PJ. (1998). LDL particle size and LDL and HDL cholesterol changes with dietary fat and cholesterol in healthy subjects. *J lipid Res* 39: 1799-1804.
 36. Austin M, King M, Vranizan K, Krauss R. (1990). Atherogenic lipoprotein phenotype. a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 82:495-506.

37. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. (1988). Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 260: 1917-21.
38. Steinbeck KS, Bermingham MA, Mahajan D and Baur LA. (2001). Low-density lipoprotein subclasses in children under 10 years of age. *J Paediatr Child Health*. 37:550-553.
39. Ginsberg H, Le N-A, Mays C, Gibson J and Brown V. (1981). Lipoprotein Metabolism in nonresponders to increased dietary cholesterol. *Arteriosclerosis* 1:463-470.
40. Fernandez ML, Lin ECK, McNamara DJ. (1992). Differential effects of saturated fatty acids on low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 33:1833-42.
41. Nicolosi RJ. (1997). Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. *Am J Clin Nutr*. (suppl): 1617S-27S.
42. Kris-Etherton P, Yu S: (1997). Individual fatty acids on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *AmJ Clin Nutr* 65 (suppl): 1628S-1644S.
43. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett W. (1997). Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Eng J Med*. 337:1491-9.
44. Fernandez ML, West KL. (2005) Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J Nutr*. 135:2075-2078
45. Rudel, L.L. (1997). Genetic factors influence the atherogenic response of lipoproteins to dietary fat and cholesterol in non human primates. *J Am Coll Nutr*. 16:306-312.
46. McNamara, DJ. (2000). Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1529:310-320,
47. D. Kromhout, A. Menotti, B. Bloemberg, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, A.S. Dontas, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen et al. (1995). Dietary saturated

- and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the seven countries study. *Prev Med.* 24:308-315.
48. D.M. Hegsted, L.M. Ausman. (1988). Diet, alcohol and coronary heart disease in men. *J Nutr.* 118:1184-1189.
 49. F.B. Hu, M.J. Stampfer, J.E. Manson, E. Rimm, G.A. Colditz, B.A. Rosner, C.H. Hennekens, W.C. Willett. (1997). Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in woman. *New Engl J Med.* 337:1491-1499.
 50. Ascherio, E.B. Rimm, E.L. Giovannucci, D. Spiegelman, M. Stampfer, W.C. Willett. (1996). Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *Br Med J.* 313:84-90.
 51. P. Pietinen, A. Ascherio, P. Korhonen, A.M. Hartman, W.C. Willett, D. Albanes, J. Virtamo. (1997). Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men-the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Am J Epidemiol.* 145:876-887.
 52. M. Toeller, A.E. Buyken, G. Heitkamp, W.A. Scherbaum, H.M.J. Krans, J.H. Fuller. (1999). EURODIAB IDDM Complications Group. Associations of fat and cholesterol intake with serum lipid level and cardiovascular disease: The EURODIAB IDDM Complications Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 107:512-521.
 53. Howell WH, Mc Namara DJ, Tosca MA, Smith BT, Gaines JA (1997). Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 65:1747-1764.
 54. Friedlander Y, Leitersdorf E, Vecsler R, Funke H, Kark J: (1999) The contribution of candidate genes to the response of plasma lipids and lipoproteins to dietary challenge. *Atherosclerosis* 152:239-248
 55. Beynen AC, Katan MB. (1985). Inter-individual variation in the cholesterolemic response to dietary cholesterol. In. *detection and treatment of Lipid and Lipoprotein Disorders of Childhood*. Alan R Liss, Inc ©. págs 195-207.

56. Beynen AC, Katan MB. (1988). Human hypo-and hiperresponders to dietary cholesterol and fatty acids. In. *Recent Aspects of Diagnosis and Treatment of lipoprotein disorders: Impact on Prevention of Atherosclerotic Diseases*. Alan R. Liss, Inc ©. págs 205-217.
57. Herron KL, Vega-López S, Conde K, Ramjiganesh T, Roy S, Shachter NS, Fernández ML. (2002). Pre-menopausal women, classified as hypo-or hyper responders, do not alter their LDL/HDL ratio following a high dietary cholesterol challenge. *J Am Coll Nutr*. 21:3:250-258.
58. Herron KL, Vega-López S, Conde K, Ramjiganesh T, Shachter NS, Fernández ML. (2003). Men Classified as hypo- or hiperresponders to dietary cholesterol feeding exhibit differences in lipoprotein metabolism. *J Nutr* 133: 1036-1042.
59. Dawber TR, Nickerson RJ, Brand, Pool J. (1982). Eggs, serum cholesterol and coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*. 36:617-625.
60. Gramenzi A, Gentile M, Fasoli E, Negri F, Parazzini C. la Vecchia. (1990). Association between certain foods and risk of acute myocardial infarction in women. *Br Med J*. 300:771-773.
61. Hu FB, Stampfer EB, Rimm JE, Manson A, Ascherio GA, Colditz BA, Rosner D, Spiegelman, FE, Speizer FR, Sacks CH Hennekens CH, Willet WC. (1999). A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *J Am Med Assoc*. 281:1387-1394.
62. Reaven, GM. Banting lecture (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 3: 1595-607.
63. Grundy SM. (2002). Obesity, Metabolic Syndrome, and Coronary Atherosclerosis. *Circulation*. 105: 2696-2698.
64. Alexander CM. (2003). The coming of age of the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 26:11: 3180-3181.
65. Haffner SM, Mykkanen L, Festa A. (2000). Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects:

- implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation*. 101:975-980
66. Bonora E, Kiechl S, Willeit J et al. (1998). Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders: The Bruneck study. *Diabetes*, 47:1643-1649.
 67. Lee J-Y, Mitmesser SH and Carr TP Regulation of Cellular Cholesterol in *Molecular Nutrition*. Eds. Janos Zempleni and Hannelore Daniel. CABI Publishing. UK. 2003.págs 309-319.
 68. Goldstein JL, Brown MS., (1984). Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res*. 25:1450-1461.
 69. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider ML, Casey JL, Goldstein JL and Russell. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*.39:27-38.
 70. Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. (1983) cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 80:7501-7505.
 71. Spady DK, Stange EF, Bilhartz LE and Dietschy JM. (1986) Bile acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster by altering cholesterol flux across the liver. *Proceedings of Natl Acad Sci USA* 83, 1916-1920.
 72. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL and Wang X. (1993). SREBP-2, a second basic helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proceedings of the Natl Acad Sci USA* 90,11603-11607.
 73. Towle HC, (1995) Metabolic Regulation of gene transcription in mammals. *J Biol Chem* 270, 23235-23238.
 74. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Bloch Bio Acta* 1529: 103-113.

CAPITULO II
ELEVADAS INGESTAS DE GRASA SATURADA Y LA APARICION
TEMPRANA DE BIOMARCADORES ESPECIFICOS PODRIAN EXPLICAR LA
PREVALENCIA DE ENFERMEDADES CRONICAS EN EL NOROESTE DE
MEXICO

RESUMEN

En el noroeste de México existe una alta prevalencia de enfermedad coronaria (EC) y de diabetes tipo II. Con el fin de investigar si la existencia de biomarcadores de enfermedad crónica están presentes desde temprana edad, estudiamos un total de 54 niños de 8 a 12 años de edad (25 hombres y 29 mujeres) de bajo nivel socioeconómico. Se analizaron los lípidos del plasma, el tamaño de la LDL, apoproteínas, glucosa e insulina. El análisis de registro dietario de 3 días indicó que la ingesta típica de esta región es alta en grasa total (37-43%) y grasa saturada (11-13%) y baja en carbohidratos (42-49% del total de la energía). Hombres y mujeres tuvieron un promedio de pasos por día de $6,623 \pm 2892$ y $6,112 \pm 2793$ respectivamente, medido mediante un pasómetro, sugiriendo un bajo nivel de actividad física. El colesterol total y LDL colesterol (LDL-C) se encontraron dentro del percentil 50. En contraste, la población de estudio se caracterizó por tener triglicéridos elevados (TG) (percentil95) con un promedio de 111 ± 33 mg/dL para hombres y 106 ± 34 mg/dL para las mujeres. La concentración de HDL-C fue baja (25 percentil) con valores de 47 ± 8 en las niñas y de 50 ± 8 mg/dL en los niños. También se observó una alta prevalencia de LDL fenotipo B (69%), el cual está asociado con un aumento en el riesgo de enfermedades coronarias. Estos resultados sugieren que la población de niños estudiada podría tener dos diferentes componentes de factores de riesgo, uno es el contenido de grasa en la dieta, el

cual puede estar asociado con niveles elevados de LDL-C presentes en la población adulta. El otro, puede ser un componente genético que asociado con altos niveles de triglicéridos y bajos niveles de HDL además de fenotipo B, podría resultar en resistencia a insulina y diabetes tipo II en la edad adulta.

INTRODUCCION

La etiología de las enfermedades cardiovasculares es multifactorial e incluye factores de riesgo modificables y no modificables. Entre los factores de riesgo no modificables se encuentran la herencia, sexo y estado menopáusico mientras que los factores de riesgo modificables incluyen modificaciones en la dieta, incremento en ejercicio aeróbico y pérdida de peso.

En el noroeste de México existe una alta prevalencia de enfermedades coronarias (EC) (1), resistencia a insulina y diabetes tipo II. Aún en la actualidad no está claro si los biomarcadores de enfermedades crónicas son ya identificables en la niñez ó si el estilo de vida juega un papel dominante en la prevalencia de enfermedades crónicas en la población adulta. En esta población es necesario realizar estudios cuyo objetivo sea entender la contribución de los factores de riesgo en el padecimiento de enfermedades crónicas, asimismo también estudios basados en la genética.

En estudios previos realizados en adultos jóvenes hombres en ésta área de México (2,3) observamos una alta prevalencia de bajas concentraciones plasmáticas de HDL, niveles elevados de triglicéridos (TG), alta presión sanguínea y un índice de masa corporal (IMC) mayor de 26 kg/m², todos éstos factores indicativos del síndrome metabólico (4) y con un alto potencial tanto para EC como para diabetes tipo II. Además, la evaluación de factores de riesgo en ésta región indicó que sujetos de bajo nivel socioeconómico no únicamente exhiben éste parámetro de riesgo incrementado de EC, sino que también ellos tienen una dieta muy alta en grasa (5). Basados en éstos datos, decidimos examinar niños de la misma área geográfica para evaluar la potencial presencia de algunos de estos biomarcadores de enfermedades crónicas a una edad temprana.

Con este propósito se captaron niños de bajo nivel socioeconómico para determinar la ingesta dietaria, nivel de actividad física (medido por el número de

pasos por día registrado con un pasómetro), presión sanguínea, lípidos del plasma y apolipoproteínas, glucosa plasmática e insulina. Nuestra hipótesis fue que el estilo de vida y los componentes genéticos podrían afectar el riesgo potencial para EC ó diabetes tipo II en niños de ésta región.

SUJETOS Y METODOS

Materiales

Se adquirieron kits de colesterol enzimático y triglicéridos de Roche-Diagnostics (Indianápolis, IN, USA). De Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) se adquirió EDTA, aprotonina, azida de sodio y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). De la compañía Aldrich (Arlington Heights, IL) se adquirió malonaldehido bis (dietil acetal). La insulina humana y kits de radioinmunoensaye (RIA) específico para leptinasa se adquirieron de Linco Research (ST Charles, MO, USA).

Sujetos y Evaluación Dietaria

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Connecticut en Estados Unidos así como también por el Comité de Ética de CIAD (Hermosillo, Sonora, México). Los padres de los niños participantes del estudio asistieron a reuniones de información y firmaron una forma de consentimiento. Con el fin de evaluar la presencia de biomarcadores de enfermedades crónicas en una población pediátrica, se captaron un total de 54 niños (25 hombres, 29 mujeres) en edades entre 8 y 12 años de edad que asistían a la escuela primaria Mauricio Kelly localizada en un barrio de la periferia de la Cd. de Hermosillo, Sonora, México. Para evaluar la ingesta

dietaria de macronutrientes y de colesterol dietario, se realizaron registros pesados de alimento de tres días (6). Tanto a los niños como a la persona encargada de preparar los alimentos se les proveyó de una balanza especial (Ohaus CS 2000) y un cuaderno de registro de ingesta diaria. A los padres se les instruyó acerca de como pesar los alimentos, así como a llenar los registros, además los investigadores se mantuvieron muy cerca de los niños supervisando la ingesta de alimentos diariamente. La ingesta dietaria se analizó empleando la base de datos de alimentos ESHA Food processor program (ESHA, Food Processor, 7.20, ESHA Research Editor, 1998). Los alimentos regionales que no están incluidos en la base de datos se analizaron sus componentes individuales y se agregaron a la base de datos. Estos alimentos incluyen golosinas, vísceras y dulces, los cuales están incluidos en la dieta de los niños.

De cada niño se colectaron dos muestras de sangre en ayuno (12 h), en diferentes días, en tubos conteniendo 0.15g /100g de EDTA para determinar lípidos del plasma, glucosa plasmática, insulina, leptina, tamaño de LDL y apolipoproteínas. El plasma se separó por centrifugación a 1500 x g por 20 min a 4°C y se introdujo en viales conteniendo fenil metil sulfonil fluoride (0.05g /100g), azida de sodio (0.01 g/100g) y aprotinina (0.01g/100g).

La presión sistólica y diastólica se midió en el brazo derecho con el participante sentado y después de 5 min de descanso usando un baumanómetro manual Omron Hem 185 Hem 18 (Vernon Hills, IL, USA).

Lípidos Plasmáticos y Apolipoproteínas

El colesterol total se midió por método enzimático usando estándares y kits de Roche- Diagnostics (7). La HDL-C se midió en el sobrenadante después de la precipitación de las lipoproteínas conteniendo apo B (8). La LDL se determinó usando la ecuación de Friedwald (9). Los triglicéridos se determinaron usando kits de Roche Diagnostics, los cuales se ajustaron para

glicerol libre (10). Las concentraciones de apoproteína B se midieron por un método inmunoturbidimétrico y turbidimétrico a 340 nm (11). Apoproteína CIII (12) y apoproteína E (13) se midieron en un autoanalizador Hitachi 740 utilizando kits de la compañía Waco.

Glucosa e Insulina en Plasma

La glucosa en plasma se determinó enzimáticamente (14) usando kits de Waco. Brevemente, 3 ml de solución de trabajo se agregaron a 0.20 ml de muestra mezclándose, luego, se transfirieron a cubetas y se incubaron a 37°C por 5 min. y después se leyeron a 505 nm en un espectrofotómetro DU-640 UV (Beckman coulter, Fullerton CA, USA).

La insulina se midió en plasma usando un kit de radioinmunoensaye que utiliza la técnica del doble anticuerpo /polietilen glicol (15). Brevemente, 100 µl del plasma fueron incubados con insulina humana marcada con I¹²⁵ y antisuero anti-insulina humana de cuyos. Después de una noche de incubación se agregó un reactivo precipitante conteniendo IgG anti-guinea pig y las muestras se mezclaron y se incubaron por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 2500 x g por 20 min, se decantó el líquido y los tubos conteniendo el pellet se contaron por un minuto empleando para ello un sistema de conteo Cobra II-Auto Gamma Counting System (Packard Instruments, Meriden, CT, USA). Además se utilizó el modelo de evaluación de homeostasis (HOMA) (16) para calcular la resistencia a insulina de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

El modelo HOMA ha mostrado ser un método confiable para medir resistencia a insulina en varias poblaciones cuando otros métodos más invasivos no son factibles (17). Basados en la ecuación, los niños fueron clasificados con resistencia a insulina si el valor calculado fue ≥ 3.8 .

Determinación del Tamaño de LDL

Para identificar el tamaño de las LDL se utilizó el sistema LDL lipoprint (Quantimetrix Redondo Beach, CA, USA) con un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución sin gradiente. Brevemente, se agregaron 25 μ l de plasma a tubos de gel de poliacrilamida prellenados de fábrica, y se sobrellenaron con 200 μ l de gel de carga. Los tubos fueron fotopolimerizados por aproximadamente 30 min. y puestos en una cámara de electroforésis. Tanto en la parte de arriba como de abajo se agregó buffer (Tris-hidroximetil aminometano 66.1 g/100g, ácido bórico 33.9 g/100g, pH 8.2-8.6). El gel se corrió por aproximadamente 60 min. a 36mV ó hasta que la fracción HDL estuviera a aproximadamente 1cm del final del gel. Los geles se pusieron a reposar por 30 min. y luego se escanearon con un densitómetro.

Pruebas Estadísticas

Se utilizó prueba T de Student's independiente para comparar parámetros medidos entre niños y niñas. Una $p < 0.05$ se consideró como significativa.

RESULTADOS

La edad promedio de los niños fue de 10.4 ± 1.6 años con un rango de 8 a 12 años. No hubo diferencia significativa en la presión sanguínea sistólica, diastólica ó actividad física medida como pasos / día entre niños y niñas. Sin embargo, el IMC fue más alto en los niños comparado con las niñas ($p < 0.05$) (Tabla 1). Cuando los niños se clasificaron de acuerdo al BMI para la edad siguiendo las gráficas de crecimiento del CDC, 2000 (18), se encontró que 20.4 % de el total de los niños tiene un IMC para la edad situado en el percentil 85 (sobrepeso) mientras que 18.5% tienen un IMC para la edad en el percentil 95 (obeso).

Los lípidos del plasma, apolipoproteínas y tamaño de LDL-C no fueron diferentes entre niños y niñas (Tabla 2). El colesterol total y el LDL colesterol se situaron levemente por debajo del percentil 50 para ésta edad de acuerdo al Programa Nacional de Educación del Colesterol (NCEP) (19) (Tabla 3). En contraste las concentraciones de HDL-C fueron bajas, encontrándose en el percentil 25 y los triglicéridos fueron altos en el percentil 95. De igual manera las concentraciones de apo CIII fueron altas comparadas con las reportadas para hombres y mujeres adultos (20,21). El diámetro del pico de LDL fue pequeño, lo que es indicativo de la presencia de subfracciones de LDL pequeñas, confirmado por un 69 % de niños que exhibieron fenotipo B.

Si bien, las concentraciones de glucosa estuvieron dentro de los límites normales para niños de esta edad, los niveles de insulina fueron altos, incluso cuando se comparó con el rango normal de adultos (50-150 pmol/L). Adicionalmente 6 de los 54 niños (11%) fueron clasificados con resistencia a insulina determinado por la ecuación de HOMA (Tabla 2). No se encontraron diferencias significativas entre géneros debido a que 3 niños y 3 niñas fueron clasificados como resistentes a insulina.

Se encontraron correlaciones de Pearson entre el IMC y la presión diastólica. Adicionalmente los TG se correlacionaron positivamente con apo C-III ($r = 282$, $p < 0.01$).

La ingesta total de grasa (39% del total de la energía) y grasa saturada (12% del total de la energía) se encontró por encima de lo recomendado por el NCEP (Tabla 3). Por el contrario, la ingesta de carbohidratos fue baja (49 % del total de la energía) comparada con la ingesta promedio de 55% en USA. La ingesta promedio de fibra dietaria fue alta, debido principalmente al consumo de frijoles y tortillas. Los altos niveles de colesterol dietario (395 mg/día reflejan la alta cantidad de grasa animal (saturada) consumida por los niños (Tabla 3).

DISCUSION

En éste estudio hemos mostrado que los biomarcadores de enfermedades crónicas están presentes en niños del Noroeste de México, una región caracterizada por elevadas tasas de enfermedades coronarias y diabetes tipo II. Adicionalmente, los factores de estilo de vida parecen tener una contribución significativa con la presencia de estas enfermedades en la vida adulta.

En estudios previos con adultos sedentarios de esta misma región observamos valores extremadamente bajos de HDL (en un rango de 21-45 mg/dL) así como altos niveles de triglicéridos (230 ± 75 mg/dL) (2,3), con un 43 % de sujetos con LDL-C por arriba de 120 mg/dl. Estos biomarcadores pueden estar ligados a la alta prevalencia de enfermedades coronarias y de diabetes tipo II en ésta parte de México (1). Asimismo, cuando la dieta de éstos sujetos fue analizada usando registro de alimentos de 3 días, se observó un alto consumo de grasa saturada principalmente derivada de productos cárnicos (3). Otro estudio en adultos mexicanos de ésta misma región de nivel socioeconómico bajo, también presentaron biomarcadores de enfermedades coronarias y de resistencia a insulina con el mismo patrón dietario de alto consumo de grasa saturada (5). Todos estos estudios en adultos, además del presente en niños, claramente indica que esta población necesita seriamente intervenciones cuyo objetivo sea modificar la ingesta dietaria e incrementar la actividad física.

Biomarcadores de Enfermedad Crónica

Los niños de este estudio tuvieron 3 factores de riesgo identificables, los cuales podrían estar asociados con un aumento de riesgo de presentar resistencia a insulina y enfermedades coronarias en la vida adulta, principalmente elevados niveles de triglicéridos y bajos niveles de HDL-C,

además de una predominancia de LDL densa y pequeña ó fenotipo B. Es por esto que se vuelve esencial identificar factores de riesgo del síndrome metabólico y enfermedades coronarias en población joven tanto para el manejo de enfermedad como para la reducción de la prevalencia global de estas enfermedades. Adicionalmente a esto más del 39% de los niños estudiados se clasificaron con sobrepeso ó con obesidad tomando como referencia los estándares del CDC (18). También se midió la circunferencia de cintura en éstos niños y de acuerdo a los valores publicados para niños mexicanos (22) y para niños de Chipre (23), se encontró el mismo patrón de IMC. La correlación positiva detectada entre presión sanguínea diastólica y sistólica con el IMC también fue importante, sugiriendo que el peso corporal puede estar asociado con otros parámetros de enfermedad del corazón y obesidad en la población bajo estudio.

Los niveles elevados de TG y los bajos niveles de HDL-C presentes en este grupo de niños representan uno de los principales problemas en términos de biomarcadores de enfermedad crónica, debido a que ambos constituyen de forma independiente un factor de riesgo de enfermedad coronaria. Aunado a lo anterior, existe una alta prevalencia de LDL densas y pequeñas entre estos niños, así como también altas concentraciones de insulina en plasma. Adicionalmente, 11% de la población se clasificó como con resistencia a insulina a ésta temprana edad.

Elevadas concentraciones de TG están correlacionadas con un riesgo aumentado de padecer enfermedad coronaria. Se sabe que la apo CIII inhibe la hidrólisis de TG por la lipoproteína lipasa (24) disminuyendo la remoción de TG provenientes de VLDL ó de quilomicrones. De manera similar a nuestro estudio, otros han mostrado que las concentraciones de apo C-III en plasma correlacionan con niveles de triglicéridos (25) y se conoce que están aumentadas en individuos con hipertrigliceridemia (12). Los niveles de apo C-III de los niños de nuestro estudio fueron muy altos comparados con los valores

reportados para adultos (20,21), indicando que ambos factores de riesgo (elevadas apo C-III y elevados TG) están presentes en esta población.

Niveles bajos de HDL son mejores predictores para enfermedad coronaria que el colesterol total ó LDL-C (26). Concordando con la importancia de los niveles de HDL-C en el riesgo coronario, las recomendaciones del NCEP III han incrementado el punto de corte para niveles en riesgo tanto para hombres como para mujeres (> 40 mg/dL) para hombres y (>45 mg/dL) para mujeres (4). Las bajas concentraciones de HDL observadas en los niños de este estudio constituyen un factor de riesgo independiente para enfermedades coronarias y puede ser la principal razón de la prevalencia de enfermedades coronarias en la población adulta.

Además de las dislipidemias observadas en esta población, la alta prevalencia del fenotipo B contribuye a el factor de riesgo para enfermedad crónica en éstos niños. Esta bien documentado que el patrón B está asociado con una concentración elevada de TG, apo CIII y apo B, así como con una HDL disminuida (27) y está asociado con un aumento de 3 veces en el riesgo de enfermedad coronaria (28). El patrón B resulta en partículas LDL con una disminuida afinidad por los receptores LDL hepáticos, extendiendo el tiempo de permanencia en circulación, aumentando la migración hacia las células endoteliales, aumentando la propensión a ser oxidadas, un efecto estimulador en los macrófagos y un aumento en la actividad (29). Las LDL densas y pequeñas son también una característica prominente asociada con resistencia a insulina. Individuos que poseen predominantemente partículas LDL patrón B (partículas pequeñas) son más propensos a desarrollar el síndrome de resistencia a insulina. Esto es, la presencia de estos 3 biomarcadores en niños mexicanos respalda la alta prevalencia de diabetes tipo 2 en población adulta.

Efectos de la Dieta y Actividad Física en Enfermedades Crónicas

En este estudio hemos mostrado que las concentraciones de LDL-C en plasma son normales en los niños de esta región en edades de 8-12 años. Es decir, al parecer las altas concentraciones de LDL-C en plasma observadas en un alto porcentaje de población adulta son el resultado de la dieta que es típica de esta región de México. La ingesta de grasa total es mucho más alta que los valores reportados para niños que están en un riesgo alto de enfermedad cardiovascular (ECV) (30). Datos epidemiológicos claramente indican, que existe una fuerte correlación positiva entre el porcentaje obtenido de ácidos grasos saturados e incidencia de enfermedad coronaria (31). Por cada 1% de cambio en la ingesta de grasa saturada en relación al porcentaje de energía total consumida se puede esperar una fluctuación en LDL-C de 4.6 mg/dL (0.120mmol/L) (32). Por lo tanto, la alta prevalencia de enfermedades coronarias en esta población pueden en parte ser explicadas por los niveles de LDL-C en plasma resultado de una alta ingesta de ácidos grasos saturados, la cual empieza a muy temprana edad. Adicionalmente, los niños de este estudio tuvieron un nivel de actividad física moderada, medida a través de un pedómetro. Cuando se compara la actividad física de estos niños con otros valores reportados para niños usando un instrumento similar, el número de pasos registrados es mucho más bajo en el grupo de niños de nuestro estudio (33). Estudios en humanos han mostrado que incrementando la actividad física vía hacer caminata resulta en una mejoría del perfil de lipoproteínas (34), es decir que los bajos niveles de actividad física de los niños de este estudio pueden contribuir al detrimento del perfil de lípidos observado en la población adulta (2,3,5).

En resumen, este estudio muestra por primera vez que la alta prevalencia de factores de riesgo para padecer enfermedades crónicas presentes en la población adulta de ésta área de México se puede ver también en este grupo seleccionado de niños. De manera adicional, los resultados de

este estudio sugieren que existe un componente multifactorial para la presencia de enfermedades coronarias y diabetes tipo II que involucran tanto a factores genéticos como de estilo de vida.

TABLA 1. Edad, Índice de Masa Corporal, Presión Sanguínea, Actividad Física Medida como Pasos por día en Niños¹.

Variables	Todos los Niños (n=54)	Hombres (n=25)	Mujeres (n=29)
Edad (años)	10.4 ± 1.6	10.6 ± 1.6	10.2 ± 1.5
IMC (kg/m ²)	19.6 ± 3.8	20.9 ± 4.3 ^a	18.4 ± 2.9 ^b
Presión sistólica (mm Hg)	101.8 ± 6.1	102.5 ± 6.9	101.2 ± 5.3
Presión Diastólica (mm Hg)	63.9 ± 3.6	64.8 ± 3.9	63.0 ± 3.2
Actividad Física (pasos/día)	6344 ± 2822	6624 ± 2893	6113 ± 2793

¹ Valores son expresados como media ± DS para el número de niños indicado en el paréntesis. Valores en el mismo renglón con diferente subíndice son significativamente, determinado por prueba T de Student's ($p < 0.05$).

TABLA 2. Lípidos Plasmáticos, Apoproteínas, Relación LDL/HDL, Tamaño de LDL y Fenotipo de LDL de Niños.

Variables	Todos los Niños (n = 54)	Hombres (n=25)	mujeres (n=29)
Colesterol Total (mg/dL)	135.8 ± 16.2	138.5 ± 17	133.5 ± 16.6
LDL-Colesterol (mg/dL)	65.8 ± 18.5	66.5 ± 18.2	65.4 ± 19.3
HDL- Colesterol (mg/dL)	48.4 ± 8.1	50.3 ± 8.5	47.2 ± 7.7
Triglicéridos (mg/dL)	108.8 ± 33.6	110.6 ± 32.7	105.3 ± 33.6
Relación LDL/HDL	1.41 ± 0.51	1.36 ± 0.43	1.45 ± 0.58
Tamaño de LDL (nm)	26.33 ± 0.76	26.28 ± 0.93	26.30 ± 0.85
Patrón B (%)	69	71	69
Apolipoproteína B (mg/L)	604 ± 78	608 ± 81	601 ± 76
Apolipoproteína C-III (mg/L)	113 ± 23	113 ± 22	113 ± 25
Apolipoproteína E (mg/L)	34 ± 9	37 ± 13	33 ± 5

¹ Valores son expresados como media ± DS para el número de niños indicado en paréntesis.

Valores en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes, determinado por prueba T de Student's (p < 0.05).

TABLA 3. Ingesta de Diferentes Componentes de la Dieta de los Niños.

Variables	Todos los Niños (n = 54)	Hombres (n=25)	Mujeres (n=29)
Kilocalorías. Totales	1656 ± 241	1837 ± 348	1500 ± 248
Grasa Total (%) Energía Total	39.0 ± 3.8	39.1 ± 4.4	38.9 ± 3.3
Grasa Saturada (%)	12.0 ± 1.9	12.1 ± 1.9	11.8 ± 1.9
Grasa Monoinsaturada (%)	13.8 ± 1.9	13.9 ± 2.0	13.7 ± 1.7
Grasa Poliinsaturada (%)	8.5 ± 1.9	8.2 ± 1.8	8.7 ± 1.9
Carbohidratos (%)	47.1 ± 4.4	46.6 ± 4.4	47.6 ± 4.4
Proteínas (%)	16.8 ± 2.3	16.9 ± 2.1	16.7 ± 2.5
Fibra Dietaria (g/día)	18.1 ± 6.6	19.9 ± 7.2	16.5 ± 5.6
Colesterol Dietario (mg/d)	395.0 ± 62.6	424.2 ± 69.1	370.0 ± 43.7

¹ Valores expresados como media ± DS para el número de niños indicado en el paréntesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Posadas-Romero, C., Tapia-Conyer, R. & Lerman-Garber, I. (1995) Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population. *Atherosclerosis* 118:275- 284.
2. Vidal-Quintanar, R.L., Mendivil, R.L., Peña, M., & Fernandez, M.L. (1999) Lime-treated maize husks lower plasma LDL-cholesterol in normal and hypercholesterolemic adult men from northern Mexico. *Brit. J. Nutr.*81:281-288.
3. Romero, A.L., Romero, J.E., Galaviz, S. & Fernandez, M.L. (1988) Cookies enriched with psyllium and oat bran lower plasma LDL-cholesterol in normal and hypercholesterolemic men from Northern Mexico. *J. Am. Coll. Nutr.*17: 601-608.
4. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2001) *J. Am. Med Assoc.* 285:2486-2496.
5. Ballesteros, M.N., Cabrera, R.M., Saucedo, M.S., Yepiz-Plascencia, G.M. & Valencia M.E. (2001) Dietary fiber and life style influence serum lipids in free-living adult men. *J. Am. Coll. Nutr.* 20:649-655.
6. Bingham, S.A. (1988). The dietary assessment of individuals: methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Dietary Survey Method* 57:705-741.
7. Allain CC, Poon LC, Chan CS, Richard W & Fu. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20:470-475.
8. Warnick, G.R., Benderson, J. & Albers, J.J. (1982). Dextran-sulphate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin. Chem.* 28:1379-1388.

9. Friedewald, W.T., Levy, R.I. & Fredrickson, D.S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18:499-502.
10. Carr, T., Anderssen, C.J & Rudel, L.L. (1993) Enzymatic determination of triglycerides, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* 26:39-42.
11. Rifai, N. & King, M.E. (1986) Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A-I, A-II and B in serum. *Clin. Chem.* 32:957-960.
12. Freudenrich, A., Giroux, L.M., Tremblay, M., Krimbou, L., Davignon, J. & Cohn, J.S. (1997) Plasma lipoprotein distribution of apo C-III in normolipidemic and triglyceridemic subjects: comparison of the apo C-III to apo E ratio in different lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.* 38:1421-1432.
13. Cohn, J.S., Tremblay, M., Amiot, M., Bouthillier, D., Roy, M., Genest, J. & Davignon, J. (1996) Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-size remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:149-159.
14. Relijic R, Ries M, Anic N, Ries B (1992) New chromogen for assay of glucose in serum. *Clin Chem* 38: 522-525.
15. Lofgren
16. Haffner, S. M., Miettinen, H. & Stern, M. P. (1997) The Homeostasis Model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 20:1087-1092.
17. Ascaso, J.F., Romero, P., Real, J.T., Priego, A., Valdecabres, C. & Carmena, R. (2001) Insulin resistant quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med. Cin. (Barc)* 117:530-533.
18. Orden, C.L., Kuczmarski, R.J., Flegal, K.M. (2002) Centers for Disease Control and Prevention 2000 Growth Charts for United States: Improvements to the 1077 National Center for Health Statistics. *Pediatrics.*109: 45-60.

19. American Academic of Pediatrics. National Cholesterol Education Program. Report of the Expert Panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. (1992) *Pediatrics* 89:525-584.
20. Herron, K.L, Vega-Lopez, S., Ramjiganesh, T., Conde-Knape, K., Shachter, N. & Fernandez, M.L. (2003) Men classified as hypo- or hyper-responders to dietary cholesterol feeding exhibit differences in lipoprotein metabolism. *J. Nutr.* 133:1036-1042.
21. Vega-Lopez S, Conde K, Vidal-Quintanar RL, Shachter N & Fernandez ML. 2002. Sex and Hormonal Status Influence the Effects of Psyllium on Lipoprotein Remodeling and Composition. *Metab. Clin Exp.* 51:500-507.
22. Del Río- Navarro, B.E., Velázquez-Monroy, O., Sanchez-Castillo, C.P., Lara-Esqueda, A., Berber, A., Fanghanel, G., Violante, R., Tapia-Conyer, R. & James, W.P. (2004) The high prevalence of overweight and obesity in Mexican children. *Obes. Res.* 12:215-223.
23. Savva, S.C., Kourides, Y., Tornaritis, M., Epiphaniou-Savva, M., Tafouna, P. & Kafatos, A. (2001) Reference growth curves for Cypriot children 6 to 17 years of age. *Obes. Res.* 9: 754-762.
24. Shachter, N.S. (2001) Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 12:297-304.
25. Sacks, F.M., Alaupovic, P., Moye, L.A., Cole, T.G., Sussex, V., Stampfer, M.J., Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. (2000) VLDL, Apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation.* 102:1886-1892.
26. Alessandri, C., Basili, S., Peverini, F., Barsi, R., Paradiso, M., Coppotelli, L., Violi, F. & Cordova, C. (1992) High density lipoprotein cholesterol low serum level as the only risk factor in male patients with coronary heart disease. *Clin. Ter.* 141:109-114.

27. Dreon, D.M., Fernstrom, H.A., Williams, P.T. & Kraus, R.M. (1999). A very-low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 69:411-418.
28. Gardener, C.D, Fortmann, S.P. & Krauss, R.M. (1996) Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am Med Assoc.* 276:875-881.
29. Sevanian, A., Asatryan, L. & Ziouzenkova, O. (1999) Low density lipoprotein modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood Purif.* 17:66-78.
30. Kelley, C., Krummel, D., Gonzalez, E.N., Neal, W.A & Fitch CW. (2004) Dietary intake of children at high risk for cardiovascular disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 104:222-225.
31. Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Giampaoli, S. & Jansen, A. (1995) Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the seven countries study. *Prev. Med.* 24:308-315.
32. Howell, W.H., McNamara, D.J., Tosca, M.A., Smith, B.T. & Gaines, J.A. (1997) Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 65:1747-1764.
33. Loucaides, C.A., Chedzoy, S.M. & Bennett, N. (2002) Differences in physical activity levels between urban and rural school children in Cyprus. *Health Ed. Res.* 19:138-147.
34. Nicklas, B.J., Dennis, K.E., Berman, D.M., Lynch, N.A. & Dennis, K.E. (2003) Lifestyle intervention of hypocaloric dieting and walking reduces abdominal obesity and improves coronary heart disease risk factors in obese, postmenopausal, African-American and caucasian women. *J. Geront.* 58A:181-189.

CAPÍTULO III
EL COLESTEROL DIETARIO NO INCREMENTA LOS BIOMARCADORES DE
ENFERMEDADES CRÓNICAS EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA EN EL
NORTE DE MEXICO

RESUMEN

Antecedentes: En el Norte de México existe una alta prevalencia de enfermedades coronarias. Los efectos de componentes dietarios específicos en factores de riesgo de enfermedades coronarias CAD no han sido evaluados en niños.

Objetivo: El propósito fue evaluar el efecto del colesterol dietario provuelto por huevo entero en el perfil de lipoproteínas, tamaño de LDL y fenotipo en niños de esta región.

Diseño: Un grupo de niños (29 niñas y 25 niños en edades de 8-12 años) fueron aleatoriamente asignados ya sea a el tratamiento de 2 huevos diarios (período de huevo 518 mg de colesterol adicional) ó la cantidad equivalente de clara de huevo (período de sustituto de huevo, 0 mg de colesterol adicional) por 30 días. Después de un período de 3 semanas de descanso los niños se asignaron al tratamiento alterno.

Resultados: Los sujetos se clasificaron como hiposensibles (sin aumento ó \leq 2.2 mg/dL de aumento en el colesterol del plasma por cada 100 mg adicionales

CAPÍTULO III
EL COLESTEROL DIETARIO NO INCREMENTA LOS BIOMARCADORES DE
ENFERMEDADES CRÓNICAS EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA EN EL
NORTE DE MEXICO

RESUMEN

Antecedentes: En el Norte de México existe una alta prevalencia de enfermedades coronarias. Los efectos de componentes dietarios específicos en factores de riesgo de enfermedades coronarias CAD no han sido evaluados en niños.

Objetivo: El propósito fue evaluar el efecto del colesterol dietario provecto por huevo entero en el perfil de lipoproteínas, tamaño de LDL y fenotipo en niños de esta región.

Diseño: Un grupo de niños (29 niñas y 25 niños en edades de 8-12 años) fueron aleatoriamente asignados ya sea a el tratamiento de 2 huevos diarios (período de huevo 518 mg de colesterol adicional) ó la cantidad equivalente de clara de huevo (período de sustituto de huevo, 0 mg de colesterol adicional) por 30 días. Después de un período de 3 semanas de descanso los niños se asignaron al tratamiento alterno.

Resultados: Los sujetos se clasificaron como hiposensibles (sin aumento ó \leq 2.2 mg/dL de aumento en el colesterol del plasma por cada 100 mg adicionales

de colesterol dietario) ó hipersensibles (≥ 2.5 mg/dL de incremento). Durante el período de huevo, los hipersensibles ($n= 18$) tuvieron una elevación tanto en LDL-colesterol (de 59.59 ± 14.61 a 74.69 ± 13.93) como en HDL-colesterol (de 47.60 ± 10.06 a 52.24 ± 11.23) y no hubo cambios en la relación LDL: HDL. Por el contrario, los hiposensibles ($n= 36$) no tuvieron alteraciones significativas en las concentraciones plasmáticas de LDL ó HDL. Todos los sujetos tuvieron un incremento en el diámetro del pico de LDL durante el período de huevo ($p < 0.01$) y un decremento ($p < 0.01$) en la subfracción de la LDL pequeña. Adicionalmente, 5 de los niños que tenían fenotipo B ó LDL pequeña (15% de la muestra) cambiaron de patrón B de alto riesgo a patrón A después de consumir el tratamiento con huevo.

Conclusiones: El consumo de 2 huevos /día provoca que se mantenga la relación LDL: HDL y que se generen partículas LDL menos aterogénicas en esta población de niños Mexicanos.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza multifactorial de las enfermedades arterio coronarias (EAC) comprende factores de riesgo no modificables y modificables. Las dislipidemias, incluyendo concentraciones elevadas de LDL colesterol y triglicéridos, así como también bajas concentraciones de HDL colesterol (1) y la presencia de LDL densas y pequeñas representativas de el patrón B (2), tienen una contribución significativa en la incidencia de EAC.

El principal tratamiento para modificar estos factores de riesgo debe ser cambiar hábitos dietarios, incrementar el ejercicio aeróbico y mantener el peso corporal. Algunas de las recomendaciones dietarias incluyen disminución en la ingesta de grasa saturada y colesterol y un aumento en los carbohidratos complejos y fibra dietaria. Sin embargo, hay una vasta controversia alrededor del colesterol dietario y la prevención de enfermedades (3). Es bien conocida la variabilidad que existe en la respuesta al colesterol dietario entre los individuos; por ello, algunos estudios han examinado la interacción dieta - gen a fin de poder explicar la variabilidad en la respuesta a la ingesta de colesterol (4).

En el noroeste de México se ha encontrado que hay una alta prevalencia de enfermedades arterio coronarias, resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (5). No está claro si los biomarcadores para enfermedades crónicas pueden ser identificados durante la niñez y si el estilo de vida elegido en el tiempo juega un papel significativo en la prevalencia de enfermedades crónicas en la población adulta. Por esta razón es necesario realizar estudios en esta población enfocados a entender la causa de las EAC y la contribución de los factores de riesgo modificables en las enfermedades crónicas.

Un análisis de múltiples estudios de alimentación con colesterol, conducidos desde hace 50 años ha mostrado que un modesto incremento en el colesterol total de 2.2 a 2.5mg/dL puede ser predecido por cada 100 mg/colesterol diarios adicionales en la dieta de colesterol (6). Si este

incremento moderado es empleado como referencia, aquellos que experimentan una elevación ≥ 2.5 mg/dL en colesterol del plasma pueden ser clasificados como hipersensibles, mientras que, los hiposensibles pueden ser aquellos que no presentan cambios ó que tienen un incremento ≤ 2.2 mg/dL en respuesta a los 100 mg adicionales de colesterol en la dieta. En reportes previos en hombres adultos y mujeres menopáusicas, se mostró la presencia de 2 distintas poblaciones (7,8). Por ello, se volvió muy importante identificar si en una población pediátrica los niños pueden ser clasificados similarmente.

Si bien el huevo es un alimento central en la dieta de los mexicanos, que incluye a todas las clases de nivel socioeconómico, poco se conoce acerca de la respuesta de los lípidos del plasma al colesterol dietario en una población pediátrica. Si la ingesta de huevo realmente tiene implicaciones negativas en la salud, podría esperarse que el consumo resultara en un detrimento del perfil de lipoproteínas y en el desarrollo de una partícula LDL más aterogénica. Por ello, el propósito de la presente investigación fue evaluar el efecto del colesterol dietario en los lípidos del plasma y la aterogenicidad de la LDL en una población pediátrica (niños en edad de 8-12 años) de una región de México donde se han identificado dislipidemias significativas en adultos (9).

SUJETOS Y METODOS

Materiales

Se adquirieron kits de colesterol enzimático y triglicéridos de Roche-Diagnostics (Indianápolis, IN, USA). De la compañía Wako Pure Chemical (Osaka, Japón) se adquirieron kits para colesterol libre, apolipoproteína B (apo B) y apo E enzimática. De Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) se obtuvieron: EDTA, aprotonina, azida de sodio y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). Las balanzas para pesar alimentos fueron compradas en Ohaus Corporation (Pine

Brook, NJ, USA). los huevos se adquirieron en Pecuaria Sonorense, Hermosillo, Sonora, México, y el colorante en polvo de flor de zempazuchitl de laboratorios Castells, Ciudad de México.

Sujetos y Diseño Experimental

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Connecticut en Estados Unidos así como también por el Comité de Ética del Centro de Investigación y desarrollo A.C. (Hermosillo, Sonora, México). Los padres de los niños participantes del estudio asistieron a reuniones de información y firmaron una forma de consentimiento. Los niños también recibieron una explicación a detalle del protocolo. En el trabajo participaron 60 niños (30 niños y 30 niñas) en edades de 8 a 12 años de edad que asistían a la escuela primaria Mauricio Kelly localizada en un barrio de la periferia de la Cd. de Hermosillo, Sonora, México. Los niños fueron aleatoriamente asignados a dos tratamientos huevo (HUEVO) y sustituto de huevo (SUS) durante 30 días con un período de descanso de 3 semanas seguido por la dieta alternativa. Los niños consumieron diariamente 110 g de huevo (2 huevos diarios) (518 g de colesterol dietario adicional) ó la cantidad equivalente de clara de huevo (0 mg adicionales de colesterol dietario) con color adicionado (SUS). La clara de huevo se coloreo con un polvo comercial (10 mg/100 g de huevo) derivado de flor de zempazuchitl, la cual es rica en luteína.

Tanto el huevo como el sustituto de huevo se prepararon en forma de huevo revuelto y se les sirvió a cada uno de los niños como desayuno durante cada mañana en el comedor de la escuela. Los niños se dividieron en dos grupos, los cuales tuvieron diferentes arreglos en las sillas para evitar discusión en las diferencias potenciales del color entre los productos (huevos y sustituto). Para el fin de semana los huevos se empacaron y se enviaron a casa con los niños. Los padres fueron cuidadosamente instruidos antes de que iniciara la intervención de cómo debía ser su alimentación durante los periodos

correspondientes. Los padres fueron monitoreados muy cercanamente y entrevistados algunas veces para asegurarse que siguieran propiamente las instrucciones. El apego fue de más del 98% durante la semana y bajo supervisión de los padres. Adicionalmente para evaluar la actividad física, los niños llevaron un pasómetro unido a su ropa durante una semana para registrar el número de pasos. Las etapas fueron registradas en línea basal, durante el periodo de huevo y durante el periodo de SUS. Un total de 54 niños (29 niñas y 25 niños) completaron el estudio.

A los niños se les cuestionó acerca de su dieta regular durante ambos periodos dietarios. Se utilizó un registro pesado de alimentos de 3 días y con ello se evaluó la ingesta dietaria de macronutrientes y colesterol dietario durante ambos periodos (10). Tanto a los niños como a las personas encargadas de preparar la comida en casa, se les proveyó con una balanza para pesar alimentos (Ohaus CS 2000) y un cuaderno de registro para la ingesta diaria. A los padres se les instruyó en como llenar los registros, y los investigadores a cargo del estudio trabajaron muy estrechamente con los niños para documentar la ingesta de alimentos durante el día. La ingesta dietaria se analizó con la base de alimentos ESHA Food Processor program (ESHA, Food Processor, 7.20, ESHA Research Editor, 1998, Salem, OR USA), los alimentos regionales que no están incluidos en esta base de datos se les analizó el contenido de componentes individuales y se agregaron a dicha base de datos. Estos alimentos incluyen, golosinas, frijoles preparados en tres diferentes formas (secos, caldudos y guisados), tipos de carnes específicas, harina y tortillas de harina, vísceras y dulces, los cuales fueron regularmente consumidos por los niños.

Lípidos del Plasma y Apolipoproteínas

De cada niño se obtuvieron dos muestras de sangre en ayuno (12 h) en dos diferentes días. La sangre se extrajo en tubos conteniendo 0.15 g/100g

EDTA para determinar los lípidos del plasma a nivel basal. El plasma se separó por centrifugación a 1500 x g por 20 min. a 4°C y se colocó en viales conteniendo fenil metil sulfonil fluoruro (0.05 g/ 100g), azida de sodio (0.01g /100g), y aprotonina 0.01g/100g). Adicionalmente se obtuvieron dos muestras de sangre al final de cada tratamiento y del período de observación. Las variables de peso corporal, presión sanguínea, y actividad física fueron medidas a nivel basal y después de cada período dietario, con el fin de tomar en cuenta la posible influencia de estos factores en los lípidos del plasma.

El colesterol total se determinó por método enzimático empleando kits y estándares de Roche- Diagnostics (11). La HDL colesterol se midió en el sobrenadante después de la precipitación de las lipoproteínas conteniendo apo B (12) y el LDL colesterol se determinó a través de la ecuación de Friedewald (13). Los triglicéridos se determinaron con kit de Roche-Diagnostics, los cuales se ajustan para glicerol libre (14). Para evaluar diferencias entre tratamientos en los dos períodos se tomó la media de las 2 tomas de sangre. Las concentraciones de apoproteína B se determinaron por un método inmunturbidimétrico y la turbidez se midió en un lector de placas de ELISA a 340 nm (15). La apoproteína CIII (16) y la apoproteína E (17) fueron medidas con un autoanalizador Hitachi a 740 utilizando kits de la Cia. Wako.

Determinación del Tamaño de LDL

Para determinar el diámetro del pico de partícula de LDL y la distribución de subclases se empleó el sistema Lipoprint LDL (Quantimetrix, Redondo Beach, CA), el cual emplea electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución sin gradiente. Brevemente. Se agregaron 25 µl del plasma a tubos prellenados con gel de poliacrilamida los cuales se cubrieron con 20 µl de buffer de carga, los tubos fueron después fotopolimerizados por aproximadamente 30 min para después ser colocados en una cámara de electroforesis. El buffer de electroforesis (Tris-hydroximetil aminometano: 66.1 g/100g; ácido bórico: 33.9 g/100g; pH 8.2-8.6) se agregó de manera que cubriera desde el fondo hasta la

superficie de la cámara. El gel se corrió por aproximadamente 60 min a 36 mV ó hasta que la fracción HDL estuvo aproximadamente a 1 cm del final del tubo. Se dejó que los geles reposaran por 30 min. y después fueron escaneados en un densitómetro. El sistema Lipoprint cuantifica 6 diferentes subclases de LDL de acuerdo al tamaño. Muchos individuos no tienen LDL-4, LDL-5 y LDL-6 en una cantidad que puede ser detectada; es por ello, que en este estudio únicamente se reportan 3 fracciones. Sin embargo, para aquellos sujetos que acarrean cantidades detectables en las fracciones de LDL pequeñas, estas concentraciones fueron adicionadas a la fracción LDL-3.

Análisis de Datos

Se utilizó la versión 11.5 del SSPS para el análisis estadístico. Para comparar las características iniciales entre niños y niñas se utilizó una prueba T de Student's. El análisis inicial reveló que no hubo diferencias significativas debido al sexo en la respuesta al colesterol dietario ó en cualquier otro parámetro medido. Esto es, para mejorar la claridad en la presentación de los datos hombres y mujeres se incluyeron en un solo "pool" de acuerdo a su clasificación para el análisis estadístico. Para analizar los lípidos plasmáticos a nivel basal entre niños y niñas hipo e hipersensibles se utilizó un análisis de varianza de dos caminos ANOVA. Un análisis de variancia (ANOVA) con Mediciones -Repetidas se utilizó para analizar los efectos de la dieta, efectos de respuesta, y las interacciones para lípidos del plasma, apolipoproteínas, componentes dietarios, distribución del colesterol en las subfracciones de LDL y tamaño del pico de LDL. Cada uno de los niños durante ambos periodos dietarios fue su propia repetición mientras que la comparación entre grupos fue entre hiposensibles e hipersensibles. Una probabilidad de $p \leq 0.05$ se considero estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Las características basales de los niños [niveles de lípidos plasmáticos, niveles de actividad física, presión sanguínea e índice de masa corporal (BMI)] clasificadas por sexo se presentan en la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en cuanto a la edad. Adicionalmente, también se determinó que el sexo no tuvo una influencia en los niveles basales de colesterol total, LDL colesterol, HDL colesterol ó triglicéridos del plasma, ni tampoco en su nivel de actividad física ó presión sanguínea.

Los niños de esta población se caracterizaron por tener un valor de HDL colesterol en el percentil 25 de acuerdo al reporte del Programa Nacional del Colesterol en Estados Unidos (NECP) y un a concentración plasmática de triglicéridos en el percentil 95(18). Por el contrario la LDL colesterol y el colesterol total se encontraron en el percentil 50 para niños en éste rango de edad (18).

Como previamente mencionamos, un modesto incremento en el colesterol total de 2.2 a 2.5 mg/dL pueden ser considerados normales en respuesta a 100 mg diarios adicionales de colesterol dietario (19). En base a datos obtenidos en estudios previos (7, 8) y de nuestra evaluación en este grupo de niños mexicanos, los sujetos que experimentaron un aumento en el colesterol total ≥ 2.5 mg/dL por cada 100 mg adicionales de colesterol dietario se consideraron ó clasificaron como hipersensibles (Figura 1).

Debido a que los niños fueron alimentados con 518 mg de colesterol dietario adicionales a su dieta durante el periodo de huevo, aquellos niños que experimentaron un aumento de colesterol plasmático de 12.8 mg/dL fueron considerados como hipersensibles. El resto de los sujetos que experimentó fluctuaciones de menos de 11 mg/dL (un incremento en el colesterol total de ≤ 2.2 por cada 100 mg de colesterol adicional consumido) ó no tuvo cambios en el colesterol plasmático fueron identificados como hiposensibles.

Después de que los niños fueron colocados según su clasificación, se analizaron los datos a fin de determinar si los lípidos del plasma diferían a nivel basal. Ambos, niños y niñas clasificados como hipo ó como hipersensibles no presentaron diferencias significativas en relación a sus características basales para las concentraciones de LDL colesterol, HDL colesterol y triglicéridos plasmáticos ó para otros parámetros evaluados, incluyendo el nivel de ejercicio, presión sanguínea ó IMC (datos no mostrados).

Como se muestra en la Tabla 2, esta población de niños se caracterizó por consumir una dieta alta en grasa independientemente del periodo dietario. El porcentaje de energía derivado de grasa total y grasa saturada estuvo en un rango de 37 a 43% y de 10.5 a 13.6% respectivamente. Por el contrario el porcentaje de carbohidratos fue bajo estando en un rango de 42 a 49%. Mucho de la elevada cantidad de grasa incluida en la dieta de ésta población, se debe al consumo de productos cárnicos de bajo costo altos en grasa, incluyendo además carne alta en grasa, pollo con piel, chorizo y hot-dogs altos en grasa, además de, aceite hidrogenado el cual es utilizado en la preparación de tortillas (20). Sin embargo, la cantidad de fibra dietaria en la dieta es adecuada y puede ser debida al alto consumo de tortillas y frijol (20).

En relación a la respuesta de clasificación, la cantidad de calorías totales consumidas no fue diferente para hipersensibles ó hiposensibles durante ambos periodos dietarios. El porcentaje de calorías derivado de carbohidratos y proteínas fue más alto durante el periodo SUS ($p \leq 0.01$, Tabla 2). Adicionalmente los niños hipersensibles consumieron menos carbohidratos durante el periodo de huevo que los hiposensibles en el mismo periodo y también más que cada grupo durante el periodo SUS (efecto interactivo $p < 0.05$). En contraste, el porcentaje de calorías derivado de grasa y ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) fueron más altos durante el periodo de huevo ($p < 0.05$). Los ácidos grasos saturados (SFA) no fueron diferentes en los niños hipersensibles entre dietas. Los niños hiposensibles durante el periodo SUB

consumieron menos porcentaje de energía proveniente de ácidos grasos saturados que en el periodo de huevo, incluso el porcentaje fue menor que el consumido por los hipersensibles en ambos periodos.

El análisis estadístico efectuado mostró que existían diferencias significativas (un efecto interactivo de dieta y clasificación) en el consumo de grasa total y grasa monoinsaturada de los niños hipersensibles entre el periodo de huevo y el periodo SUS; así como también con respecto al consumo de estos componentes de los niños hiposensibles durante ambos periodos ($p < 0.05$). El porcentaje de calorías derivadas de ácidos grasos polinsaturados y la cantidad de fibra total no fueron diferentes entre periodos dietarios (Tabla 2).

Tal y como se esperaba, la cantidad de colesterol dietario fue significativamente más alta para todos los niños durante el periodo de huevo y esto es principalmente fue debido a los 518 mg adicionales de colesterol dietario proveído por la yema del huevo (Tabla 2). El consumo de vitamina E fue significativamente más alto durante el periodo de huevo, indicando la importancia del huevo entero en la contribución de los valores recomendados de 8 mg para las niñas y de 10 mg para los niños.

Otras variables tales como el nivel de actividad física, fluctuaciones en el peso corporal ó cambios en la presión sanguínea, los cuales podrían influenciar los lípidos del plasma, fueron analizados durante ambos periodos dietarios. Como se indicó en la Tabla 3, no se observaron diferencias significativas en el número de pasos dados por días, presión sistólica ó IMC entre hiposensibles ó hipersensibles durante el periodo de huevo ó de SUS. Interesantemente, se observó que la presión diastólica fue más baja durante el periodo de huevo tanto en hipersensibles como en hiposensibles (efecto de la dieta, $p < 0.05$; Tabla 3).

Después de clasificar la respuesta de los niños al colesterol dietario como hiper ó hipo sensibles, se evaluaron los datos de lípidos del plasma y

las apoproteínas. Como se muestra en la Tabla 4 hubo un efecto de la dieta ($p < 0.001$) y un efecto de la respuesta ($p < 0.001$) tanto en LDL colesterol como en HDL colesterol. También, se observó un efecto interactivo en los niños hipersensibles con altas concentraciones de LDL ($p < 0.01$) y HDL ($p < 0.05$) durante el período de huevo, sin cambios significativos en los hiposensibles. La relación colesterol total: HDL (Tabla 4) y la relación LDL: HDL, importantes marcadores de factor de riesgo de infarto coronario, se mantuvieron durante el período de huevo y también en el período SUS en todos los participantes. La relación LDL: HDL fue de 1.49 ± 0.45 (período de huevo) y 1.31 ± 0.41 (período SUS) para hipersensibles y 1.57 ± 0.49 (período de huevo) y 1.56 ± 0.44 (período SUS) para hiposensibles. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de apo B plasmáticas entre hipersensibles e hiposensibles ni entre ingesta de huevo ó sustituto (Tabla 4). Asimismo, las concentraciones de la apo CIII y apo E no cambiaron durante ningún periodo dietario. Los valores para apo CIII fueron de 121 ± 31 (período de huevo) y 115 ± 24 mg/L (período SUS) para hipersensibles y 106 ± 26 (período de huevo) y 115 ± 37 mg/L (período SUS) para hiposensibles. Las concentraciones de apo E en plasma fueron de 38 ± 14 (período de huevo) y de 33 ± 6 mg/L (período SUS) para hipersensibles y de 35 ± 15 (período de huevo) y 33 ± 8 mg/L (período SUS) para hiposensibles.

En cuanto al análisis de las subfracciones de LDL, en el Tabla 5 se puede observar un análisis detallado así como su diámetro del pico. De los 54 niños que fueron analizados 34 de ellos, es decir el 63% presentaron un patrón B asociado con la LDL densa y pequeña (LDL-3) durante el periodo SUS. Sin embargo, 5 de estos niños durante el período de huevo cambiaron de patrón B a patrón A. El diámetro del pico de LDL fue más grande durante el periodo del huevo y este hallazgo se asoció con un aumento en la concentración de LDL colesterol en la fracción más grande (LDL-1) ($p < 0.01$). La subfracción LDL-2 no se vio afectada por la dieta ó por la clasificación de la respuesta, mientras

que los niños tuvieron una concentración más grande de la subfracción LDL-3 durante el periodo SUB. La ausencia de cambios en las concentraciones de apo B sugiere que el número de partículas LDL no se modificó por la dieta (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con las observaciones de un tamaño aumentado en las partículas LDL de los hipersensibles durante el periodo de huevo.

aumentos en LDL colesterol en los hipersensibles. Sin embargo, los hiposensibles no tuvieron modificaciones significativas en sus concentraciones promedio de LDL colesterol durante el período de huevo (23). Parte de éstos resultados podría ser explicado en base al tipo de grasa consumida. En dietas en las cuales se reemplaza SFA con MUFA ó con ácidos grasos polinsaturados, el resultado es una disminución en las concentraciones de LDL colesterol tanto como un 15% (24). En éste estudio los niños hipersensibles fue el grupo que reportó un aumento significativo en la ingesta de MUFA durante el período de huevo. Estos hallazgos sugieren que mucho de las fluctuaciones observados en el compartimiento del plasma son manejados por la contribución de colesterol del huevo en la dieta. Otros cambios significativos durante el período del huevo fue una disminución en la ingesta de energía derivado de carbohidratos y proteínas, lo cual fue debido principalmente al reemplazo de éstos nutrientes por grasa dietaria. La fibra dietaria, un factor bien conocido que influencia las concentraciones de colesterol en plasma (25), no fue diferente entre períodos.

Lípidos del Plasma

En este estudio tanto niños como niñas hipersensibles experimentaron aumentos significativos en LDL como en HDL colesterol como resultado de la carga del colesterol dietario, mientras que las apolipoproteínas del plasma no se alteraron. El aumento observado en la concentración de LDL colesterol, por si solo, no sugiere que esta población haya incrementado su riesgo de enfermedad arterio coronaria. La remodelación intravascular de las lipoproteínas, también como la relación colesterol total: HDL y LDL: HDL constituyen fuertes indicadores de riesgo, y en el presente estudio, ambas relaciones se mantuvieron durante ambos períodos en los niños hipersensibles. Concordando con nuestros resultados, otros estudios han mostrado que elevaciones en el colesterol del plasma atribuidas al colesterol dietario son

debidas a un aumento en la partícula LDL aterogénica también como en la fracción de HDL, la cual funciona en una forma protectora (7,8,26-32). Los hallazgos de éste estudio indican que los niños hipersensibles podrían aumentar su HDL colesterol para promover la ruta del colesterol reverso por movilización del exceso de colesterol del plasma hacia el hígado, el principal sitio de eliminación de colesterol del cuerpo.

Colesterol Dietario y Aterogenicidad de LDL

Esta bien establecido que la aterogenicidad de la partícula LDL es un importante indicador de riesgo de enfermedad arterio coronaria. Una predominancia de partículas de LDL en el patrón B ha mostrado estar asociada con un aumento de 3 veces de riesgo de enfermedad arterio coronaria (33,34), lo anterior puede ser debido a la facilidad con que pueden ser captadas por la pared arterial y también por su alta susceptibilidad a la oxidación (32). Queda claro, tomando en cuenta la distribución del colesterol hacia partículas más grandes y el cambio de alguno de los sujetos del fenotipo B a uno menos aterogénico fenotipo A que la carga de colesterol dietario redujo la aterogenicidad de la LDL. Estos resultados se vuelven más importantes a la luz de la predominancia significativa del fenotipo B en esta población de niños. La falta de cambios en las concentraciones de apo B durante el periodo de huevo enfatizaron que el aumento en el LDL colesterol de los niños hipersensibles no fue debido a un aumento en el número de partículas circulando, sino a un aumento en el tamaño de la LDL.

Los hallazgos de estudios en gemelos contradicen la posibilidad de un completo control genético sobre el fenotipo LDL (35) y sugieren que la predeterminación genética del fenotipo LDL pudiera ser modificable por factores ambientales tales como la edad, sexo, adiposidad, composición de la dieta, hormonas y fármacos (36). En éste estudio, hemos demostrado que la composición de macronutrientes del huevo modificó el fenotipo cambiando

predictor de la progresión de la aterosclerosis (44, 45). De hecho, el estudio de Cohorte Cardiovascular de Québec (46) el cual examinó 2034 hombres, encontró que la predominancia de partículas LDL con un diámetro de pico de < 25.5 nm se asoció positivamente con un aumento en el riesgo de enfermedad arterio coronaria (riesgo relativo = 4.6, $p < 0.001$). Si el método tradicional de evaluación de riesgo fuera a ser usado, los hipersensibles en éste estudio se podría esperar tuvieran un riesgo incrementado después de la ingesta de huevo debido a la elevación resultante en LDL colesterol. Sin embargo, se encontró que ésta población tiene una predominancia de subclases LDL-1 después del consumo de huevo. Estos hallazgos claramente ilustran la discrepancia existente entre el uso de concentraciones de LDL colesterol y el tamaño de partícula como predictor de enfermedad de riesgo.

En conclusión, los resultados de éste estudio claramente indican que la ingesta de huevo por una población de niños con biomarcadores distintivos de enfermedad arterio coronaria y resistencia a insulina no tiene implicaciones de salud negativas en relación a aterogenicidad de LDL: HDL ó aterogenicidad de LDL.

TABLA 1. Características Basales de Niños y Niñas Participantes del Estudio

Variables	Niños (n=25)	Niñas (n=29)	Valor p
Edad (años)	10.6 ± 1.6	10.2 ± 1.5	N.S.
Actividad Física(pasos/día)	6624 ± 2893	6113 ± 2793	NS
IMC (kg/m ²)	20.9 ± 4.3 ^a	18.4 ± 2.9 ^b	p < 0.05
Presión Sanguínea Sistólica (mmHg)	102.5 ± 6.9	101.2 ± 5.3	N.S.
Presión Sanguínea Diastólica (mmHg)	64.8 ± 3.9	63.0 ± 3.2	N.S.
Colesterol Total (mg/dL)	139.3 ± 17	133.9 ± 16.6	N.S.
LDL-colesterol (mg/dL)	66.5 ± 18.5	65.4 ± 19.35	N.S.
HDL-colesterol (mg/dL)	50.4 ± 8.5	47.2 ± 7.7	N.S.
Triglicéridos (mg/dL)	111.5 ± 32.7	107 ± 34.5	N.S.
Relación LDL/HDL	1.36 ± 0.43	1.45 ± 0.58	N.S.

¹Datos son presentados como media ± DS. Valores en el mismo renglón con diferente superíndice son significativamente diferentes, determinado por prueba T Student's.

TABLA 2. Ingesta de Carbohidratos (CHO), Proteínas (PRO), Grasa total, Acidos Grasos Saturados (SAT), Polinsaturados (PUFA) y Monoinsaturados (MUFA), Colesterol Dietario, Fibra Dietaria y Vitamina E de Hiper e Hipo-Sensibles Durante los Periodos de Huevo y SUS

Componente Dietario	Hiper-Sensibles			Hipo-Sensibles			Valor de P		
	HUEVO	SUB	SUB	HUEVO	SUB	SUB	Efecto Dieta	Efecto Respuesta	Interacción
Total Kjoules	6765 ± 1592	7182 ± 1610	7240 ± 1997	6583 ± 1797	NS	NS	NS	NS	NS
%Energía CHO	42.8 ± 3.8	47.8 ± 8.3	46.4 ± 7.6	49.0 ± 7.5	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
%Energía PRO	14.4 ± 2.2	18.5 ± 3.1	15.0 ± 3.4	18.8 ± 3.9	<0.01	NS	NS	NS	NS
%Energía Grasa Total	43.1 ± 3.7	38.3 ± 6.1	39.2 ± 5.5	37.1 ± 6.3	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
% Energía SAT	13.6 ± 2.0	12.0 ± 3.0	12.6 ± 2.4	10.5 ± 2.4	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
% Energía PUFA	8.8 ± 1.9	7.6 ± 2.3	8.4 ± 2.3	9.2 ± 3.3	NS	NS	NS	NS	NS
% Energía MUFA	15.5 ± 2.2	13.3 ± 3.2	13.7 ± 3.0	13.2 ± 2.8	<0.05	NS	NS	NS	<0.05
Colesterol Dietario (mg/d)	602.8 ± 75.4	175.1 ± 144.3	663.8 ± 101.7	132.3 ± 67.6	<0.001	NS	NS	NS	NS
Fibra Total (g/d)	19.3 ± 6.1	19.6 ± 7.9	16.6 ± 9.1	18.2 ± 7.5	NS	NS	NS	NS	NS
Vitamina E (mg/d)	14.6 ± 5.9	6.2 ± 3.1	14.8 ± 10.0	5.7 ± 2.2	<0.001	<0.001	NS	NS	NS

¹ Valores son expresados como media ± DS para n= 18 hiper-sensibles 36 hipo-sensibles.

TABLA 3. Índice de Masa Corporal, Números de Pasos por día y Presión Sanguínea Sistólica y Diastólica de Hipo e Hiper Sensibles Durante los Periodos de Huevo y SUS ¹

	IMC (kg/m ²)	Presión Sistólica (mm Hg) ²	Presión Distólica (mm Hg)	Número de Pasos /día
Hiposensibles				
HUEVO	19.8 ± 4.1	100.2 ± 7.2	62.3 ± 3.2 ^a	6847 ± 3353
SUS	19.8 ± 3.9	100.3 ± 7.4	64.7 ± 4.0 ^b	6818 ± 2980
Hipersensibles				
HUEVO	19.5 ± 3.6	102.9 ± 7.4	63.4 ± 4.5 ^a	6642 ± 3268
SUS	19.4 ± 3.8	101.9 ± 6.7	64.7 ± 5.2 ^b	6504 ± 3394

¹ Valores son presentados como media ± DS para N = 18 hiper- y N=36 hipo sensibles. No hubo diferencias significativas en el IMC, presión sistólica y número de pasos por día debido al periodo dietario ó clasificación de respuesta al colesterol dietario.

² La presión sanguínea sistólica fue más baja durante el periodo de huevo, analizado por ANOVA con mediciones repetidas (p < 0.025).

TABLA 4. Lípidos Plasmáticos, Relación de Lipoproteínas y Concentraciones de apo B de Hiper e Hipo Sensibles Durante los Periodos de HUEVO y SUS¹

	LDL-C	HDL-C	TG	LDL/HDL	Apo B
	mg/dL				g/L
Hipersensibles					
HUEVO	74.9 ± 4.1 ^a	52.3 ± 11.1 ^a	88.5 ± 60.2 ^a	1.49 ± 0.45 ^a	606 ± 96 ^a
SUS	59.9 ± 4.9 ^b	47.9 ± 10.2 ^b	90.3 ± 32.7 ^a	1.31 ± 0.41 ^a	598 ± 126 ^a
Prueba t pareada	P < 0.0001	P < 0.001	NS	NS	NS
Hiposensibles					
Huevo	72.7 ± 16.2 ^b	49.5 ± 7.3 ^b	82.2 ± 27.7 ^a	1.57 ± 0.49 ^b	583 ± 106 ^a
SUS	70.8 ± 17 ^b	47.2 ± 7.4 ^b	97.3 ± 41.3 ^a	1.56 ± 0.44 ^a	627 ± 109 ^a
Prueba t pareada	NS	NS	NS	NS	NS

¹ Los valores son expresados como media ± DS para n= 18 hipersensibles (9 niños y 9 niñas) y n= 36 hipo-sensibles (16 niños y 20 niñas). Valores in la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes, determinado por prueba t pareada.

TABLA 5. Distribución de Colesterol en Subfracciones LDL, Diámetro del pico de LDL de Hiper e Hipo Sensibles Durante los Periodos de HUEVO y SUS¹

	LDL-1	LDL-2	LDL-3	LDL diámetro (nm)
	(mg/dL)			
Hipersensibles				
HUEVO	58.8 ± 22	13.1 ± 7.3	6.19 ± 8.9	26.51 ± 0.10
SUS	44.8 ± 11.2	10.4 ± 5.0	10.0 ± 10.8	26.10 ± 0.11
Hiposensibles				
HUEVO	56.1 ± 18.9	15.5 ± 8.5	9.3 ± 8.9	26.32 ± 0.09
SUS	53 ± 16.2	15.1 ± 5.4	9.6 ± 9.3	26.19 ± 0.09
Efecto de la Dieta	p < 0.01	NS	p < 0.05	p < 0.01
Respuesta	NS	NS	NS	NS
Interacción	NS	NS	NS	NS

¹ Valores son expresados como media ± DE para n= 18 hiper y n=36 hiposensibles. Valores en la misma columna con diferente superscript son significativamente diferentes, determinado ANOVA con mediciones repetidas y Newman Keuls como prueba post hoc

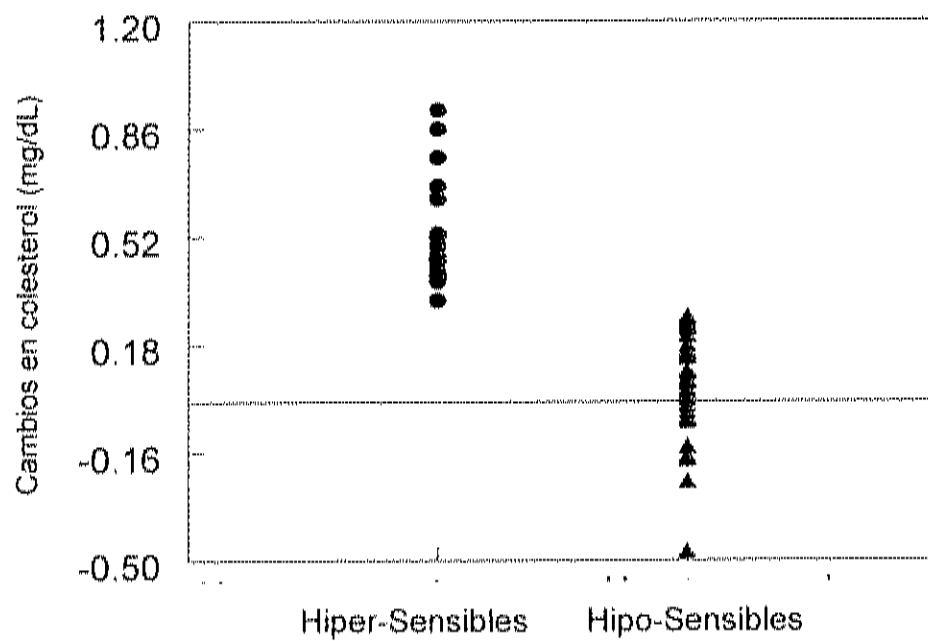


Figura 1. Cambios en los Niveles de Colesterol Durante el Periodo de Huevo y SUS en Hiper-Sensibles (•) (n= 18) e Hipo-Sensibles (^) (n= 36)

BIBLIOGRAFIA

1. Stamler J, Wentforth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356, 222 primary screens of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*. 1986; 256:2823-2828.
2. Krauss RM: Atherogenic lipoprotein phenotype and diet-gene interactions. *J Nutr*. 2001;131:340S-343S.
3. McNamara, D.J. The impact of egg limitations on coronary heart disease risk: do the numbers add up? *J. Am. Coll. Nutr*. 2000;19:540S-548S.
4. Ordovas, J. M. The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions. *Proc. Nutr. Soc*. 1999; 58:171-187.
5. Posadas-Romero, C., Tapia-Conyer, R., Lerman-Garber I. Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population. *Atherosclerosis* 1995; 118:275- 284.
6. Howell WH, McNamara DJ, Tosca MA, Smith BT, Gaines JA: Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:1747-1764.
7. Herron KL, Vega-Lopez S, Conde K, Ramjiganesh T, Roy S, Shachter NS, Fernandez ML. Pre-menopausal women, classified as hypo or hyper-responders, do not alter their LDL/HDL ratio following a high dietary cholesterol challenge. *J. Am. Coll. Nutr*. 2002;21:250-258.
8. Herron KL, Vega-Lopez S, Ramjiganesh T, Conde-Knape K, Shachter N, Fernandez ML. Men classified as hypo- or hyper-responders to dietary cholesterol feeding exhibit differences in lipoprotein metabolism. *J. Nutr*. 2003;133:1036-1042.
9. Romero AL, Romero JE, Galaviz S & Fernandez ML. Cookies enriched with psyllium and oat bran lower plasma LDL-cholesterol in normal and hypercholesterolemic men from Northern Mexico. *J. Am. Coll. Nutr*. 1998;17: 601-608.
10. Bingham SA. The dietary assessment of individuals: methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Dietary Survey Method* 198;57:705-741.

11. Allain CC, Poon LC, Chan CS, Richard W, Fu PC Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 1974; 20:470-475.
12. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran-sulphate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin. Chem.* 1982;28:1379-1388.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972;18:499-502.
14. Carr T, Anderssen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglycerides, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* 1993; 26:39-42.
15. Rifai N, King ME. Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A-I, A-II and B in serum. *Clin. Chem.* 1986;32:957-960.
16. Frenckenrich A, Giroux LM, Tremblay M, Krimbou L, Davignon J, Cohn JS. Plasma lipoprotein distribution of apo C-III in normolipidemic and triglyceridemic subjects: comparison of the apo C-III to apo E ratio in different lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.* 1997;38:1421-1432.
17. Cohn JS, Tremblay M, Amiot M, Bouthillier D, Roy M, Genest J, Davignon J. Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-size remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996;16:149-159.
18. American Academic of Pediatrics. National Cholesterol Education Program. Report of the Expert Panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992;89:525-584.
19. Friedlander Y, Leitersdorf E, Vecsler R, Funke H, Kark J. The contribution of candidate genes to the response of plasma lipids and lipoproteins to dietary challenge. *Atherosclerosis.* 1999;152:239-248.
20. Ballesteros MN, Cabrera RM, Saucedo MS, Yepiz-Plascencia GM, Valencia ME. Dietary fiber and life style influence serum lipids in free-living adult men. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001;20:649-655.
21. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev. Med.* 1995; 24:308-315.

22. Human Nutrition Information Service, USDA. (1989) Supplement-Agriculture Handbook No. 8.
23. Heyden, S. Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet to prevent coronary heart disease via cholesterol reduction. *Ann. Nutr. Metab.* 1994;38:117-122.
24. Hodson L, Skeaff CM, Chisholm WA. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated fat or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2001;55:908-915.
25. Vega-Lopez S, Vidal-Quintanar RL, Fernandez ML. Sex and hormonal status modulate the plasma lipid responses to psyllium. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001;74:435-441.
26. Ginsberg HN, Karmally W, Siddiqui M, Holleran S, Tall AR, Blaner WS, et al. Increases in dietary cholesterol associated with modest increases in both LDL and HDL cholesterol in healthy young women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:169-178.
27. Clifton PM, Abbey M, Noakes M, Beltrame S, Rumbelow N, Nestel PJ. Body fat distribution is a determinant of the high-density lipoprotein response to dietary fat and cholesterol in women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1070-1078.
28. Dawber TR, Nickerson RJ, Brand FN, Pool J. Eggs, serum cholesterol, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982;36:617-625.
29. Hu FB, Stampfer MJ, Rimm EB, Manson JE, Ascherio A et al. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *JAMA.* 1999;281:1387-1394.
30. Ginsberg H, Le NA, Mays C, Gibson J, Brown WV. Lipoprotein metabolism in nonresponders to increased dietary cholesterol. *Arteriosclerosis.* 1981;1:463-470.
31. Flaim E, Ferreri LF, Thye FW, Hill JE, Ritchey SJ. Plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations in adult males consuming normal and high cholesterol diets under controlled conditions. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981;34:1103-1108.
32. Song WO, Kerver JM. Nutritional contribution of eggs to American diets. *J. Am. Coll. Nutr.* 2000;19:556S-562S.
33. Austin MA. Genetic and environmental influences on LDL subclass phenotypes. *Clin. Genet.* 1994;46:64-70.

34. Gardener CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am. Med. Assoc.* 1996;276:875-881.
35. Lamon-Fava S, Jiménez D, Christian JC, et al. The NHLBI twin Study: heritability of apolipoprotein A-1, B and low-density lipoprotein subclasses and concordance for lipoprotein (a). *Atherosclerosis* 1991;91:97-106.
36. Austin MA, King MC, Varnizan KM, Newman B, Krauss RM. Inheritance of low-density lipoprotein sub-class patterns: results of complex segregation analysis. *Am J Hum Genet.* 43:838-846, 1988.
37. Katan MB, Beynen AC: Characteristics of human hypo-and hyperresponders to dietary cholesterol. *Am J Epidemiol.* 1987;125:387-399.
38. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ausman LM, Ordovas JM, Clevidence BA, Judd JT et al. Individual variability in lipoprotein cholesterol response to National Cholesterol Education Program Step 2 diets. *Am J Clin Nutr.* 1996; 65:823-830, 1996.
39. Ruderman NB, Jones AL, Krauss RM, Shrafir E. A biochemical and morphologic study of very low density lipoproteins in carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* 1971;50:1355-1368.
40. Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT, Krauss RM. A very-low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:411-418.
41. Hamsten A, Walldius G, Szamosi A, Dahlen G, deFaire U. Relationship of angiographically defined coronary artery disease to serum lipoproteins and apolipoproteins in young survivors of myocardial infarction. *Circulation.* 1986;73:1097-1110.
42. Nieminen MS, Mattila KJ, Aalto-Setälä K, Kuusi T, Kontula K, Kauppinen-Makelin R et al. Lipoproteins and their genetic variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:58-69.
43. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001; 285: 2486-2497.
44. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low density

lipoprotein subclass pattern and risk for myocardial infarction. *JAMA*. 1988; 60:97-104.

45. Lamarche B, St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Depres JP. A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can J Cardiol*. 2001;7:859-65.
46. St.-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Depres JP et al. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation*. 2001;104:2295-2299.

significativamente la expresión del LDL-R ni de la enzima HMG-CoA reductasa en hipo ni en hipersensibles. Los resultados de este estudio sugieren que la mayor abundancia de mRNA del LDL-R en los niños hiposensibles les confiere mayor capacidad para captar LDLs del plasma y por lo tanto más colesterol, manteniendo así la homeostasis del colesterol plasmático.

INTRODUCCIÓN

Estudios clínicos, sobre la relación entre el colesterol dietario y el colesterol del plasma han mostrado que existe una considerable variabilidad en la respuesta individual (1,2,3,4,5,6). Mientras que ciertos individuos muestran poco incremento en los niveles de colesterol sérico (no-sensibles ó hiposensibles), otros desarrollan altos grados de hipercolesterolemia (hipersensibles).

Una de las principales rutas de remoción del colesterol de la circulación es a través de la captación mediada por el receptor de la LDL (7), lo cual ocurre principalmente en el hígado. A nivel fisiológico una gran cantidad de proteínas están involucradas en mantener la homeostasis del colesterol hepático, destacando entre éstas, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa que regula la síntesis de colesterol; el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) que constituye el principal mecanismo de remoción de colesterol del plasma; y la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa, que regula la ruta clásica de la síntesis de ácidos biliares (8).

Los estudios de consumo de colesterol realizados en animales y ensayos de cultivos de células humanas muestran que el aumento de colesterol dietario resulta en una regulación del receptor, llevando a una depleción en el colesterol sérico.

De acuerdo a Goldstein y Brown, 1990 (9), la biosíntesis de colesterol es controlada a través de la regulación de genes en respuesta a los niveles de colesterol celular. La transcripción es alta en células deprivadas de esteroides y baja en células expuestas a exceso de esteroides. Un aumento en el colesterol de las células disminuye la actividad de HMG-CoA reductasa a través de la regulación mediada por SREBP (proteína de enlace a elementos de respuesta a esteroides).

La actividad del receptor LDL parece estar regulada a nivel transcripcional en respuesta a la concentración de colesterol libre en la célula. El promotor del gen del receptor de LDL contiene un elemento de respuesta a esteroides (SER) el cual es el sitio de unión con factores de transcripción llamados proteínas de enlace a elementos de respuesta a esteroides (SREBP). Bajas concentraciones de colesterol celular inducen la liberación de los factores de transcripción SREBPs, y el resultado es la transactivación del gen del receptor LDL (10).

El colesterol dietario puede afectar la concentración de colesterol total en el hígado, el cual a su vez influencia la actividad del receptor LDL. Si bien, algunos mecanismos homeostáticos responden al aumento en la concentración de colesterol hepático, el principal mecanismo compensatorio es la disminución de la actividad del receptor. En humanos saludables, las dietas ricas en colesterol parecen significativamente aumentar la concentración de colesterol hepático reprimiendo la abundancia de mRNA del receptor de LDL y de HMG-CoA (11). Asimismo, dietas muy elevadas de colesterol parecen exceder la capacidad del receptor para remover las lipoproteínas LDL adecuadamente del plasma, resultando en un aumento en las concentraciones de LDL en plasma (12).

Resultados previos de niños en edades entre 8 y 12 años cuyos monocitos fueron evaluados en el presente estudio demostraron que altas ingestas de colesterol no provocan cambios en LDL de niños clasificados como hiposensibles pero sí una elevación significativa en niños hipersensibles, pero sin un aumento en el número de partículas de LDL (13).

El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión del gen del receptor LDL y de HMG-CoA reductasa en los niños hiposensibles e hipersensibles al colesterol dietario, así como el efecto de la suplementación con colesterol sobre su expresión. (13).

MATERIALES Y METODOS

Materiales. EDTA, Solución salina balanceada de Hank's (HBSS) e Histopaque 1077 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Reactivo de TriZOL, DNA ladder de 1 Kb y agarosa se obtuvieron de GIBCO BRL (Rockville, MD). Un kit de One-Step Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) adquirido en Qiagen (Valencia, CA).

Sujetos y Métodos. Para la intervención clínica. Se captaron un total de 60 niños voluntarios (30 niños y 30 niñas), libres de diabetes, enfermedades cardiovasculares ó tratamientos para bajar lípidos (hipolipemiantes) de los cuales 54 completaron el estudio. Los participantes fueron aleatoriamente asignados para recibir un suplemento de colesterol a base de huevo (500mg diarios) ó clara de huevo como sustituto (0 mg de colesterol/ día) ambos provistos como huevo y clara de huevo en un diseño aleatorio cruzado. Los participantes consumieron 2 huevos diarios como desayuno durante un periodo de 30 días seguido por un periodo de descanso de 21 días. Durante el resto del día los niños consumieron su dieta normal en ambos periodos de tratamiento. El apego a la dieta se evaluó por medio de un registro pesado de alimentos de 3 días (14). Se obtuvo una forma de consentimiento de cada sujeto de estudio y el protocolo de estudio se aprobó por el comité de ética de la Universidad de connecticut así como de CIAD A.C. La dieta, las características basales de los participantes y el apego al estudio se reportaron previamente (13,14). El presente reporte incluye datos de una submuestra de 6 niños hiposensible y 6 hipersensibles cuyas células mononucleares estaban disponibles.

Colección de la Muestra y Aislamiento de Células Mononucleares. Al final de cada período de tratamiento, se colectó una muestra de sangre en un tubo conteniendo EDTA. Las células mononucleares se aislaron de sangre total a través de centrifugación con un gradiente de Ficoll de acuerdo al método de Boyum (15). Brevemente, 20 mL de sangre se diluyeron con 10 mL de HBSS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , posteriormente se formó una capa superior con 10 mL de solución de Histopaque 1077 y se centrifugó a 500 g por 30 minutos. La interfase compuesta por células mononucleares se removió y se lavó con HBSS a 600 g por 10 minutos dos veces. El pellet de células se resuspendió en 200 μl de buffer Tris (Tris 10 mmol, NaCl 150 mmol y CaCl_2 1 mmol por litro, pH 7.4) y se mantuvo a -70°C hasta la extracción de RNA total.

Extracción de RNA. El RNA total se extrajo de células mononucleares en base al método desarrollado por Chomczynski y Sacchi (16). El reactivo TriZOL se empleó de acuerdo a las instrucciones del fabricante; la concentración de RNA se determinó en un espectrofotómetro (Beckman, -DU 530 Lite Science UV/ VIS Spectrophotometer, USA) estimando midiendo la absorbancia en luz ultravioleta a 260 nm.

Análisis de RNA. Se determinó la abundancia de mRNA del receptor de LDL, y de la enzima 3-Hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa de muestras representativas empleando un método semicuantitativo RT-PCR adaptado del método de Powell y Kroon (17). Los oligonucleótidos iniciadores empleados para la amplificación fueron los empleados por Vega-López (18), como sigue:

Para el receptor de LDL, primer 5', 5'-CAATGTCTCACCAAGCTCTG-3' y primer 3', 5'- TCTGTCTCGAGGGGTAGCTG-3' (19). Para HMG-Co A reductasa, primer 5', 5'-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3', y primer 3', 5'-CAAGCCTAGAGACATAATCATC-3' (20), y para GAPDH, primer 5', 5'-

CATGCCAGTGAGCTTCCCGTT-3', y para 3', 5'-GTGGAGTCTACTGGCGTCTTC-3' (21). El tamaño de los productos de la reacción es como sigue: para el receptor de LDL, 258 bp; HMG-CoA reductasa, 247 bp; y para gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenada (GAPDH), 408 bp. GAPDH fue empleado como un control interno en todas las reacciones. La reacción de RT-PCR fue llevada a cabo en una termocicladora Gene Amp PCR 9700 (Applied Biosystems, CA) empleando un kit Qiagen One-step RT-PCR. La mezcla de reacción contenía 100 ng de RNA celular total. La amplificación se llevó a cabo a una temperatura de alineamiento de 60°C y 30 ciclos para el receptor de LDL, 56°C y 30 ciclos para HMG-CoA reductasa. Posteriormente, 10 µl de la mezcla de reacción se fraccionaron por tamaño vía electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en un buffer 1X Tris-Borato/EDTA y las bandas se visualizaron mediante tinción del gel con bromuro de etidio y exposición a la luz ultravioleta. Los productos fueron cuantificados por medición de la intensidad de banda relativa, empleando un sistema de documentación Nucleovisión con el software Gel Expert 3.0 (NucleoTech Corp., San Mateo, CA). La intensidad de las bandas se normalizó basados en la señal GAPDH, coamplificada en la misma reacción.

Análisis Estadísticos. Se utilizó prueba T pareada para detectar diferencias en la abundancia de mRNA entre el grupo con clara de huevo y el grupo consumiendo huevo. Los datos son presentados como medias \pm DS de la intensidad de las bandas para el número de sujetos en cada grupo. Diferencias con $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS para Windows 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

La comparación a nivel basal de la abundancia de mRNA del LDL-R de células mononucleares entre los niños hiposensibles e hipersensibles, mostró que los niños clasificados como hiposensibles tienen niveles significativamente ($P=0.006$) mayores de mRNA que los niños hipersensibles ($p<0.006$).

No se observaron cambios significativos en la acumulación del mRNA del receptor de la lipoproteína LDL después de la suplementación con huevo, lo que sugiere que el colesterol de la dieta no tuvo un efecto sobre la expresión del receptor en las células mononucleares de los niños hiposensibles así como tampoco en los hipersensibles ($p >0.05$; $p > 0.05$) (Tabla 1).

Respecto a la enzima HMG-CoA reductasa, a nivel basal no se observaron diferencias significativas en la abundancia de mRNA entre los niños hipo e hiper sensibles. De igual manera, durante el período de consumo de huevo, no se lograron observar cambios en la acumulación de mRNA de la enzima, que fueran indicativos del impacto del colesterol de la dieta en la expresión del gen de HMG-CoA reductasa en células mononucleares de los niños hipo ó hipersensibles.

DISCUSION

Efecto de Ingestas Elevadas de Colesterol sobre la Abundancia de mRNA del Receptor LDL y de HMG-CoA Reductasa.

Los niños evaluados en este estudio, consumieron dos huevos diarios durante un mes, lo que incremento la cantidad de colesterol en su dieta en 518 mg diarios. Los resultados obtenidos indican que a nivel basal, las células mononucleares de los niños clasificados como hiposensibles tienen mayor

abundancia de mRNA del receptor de la lipoproteína LDL que los niños clasificados como hipersensibles.

La presencia de una mayor cantidad de receptores en la célula de los niños hiposensibles, sugiere una más amplia capacidad de captación de LDLs provenientes del plasma y por lo tanto mayor capacidad para aceptar colesterol. Lo anterior, por un lado podría explicar por que las concentraciones de lipoproteína LDL en el plasma de estos niños permanecieron sin cambio después de una dieta alta en colesterol a base de huevo [datos reportados previamente (13)]. Además, la hiposensibilidad al colesterol pareciera ser consecuencia de una cantidad más elevada de receptores de LDL, como ya había sido sugerido por Mistry et al (22). Lo anterior, también implica que los niños hipersensibles tienen una menor capacidad para catabolizar LDL.

Al parecer 518 mg de colesterol adicionales en la dieta de los niños hiposensibles e hipersensibles no fueron suficientes para inducir la expresión del receptor LDL, dado que no se observaron cambios en la acumulación del mRNA en las células mononucleares entre periodos dietarios.

Sin embargo, después del período de huevo se siguió observando una diferencia significativa ($p < 0.04$) en la abundancia de mRNA del receptor LDL entre los niños hiposensibles e hipersensibles.

Powell y Kroon (17) documentaron que la expresión del gen del receptor LDL de células mononucleares era paralela a la expresión del gen en el hígado de pacientes que estaban bajo colecistectomía por piedras de vesícula biliar. Tomando como punto de referencia ésta información, los resultados obtenidos en nuestro estudio reflejan lo que sucede a nivel hepático.

Enzima HMG-CoA Reductasa.

La HMG-CoA reductasa es la enzima de regulación de la síntesis de colesterol. Las mediciones de la abundancia de mRNA de la enzima en las

células mononucleares de los niños, mostraron que a nivel basal no existen diferencias entre hiposensibles e hipersensibles.

La carga de colesterol no indujo la expresión del mRNA de la enzima en las células mononucleares, pues no se observaron cambios significativos entre períodos dietarios, así como tampoco entre hiposensibles e hipersensibles. Esto sugiere que la homeostasis del colesterol del plasma en los niños clasificados como hipo e hipersensibles no está definida por la enzima de regulación de la síntesis de colesterol HMG CoA reductasa, pues los niños hipersensibles sí experimentaron un aumento en el colesterol del plasma, en LDL colesterol, así como también en HDL colesterol.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden parcialmente con los reportados por Applebaum-Borden et al (12) quienes condujeron un estudio de suplementación de colesterol en 9 adultos (6 hombres y tres mujeres) con 1034 ± 25 mg de colesterol por día en la fase alta de colesterol. El aumento en el colesterol dietario se asoció con un aumento de $11 \pm 9\%$ en LDL sérica y un decremento de 41 ± 14 en la actividad del receptor LDL, concluyendo que los niveles elevados de colesterol dietario pueden disminuir la expresión del receptor de LDL en humanos. Por su parte, Boucher et al, 1998 (11) en un estudio con humanos adultos saludables ($n= 5$) a los que se les proporcionó durante 7 días 791 ± 150 mg/ día de colesterol dietario ($n= 3$ controles que no se les restringió su dieta). El colesterol sérico permaneció estable, mientras el número de copias de mRNA en células mononucleares del receptor LDL y HMG-CoA reductasa disminuyeron en 46 y 72% respectivamente.

En nuestro estudio, en el período de alto consumo de colesterol se observó que los niños hiposensibles presentaron una tendencia que no fue significativa de reducir la expresión tanto del receptor LDL (16%) como de la enzima HMG-CoA reductasa (13%). Considerando los avances de los últimos años en biología molecular, una disminución en la expresión del mRNA del receptor de LDL pudiera deberse a que una vez que se rebasa la capacidad de

células mononucleares de los niños, mostraron que a nivel basal no existen diferencias entre hiposensibles e hipersensibles.

La carga de colesterol no indujo la expresión del mRNA de la enzima en las células mononucleares, pues no se observaron cambios significativos entre periodos dietarios, así como tampoco entre hiposensibles e hipersensibles. Esto sugiere que la homeostasis del colesterol del plasma en los niños clasificados como hipo e hipersensibles no está definida por la enzima de regulación de la síntesis de colesterol HMG CoA reductasa, pues los niños hipersensibles si experimentaron un aumento en el colesterol del plasma, en LDL colesterol, así como también en HDL colesterol.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden parcialmente con los reportados por Applebaum-Borden et al (12) quienes condujeron un estudio de suplementación de colesterol en 9 adultos (6 hombres y tres mujeres) con 1034 ± 25 mg de colesterol por día en la fase alta de colesterol. El aumento en el colesterol dietario se asoció con un aumento de $11 \pm 9\%$ en LDL sérica y un decremento de 41 ± 14 en la actividad del receptor LDL, concluyendo que los niveles elevados de colesterol dietario pueden disminuir la expresión del receptor de LDL en humanos. Por su parte, Boucher et al, 1998 (11) en un estudio con humanos adultos saludables ($n= 5$) a los que se les proporcionó durante 7 días 791 ± 150 mg/ día de colesterol dietario ($n= 3$ controles que no se les restringió su dieta). El colesterol sérico permaneció estable, mientras el número de copias de mRNA en células mononucleares del receptor LDL y HMG-CoA reductasa disminuyeron en 46 y 72% respectivamente.

En nuestro estudio, en el período de alto consumo de colesterol se observó que los niños hiposensibles presentaron una tendencia que no fue significativa de reducir la expresión tanto del receptor LDL (16%) como de la enzima HMG-CoA reductasa (13%). Considerando los avances de los últimos años en biología molecular, una disminución en la expresión del mRNA del receptor de LDL pudiera deberse a que una vez que se rebasa la capacidad de

la célula para almacenar colesterol, el exceso empieza a funcionar como un represor de la activación del factor de transcripción SREBP2, lo que provoca que no se de la maduración del mismo, y de ésta manera se inhiba la activación de la transcripción del gen del receptor LDL. Otra posible explicación es que el exceso de colesterol se transforme en oxisteroles los cuales también alcancen a inactivar al factor de transcripción. Los niños clasificados como hiposensibles, como anteriormente se comentó aparentemente tienen mayor capacidad para captar colesterol, por esta razón es posible que la reducción en la expresión no sea tan marcada como la reportada por Applebaum-Borden et al, 1984 (12) y Boucher et al, 1998 (11) quienes no diferenciaron entre hipo e hipersensibles en sus estudios. También es posible pensar que la cantidad de colesterol adicional en la dieta no represente un exceso a nivel celular en los niños hiposensibles.

En conclusión los niños hipersensibles no parecen tener capacidad de respuesta celular de regulación ante la carga de colesterol pues no mostraron cambios ni en la expresión del receptor LDL ni en la enzima HMG-CoA reductasa, y en cambio si tuvieron una elevación de la LDL en plasma. Sin embargo el análisis de tamaño de LDL, mostró que no hubo un aumento en el número de partículas sino que la fracción pequeña de LDL aumento el contenido de colesterol, y al aumentar de tamaño se convirtió en menos aterogénica.

La respuesta celular de regulación de colesterol de los niños hiposensibles como respuesta al colesterol dietario puede deberse a que cuentan con un mayor número de receptores de la lipoproteína LDL, lo que les provee de una mayor capacidad para captar y almacenar colesterol que los niños hipersensibles, ayudándolos a mantener la homeostasis de colesterol sin cambios en LDL en el plasma.

TABLA 1. Abundancia de mRNA del Receptor LDL y de la Enzima HMG-CoA Reductasa en Niños Clasificados como Hipo e Hipersensibles al Colesterol Dietario Después de un Período de 30 días con Dieta Alta y Baja en Colesterol¹

	Placebo n = 6	Huevo n = 6	P ²
Hiposensibles LDL-R	122 ± 59 ³	101.9 ± 58 ³	NS
Hipersensibles LDL-R	39.6 ± 8 ³	43.6 ± 22 ³	NS
Hiposensibles HMG-CoA reductasa	83.9 ± 32	66.4 ± 32	NS
Hipersensibles HMG-CoA	65.4 ± 15	57.8 ± 16	NS

¹ Los datos se presentan como media y DS de tasas de intensidad. LDL-R y HMG-CoA reductasa, corregidos por GAPDH a nivel basal y PostIntervención.

² Efecto del Huevo: Abreviatura usada NS, no significativa

³ Efecto de la sensibilidad: P < 0.05. Diferencia significativa basada en prueba t de Student comparando hipo e hiper -sensibles en cada tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Quintao E, Grundy SM, Aherns EHJr (1971). Effects of dietary colessterol on the regulation of total body colessterol in man. *J Lipid Res* 12: 233.
2. Beynen, A.C.,M.B. Katan and L.F.Van Zutphen. (1987). Hypo and hyperresponders: individual differences in the response of serum colessterol concentration to changes in diet. *Adv. Lipid Res.* 22:115-171.
3. Katan, M.B.,and A.C. Beynen.(1987). Characteristic of human hypo and hyperresponders to dietary colessterol. *Am.J.Epidemiol.* 125:387-399.
4. Sehayek, E.,Nath Ch.,Heinemann, T.,McGee, M.,Seidman,C. E., Samuel, P., and Breslow,J.L. (1998). U-Shape relationship between change in dietary colessterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary colessterol absorption in humans. *J.lipid.Res.* 39: 2415-2421.
5. Herron, K.L., Vega-López,S.,Conde, K.,Ramjiganesh,T., Roy,S., Shcachter,N.S.,and Fernandez, M.L. (2002). Pre-menopausal women, classified as hypo-or hiper responders, do not alter their ldl/hdl ratio following a high dietary colessterol challenge. *J.Am.Coll.* 21:3;250-258.
6. Herron, K.L., Vega-López,S.,Conde, K.,Ramjiganesh,T., Shcachter, N. S., and Fernandez, M. L. 2003. Men Classified as hypo- or hyperresponders to dietary colessterol feeding exhibit differences in lipoprotein metabolism. *J.Nutr.* 133:1036-1042.
7. Rudling, M., Reihner, E., Einarsson, K., Ewerth, S.& Angelin, B. (1990). Low density lipoprotein receptor-binding activity in human tisúes: quantitqtive importante of hepaticreceptors and evidence for regulation of their expresión in vivo. *PNAS* 87.3469-3473.
8. Lee Ji-Young, Mitmesser S H., Carr Timothy P. Regulation of cellular colessterol in Molecular Nutrition. (2003). Eds. JZempleni and H Daniel. CABI Publishing,Cambridge,MA. USA. Pag 309-319.

9. Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430.
10. Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L, Brown, M.S. and Hobbs, H.H. (1995). Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF-1) and Localization of SREBF-1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 y 22q 13. *Genomics*. 25: 667-673.
11. Boucher P., de Lorgeril M., Salen P., Crozier P., Delaye J., Vallon JJ., Geysant A., Dante R. (1998). Effect of dietary cholesterol on low density lipoprotein-receptor, e-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and low density lipoprotein receptor-related protein mRNA expression in healthy humans. *Lipids*. 33:1177-1186.
12. Applebaum-Bowden D., Haffner SM., Hartsook E., Luk K H., Albers J J., Hazzard W R. 1984. Down-regulation of the low-density lipoprotein receptor by dietary cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr*; 39: 360-367.
13. Ballesteros M N., Cabrera R M., Saucedo M S., Fernandez M L. (2004). Dietary cholesterol does not increase biomarkers for chronic disease in a pediatric population from northern México. *Am J.Clin. Nutr.* ; 80:855-61.
14. Ballesteros M N., Cabrera R M., Saucedo M S., Fernandez M L. (2005). High intake of saturated fat and early occurrence of specific biomarkers may explain the prevalence of chronic disease in northern Mexico. *J.Nutr.* ; 135: 70-73.
15. Boyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97: 77- 89.
16. Chomczynski, P.& Sachi, N. (1987). Single -step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
17. Powell, E. E& Kroon, P.A. (1992). Measurement of mRNA by quantitative PCR with a nonradioactive label. *J.Lipid. Res.* 33:609-614.

18. Vega-López, S., Freake, H. C. & Fernandez M. L. (2003). Sex and Hormonal Status Modulate the Effects of Psyllium on Plasma Lipids and Monocyte Gene Expression in Human. *J. Nutr.* 133: 67-70.
19. Yamamoto, T., C.G. Davis, M.S. Brown, W.J. Schneider, M.L. Casey, J.L. Goldstein, and D.W. Russell. (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell.* 39:27-38.
20. Luskey, K.L. & Stevens B. (1985). Human 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domain responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J.Biol.Chem.*260:10271-10277.
21. Tso, J. Y., Sun, X.H., Kao, T.h., Reece, K.S. & Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucl. Acids Res.* 13:2485-2502.
22. Mistry P, Millar NE, Laker M, Hazzard WR, Lewis B (1981). Individual variation in the effects of dietary cholesterol on plasma lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis in man. *J Clin Invest* 67:493.

CAPITULO V

DISCUSION GENERAL

Existe suficiente evidencia que indica que entre los principales factores de riesgo involucrados en enfermedades crónicas se encuentra la hipercolesterolemia, la obesidad, inactividad física e hiperinsulinemia, así como también aspectos de la dieta, entre los que resalta un elevado consumo de grasa y en especial grasa saturada.

A nivel mundial, en México y específicamente en nuestra región las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2 ocupan las primeras causas de muerte. Los estudios realizados en población adulta en esta región, consistentemente han mostrado la presencia de factores de riesgo distintivos de enfermedades crónicas. En la actualidad, la aterosclerosis es una enfermedad que inicia durante la niñez y que no presenta manifestaciones clínicas hasta etapas ya avanzadas. Basados en este conocimiento se hipotetizó que es posible que los biomarcadores de enfermedades crónicas sean ya identificables en ésta etapa de la vida. Nuestro primer estudio consistió en explorar esta hipótesis.

Primer Estudio

Se diseñó un estudio en el que participaron niños (hombres y mujeres) entre 8 y 12 años de edad a los que se les realizaron análisis clínicos de lípidos

del plasma, tamaño de LDL, apoproteínas, glucosa e insulina, asimismo, se evaluó su dieta y se midió su actividad física.

Del total de la energía consumida por los niños el 39% viene de grasa y el 12% es de grasa saturada, lo que la coloca como una dieta aterogénica y además coincide con lo encontrado en los adultos de la misma región.

El sobrepeso y la obesidad están presentes en esta población pediátrica en un 18 y 20% respectivamente y es más común en los niños hombres (Tabla 1). La obesidad central, medida como circunferencia de cintura mostró como era de esperarse que los niños con obesidad fueron los que tuvieron mayor circunferencia de cintura (Fig. 1).

En general, la presión arterial se encontró dentro de lo normal, pero se observó que los niños con obesidad tienen mayor presión sistólica y diastólica que los niños normales y con sobrepeso (Fig. 2). Por lo que se puede deducir que el peso corporal está asociado con otros parámetros de enfermedades del corazón.

La actividad física (AF) de los niños medida como pasos por día es baja comparada con reportes para otras poblaciones infantiles. Estudios en humanos han mostrado que un incremento en la actividad física resulta en una mejoría del perfil de lípidos. Los bajos niveles de AF de estos niños pueden contribuir al detrimento de su estado lipídico

Los datos presentados en este estudio demuestran que esta población de niños tiene niveles muy elevados de triglicéridos (95 percentil), bajas concentraciones de HDL (25 percentil) y altas concentraciones de insulina. El colesterol total y LDL colesterol están dentro de lo que se considera adecuados, sin embargo, el 69% de los niños pertenece al fenotipo B es decir tienen mayor cantidad de LDL densas y pequeñas que está asociado con un elevado riesgo cardiovascular.

Las elevadas concentraciones de triglicéridos están correlacionadas con un riesgo aumentado de padecer enfermedad coronaria. Se ha mostrado que

en pacientes con hipertrigliceridemia únicamente una porción de la apo B de VLDL es transformada a apo B de LDL sugiriendo que la VLDL grande característica en estos pacientes es removida de la circulación y que parte de ésta remoción puede ocurrir en la pared arterial.

Niveles bajos de HDL colesterol son mejores predictores de enfermedad cardiovascular que la LDL. Las bajas concentraciones encontradas en los niños constituyen un factor de riesgo independiente para EC y pueden ser la principal razón de la prevalencia de EC en la población adulta.

La apoproteína CIII, inhibe la acción de la lipoproteína lipasa encargada de hidrolizar los triglicéridos en la sangre, decreciendo la remoción de VLDL ó de quilomicrones. En humanos las concentraciones de apo CIII en plasma correlacionan con los niveles de triglicéridos y se sabe que se encuentran elevados en individuos con hipertrigliceridemia. Este estudio encontró que las concentraciones de apo CIII en los niños son muy altas, incluso cuando se comparan con valores reportados para población adulta. Además en este caso también concuerdan con los valores de triglicéridos encontrados.

Además de las dislipidemias observadas, la alta prevalencia del fenotipo B contribuye al factor de riesgo para enfermedad crónica en éstos niños. Esta bien documentado que el patrón B está asociado con una concentración elevadas de triglicéridos, apo CIII y apo B, así como con una HDL disminuida y esta asociado con un aumento de tres veces en riesgo de EC.

Los individuos que poseen predominantemente partículas LDL patrón B son más propensos a desarrollar el síndrome de resistencia a insulina. Esto es, la presencia de estos tres biomarcadores en los niños respalda la alta prevalencia de diabetes tipo 2 en la población adulta.

Adicionalmente a todo lo anterior se obtuvo que un 11% de los niños presenta ya resistencia a insulina

Los datos presentados en este estudio demuestran que a esta edad ya se pueden identificar la presencia de biomarcadores tempranos distintivos de

enfermedades crónicas presentes en la vida adulta. De manera adicional, los resultados de este estudio sugieren que existe un componente multifactorial para la presencia de enfermedades coronarias y diabetes tipo 2 que involucran tanto a factores genéticos como de estilo de vida.

Segundo Estudio

Un apartado especial ha merecido el colesterol de la dieta al cual se le ha relacionado directamente con hipercolesterolemia, y enfermedades cardiovasculares. Después de décadas de estudios de alimentación con colesterol se sabe que en humanos la respuesta no es uniforme y que un modesto incremento en el colesterol sanguíneo de 1.9 a 2.5 m/dL por cada 100mg adicionales de colesterol dietario se considera normal. Basados en esto se clasifica a los individuos como hiposensibles e hipersensibles. No obstante, las guías clínicas y dietarias de organismos importantes de salud como El programa Nacional del Colesterol en Estados Unidos y de la Asociación Americana del Corazón han recomendado disminuir su consumo a <300 mg/día con el objetivo de disminuir la mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Por esta razón, alimentos como el huevo, importantes desde el punto de vista nutricional han dejado de ser consumidos.

Tomando en consideración el hecho de que los niños evaluados tienen marcadores característicos de enfermedades crónicas, así como también el de que se considera que el colesterol de la dieta puede provocar hipercolesterolemia, nosotros hipotetizamos que el consumo de huevo como alimento aportador de colesterol, no resulta en un aumento de riesgo de enfermedad cardiovascular en niños de edad escolar con biomarcadores distintivos de enfermedades crónicas.

Se realizó un segundo estudio en el que participaron los 54 niños evaluados en el primer estudio con el objetivo de evaluar el efecto del colesterol dietario en los lípidos del plasma y la aterogenicidad de las LDL en esta

población pediátrica. Se utilizó un diseño aleatorio cruzado en el que los niños fueron asignados a dos tratamientos: 1) dieta con huevo (518mg adicionales de colesterol) y 2) dieta con sustituto de huevo (clara de huevo; 0 mg adicionales de colesterol) durante 30 días.

Respuesta al Colesterol Dietario

El estudio determinó que el 66 % de los niños quedaron clasificados como hiposensibles al colesterol de la dieta y el 33 % como hipersensibles.

Actividad Física y Peso Corporal

La actividad física de los niños no se modificó durante ambos períodos dietarios, así como tampoco se observaron fluctuaciones en el peso corporal, por lo que este estudio asume que los cambios en los lípidos del plasma observados se deben a que la dieta tuvo un efecto importante.

Lípidos Sanguíneos

Los niños hipersensibles fueron los únicos que experimentaron un cambio en las concentraciones plasmáticas de LDL colesterol y HDL colesterol. La dieta y la clasificación de la respuesta al colesterol tuvieron un efecto

Los AGS no cambiaron durante ambos períodos dietarios en los niños hipersensibles. Sin embargo, el consumo de grasa total y grasa monoinsaturada fue mayor cuando consumieron huevo. En estudios de alimentación en los cuales se han probado dietas en las que se reemplaza AGS con AGM o AGP el resultado es una disminución en las concentraciones de LDL colesterol tanto como un 15%. Considerando lo anterior, los hallazgos de este estudio sugieren que las fluctuaciones observadas en los lípidos del plasma de los niños hipersensibles son debidas a la contribución de colesterol del huevo.

Por su parte, los niños hiposensibles aún a pesar de que tuvieron un incremento en el consumo de AGS y colesterol durante el período de huevo no

mostraron cambios significativos en sus concentraciones plasmáticas de LDL colesterol y HDL colesterol.

El aumento en la concentración de LDL colesterol en los niños hipersensibles, por sí solo, no sugiere que esta población haya aumentado su riesgo de enfermedad coronaria. En este contexto, las relaciones CT: HDL y LDL: HDL importantes marcadores de riesgo de infarto coronario no se vieron afectados en ninguno de los casos hiper ó hiposensibles manteniéndose en un nivel considerado como deseable. Los hallazgos de este estudio, indican que los niños hipersensibles podrían aumentar su HDL colesterol para promover la ruta de colesterol en reversa por movilización del exceso de colesterol del plasma hacia el hígado, el principal sitio de eliminación de colesterol del cuerpo.

La dieta tampoco afectó a la concentración de apoproteína B, pues no se observó ningún cambio. Asimismo las concentraciones de apoproteínas CIII y E se vieron afectadas.

En el análisis de las subfracciones este estudio determinó que del total de niños evaluados el 63 % presentaron patrón B asociado con LDL densa y pequeña (LDL-3) durante el periodo de sustituto de huevo. Sin embargo, 5 de estos niños durante el periodo de huevo cambiaron de patrón B a patrón A.

El diámetro del pico de LDL fue más grande durante el periodo de huevo y este hallazgo se asoció con el aumento observado en la concentración de LDL colesterol en la fracción más grande. La subfracción LDL-2 no se vio afectada, en tanto que los niños tuvieron una concentración menor de la subfracción LDL-3 durante el periodo de huevo. El hecho de no observar cambios en las concentraciones de apo B sugiere que el número de partículas de LDL no fueron modificadas por la dieta y que la disminución en la concentración de partículas LDL-3 en el periodo de huevo parece coincidir con el aumento de la subfracción LDL-1 lo que significa que las partículas pequeñas cambiaron de tamaño a uno más grande disminuyendo su aterogenicidad.

La aterogenicidad de las partículas LDL patrón B es asociada con la facilidad con que pueden ser captadas por la pared arterial y también por su alta susceptibilidad a la oxidación. En este estudio hemos demostrado que la carga de colesterol dietario proveniente del huevo redujo la aterogenicidad de la LDL cambiando algunos niños al fenotipo patrón A.

Este estudio claramente indica que la ingesta de huevo por una población de niños con biomarcadores distintivos de enfermedad arteriocoronaria y resistencia a insulina no tiene implicaciones de salud negativas en relación a aterogenicidad de LDL: HDL ó aterogenicidad de LDL.

Tercer Estudio

Con el conocimiento de que los niños hiposensibles no muestran cambios en sus niveles de LDL-C en plasma, mientras que los hipersensibles los incrementan significativamente. Nosotros hipotetizamos que la forma en la que los niños hiposensibles mantienen la homeostasis del colesterol plasmático es a través de disminuir la expresión del receptor de LDL y de disminuir la expresión de la enzima HMG-CoA reductasa.

Se obtuvo RNA total de células mononucleares que fueron obtenidas al final de cada período dietario y a través de RT-PCR se midió la abundancia de mRNA tanto del receptor como de la enzima para determinar si el colesterol indujo la expresión de estos genes.

Este estudio demostró que a nivel basal los niños hiposensibles cuentan con más abundancia de mRNA del receptor LDL, lo que significa que tienen mayor capacidad para captar LDLs del plasma y por lo tanto mayor capacidad para aceptar colesterol. Esto explica por que las concentraciones de LDL en estos niños no se ven afectadas después del período dietario alto en colesterol. Asimismo sugiere que el ser hiposensibles es producto es el resultado de una baja expresión de receptores de LDL.

La enzima HMG-CoA reductasa no mostró diferencias a nivel basal ni después del período dietario sugiriendo que la homeostasis del colesterol en los niños no es regulada a través de ésta enzima.

En los niños hipersensibles no se observaron cambios en la expresión de ninguno de los genes después del período dietario alto en colesterol, indicando que en ellos esta forma de regulación es deficiente.

TABLA 1. Prevalencia (%) de Sobrepeso y Obesidad en Niños del Noroeste de México.

IMC ^a	Todos los Niños (n=54) (%)	Niños (%) (n=25)	Niñas (%) (n=29)
Sobrepeso CDC \geq 85 ^b	20.37	32	10.34
Obesidad CDC \geq 95 ^b	18.51	24	13.79

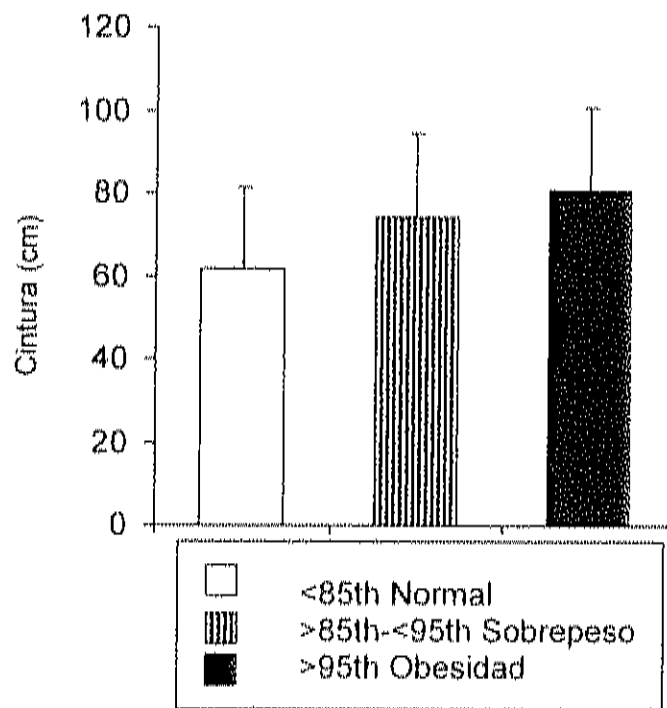


FIGURA 1. Cintura en Relación a IMC/E

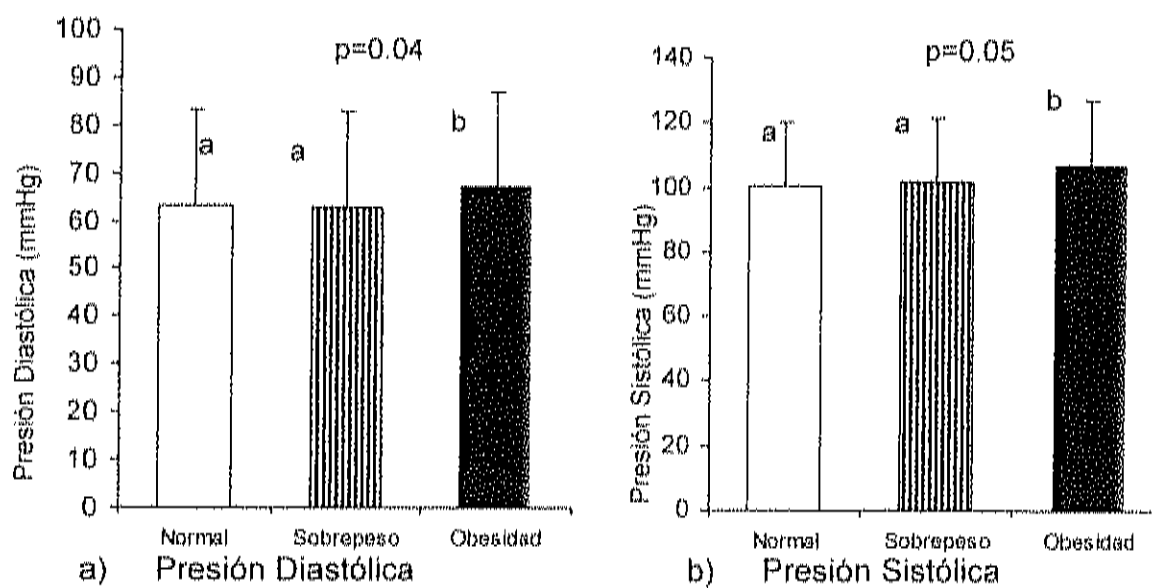


FIGURA 2. Obesidad Y Presión Arterial en los Niños

PUBLICACIONES

High Intake of Saturated Fat and Early Occurrence of Specific Biomarkers May Explain the Prevalence of Chronic Disease in Northern Mexico¹

Martha Nydia Ballesteros,* Rosa Maria Cabrera,* Maria del Socorro Saucedo,*
Dimple Aggarwal,[†] Neil S. Shachter,** and Maria Luz Fernandez^{†2}

*Centro de Investigacion de Alimentos y Desarrollo (CIAD), Hermosillo, Mexico; [†]Department of Nutritional Sciences, University of Connecticut, Storrs, CT 06269; and **Columbia University, New York, NY 10032

ABSTRACT To investigate whether the high prevalence of coronary heart disease (CHD) and type II diabetes prevalent in Northern Mexico could be related to the presence at a young age of biomarkers for chronic disease, 25 boys and 29 girls (8–12 y old) from a low socioeconomic group were recruited. Plasma lipids, LDL phenotype, apolipoproteins (apos), glucose, and insulin were evaluated. Analysis of 3-d dietary records indicated the typical intake of this region to be high in total fat (37–43% energy) and saturated fat (11–13% energy). Boys and girls had an average of 6623 ± 2892 and 6112 ± 2793 steps/d, respectively, as measured by a pedometer, suggesting a low level of activity. Plasma total and LDL cholesterol (LDL-C) were within the 50th percentile. In contrast, the study population was characterized by having high triglycerides (TG) (95th percentile, 1.25 ± 0.37 mmol/L in boys and 1.19 ± 0.38 mmol/L in girls). HDL cholesterol (HDL-C) concentrations were low (25th percentile), 1.22 ± 0.20 mmol/L in girls and 1.29 ± 0.20 mmol/L in boys. There was also a high prevalence of the small dense LDL phenotype B (69%), which is associated with increased risk for CHD. These results suggest that the population of children studied may have 2 different components of risk, one being the high-fat diet, which could be associated with the elevated levels of plasma LDL-C present in the adult population. A second component, related to the insulin resistance syndrome, may be principally genetic and associated with the high TG, low HDL, and LDL phenotype B observed in these Mexican children. *J. Nutr.* 135: 70–73, 2005.

KEY WORDS: • chronic disease • Mexican children • LDL phenotype • saturated fat • plasma triglycerides

The etiology of chronic disease is multifactorial and comprises modifiable and nonmodifiable risk factors. Among the nonmodifiable risk factors, heredity and sex are relevant, whereas the modifiable risk factors include modifications in diet, increases in aerobic exercise, and weight loss. There is a high prevalence of coronary heart disease (CHD),³ insulin resistance, and type II diabetes in the northern part of Mexico (1). It is not clear whether biomarkers for chronic disease are already identifiable in childhood or whether lifestyle plays the dominant role in the prevalence of chronic disease in the adult population. Studies aimed at understanding the contribution of modifiable risk factors for chronic disease, as well as those that are genetically based, are needed for this population.

In studies conducted with young male adults in this area of Mexico (2,3), we previously observed an increased prevalence of low plasma concentrations of HDL, high triglycerides (TG), high blood pressure, and BMI > 26 kg/m², all factors indica-

tive of the metabolic syndrome (4) and the potential for both CHD and type II diabetes. In addition, evaluation of risk factors in this region indicated that subjects from a low socioeconomic background not only exhibited these parameters of increased risk for CHD, but also consumed very high-fat diets (5). Based on these data, we examined children from the same geographical area to evaluate the potential presence at a young age of these biomarkers for chronic disease.

We recruited children of low socioeconomic background to determine dietary intake, level of physical activity (as measured by number of steps taken per day recorded with a pedometer), blood pressure, plasma lipids and apolipoproteins (apos), plasma glucose, and insulin. Our hypothesis was that both lifestyle and genetic components would affect the potential risk for CHD or type II diabetes in children from this region.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Enzymatic cholesterol and TG kits were obtained from Roche-Diagnostics. Glucose kits were from Wako. BHTA, aprotinin, sodium azide, and phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) were obtained from Sigma Chemical. Malonaldehyde bis(diethyl acetal) was obtained from Aldrich. Human insulin-specific RIA kits were from Linco Research.

Subjects and dietary assessment. The experimental protocol was approved by the University of Connecticut Institutional Review Board and by the Review Board of CIAD. Parents of children par-

¹ This study was supported by the American Egg Board/Egg Nutrition Center and by NIH HL-70006 to NSS.

² To whom correspondence should be addressed.
E-mail: maria-luz.fernandez@uconn.edu.

³ Abbreviations used: apo, apolipoprotein; CHD, coronary heart disease; HDL-C, HDL cholesterol; HOMA, homeostasis model assessment; IR, insulin resistance; LDL-C, LDL cholesterol; NCEP, National Cholesterol Education Program; PMSF, phenyl methyl sulfonyl fluoride; TG, triglyceride.

TABLE 1

Age, BMI, blood pressure, and physical activity measured as number of steps taken per day (in Mexican children)¹

Variable	All children (n = 54)	Boys (n = 25)	Girls (n = 29)
Age, y	10.4 ± 1.6	10.6 ± 1.6	10.2 ± 1.5
BMI, ² kg/m ²	19.6 ± 3.8	20.9 ± 4.3 ¹	18.4 ± 2.9 ²
Systolic blood pressure, mm Hg	101.8 ± 6.1	102.5 ± 6.9	101.2 ± 5.3
Diastolic blood pressure, mm Hg	63.9 ± 3.6	64.8 ± 3.9	63.0 ± 3.2
Physical activity, steps/d	6344 ± 2822	6624 ± 2893	6113 ± 2793

¹ Values are means ± SD. Values in the same row with different superscripts differ as determined by Student's *t* test ($P < 0.05$).

² A total of 20.4% of the children had a BMI higher than the 85th percentile and 18.5% had a BMI higher than the 95th percentile according to CDC guidelines (18).

icipating in the study attended informational meetings and signed the consent form. Fifty-four children (25 boys and 29 girls) 8 to 12 y old were recruited from the Mauricio Kelly school located in one of the poorest neighborhoods of the city of Hermosillo, Mexico, to assess the presence of biomarkers for chronic disease in this pediatric population. Three-day weighed food records (6) were used to evaluate dietary intake of macronutrients and dietary cholesterol. Both the children and the individual in charge of preparing meals at home were provided with food scales (Ohaus CS 2000) and a chart to record the subject's daily intake. Parents were instructed how to keep the records and researchers in the study worked very closely with children to document their food intake during the day. Diet intake was analyzed using the ESHA Food Processor Program (ESHA, Food Processor, 7.20, ESHA Research Editor, 1998). Regional foods that were not included in the database were analyzed for individual components and added to the database. These foods included snacks, organ meats, and candies, which were usually consumed by the children.

Two fasting (12-h) blood samples were collected, on different days, from each subject into tubes containing 0.15 g/100 g EDTA to determine plasma lipids, plasma glucose, insulin, leptin, LDL peak size, and plasma apos. Plasma was separated by centrifugation at 1500 × *g* for 20 min at 4°C and placed into vials containing PMSF (0.05 g/100 g), sodium azide (0.01 g/100 g), and aprotinin (0.01 g/100 g).

Systolic and diastolic blood pressure were measured in the right arm with the participant seated and following a 5-min rest using an Omron manual blood pressure Hem 185 Hem 18.

Plasma lipids and apos. Total cholesterol was determined by enzymatic methods using Roche Diagnostics standards and kits (7). HDL cholesterol (HDL-C) was measured in the supernatant after precipitation of apo B-containing lipoproteins (8). LDL cholesterol (LDL-C) was determined using Friedewald's equation (9). TGs were determined using Roche Diagnostics kits, which adjust for free glycerol (10). Apo B concentrations were measured by an immunoturbidimetric method and turbidity was determined at 340 nm (11). Apo C-III (12) and apo E (13) were measured on an Hitachi Autoanalyzer 740 utilizing kits from Wako.

Plasma glucose and insulin. Plasma glucose was determined enzymatically (14). Briefly, 3 mL of working solution was added to 0.20 mL of sample and mixed, transferred to cuvettes, incubated at 37°C for 5 min, and then read at 505 nm on a DU-640 UV spectrophotometer (Beckman Coulter). Insulin was measured in plasma using a radioimmunoassay kit that utilizes the double-antibody/polyethylene glycol technique as previously described (15). In addition, the homeostasis model assessment (HOMA) (16) was used to calculate insulin resistance (IR) according to the following equation: IR (HOMA IR) = fasting insulin (μU/mL) × fasting glucose (mmol/L) ÷ 22.5. The HOMA model has been shown to be a reliable method

of measuring insulin resistance in various populations when other more invasive methods are not feasible (16). Based on the equation, children were classified as having IR if the calculated value was ≥3.8 (17).

LDL size determination. The Lipoprint LDL system (Quantimetrix) was used to identify the size of LDL using a nongradient high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis system. Briefly, 2.5 μL of plasma was added to precast polyacrylamide gel tubes and overlaid with 200 μL of loading gel. Tubes were then photopolymerized for ~30 min and placed into the electrophoresis chamber. Electrophoresis buffer (Tris-hydroxymethyl aminomethane 66.1 g/100 g, boric acid 33.9 g/100 g, pH 8.2–8.6) was added to the top and bottom portions of the chamber. The gel was run for ~60 min at 36 mV or until the HDL fraction was ~1 cm from the end of the gel. Gels were allowed to sit for 30 min and scanned with a densitometer. LDL size was determined using software supplied by the manufacturer.

Statistical analysis. Student's independent *t* test was used to compare boys and girls. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The mean age of children was 10.4 ± 1.6 y with a range from 8 to 12 y (Table 1). Systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and physical activity measured as steps per day did not differ between boys and girls. However, BMI was higher in boys compared to girls ($P < 0.05$) (Table 1). When we classified the children according to BMI for age following the 2000 CDC growth charts (18), we found that 20.4% of the total children had a BMI for age higher than the 85th percentile (overweight) whereas 18.5% had a BMI for age higher than the 95th percentile (obese).

Plasma lipids, apolipoproteins, LDL size, glucose, and insulin did not differ between boys and girls (Table 2). Plasma total and LDL cholesterol were below the 50th percentile for children of that age according to the National Cholesterol Education Program (NCEP) (19) (Table 3). In contrast, plasma HDL-C concentrations were low (25th percentile) and plasma TG concentrations were high (95th percentile) according to NCEP (19). Similarly, plasma apo C-III concentrations were high compared to what has been reported for female and male adults (20,21). LDL peak diameter was small, indicative of the presence of smaller LDL subfractions as confirmed by the high percentage of children (69%) who exhibited the phenotype B (Table 2). Although plasma glu-

TABLE 2

Plasma lipids, apoproteins, LDL/HDL ratio, LDL peak size, and LDL phenotype of Mexican children¹

Variable	All children (n = 54)	Boys (n = 25)	Girls (n = 29)
Total cholesterol, mmol/L	3.51 ± 0.42	3.58 ± 0.44	3.45 ± 0.43
LDL cholesterol, mmol/L	1.70 ± 0.48	1.72 ± 0.47	1.69 ± 0.50
HDL cholesterol, mmol/L	1.25 ± 0.21	1.30 ± 0.22	1.22 ± 0.20
Triglycerides, mmol/L	1.23 ± 0.38	1.25 ± 0.37	1.19 ± 0.38
LDL-C/HDL-C ratio	1.41 ± 0.51	1.36 ± 0.43	1.45 ± 0.58
LDL size, nm	26.33 ± 0.76	26.28 ± 0.93	26.30 ± 0.85
Pattern B, %	69	71	69
Apo B, mg/L	604 ± 78	608 ± 81	601 ± 76
Apo C-III, mg/L	113 ± 23	113 ± 22	113 ± 25
Apo E, mg/L	34 ± 9	37 ± 13	33 ± 5
Glucose, mmol/L	4.69 ± 0.46	4.77 ± 0.47	4.61 ± 0.43
Insulin, pmol/L	126 ± 44	127 ± 46	125 ± 42
Insulin resistance, %	11	12	10.3

¹ Values are means ± SD.

Thus, it appears that the high plasma LDL-C concentrations observed in a high percentage of the adult population are a result of the diet that is typical in this region of Mexico. The intake of total fat is much higher than reported values for children who are at high risk for cardiovascular disease (CVD) (30). Epidemiological data clearly indicate that a strong positive relationship exists between the percentage of energy obtained from saturated fatty acids and CHD incidence (31). A fluctuation in LDL-C of 0.120 mmol/L (4.6 mg/dL) can be expected for every 1% change in saturated fat intake with relation to the percentage of total energy consumed (32). Therefore, the high prevalence of CHD in this population can in part be explained by the elevated levels of plasma LDL-C resulting from the high intake of saturated fat, which starts at a very early age. In addition, children from this group had a moderate level of physical activity as measured by pedometer. When compared to other reported values in children using a similar instrument, the number of steps taken per day was much lower (33) in this group of Mexican children. Human studies have shown that increased physical activity achieved via walking results in improved plasma lipoprotein profiles (34); thus, the low levels of activity present in these children may contribute to the detrimental lipid profiles observed in the adult population (2,3,5).

In summary, this study shows for the first time that the high prevalence of risk factors for chronic disease present in the adult population in this area of Mexico is also seen in this selected group of children. In addition, our results from this study suggest that there is a multifactorial component for the presence of CHD and type II diabetes that involves both genetics and lifestyle.

LITERATURE CITED

- Posadas-Romero, C., Tapia-Coyner, R. & Lerman-Garbol, I. (1995) Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population. *Atherosclerosis* 118: 275-284.
- Vidal-Quintanar, R. L., Mendivil, R. L., Peña, M., & Fernandez, M. L. (1998) Lime-treated maize husks lower plasma LDL-cholesterol in normal and hypercholesterolemic adult men from northern Mexico. *Br. J. Nutr.* 81: 281-288.
- Romero, A. L., Romero, J. E., Galaviz, S. & Fernandez, M. L. (1998) Cookies enriched with psyllium and oat bran lower plasma LDL-cholesterol in normal and hypercholesterolemic men from Northern Mexico. *J. Am. Coll. Nutr.* 17: 601-606.
- Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2001) *J. Am. Med. Assoc.* 285: 2486-2496.
- Ballesteros, M. N., Cabrera, R. M., Saucedo, M. S., Yapla-Plascencia, G. M. & Valencia M. E. (2001) Dietary fiber and life style influence serum lipids in free-living adult men. *J. Am. Coll. Nutr.* 20: 649-655.
- Bingham, S. A. (1988) The dietary assessment of individuals: methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Diet. Surv. Method* 57: 705-741.
- Allen, C. C., Poon, L. C., Chan, C. S., Richard, W. & Fu, P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475.
- Warnick, G. R., Benderson, J. & Albers, J. J. (1982) Dextran-sulphate-Mg+2 precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin. Chem.* 28: 1379-1388.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499-502.
- Car, T., Anderssen, C. J. & Rudolf, L. L. (1993) Enzymatic determination of triglycerides, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin. Biochem.* 26: 39-42.
- Rifat, N. & King, M. E. (1986) Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A-I, A-II and B in serum. *Clin. Chem.* 32: 937-950.
- Frendenrich, A., Groux, L. M., Tremblay, M., Krimbou, L., Davignon, J. & Cohn, J. S. (1987) Plasma lipoprotein distribution of apo C-III in normolipidemic and triglyceridemic subjects: comparison of the apo C-III to apo E ratio in different lipoprotein fractions. *J. Lipid Res.* 28: 1421-1432.
- Cohn, J. S., Tremblay, M., Amiot, M., Bouthillier, D., Roy, M., Genest, J. & Davignon, J. (1986) Plasma concentration of apolipoprotein E in intermediate-size remnant-like lipoproteins in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16: 149-159.
- Reljic, R., Ries, M., Anic, N. & Ries, B. (1992) New chromogen for assay of glucose in serum. *Clin. Chem.* 38: 622-625.
- Lolgren, I. E., Hanon, K. L., Zern, T. L., West, K. L., Patalay, M., Shachter, N. S., Kos, S. I. & Fernandez, M. L. (2004) Waist circumference is a better predictor than body mass index of coronary heart disease risk in overweight premenopausal women. *J. Nutr.* 134: 1071-1076.
- Haffner, S. M., Miettinen, H. & Stern, M. P. (1997) The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 20: 1097-1099.
- Aacasa, J. F., Romero, P., Real, J. T., Priego, A., Valdecabres, C. & Carmona, R. (2001) Insulin resistant quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population. *Med. Clin. (Barc.)* 117: 530-533.
- Orden, C. L., Kuczmarski, R. J., & Flegal, K. M. (2002) Centers for Disease Control and Prevention 2000 Growth Charts for United States: improvements to the 1977 National Center for Health Statistics. *Pediatrics* 109: 45-60.
- American Academic of Pediatrics. National Cholesterol Education Program. Report of the Expert Panel on blood cholesterol levels in children and adolescents (1992) *Pediatrics* 89: 525-554.
- Heron, K. L., Vega-Lopez, S., Ramigonesh, T., Conde-Knappe, K., Shachter, N. & Fernandez, M. L. (2003) Men classified as hypo- or hyper-responders to dietary cholesterol loading exhibit differences in lipoprotein metabolism. *J. Nutr.* 133: 1036-1042.
- Vega-Lopez, S., Conde, K., Vidal-Quintanar, R. L., Shachter, N. & Fernandez, M. L. (2002) Sex and hormonal status influence the effects of psyllium on lipoprotein remodeling and composition. *Metab. Clin. Exp.* 51: 600-607.
- Del Rio-Navarro, B. E., Valázquez-Monroy, O., Sánchez-Castillo, C. P., Lara-Esqueda, A., Berber, A., Farhanat, G., Violante, R., Tapia-Coyner, R. & James, W. P. (2004) The high prevalence of overweight and obesity in Mexican children. *Obes. Res.* 12: 215-223.
- Savva, S. C., Kourides, Y., Tomaritis, M., Epiphaniou-Savva, M., Tefouna, P. & Kalatas, A. (2001) Reference growth curves for Cypriot children 6 to 17 years of age. *Obes. Res.* 9: 754-762.
- Shachter, N. S. (2001) Apolipoproteins C-I and C-II as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 297-304.
- Backs, F. M., Alajovic, P., Moya, L. A., Cole, T. G., Sussex, V., Stampfer, M. J., Pfeffer, M. A. & Braunwald, E. (2000) VLDL, Apolipoproteins B, CII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation* 102: 1886-1892.
- Alessandro, C., Basill, S., Peverini, F., Barzi, H., Paradiso, M., Coppotelli, L., Vichi, F. & Cordova, C. (1992) High density lipoprotein cholesterol low serum level as the only risk factor in male patients with coronary heart disease. *Clin. Ter.* 141: 109-114.
- Dreon, D. M., Fernstrom, H. A., Williams, P. T. & Kraus, R. M. (1999) A very-low-fat diet is not associated with improved lipoprotein profiles in men with a predominance of large, low-density lipoproteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 411-418.
- Gardener, C. D., Fortmann, S. P. & Krauss, R. M. (1996) Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J. Am. Med. Assoc.* 276: 876-881.
- Sevanian, A., Asotryan, L. & Zluzenkov, O. (1999) Low density lipoprotein modification: basic concepts and relationship to atherosclerosis. *Blood Purif.* 17: 66-78.
- Kelley, C., Krummel, D., Gonzalez, E. N., Neal, W. A. & Fitch, C. W. (2004) Dietary intake of children at high risk for cardiovascular disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 104: 222-225.
- Kromhout, D., Menotti, A., Bloemberg, B., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Dontas, A. S., Fidanza, F., Giampaoli, S. & Jansen, A. (1995) Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 26-year mortality from coronary heart disease: the seven countries study. *Prev. Med.* 24: 308-315.
- Howell, W. H., McNamara, D. J., Tosca, M. A., Smith, B. T. & Gaines, J. A. (1997) Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1747-1754.
- Loucaides, C. A., Chedzoy, S. M. & Bonnett, H. (2002) Differences in physical activity levels between urban and rural school children in Cyprus. *Health Ed. Res.* 19: 136-147.
- Nicklas, B. J., Dennis, K. E., Berman, D. M., Lynch, N. A. & Dennis, K. E. (2003) Lifestyle intervention of hypocaloric dieting and walking reduces abdominal obesity and improves coronary heart disease risk factors in obese, postmenopausal, African-American and caucasian women. *J. Gerontol.* 58A: 181-189.

TABLE 3

Daily energy, macronutrient, fiber, and cholesterol intakes
by Mexican children¹

Variable	All children (n = 54)	Boys (n = 25)	Girls (n = 29)
Energy intake, kJ/d	6922 ± 1007	7679 ± 1455	6270 ± 1037
Total fat, % energy	39.0 ± 3.8	39.1 ± 4.4	38.9 ± 3.3
Saturated fat, % energy	12.0 ± 1.9	12.1 ± 1.9	11.8 ± 1.9
Monounsaturated fat, % energy	13.8 ± 1.9	13.9 ± 2.0	13.7 ± 1.7
Polyunsaturated fat, % energy	6.6 ± 1.9	6.2 ± 1.9	6.7 ± 1.9
Carbohydrates, % energy	47.1 ± 4.4	46.6 ± 4.4	47.6 ± 4.4
Protein, % energy	16.8 ± 2.3	16.9 ± 2.1	16.7 ± 2.5
Dietary fiber, g/d	18.1 ± 6.6	19.9 ± 7.2	16.5 ± 5.6
Dietary cholesterol, mg/d	395.0 ± 62.6	424.2 ± 69.1	370.0 ± 43.7

¹ Values are means ± SD.

case levels were within normal limits for children of that age, plasma insulin levels were high even compared to the normal adult range (50–150 pmol/L). In addition, 6 of the 54 children (11%) were classified as having insulin resistance as determined by the HOMA equation (Table 2). There was no gender difference in this variable because 3 boys and 3 girls were classified as having insulin resistance.

Pearson correlations were found between BMI and diastolic ($r = 0.495$, $P < 0.01$) and systolic ($r = 0.544$, $P < 0.01$) blood pressure. In addition plasma TG were positively correlated with apo C-III ($r = 0.282$, $P < 0.01$) and negatively correlated with plasma HDL-C concentrations ($r = -0.320$, $P < 0.01$).

Intake of total fat (39% of total energy) and saturated fat (12% of total energy) was higher than NCEP recommendations (Table 3). In contrast, carbohydrate intake was low (49% of total energy) compared to the average intake of 55% in the United States. The average intake of dietary fiber was high, due mostly to the consumption of tortillas and beans. The high level of dietary cholesterol (395 mg/d) reflects the high amount of animal (saturated) fat consumed by the children (Table 3).

DISCUSSION

In this study we show that biomarkers for chronic disease are present in young children from Northern Mexico, a region characterized by increased rates of CHD and diabetes type II. In addition, lifestyle factors appear to make a significant contribution to the prevalence of these diseases later in life.

In our previous studies with adult sedentary males from this same region, we observed extremely low HDL levels (ranging from 0.54 to 1.15 mmol/L) and high fasting plasma TG (mean 2.61 ± 0.85 mmol/L) (2,3), with 43% of these subjects having plasma LDL-C levels higher than 3.09 mmol/L. These biomarkers can be linked to the high prevalence of CHD and type II diabetes in this part of Mexico (1). In addition, when the diet from these subjects was analyzed using 3-d dietary records, there was a high consumption of saturated fat, mainly derived from meat products (3). Further, Mexican subjects from a low socioeconomic group also exhibited the biomarkers for CHD and insulin resistance and presented the same dietary pattern of high consumption of saturated fat (5). All these studies in adults plus our current study in children clearly indicate that

interventions targeted at modifying dietary intakes and increasing physical activity are seriously needed in this population.

Biomarkers of chronic disease. Children from this study had 3 identifiable risk factors, which could be associated with the increased risk for insulin resistance and CHD later in life, mainly high plasma TG, low HDL-C concentrations, and the predominance of small dense LDL or phenotype B. Identifying risk factors for the metabolic syndrome and CHD in young populations is essential for disease management and for the reduction of overall prevalence of these diseases. In addition, about 39% of children were classified as either overweight or obese according to CDC standards (18). We also measured the waist circumference in these children and, according to published values for Mexican children (22) and those from Cyprus (23), we found the same pattern as for BMI. The positive correlations detected between diastolic and systolic blood pressure with BMI were also important, suggesting that body weight may be associated with other parameters of heart disease and obesity in the population under study.

The elevated levels of plasma TG and the low levels of HDL-C present in this group of children represent a major concern in terms of biomarkers for chronic disease because both independently constitute a risk factor for CHD. In addition, there was a high prevalence of small dense LDL among these children and they also had elevated concentrations of plasma insulin. Furthermore, 11% of the population was classified as having insulin resistance.

Elevated plasma TG concentrations are correlated with increased risk for CHD. Apo C-III is known to inhibit TG hydrolysis by lipoprotein lipase (24), decreasing the removal of TG from VLDL or chylomicrons. Similar to our study, others have shown that plasma apo C-III concentrations correlate with TG levels (25) and are known to be increased in hypertriglyceridemic individuals (12). Plasma apo C-III levels were very high in children in the present study compared to values reported for adults (20,21), indicating that both risk factors (high apo C-III and high TG) are present in this population.

Low levels of HDL are better predictors for CHD than total or LDL-C (26). In agreement with the importance of HDL-C levels for CHD risk, the recommendations of the NCEP Adult Treatment Panel III report include an increased cutoff point for risk levels of HDL-C for both men (>1.03 mmol/L) and women (>1.16 mmol/L) (4). The low HDL-C concentrations observed in children in this study constitute an independent risk factor for CHD and may be a major reason for the prevalence of CHD in older populations.

In addition to the observed dyslipidemias in this population, the high prevalence of phenotype B contributes to the risk factors for chronic disease. Pattern B is associated with increased concentrations of TG, apo C-III, and apo B and decreased HDL (27) and is associated with a 3-fold increase in CHD risk (28). Pattern B results in LDL particles with decreased affinity to hepatic LDL receptors, extended residence time in circulation, increased migration into endothelial cells, increased propensity for oxidation, a stimulatory effect on macrophages, and enhanced coagulant activity (29). Small dense LDL is also a prominent feature associated with insulin resistance. Individuals who possess predominantly pattern B LDL particles (small LDL) are more prone to develop the insulin resistance syndrome. Thus, the presence of these 3 biomarkers in Mexican children supports the high prevalence of diabetes type II in the older population.

Diet and physical activity effects on chronic disease. We have shown in this study that plasma LDL-C concentrations are normal in children from this region at the ages of 8–12 y.

Dietary cholesterol does not increase biomarkers for chronic disease in a pediatric population from northern Mexico¹⁻³

Martha Nydia Ballesteros, Rosa Maria Cabrera, Maria del Socorro Saucedo, and Maria Luz Fernandez

ABSTRACT

Background: An increased incidence of coronary artery disease (CAD) is prevalent in northern Mexico. Effects of specific dietary components on risk factors for CAD have not been evaluated in children.

Objective: The purpose was to evaluate the effects of dietary cholesterol provided by whole eggs on the lipoprotein profile, LDL size, and phenotype in children from this region.

Design: Children (29 girls and 25 boys aged 8–12 y) were randomly assigned to either 2 eggs/d (EGG period; 518 additional mg cholesterol) or the equivalent amount of egg whites (SUB period; 0 additional mg cholesterol) for 30 d. After a 3-wk washout period, the children were assigned to the alternate treatment.

Results: Subjects were classified as hyporesponders (no increase or ≤ 0.05 mmol/L increase in plasma cholesterol for 100 mg additional cholesterol) or hyperresponders (≥ 0.06 mmol/L increase). During the EGG period, the hyperresponders ($n = 18$) had an elevation in both LDL cholesterol (from 1.54 ± 0.38 to 1.93 ± 0.36 mmol/L) and HDL cholesterol (from 1.23 ± 0.26 to 1.35 ± 0.29 mmol/L) with no changes in LDL:HDL. In contrast, hyporesponders ($n = 36$) had no significant alterations in plasma LDL or HDL cholesterol. All subjects had an increase in LDL peak diameter during the EGG period ($P < 0.01$) and a decrease ($P < 0.01$) in the smaller LDL subfractions. In addition, 5 of the children having LDL phenotype B (15%) shifted from this high-risk pattern to pattern A after the EGG treatment.

Conclusions: Intake of 2 eggs/d results in the maintenance of LDL:HDL and in the generation of a less atherogenic LDL in this population of Mexican children. *Am J Clin Nutr* 2004;80:855–61.

KEY WORDS Dietary cholesterol, children, LDL atherogenicity, LDL cholesterol, HDL cholesterol

INTRODUCTION

The multifactorial nature of coronary artery disease (CAD) comprises both nonmodifiable and modifiable risk factors. Dyslipidemias, including elevated concentrations of plasma LDL cholesterol and triacylglycerol, low HDL-cholesterol concentrations (1), and the presence of small dense LDL representative of the pattern B subclass (2), have a significant contribution to the incidence of CAD.

The primary treatment for modifying these risk factors should be changing dietary habits, increasing aerobic exercise, and maintaining body weight. Several of the dietary recommendations include decreasing saturated fat and cholesterol intake and

increasing complex carbohydrates and dietary fiber. However, a vast controversy surrounds dietary cholesterol and disease prevention (3). Furthermore, it is well known that remarkable variability exists in the response to dietary cholesterol among individuals; therefore, studies examining diet–gene interactions were carried out to explain the interindividual variability in the response to cholesterol intake (4).

A high prevalence of CAD, insulin resistance, and type 2 diabetes is found in northern Mexico (5). It is not clear whether the biomarkers for chronic disease can be identified at childhood or whether lifestyle choices over time play a significant role in the prevalence of chronic disease in the adult population. Therefore, studies aimed at understanding the cause of CAD and the contribution of modifiable risk factors to chronic disease are needed for this population.

An analysis of multiple cholesterol-feeding studies, conducted over a 50-y period, has shown that a modest increase in total cholesterol of 0.05–0.06 mmol/L could be predictable in response to a 100-mg/d increase in dietary cholesterol (6). If this moderate increase is used as a reference, those who experience elevations of ≥ 0.06 mmol/L in plasma cholesterol would be classified as hyperresponders, whereas hyporesponders would be those who have no change or have increases of ≤ 0.05 mmol/L in response to a 100-mg/d increase in cholesterol intake. In our previous reports in men and premenopausal women, the presence of 2 distinct populations was shown (7, 8). Therefore, it was important to identify in the pediatric population of the current study whether children can be classified similarly.

Although eggs are a central food in the diets of Mexicans that span all socioeconomic classes, little is known about the plasma lipid response to dietary cholesterol in the pediatric population. If egg intake does indeed have negative health implications, consumption would be expected to result in a detrimental lipoprotein profile and in the development of a more atherogenic LDL particle. Therefore, the purpose of the current investigation was to evaluate the effects of dietary cholesterol on plasma lipids

¹ From the Centro de Investigación y Desarrollo AC, Hermosillo, Sonora, Mexico (MNB, RMC, MdSS), and the Department of Nutritional Sciences, University of Connecticut, Storrs (MLF).

² Supported by the American Egg Board and the University of Connecticut Research Foundation.

³ Address reprint requests to ML Fernandez, University of Connecticut, Department of Nutritional Sciences, 3624 Horsebarn Road Extension, U-4017, Storrs, CT 06269. E-mail: maria-luz.fernandez@uconn.edu.

Received December 15, 2003.

Accepted for publication April 14, 2004.

and LDL atherogenicity in a pediatric population (children aged 8–12 y) from a region in Mexico where significant dyslipidemias were identified in the adults (9).

SUBJECTS AND METHODS

Materials

Enzymatic cholesterol and triacylglycerol kits were from Roche-Diagnostics (Indianapolis). Free cholesterol, apolipoprotein B (apo B), and apo E enzymatic kit was from Wako Pure Chemical (Osaka, Japan). EDTA, aprotinin, sodium azide, and phenyl methyl sulfonyl fluoride were obtained from Sigma Chemical (St Louis). Food scales were purchased at Ohaus Corporation (Pine Brook, NJ). Eggs were obtained from Pecuaria Sonorense, Hermosillo, Sonora, Mexico, and marigold powder from Laboratories Castells, Mexico City.

Subjects and experimental design

The experimental protocol was approved by the University of Connecticut Institutional Review Board and by the Review Board of Centro de Investigacion y Desarrollo A.C. Parents of children participating in the study attended informational meetings and signed the consent form. Children also received an explanation of the protocols in detail. Sixty children (30 boys and 30 girls) aged 8–12 y were recruited from the school Mauricio Kelly located in one of the lowest socioeconomic quarters of the city of Hermosillo, Mexico. They were randomly allocated to an egg (EGG) or a substitute (SUB)-based diet for a period of 30 d with a washout period of 3 wk, followed by allocation to the alternate diet. Children consumed daily either the equivalent of 110 g or 2 whole eggs (518 additional mg dietary cholesterol) or the equivalent amount of egg whites (0 additional mg dietary cholesterol) with added color (SUB). Egg whites were colored with a commercial powder (10 mg/100 g egg), derived from marigold, which is rich in lutein.

Both the eggs and the SUB were prepared and served as scrambled eggs to all children every morning during breakfast in the school cafeteria. Children were divided into 2 groups, which had different sitting arrangements to avoid discussion on the potential differences in color between products (EGG compared with SUB). For the weekend, eggs were packed and sent home with the children. Parents were carefully instructed before the intervention started on feeding the correct product to the children, EGG or SUB (with the added color), during the corresponding periods. Parents were monitored closely and interviewed several times during the study to ensure that instructions were properly followed. Compliance was more than 98% both during the week and under parental supervision. In addition, to evaluate physical activity, children wore a pedometer attached to their clothing during a whole week to record the number of steps taken. Steps were recorded at baseline, during the EGG, and during the SUB periods. Fifty-four subjects (25 boys and 29 girls) completed the study.

Children were asked to follow their usual diet during both dietary periods. Three-day weighed food records (10) were used to evaluate dietary intake of macronutrients and dietary cholesterol during both periods. Both the children and the individual in charge of preparing meals at home were provided with food scales (Ohaus CS 2000) and a chart to record the subject's daily intake. Parents were instructed on how to keep the records, and

researchers in the study worked closely with children to document their food during the day. Diet intake was analyzed by using the ESHA Food Processor program (ESHA, Food Processor, 7.20, ESHA Research Editor, 1998, Salem, OR). Regional foods that were not included in the database were analyzed for individual components and added to the database. These foods include snacks, beans prepared in 3 different ways (dry, whole, and with broth), specific meats, flour and corn tortillas, organ meats, and candies, which were usually consumed by the children. Parents whose children agreed completed 3 24-h dietary records during each treatment period.

Plasma lipids and apolipoproteins

Two fasting (12 h) blood samples were collected on 2 different days for each subject into tubes containing 0.15 g/100 g EDTA to determine baseline plasma lipids. Plasma was separated by centrifugation at $1500 \times g$ for 20 min at 4 °C and placed into vials containing phenyl methyl sulfonyl fluoride (0.05 g/100 g), sodium azide (0.01 g/100 g), and aprotinin (0.01 g/100 g). Two additional blood samples were collected at the end of each diet treatment and washout period. The variables of weight, blood pressure, and level of activity were measured at baseline and after each dietary period to account for the possible influence of these factors on plasma lipids.

Total cholesterol was determined by enzymatic methods by using Roche-Diagnostics standards and kits (11). HDL cholesterol was measured in the supernatant after precipitation of apo B-containing lipoproteins (12) and LDL cholesterol was determined by using the Friedewald equation (13). Triacylglycerols were determined by using Roche-Diagnostics kits, which adjust for free glycerol (14). Means of the 2 blood draws were used to assess differences between treatment periods. Apo B concentrations were determined with use of an immunoturbidimetric method, and turbidity was measured in a microplate spectrophotometer at 340 nm (15). Apo C-III (16) and apo E (17) were measured with a Hitachi Autoanalyzer 740 using kits from Wako.

LDL size determination

The Lipoprint LDL system (Quantimetrix, Redondo Beach, CA), which uses nongradient high-resolution polyacrylamide gel electrophoresis, was used to determine LDL peak particle diameter and subclass distribution. Briefly, 25 μ L plasma was added to precast polyacrylamide gel tubes and overlaid with 200 μ L loading buffer. Tubes were then photopolymerized for \approx 30 min and then placed into the electrophoresis chamber. Electrophoresis buffer (Tris-hydroxymethyl aminomethane: 66.1 g/100 g; boric acid: 33.9 g/100 g; pH 8.2–8.6) was added to the top and bottom portion of the chamber. The gel was run for \approx 60 min at 36 mV or until the HDL fraction was \approx 1 cm from the end of the tube. Gels were allowed to sit for 30 min and then scanned with a densitometer. The Lipoprint system quantifies 6 different LDL subclasses according to size. Most subjects did not have LDL-4, -5, and -6 in an amount that could be detected; therefore, only 3 fractions are reported here. However, for those subjects who carried a detectable amount of cholesterol in the smaller LDL fractions, these concentrations were added into LDL-3 fraction.

TABLE 1
Baseline characteristics of the boys and girls participating in the study¹

Parameter	Boys (n = 25)	Girls (n = 29)
Age (y)	10.6 ± 1.6	10.2 ± 1.5
Physical activity (steps/d)	6624 ± 2893	6113 ± 2793
BMI (kg/m ²)	20.9 ± 4.3	18.4 ± 2.9 ²
Systolic blood pressure (mm Hg)	102.5 ± 6.9	101.2 ± 5.3
Diastolic blood pressure (mm Hg)	64.8 ± 3.9	63.0 ± 3.2
Total cholesterol (mmol/L)	3.60 ± 0.44	3.46 ± 0.43
LDL cholesterol (mmol/L)	1.72 ± 0.48	1.69 ± 0.50
HDL cholesterol (mmol/L)	1.30 ± 0.22	1.22 ± 0.20
Triacylglycerols (mmol/L)	1.26 ± 0.37	1.21 ± 0.39
LDL:HDL	1.36 ± 0.43	1.45 ± 0.58

¹ All values are $\bar{x} \pm SD$.

² Significantly different from boys, $P < 0.05$ (Student's *t* test).

Data analysis

SPSS version 11.5 (SPSS Inc, Chicago) was used for statistical analysis. Student's *t* test was used to compare initial characteristics between boys and girls. Initial analysis revealed that there were no differences because of sex in the response to dietary cholesterol or to any of the measured parameters. Thus, to improve clarity in the presentation of data, boys and girls were pooled according to response classification for statistical analysis. Two-way analysis of variance ANOVA was used to analyze initial plasma lipids in boy and girl hyperresponders and hyporesponders. Repeated-measures ANOVA was used to analyze diet effects, responder effects, and the interactions for plasma lipids, apolipoproteins, dietary components, distribution of cholesterol in LDL subfractions, and LDL peak size. Each subject during both dietary periods was the repeated measure, whereas the comparison between groups was between hyperresponders and hyporesponders. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Baseline characteristics of the children [plasma lipids, level of activity, blood pressure, and body mass index (BMI)] classified by sex are presented in **Table 1**. No significant differences were seen in age between boys and girls. In addition, sex did not influence plasma total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, or triacylglycerol, level of activity, or blood pressure at baseline. However, BMI was higher in boys than girls.

Children in this population were characterized for having a value for HDL cholesterol in the 25th percentile according to the report from the National Cholesterol Education Program and triacylglycerol in the 95th percentile (18). In contrast LDL cholesterol and total cholesterol are in the 50th percentile for children in this age range (18).

As previously mentioned, a modest increase in total cholesterol of 0.05–0.06 mmol/L can be considered normal in response to a 100-mg/d increase in dietary cholesterol (19). On the basis of our data from our previous studies (7, 8) and our evaluation of the response in this group of Mexican children, subjects who experienced an increase in total cholesterol ≥ 0.06 mmol/L for each additional 100 mg dietary cholesterol were considered hyperresponders (**Figure 1**). Because children were fed an additional 518 mg/d dietary cholesterol during the EGG period, those children who experienced an increase in plasma cholesterol of ≥ 0.33

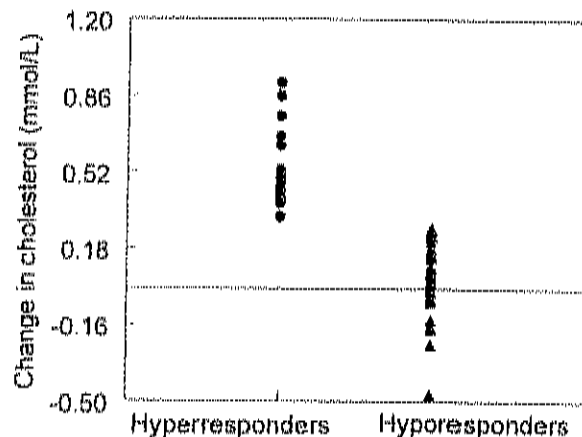


FIGURE 1. Changes in total cholesterol concentrations during the EGG and the substitute periods for hyperresponders (●; $n = 18$) and hyporesponders (▲; $n = 36$).

mmol/L were considered hyperresponders. The remaining subjects who experienced fluctuations of <0.29 mmol/L (an increase in total cholesterol of ≤ 0.05 mmol/L for each additional 100 mg dietary cholesterol consumed) or had no change in plasma cholesterol were identified as hyporesponders.

After the classification of subjects, we analyzed the data to determine whether plasma lipids differed at baseline. Both boys and girls classified as hyporesponders or hyperresponders did not have significant differences in their baseline characteristics for plasma LDL, HDL, or triacylglycerol concentrations or for the other parameters evaluated, including level of exercise, blood pressure, and BMI (data not shown).

As shown in **Table 2**, this population of children was characterized by consuming a high-fat diet independent of dietary period. The percentage of energy derived from fat and saturated fat ranged from 37% to 43% and 10.5% to 13.6%, respectively. In contrast the percentage of carbohydrates was low, ranging from 42% to 49%. The high amount of fat in this population is mostly due to the consumption of low-cost meat products, including high-fat meat, chicken with skin, chorizo, and high-fat hot dogs plus hydrogenated oil used for the preparation of tortillas (20). However, the amount of dietary fiber in the diet is adequate and might be due to the high consumption of tortillas and beans (20).

In regard to response classification, the amount of total calories consumed was not different for hyperresponders or hyporesponders during both dietary periods. The percent of calories derived from carbohydrates and protein was higher during the SUB period ($P < 0.01$; **Table 2**). In addition, hyperresponders consumed less carbohydrate during the EGG period than hyporesponders during the EGG period or either group during the SUB period (interactive effect, $P < 0.05$). In contrast the percent of calories derived from fat and monounsaturated fatty acids (MUFAs) were higher during the EGG period ($P < 0.05$). Saturated fatty acid (SFA) was not significantly different in hyperresponders between diets. SFA was significantly lower during the SUB period in the hyporesponders than in the hyporesponders during EGG or than the hyperresponders during either period.

An interactive effect was also seen with hyperresponders consuming more total, SFA, and MUFA during the EGG period ($P <$

TABLE 2

Intakes of carbohydrate, protein, total fat, saturated (SFA), polyunsaturated (PUFA), and monounsaturated (MUFA) fatty acids; dietary cholesterol; dietary fiber; and vitamin E of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

Dietary component	Hyperresponders		Hyporesponders		P		
	EGG	SUB	EGG	SUB	Diet effect	Responder effect	Interaction
Energy (kJ)	6765 ± 1592	7182 ± 1610	7240 ± 1997	6583 ± 1797	NS	NS	NS
Carbohydrate (% of energy)	42.8 ± 3.8 ^a	47.8 ± 8.3 ^a	46.4 ± 7.6 ^a	49.0 ± 7.5 ^a	< 0.01	< 0.05	< 0.05
Protein (% of energy)	14.4 ± 2.2	18.5 ± 3.1	15.0 ± 3.4	18.8 ± 3.9	< 0.01	NS	NS
Total fat (% of energy)	43.1 ± 3.7 ^a	38.3 ± 6.1 ^b	39.2 ± 5.5 ^b	37.1 ± 6.3 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
SFA (% of energy)	13.6 ± 2.0 ^a	12.0 ± 3.0 ^{ab}	12.6 ± 2.4 ^a	10.5 ± 2.4 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
PUFA (% of energy)	8.8 ± 1.9	7.6 ± 2.3	8.4 ± 2.3	9.2 ± 3.3	NS	NS	NS
MUFA (% of energy)	15.5 ± 2.2 ^a	13.3 ± 3.2 ^a	13.7 ± 3.0 ^a	13.2 ± 2.8 ^b	< 0.05	NS	< 0.05
Dietary cholesterol (mg)	602.8 ± 75.4	175.1 ± 144.3	663.8 ± 101.7	132.3 ± 67.6	< 0.001	NS	NS
Total fiber (g)	19.3 ± 6.1	19.6 ± 7.9	16.6 ± 9.1	18.2 ± 7.5	NS	NS	NS
Vitamin E (mg)	14.6 ± 5.9	6.2 ± 3.1	14.8 ± 10.0	5.7 ± 2.2	< 0.001	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm$ SD for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Within a row, values with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$ (repeated-measures ANOVA and Tukey's post hoc test).

0.05) than any other group or time. The percent of calories derived from polyunsaturated fatty acids or the amount of total fiber were not different between dietary periods (Table 2).

As expected the amount of dietary cholesterol was significantly higher for all subjects during the EGG period and is mostly because of the 518 additional mg dietary cholesterol provided by the egg yolks (Table 2). Vitamin E was significantly higher during the EGG period, indicating the importance of whole egg in the contribution to the recommended values of 8 mg for girls and 10 mg for boys.

Other variables such as level of activity, fluctuations in body weight, or changes in blood pressure, which might influence plasma lipids, were analyzed during both dietary periods. As indicated in Table 3, no significant differences were seen in number of steps taken per day, systolic blood pressure, or BMI for hyporesponders or hyperresponders during the EGG or the SUB period. Interestingly, the diastolic blood pressure was lower during the EGG period for both hyperresponders and hyporesponders (diet effect, $P < 0.05$; Table 3).

Plasma lipids and apoproteins were evaluated after the classification of subjects as hyperresponders or hyporesponders. As shown in Table 4, there was a diet effect ($P < 0.001$) and

responder effect ($P < 0.001$) for both plasma LDL-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations. There was also an interactive effect with the hyperresponders having higher concentrations of both LDL ($P < 0.01$) and HDL ($P < 0.05$) during the EGG period with no significant change in the hyporesponders. The total cholesterol:HDL (Table 4) and the LDL:HDL, important markers for coronary heart disease risk, were maintained during the EGG or SUB periods for all participants. The LDL:HDL was 1.49 ± 0.45 (EGG period) and 1.31 ± 0.41 (SUB period) for hyperresponders and 1.57 ± 0.49 (EGG period) and 1.56 ± 0.44 (SUB period) for the hyporesponders. In addition, plasma apo B concentrations did not differ between hyperresponders or hyporesponders or between EGG or SUB intake (Table 4). Likewise plasma apo C-III and apo E concentrations did not change during either dietary period. Values for apo C-III were 121 ± 31 (EGG period) and 115 ± 24 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 106 ± 26 (EGG period) and 115 ± 37 mg/L (SUB period) for hyporesponders. For plasma apo E concentrations, values were 38 ± 14 (EGG period) and 33 ± 6 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 35 ± 15 (EGG period) and 33 ± 8 mg/L (SUB period) for hyporesponders.

TABLE 3

Body mass index, systolic and diastolic blood pressure, and number of steps taken per day of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

	Body mass index	Systolic blood pressure	Diastolic blood pressure	No. of steps
	kg/m ²	mm Hg	mm Hg	steps/d
Hyperresponders				
EGG	19.8 ± 4.1	100.2 ± 7.2	62.3 ± 3.2	6847 ± 3353
SUB	19.8 ± 3.9	100.3 ± 7.4	64.7 ± 4.0	6818 ± 2980
Hyporesponders				
EGG	19.5 ± 3.6	102.9 ± 7.4	63.4 ± 4.5	6642 ± 3268
SUB	19.4 ± 3.8	101.9 ± 6.7	64.7 ± 5.2	6504 ± 3394
Diet effect	NS	NS	$P < 0.05$	NS
Responder effect	NS	NS	NS	NS
Interaction	NS	NS	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm$ SD for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Repeated-measures ANOVA was used to analyze diet effects, responder effects, and their interaction.

TABLE 2

Intakes of carbohydrate; protein; total fat; saturated (SFA), polyunsaturated (PUFA), and monounsaturated (MUFA) fatty acids; dietary cholesterol; dietary fiber; and vitamin E of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

Dietary component	Hyperresponders		Hyporesponders		Diet effect	Responder effect	Interaction
	EGG	SUB	EGG	SUB			
Energy (kJ)	6765 ± 1592	7182 ± 1610	7240 ± 1997	6583 ± 1797	NS	NS	NS
Carbohydrate (% of energy)	42.8 ± 3.8 ^b	47.8 ± 5.3 ^a	46.4 ± 7.6 ^a	49.0 ± 7.5 ^a	< 0.01	< 0.05	< 0.05
Protein (% of energy)	14.4 ± 2.2	18.5 ± 3.1	15.0 ± 3.4	18.8 ± 3.9	< 0.01	NS	NS
Total fat (% of energy)	43.1 ± 3.7 ^a	38.3 ± 6.1 ^b	39.2 ± 5.5 ^b	37.1 ± 6.3 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
SFA (% of energy)	13.6 ± 2.0 ^a	12.0 ± 3.0 ^{a,b}	12.6 ± 2.4 ^a	10.5 ± 2.4 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
PUFA (% of energy)	8.8 ± 1.9	7.6 ± 2.3	8.4 ± 2.3	9.2 ± 3.3	NS	NS	NS
MUFA (% of energy)	15.5 ± 2.2 ^a	13.3 ± 3.2 ^b	13.7 ± 3.0 ^b	13.2 ± 2.8 ^b	< 0.05	NS	< 0.05
Dietary cholesterol (mg)	602.8 ± 75.4	175.1 ± 144.3	663.8 ± 101.7	132.3 ± 67.6	< 0.001	NS	NS
Total fiber (g)	19.3 ± 6.1	19.6 ± 7.9	16.6 ± 9.1	18.2 ± 7.5	NS	NS	NS
Vitamin E (mg)	14.6 ± 5.9	6.3 ± 3.1	14.8 ± 10.0	5.7 ± 2.2	< 0.001	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm$ SD for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Within a row, values with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$ (repeated-measures ANOVA and Tukey's post hoc test).

0.05) than any other group or time. The percent of calories derived from polyunsaturated fatty acids or the amount of total fiber were not different between dietary periods (Table 2).

As expected the amount of dietary cholesterol was significantly higher for all subjects during the EGG period and is mostly because of the 518 additional mg dietary cholesterol provided by the egg yolks (Table 2). Vitamin E was significantly higher during the EGG period, indicating the importance of whole egg in the contribution to the recommended values of 8 mg for girls and 10 mg for boys.

Other variables such as level of activity, fluctuations in body weight, or changes in blood pressure, which might influence plasma lipids, were analyzed during both dietary periods. As indicated in Table 3, no significant differences were seen in number of steps taken per day, systolic blood pressure, or BMI for hyporesponders or hyperresponders during the EGG or the SUB period. Interestingly, the diastolic blood pressure was lower during the EGG period for both hyperresponders and hyporesponders (diet effect, $P < 0.05$; Table 3).

Plasma lipids and apoproteins were evaluated after the classification of subjects as hyperresponders or hyporesponders. As shown in Table 4, there was a diet effect ($P < 0.001$) and

responder effect ($P < 0.001$) for both plasma LDL-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations. There was also an interactive effect with the hyperresponders having higher concentrations of both LDL ($P < 0.01$) and HDL ($P < 0.05$) during the EGG period with no significant change in the hyporesponders. The total cholesterol:HDL (Table 4) and the LDL:HDL, important markers for coronary heart disease risk, were maintained during the EGG or SUB periods for all participants. The LDL:HDL was 1.49 ± 0.45 (EGG period) and 1.31 ± 0.41 (SUB period) for hyperresponders and 1.57 ± 0.49 (EGG period) and 1.56 ± 0.44 (SUB period) for the hyporesponders. In addition, plasma apo B concentrations did not differ between hyperresponders or hyporesponders or between EGG or SUB intake (Table 4). Likewise plasma apo C-III and apo E concentrations did not change during either dietary period. Values for apo C-III were 121 ± 31 (EGG period) and 115 ± 24 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 106 ± 26 (EGG period) and 115 ± 37 mg/L (SUB period) for hyporesponders. For plasma apo E concentrations, values were 38 ± 14 (EGG period) and 33 ± 6 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 35 ± 15 (EGG period) and 33 ± 8 mg/L (SUB period) for hyporesponders.

TABLE 3

Body mass index, systolic and diastolic blood pressure, and number of steps taken per day of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

	Body mass index	Systolic blood pressure	Diastolic blood pressure	No. of steps
	kg/m^2	$mm\ Hg$	$mm\ Hg$	$steps/d$
Hyperresponders				
EGG	19.8 ± 4.1	100.2 ± 7.2	62.3 ± 3.2	6847 ± 3353
SUB	19.8 ± 3.9	100.3 ± 7.4	64.7 ± 4.0	6818 ± 2980
Hyporesponders				
EGG	19.5 ± 3.6	102.9 ± 7.4	63.4 ± 4.5	6642 ± 3268
SUB	19.4 ± 3.8	101.9 ± 6.7	64.7 ± 5.2	6504 ± 3394
Diet effect	NS	NS	$P < 0.05$	NS
Responder effect	NS	NS	NS	NS
Interaction	NS	NS	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm$ SD for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Repeated-measures ANOVA was used to analyze diet effects, responder effects, and their interaction.

TABLE 2

Intakes of carbohydrate; protein; total fat; saturated (SFA), polyunsaturated (PUFA), and monounsaturated (MUFA) fatty acids; dietary cholesterol; dietary fiber; and vitamin E of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

Dietary component	Hyperresponders		Hyporesponders		Diet effect	Responder effect	Interaction
	EGG	SUB	EGG	SUB			
Energy (kJ)	6765 ± 1592	7182 ± 1610	7240 ± 1997	6583 ± 1797	NS	NS	NS
Carbohydrate (% of energy)	42.8 ± 3.8 ^a	47.8 ± 8.3 ^a	46.4 ± 7.6 ^a	49.0 ± 7.5 ^a	< 0.01	< 0.05	< 0.05
Protein (% of energy)	14.4 ± 2.2	18.5 ± 3.1	15.0 ± 3.4	18.8 ± 3.9	< 0.01	NS	NS
Total fat (% of energy)	43.1 ± 3.7 ^a	38.3 ± 6.1 ^b	39.2 ± 5.5 ^b	37.1 ± 6.3 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
SFA (% of energy)	13.6 ± 2.0 ^a	12.0 ± 3.0 ^{a,b}	12.6 ± 2.4 ^a	10.5 ± 2.4 ^b	< 0.01	< 0.05	< 0.05
PUFA (% of energy)	8.8 ± 1.9	7.6 ± 2.3	8.4 ± 2.3	9.2 ± 3.3	NS	NS	NS
MUFA (% of energy)	15.5 ± 2.2 ^a	13.3 ± 3.2 ^b	13.7 ± 3.0 ^b	13.2 ± 2.8 ^b	< 0.05	NS	< 0.05
Dietary cholesterol (mg)	602.8 ± 75.4	175.1 ± 144.3	663.8 ± 101.7	132.3 ± 67.6	< 0.001	NS	NS
Total fiber (g)	19.3 ± 6.1	19.6 ± 7.9	16.6 ± 9.1	18.2 ± 7.5	NS	NS	NS
Vitamin E (mg)	14.6 ± 5.9	6.2 ± 3.1	14.8 ± 10.0	5.7 ± 2.2	< 0.001	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm SD$ for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Within a row, values with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$ (repeated-measures ANOVA and Tukey's post hoc test).

0.05) than any other group or time. The percent of calories derived from polyunsaturated fatty acids or the amount of total fiber were not different between dietary periods (Table 2).

As expected the amount of dietary cholesterol was significantly higher for all subjects during the EGG period and is mostly because of the 518 additional mg dietary cholesterol provided by the egg yolks (Table 2). Vitamin E was significantly higher during the EGG period, indicating the importance of whole egg in the contribution to the recommended values of 8 mg for girls and 10 mg for boys.

Other variables such as level of activity, fluctuations in body weight, or changes in blood pressure, which might influence plasma lipids, were analyzed during both dietary periods. As indicated in Table 3, no significant differences were seen in number of steps taken per day, systolic blood pressure, or BMI for hyporesponders or hyperresponders during the EGG or the SUB period. Interestingly, the diastolic blood pressure was lower during the EGG period for both hyperresponders and hyporesponders (diet effect, $P < 0.05$; Table 3).

Plasma lipids and apoproteins were evaluated after the classification of subjects as hyperresponders or hyporesponders. As shown in Table 4, there was a diet effect ($P < 0.001$) and

responder effect ($P < 0.001$) for both plasma LDL-cholesterol and HDL-cholesterol concentrations. There was also an interactive effect with the hyperresponders having higher concentrations of both LDL ($P < 0.01$) and HDL ($P < 0.05$) during the EGG period with no significant change in the hyporesponders. The total cholesterol:HDL (Table 4) and the LDL:HDL, important markers for coronary heart disease risk, were maintained during the EGG or SUB periods for all participants. The LDL:HDL was 1.49 ± 0.45 (EGG period) and 1.31 ± 0.41 (SUB period) for hyperresponders and 1.57 ± 0.49 (EGG period) and 1.56 ± 0.44 (SUB period) for the hyporesponders. In addition, plasma apo B concentrations did not differ between hyperresponders or hyporesponders or between EGG or SUB intake (Table 4). Likewise plasma apo C-III and apo E concentrations did not change during either dietary period. Values for apo C-III were 121 ± 31 (EGG period) and 115 ± 24 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 106 ± 26 (EGG period) and 115 ± 37 mg/L (SUB period) for hyporesponders. For plasma apo E concentrations, values were 38 ± 14 (EGG period) and 33 ± 6 mg/L (SUB period) for hyperresponders and 35 ± 15 (EGG period) and 33 ± 8 mg/L (SUB period) for hyporesponders.

TABLE 3

Body mass index, systolic and diastolic blood pressure, and number of steps taken per day of hyper- and hyporesponders during the EGG and SUB periods¹

	Body mass index	Systolic blood pressure	Diastolic blood pressure	No. of steps
	kg/m ²	mm Hg	mm Hg	steps/d
Hyperresponders				
EGG	19.8 ± 4.1	100.2 ± 7.2	62.3 ± 3.2	6847 ± 3353
SUB	19.8 ± 3.9	100.3 ± 7.4	64.7 ± 4.0	6818 ± 2980
Hyporesponders				
EGG	19.5 ± 3.6	102.9 ± 7.4	63.4 ± 4.5	6642 ± 3268
SUB	19.4 ± 3.8	101.9 ± 6.7	64.7 ± 5.2	6504 ± 3394
Diet effect	NS	NS	$P < 0.05$	NS
Responder effect	NS	NS	NS	NS
Interaction	NS	NS	NS	NS

¹ All values are $\bar{x} \pm SD$ for $n = 18$ hyperresponders and 36 hyporesponders. During the EGG period, the subjects received 2 eggs (518 additional mg cholesterol/d); during the SUB period, the subjects received egg whites (0 additional mg cholesterol). Repeated-measures ANOVA was used to analyze diet effects, responder effects, and their interaction.