



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CUANTIFICACIÓN COMPARATIVA EN FASE  
SEMISÓLIDA DE LAS SUBPOBLACIONES DE  
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD POR  
MEDIO DE LA DETERMINACIÓN DE  
COLESTEROL Y PROTEÍNA: EFECTO DE LAS  
TIAZOLIDINEDIONAS Y OTRAS CONDICIONES  
FISIOLÓGICAS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**PAOLA TOLEDO IBELLES**



**MÉXICO, D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. Eleazar Martínez Barajas

**VOCAL:** Profa. Sobeida Sánchez Nieto

**SECRETARIO:** Prof. Óscar Armando Pérez Méndez

**1er. Suplente** Profa. Martha Patricia Neri Paez

**2° Suplente** Profa. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”,  
Departamento de Fisiología.

---

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez  
Asesor del tema

---

Paola Toledo Ibelles  
Sustentante

**ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) No. 47275. AGRADEZCO ADEMÁS  
LA BECA OTORGADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO.**

## AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos y madre. Por regalarme la oportunidad de encontrar el camino hasta este punto de mi vida, por determinar mi personalidad y ser mi brújula emocional.

A mis hermanos. Por demostrar que al decir opuesto, hay más de una opción. Me han enseñado a estar consciente de mi referencia... en muchos sentidos.

A Emilio, simplemente porque lo quiero.

Al Dr. Óscar A. Pérez Méndez. Por todo su tiempo, opiniones, apoyo y paciencia como tutor, y por trascender como un amigo.

A mis amigos: Cecilia, Mónica (Deno), Antonio (Antoua), Nancy, Ileana, Ana Lilia (Difo), Vicente(.), Iván (Sr. Panda), Pedro (Pive) y José Carlos (Joc). Porque, si vale la pena mencionar la palabra *amistad*, sin duda ustedes son la razón.

A la UNAM. Porque en sus instalaciones encontré la ciencia que me encanta, el arte que me apasiona, la amistad que me sostiene y la locura inherente a mi vida.

A los excelentes profesores que he encontrado a lo largo de mi vida académica. Les debo mis nociones, certezas y aprecio.

## ÍNDICE.

	Página
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
1 ANTECEDENTES	6
1.1. Lipoproteínas	6
1.2. Clasificación de las lipoproteínas	8
1.3. Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	10
1.4. Metabolismo de las HDL	10
1.5. Subpoblaciones de HDL	13
1.5.1. Métodos de separación y determinación	13
1.6. Enfermedad aterosclerosa coronaria	18
1.7. Arteritis de Takayasu	21
2 HIPÓTESIS	22
3 OBJETIVO GENERAL	23
4 OBJETIVOS PARTICULARES	23
5 MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Muestras	24
5.2 Obtención de muestras	25
5.3 Análisis de laboratorio	25
5.4 Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL	25
5.5 Determinación de colesterol	27

5.6	Inmunotransferencia	28
5.7	Análisis estadístico	28
6	RESULTADOS.	29
6.1	Determinación de componentes y condiciones del método	29
6.2	Evaluación del método	34
6.3	Efecto del tratamiento con TZD	44
6.4	Arteritis de Takayasu	49
7	DISCUSIÓN	53
8	PERSPECTIVAS	61
9	BIBLIOGRAFÍA	62
10	APÉNDICE 1	68
11	APÉNDICE 2	70
12	APÉNDICE 3	71

## **ABREVIATURAS.**

<b>ABCA-1:</b>	Transportador de membrana dependiente de ATP
<b>Apo:</b>	Apolipoproteínas
<b>CETP:</b>	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
<b>C-HDL:</b>	Colesterol de HDL
<b>C-LDL:</b>	Colesterol de LDL
<b>CT:</b>	Colesterol total
<b>EAC:</b>	Enfermedad aterosclerosa coronaria
<b>FMS:</b>	Fenazín metasulfato
<b>HDL:</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>IDL:</b>	Lipoproteínas de densidad intermedia
<b>LCAT:</b>	Lecitina colesterol acilo transferasa
<b>LDL:</b>	Lipoproteínas de baja densidad
<b>LH:</b>	Lipasa hepática
<b>Lp:</b>	Lipoproteínas
<b>LPL:</b>	Lipoproteína lipasa
<b>MTT:</b>	Azul de Tetrazolium
<b>PAGE:</b>	Electroforesis en gradiente de poliacrilamida
<b>PLTP:</b>	Proteína de transferencia de fosfolípidos
<b>PPAR:</b>	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
<b>RMN:</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>SR-BI:</b>	Receptor scavenger clase B tipo I
<b>Tg:</b>	Triacilgliceroles
<b>TRC:</b>	Transporte reverso del colesterol
<b>VLDL:</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad



## RESUMEN.

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la segunda causa de muerte en nuestro país y en consecuencia, es fundamental establecer los factores que influyen en su desarrollo, como el transporte intravascular del colesterol. Este lípido se asocia a partículas anfipáticas llamadas lipoproteínas, entre las que destacan las de alta densidad (HDL) porque protegen contra el desarrollo de la EAC.

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas y es posible que las distintas subclases difieran en su potencial antiateroscleroso. Existen varias subclasificaciones de las HDL basadas en diferentes métodos; separadas por precipitación selectiva y cuantificación del colesterol, se encuentran las HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. Separadas por densidad y radio hidrodinámico se reconocen 5 subclases: HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub>, HDL<sub>3c</sub>, en orden decreciente de tamaño. Según su contenido de apolipoproteínas se distinguen a las LpA-I y LpA-I:AII, y por su migración electroforética y tamaño, se separan en HDL pre $\beta$ -1,  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 y  $\alpha$ -3, entre otros.

La existencia de tantos métodos para la subclasificación de las HDL implica que ninguno de ellos tiene la capacidad para distinguir cuál es la fracción HDL que posee el mayor potencial antiateroscleroso; se ha observado que el colesterol-HDL<sub>2</sub> está disminuido, mientras que el colesterol-HDL<sub>3</sub> es la fracción predominante en pacientes con EAC; por esto, se ha postulado que la subclase HDL<sub>2</sub> es la fracción protectora. En contraste, estudios de nuestro y otros grupos de investigación, han demostrado que las HDL pequeñas aparecen en situaciones de bajo riesgo de EAC, son mejores aceptoras de colesterol y su

actividad antioxidante es mayor, sugiriendo que las HDL pequeñas tipo HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, tienen un mayor poder antiaterogénico. La aparente paradoja acerca de la fracción HDL con mayor potencial antiateroscleroso, podría encontrar un punto de convergencia en el método de determinación. Los estudios que destacan a las HDL grandes como la fracción protectora se caracterizan por cuantificar colesterol de las HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> usando precipitación selectiva o RMN, mientras que en la serie de evidencias que sostienen que las HDL pequeñas son la fracción más antiaterosclerosa, generalmente se ha realizado la determinación semicuantitativa por densidad y tamaño en función de la proteína-HDL.

Por lo tanto, un método que determine a la vez colesterol y proteína de las fracciones HDL, podría contribuir a conciliar las dos hipótesis existentes sobre la capacidad antiaterogénica de las diferentes subpoblaciones de HDL.

Este estudio pretende diseñar y estandarizar un método, en fase semisólida, que permita la cuantificación de colesterol asociada a cada una de las subpoblaciones de HDL separadas por densidad y radio hidrodinámico. Determinando la relación entre la cantidad de colesterol y la proporción de proteína contenida en cada una de las subclases de HDL en situaciones en las que existen alteraciones de estas lipoproteínas, como lo es el tratamiento farmacológico con tiazolidinedionas, enfermedades multifactoriales como la arteritis de Takayasu y la propia EAC.

## ANTECEDENTES.

### *Lipoproteínas.*

Los lípidos son biomoléculas que se caracterizan por su alta solubilidad en solventes orgánicos no polares y su baja solubilidad en agua. De este modo, los lípidos presentes en el organismo de los mamíferos tienden a asociarse con otros lípidos y proteínas formando complejos macromoleculares y pseudomicelares útiles para su transporte y metabolismo. A estos complejos se les denomina lipoproteínas.

Las lipoproteínas (Figura 1) se componen principalmente por lípidos anfipáticos, hidrófobos y proteínas. Los lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) se estructuran como componentes de superficie en una monocapa. Los lípidos hidrófobos (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) se ubican en el interior de la partícula para evitar la interacción con el medio, mientras que las apolipoproteínas (apo) favorecen la estabilidad fisicoquímica de las partículas integrando los componentes internos y de superficie.<sup>1,2</sup>

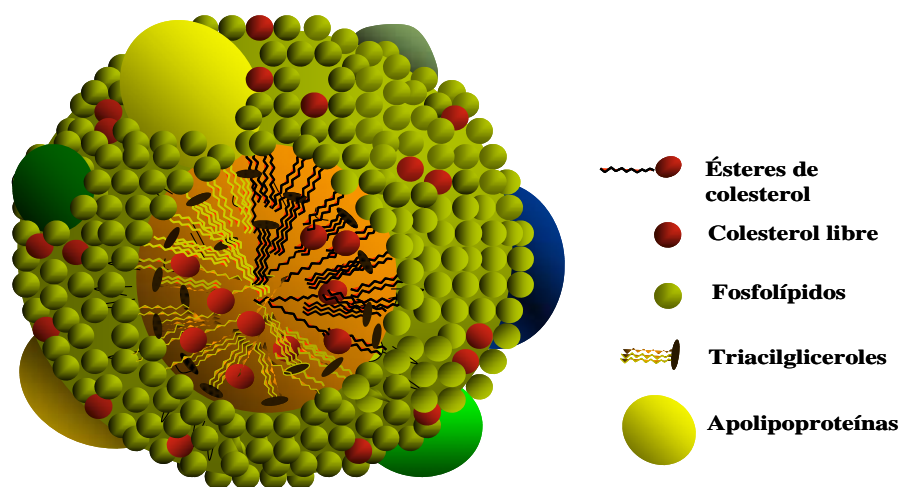


Figura 1. Composición de las lipoproteínas. Se esquematizan la estructura pseudomicelar de la partícula, los lípidos anfipáticos en la superficie, los hidrófobos en el interior y las apolipoproteínas que se integran a la partícula estabilizándola.

En el Cuadro 1 se presentan las características más importantes de algunas apolipoproteínas

Cuadro 1. Características de las apolipoproteínas.<sup>3</sup>

<b>Apo</b>	<b>P.M.</b>	<b>pI</b>	<b>Localización</b>	<b>Sitio de síntesis</b>	<b>Conc. plasmática (mg/dL)</b>	<b>Función</b>
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
B-100	512,723	-	VLDL, LDL	Hígado	80-100	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	--	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III <sub>0,1,2</sub>	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
E <sub>2,3,4</sub>	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Apo: Apolipoproteína, P.M: Peso molecular, pI: Punto isoeléctrico, Lp: Lipoproteína, Tg: Triacilglicerol, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

### ***Clasificación de las lipoproteínas.***

Las lipoproteínas pueden ser clasificadas, de acuerdo a su densidad de flotación,<sup>1,2</sup> en cinco clases que son:

- Quilomicrones: Son las lipoproteínas de mayor tamaño, con densidad menor a 0.94 g/mL. Tienen un alto contenido en triacilgliceroles y sus apolipoproteínas son B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, “Very Low Density Lipoproteins”):  $0.94 < \text{densidad} < 1.006$  g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, “Intermedie Density Lipoproteins”):  $1.006 < \text{densidad} < 1.019$  g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL, “Low Density Lipoproteins”):  $1.019 < \text{densidad} < 1.063$  g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, “High Density Lipoproteins”):  $1.063 < \text{densidad} < 1.210$  g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos, además de colesterol. Su principal apolipoproteína es la A-I, además contienen A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

En el Cuadro 2 se presentan algunas de las características de las diferentes lipoproteínas.

**Cuadro 2.** Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.<sup>4</sup>

	<b>Movilidad</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Proteína</b>	<b>Plp</b>	<b>Tg</b>	<b>CL</b>	<b>CE</b>
<b>Lp</b>	<b>Electroforética</b>	<b>(nm)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Qm	Origen	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta beta	20-30	20	30	35		35
LDL	Beta	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Plp: fosfolípidos, Tg: Triacilgliceroles, CL: colesterol libre; CE: colesterol esterificado.

Cada tipo de lipoproteína está compuesto de varias subclases que se diferencian por su diámetro, densidad, composición, y muy posiblemente, funcionalidad biológica.

### ***Lipoproteínas de alta densidad (HDL)***

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas, con diámetros que varían entre los 7.5 y los 12 nm; presentan además la mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca), y por tanto una mayor densidad en cuanto al resto de las lipoproteínas. Dentro de su composición en apolipoproteínas, la apo A-I es la más abundante, mantiene una función estructural en las HDL<sup>3</sup>. La apo AI también es indispensable en el eflujo de colesterol y desempeña la función de coenzima de la lecitina: colesterol acilo transferasa (LCAT), dentro del metabolismo de las HDL, como se describe más adelante.

Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción  $\alpha$  del plasma, por lo que algunos autores las identifican como  $\alpha$ -lipoproteínas. Existen también las partículas pre- $\beta$ 1 que pueden diferenciarse por su movilidad electroforética en combinación con su tamaño y están compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I, con una masa molecular de alrededor de 60 kDa. Estas HDL son sintetizadas en el hígado y desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas como se describe más adelante.

### ***Metabolismo de las HDL.***

La estructura, composición y distribución de las HDL son parámetros que resultan del intercambio dinámico de lípidos entre las lipoproteínas y de éstas con el organismo. Esta interacción es posible por la presencia de una gran variedad de enzimas, proteínas plasmáticas y de membrana, involucradas en el transporte, hidrólisis y transferencia de los

componentes de las lipoproteínas. Algunas de las características de estas proteínas se presentan en el Cuadro 3.

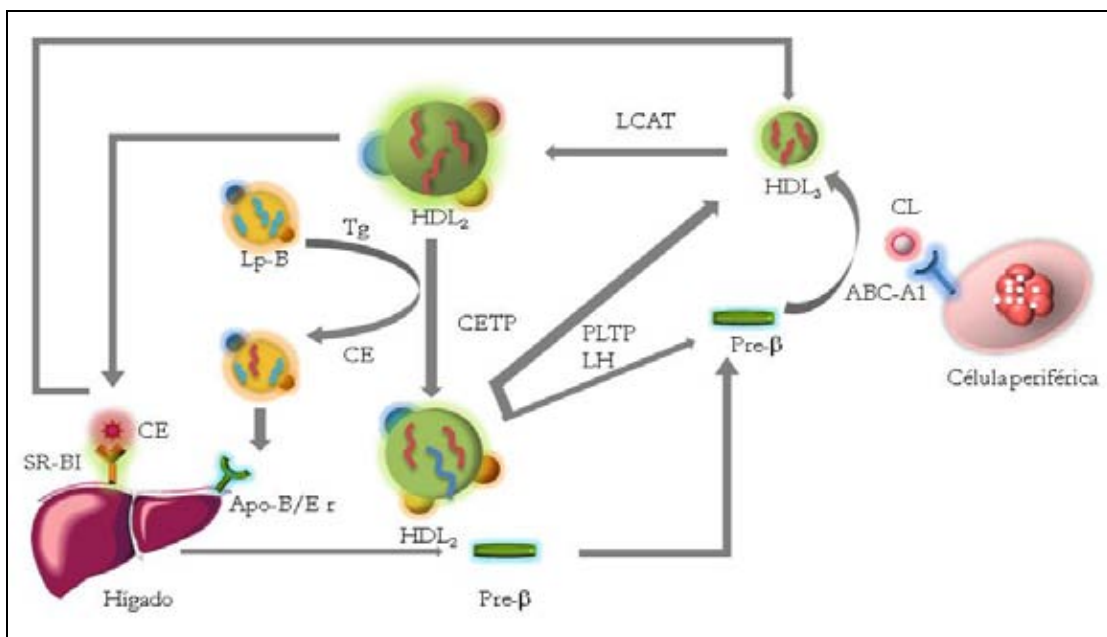
**Cuadro 3.** Enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas.<sup>4,5</sup>

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>ORIGEN</b>
LCAT	Cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la lecitina o fosfatidilcolina, al colesterol libre que se encuentra presente en las HDL y en las LDL. Contribuye a la maduración de HDL.	Hepático
LH	Hidroliza los triacilgliceroles y fosfolípidos de HDL, IDL y LDL. Es cofactor de SR-BI para una captación selectiva, así como la generación de apo A-I libre de lípidos.	Hepático
LPL	Hidroliza los triacilgliceroles de VLDL y Qm utilizando C-II como cofactor. Favorece la generación de precursores de HDL.	Tejido adiposo y muscular, pared endotelial, pulmón.
CETP	Intercambia ésteres de colesterol por triacilgliceroles entre las HDL <sub>2</sub> y las lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado
<b>RECEPTORES Y PROTEÍNAS DE MEMBRANA</b>		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, tejido esteroideogénico
ABCA-1	Modulación del eflujo de colesterol y fosfolípidos. Favorece a la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino
apo-B/E r	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa el eflujo de colesterol vía los hepatocitos.	Hígado

LCAT: Lecitina colesterol acilo-transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipasa lipoprotéica; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol. PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos, SR-BI: Receptor scavenger BI, ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP clase A, tipo 1, Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, VLDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad.



El transporte reverso del colesterol (TRC) es el intercambio dinámico donde el colesterol excedente, tanto sintetizado como depositado en las células periféricas regresa al hígado para su eliminación o uso. Lo anterior evita la formación de acumulaciones patológicas como los ateromas.<sup>6,7</sup> Este proceso (Figura 2) comienza con la captación de colesterol libre de las células periféricas por parte de HDL pequeñas, ricas en apolipoproteínas y con pocos lípidos como las HDL<sub>3</sub> y tipo pre $\beta$ . Estas partículas se convierten en partículas esféricas y/o aumentan su tamaño con la esterificación e internalización del colesterol libre captado por medio de la interacción de las HDL con la enzima LCAT. El aumento en el tamaño de las HDL y la consecuente disminución de su densidad genera HDL<sub>2</sub> que tienen dos posibilidades de interacción, con CETP y con SR-BI. El aumento en el tamaño de las HDL y la consecuente disminución de su densidad genera HDL<sub>2</sub> que tienen dos posibilidades de interacción, con CETP y con SR-BI.



**Figura 2.** Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL, lipoproteínas de baja densidad y Qm, Quilomicrones). Tg: triacilgliceroles; LCAT: Lecitina colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger BI; ABC-A1: Transportador de membrana dependiente de ATP.

Una de las interacciones es con el SR-BI en hepatocitos, mediador de la remoción selectiva de ésteres de colesterol de las HDL para su eliminación. Esta interacción no afecta a la proteína, es decir la HDL cambia su estructura y regenera partículas HDL<sub>3</sub>, que pueden continuar con el eflujo de colesterol. Por otro lado, los ésteres de colesterol asociados a las HDL son intercambiados por triacilgliceroles con las diferentes lipoproteínas que contienen apo B. Este intercambio es facilitado por la CETP; además, las apos C y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL. Los triacilgliceroles captados por las HDL<sub>2</sub> son hidrolizados por la lipasa hepática (LH), y en asociación con la actividad de la PLTP los remanentes de HDL son remodelados en partículas pre- $\beta$  y HDL<sub>3</sub>, ambas con la capacidad de iniciar el ciclo. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares.<sup>6</sup>

### ***Subpoblaciones de HDL.***

#### Métodos de separación y determinación.

La continua remodelación intravascular de las HDL propicia que estas lipoproteínas se presenten como una gama muy heterogénea de partículas, que pueden diferenciarse por su diámetro, composición lipídica, contenido en apolipoproteínas, densidad y carga. La subclasificación de las HDL comienza a ser una necesidad porque se ha sugerido que tienen diferentes funciones fisiológicas en función del subtipo del que se trate.<sup>3,8</sup> Se han propuesto diversos métodos de aislamiento y separación de las lipoproteínas y, debido a esta heterogeneidad en sus características, se han generado diferentes subclasificaciones.



Algunos de estos métodos se describen a continuación:

- Por densidad de flotación. Se realiza por la construcción de un gradiente de densidad de 1.006 a 1.24 g/mL con NaCl/KBr. Las lipoproteínas séricas se aíslan por ultracentrifugación. La fracción HDL puede separarse en cinco subclases: las HDL<sub>2b</sub> (densidad de 1.063 a 1.090 g/mL), HDL<sub>2a</sub> (densidad de 1.090 a 1.12 g/mL), las HDL<sub>3a</sub> (densidad de 1.12 a 1.15 g/mL), HDL<sub>3b</sub> (densidad de 1.15 a 1.18 g/mL) y las HDL<sub>3c</sub> (densidad 1.18 a 1.21 g/mL).<sup>9</sup> Las diferentes subclases se determinan por la concentración de sus componentes y puede calcularse la suma de las molaridades expresándola como moles de HDL; sin embargo la extracción del sobrenadante puede ser una fuente de error importante, el método requiere de equipo automatizado y se necesita un volumen de muestra muy grande para poder cuantificar las subclases de HDL.
- Por densidad de flotación en conjunto con el diámetro hidrodinámico. Las HDL son aisladas a partir de plasma o suero por ultracentrifugación secuencial con base en su densidad de flotación. A continuación, las HDL son separadas con base en su diámetro hidrodinámico por PAGE en condiciones nativas. Por último, el gel se tiñe específicamente para proteínas con azul de Coomassie R250 y se cuantifica el área bajo la curva en los intervalos de diámetro correspondiente a las diferentes subclases de HDL por densitometría óptica. Las HDL separadas por este método pueden subdividirse en HDL<sub>2b</sub> con diámetros de 9.7-12 nm, HDL<sub>2a</sub>, de 8.8-9.7 nm, HDL<sub>3a</sub> 8.2-8.8 nm, HDL<sub>3b</sub> 7.8-8.2 nm y HDL<sub>3c</sub> de 7.2-7.8 nm.<sup>3</sup> Este método es

semicuantitativo; se determina el contenido de proteína, generando una estimación proporcional de las subpoblaciones y no una medida de masa de las HDL.

- Por precipitación selectiva. Se realiza por adición secuencial de heparina/cloruro de manganeso o dextrán sulfato de bajo peso molecular (15 – 20 KDa)/ cloruro de magnesio a muestras de plasma. Dependiendo de la concentración del reactivo precipitante, precipitan todas las lipoproteínas salvo las HDL totales, o bien, el precipitante puede arrastrar a las HDL<sub>2</sub>. De esta manera, se hace la determinación del colesterol de las HDL y del colesterol de las HDL<sub>3</sub> en los sobrenadantes. Los resultados dan la concentración de C-HDL, C-HDL<sub>3</sub> y, por diferencia de los valores, C-HDL<sub>2</sub>.<sup>10-12</sup> Este método permite la cuantificación de colesterol plasmático de ambas subclases rápidamente y es un método automatizable. Sin embargo, la resolución de la separación es baja, las muestras congeladas o lipémicas suelen arrojar resultados aberrantes, y otorga poca información en comparación con otros métodos porque sólo permite la cuantificación de dos subclases de HDL.
- Por cromatografía de afinidad. Las lipoproteínas se aíslan por elución consecutiva en columnas independientes empacadas con resinas que contienen unidos covalentemente anticuerpos anti apo A-I y anti apo A-II. La fracción retenida en la primera columna únicamente, representa a la subclase de HDL que sólo contiene apo AI, denominada LpAI. La fracción de plasma retenida en ambas columnas, contiene HDL que incluyen en su estructura tanto apo AI como apo AII, subclase de HDL denominada LpAI:AII. Dichas subfracciones corresponden a una movilidad electroforética  $\alpha$  y densidades de 1.063 a 1.21 g/mL<sup>13</sup>. Este método

permite la cuantificación en masa de varios componentes estructurales de las HDL. La clasificación por este método parece tener implicaciones funcionales, ya que las LpAI se ha sugerido que son la fracción más antiaterogénica.<sup>14</sup> Este método es sólo cualitativo y sólo puede aplicarse con fines de investigación. Además, no es posible la relación directa con ningún otro método descrito previamente.

- **Inmunoelectroforesis.** Este método consiste en la separación electroforética del plasma sobre un soporte de agarosa que contiene anticuerpos anti apo AII y anti apo AI. El punto de equivalencia para las LpAI:AII se alcanza rápidamente porque se pone un exceso de anticuerpos anti apo AII, formando un halo de precipitación en forma de cometa. Las LpAI alcanzan el punto de equivalencia con los anticuerpos anti apo AI más tarde, formando un segundo halo de precipitación más grande que el primero. La altura del halo de precipitación es proporcional a la concentración de apo AI de las LpAI y de las LpAI:AII. Este método es práctico, requiere de pocos microlitros de muestra, es cuantitativo, y se puede aplicar en el laboratorio clínico y ha sido incluso comercializado por los laboratorios SEBIA.<sup>15</sup> Sin embargo, la falta de utilidad para evaluar el riesgo cardiovascular cuantificando las subclases de HDL por este método en grandes estudios epidemiológicos, ha hecho que caiga en el desuso.
- **Electroforesis en doble dimensión.** A partir de muestras de plasma, las HDL son separadas por su carga y tamaño en electroforesis usando agarosa como soporte. A continuación, el gel de agarosa se coloca al inicio de un gel en gradiente de 3 a 35% de poliacrilamida en condiciones nativas y de esta manera se separan por su diámetro hidrodinámico. Una vez separadas las HDL se electrotransfieren sobre nitrocelulosa y se revela con anticuerpos anti apo AI, donde se observa la

presencia de 3 bandas mal definidas denominadas HDL $\alpha_1$ , HDL $\alpha_2$  y HDL $\alpha_3$ .<sup>16</sup>

Además, se observa una pequeña fracción de HDL que migran en fracción pre- $\beta$  que se separa en dos bandas denominadas pre $\beta_1$  y pre $\beta_2$ . Esta separación permite la obtención de muestras de HDL sin albúmina, pero genera una subclasificación que, aunque con valor clínico, no es comparable con las empleadas por otros grupos de estudio. Además es un método muy laborioso, caro, requiere de mucho tiempo, y de mucho equipo cuando se quieren analizar varias muestras simultáneamente.

- Por resonancia magnética nuclear (RMN). Las muestras de plasma completo son analizados por RMN. Al espectro obtenido se aplican algoritmos matemáticos para deconvolucionar los picos individuales. El registro es analizado por integración en los intervalos de ppm establecidos experimentalmente para cada subpoblación tomando como referencia las subclases de HDL separadas por ultracentrifugación. Por este método las HDL alcanzan a separar en tres subclases que se denominan HDL grandes (8.8 a 13.0 nm), HDL medianas (8.2 a 8.8 nm) y HDL pequeñas (7.3 a 8.2).<sup>17</sup> Los resultados indican los moles de cada componente de las lipoproteínas indicando una proporción en masa de las mismas, sin embargo las lipoproteínas presentan diferentes intervalos de separación a los hasta ahora descritos. La gran ventaja del método es la rapidez con la que se obtienen los resultados, además de ser un método no destructivo de la muestra. El principal inconveniente es el equipamiento necesario para su realización; el resonador es incompatible con el laboratorio clínico y representa una inversión muy importante.

Las diversas formas de aislamiento y separación en subfracciones de las HDL propician que los métodos de cuantificación también sean diferentes. Esencialmente se basan en la determinación de alguno de los componentes estructurales de las lipoproteínas, como lo son el colesterol y la proteína. Diversos estudios epidemiológicos han encontrado una ligera correlación estadística que distingue a las HDL<sub>3</sub> como marcadores de enfermedad isquémica coronaria, estos estudios se caracterizan por cuantificar el colesterol de las HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> separadas por precipitación selectiva o RMN.<sup>10-12</sup> En contraste, evidencias que sostienen que las HDL pequeñas son la fracción más protectora se han realizado por la determinación semicuantitativa en función de la proteína HDL.<sup>8,18,19</sup>

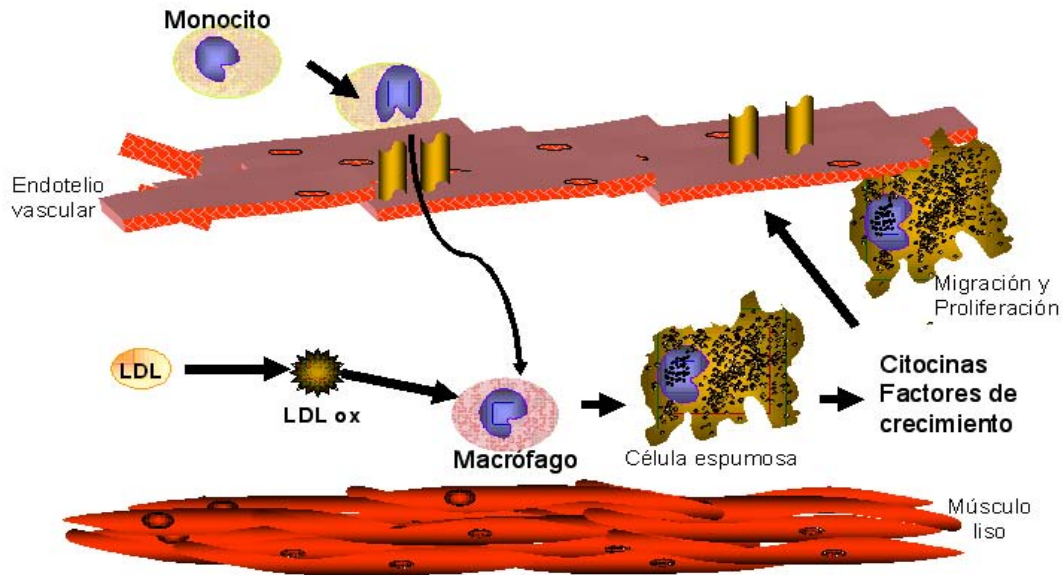
### ***Enfermedad aterosclerosa coronaria***

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y es la segunda causa de muerte en la población adulta en nuestro país, después de la diabetes mellitus (DM).<sup>20</sup> Por lo tanto, el estudio de su diagnóstico y tratamiento es prioritario para combatir este mal.

La EAC puede comenzar con la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial en donde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, que son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores denominados “scavenger”. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Antes de morir, las



células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma (Figura. 3).



**Figura 3.** Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa ateromatosa. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDLox). Los monocitos se adhieren al endotelio activado, el cual sobre expresa moléculas de adhesión. Los monocitos circulantes, atraídos, penetran en la pared y son diferenciados a macrófagos, proceso en el que también intervienen las LDLox. Los macrófagos captan LDLox y se transforman en células espumosas. Las células musculares lisas (CMLV) de la media, activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, migran a la íntima y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

En estudios epidemiológicos se ha observado que existe una correlación negativa entre las concentraciones de colesterol asociado a las HDL y la incidencia de EAC.<sup>21</sup> Debido a esto se ha postulado que las HDL tienen una función protectora en el desarrollo de esta enfermedad y se han descrito distintos mecanismos para explicar este efecto, como lo es el TRC. Además, se han realizado estudios para discernir si existe una subpoblación con mayor capacidad cardioprotectora, pero hasta el momento no se ha encontrado evidencia definitiva a este respecto. Diversos estudios han observado el efecto de tratamientos

farmacológicos en el desarrollo de la EAC, por ejemplo, el tratamiento con fibratos aumenta el C-HDL y disminuye los niveles de colesterol no asociado a HDL, disminuye los triacilgliceroles y modifica el metabolismo de las HDL.<sup>22, 23</sup> En este contexto el tratamiento con estatinas disminuye el C-LDL y aumenta el C-HDL.<sup>24,25</sup> De igual manera existe interés en las tiazolidinedionas (TZD), ya que inducen incrementos en los niveles plasmáticos de C-HDL, modifican la distribución relativa del diámetro hidrodinámico y la composición de las HDL, y además aceleran el catabolismo de estas lipoproteínas.<sup>26-29</sup> Las TZD son fármacos antidiabéticos que actúan disminuyendo la resistencia a la insulina y los niveles de ácidos grasos, por un incremento tanto en la  $\beta$ -oxidación como en su captación hepática.

### *Arteritis de Takayasu.*

La arteritis de Takayasu (TA) es una condición patológica crónica que se caracteriza por la inflamación de las arterias elásticas, la aorta y sus ramificaciones mayores. Esta enfermedad parece caracterizarse por un proceso inflamatorio que precede a una oclusión vascular. Se presenta principalmente en mujeres con ascendencia asiática.<sup>30</sup> La incidencia anual de esta enfermedad en Estados Unidos de América se estima en 2.6 por cada millón de habitantes, aunque se desconoce su incidencia en México.<sup>31</sup> Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que esta patología se presenta con una disminución de la subpoblación HDL<sub>3b</sub> y que existe una correlación positiva entre la función vascular y las HDL<sub>3b</sub>.<sup>32</sup>

## **HIPÓTESIS.**

La proporción relativa de cada una de las diferentes subclases de HDL, cuando se cuantifican por proteína, no será igual a la proporción relativa determinada por colesterol.

## **OBJETIVOS.**

### ***Objetivo general***

Desarrollar un método de cuantificación de las subpoblaciones de HDL a partir de su contenido en colesterol, en fase semisólida.

### ***Objetivos particulares.***

Caracterizar las asociaciones entre las distribuciones relativas determinadas por su contenido en proteína y colesterol.

Determinar el efecto del tratamiento con tiazolidinedionas y de la arteritis de Takayasu en la distribución de las subpoblaciones de HDL cuantificadas por colesterol y proteína.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### *Muestras.*

Se determinó la distribución relativa de las HDL por su contenido de colesterol y proteína en un grupo de muestras de plasma para evaluar si existen diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos. Las muestras fueron obtenidas de un grupo conformado por 36 sujetos sanos que no presentaban EAC de acuerdo a su historia clínica y pruebas de laboratorio. Fueron incluidos aquellos sujetos con grosores íntima-media de la arteria carótida inferiores a 1.0 mm, por considerarse este valor como ausencia de aterosclerosis,<sup>33</sup> no diabéticos, y sin tratamiento con fármacos hipolipemiantes.

Posteriormente, se aplicó la metodología desarrollada a dos situaciones metabólicas en las que potencialmente se modifican las subpoblaciones de HDL. La primera evaluación se realizó observando el efecto del tratamiento con TZD. En el tratamiento con TZD se emplearon 10 conejos macho Nueva Zelanda de 3.5 a 4.0 Kg de peso, distribuidos aleatoriamente en dos grupos de estudio; uno de los grupos recibió tratamiento de rosiglitazona (Avandia, Glaxo Smith-Kline) en suspensión acuosa, en dosis de 0.34 mg/kg. El otro grupo recibió pioglitazona (Zactos, Ely Lilly) en dosis de 1.75 mg/kg de peso corporal. El tratamiento se administró vía oral, diariamente, durante 4 semanas. Ambos grupos recibieron alimentación *ad libitum* diariamente y se mantuvieron en ciclos de luz-obscuridad de 12h.

También se evaluó un grupo de pacientes con TA, el cual está formado por 10 mujeres diagnosticadas en el Instituto Nacional de Cardiología bajo los criterios del American College of Rheumatology.

### ***Obtención de muestras.***

Después de un ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosa colectadas en tubos que contenían EDTA o heparina como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos, al término de este tiempo se separó el plasma y fue almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### ***Análisis de laboratorio***

Las concentraciones de glucosa, triacilgliceroles y colesterol se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales Randox®. En muestras de plasma se precipitó de manera selectiva las lipoproteínas que contienen apo B con una solución de sulfato de dextrán/magnesio (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de plasma) y posteriormente se determinó el colesterol de HDL (C-HDL) en el sobrenadante.

En el grupo de conejos tratados con TZD el análisis de estos parámetros se realizó antes y después de 4 semanas de tratamiento con ambos medicamentos.

Las determinaciones de proteínas totales se realizaron por el método de Lowry.<sup>34</sup> (Apéndice 1).

### ***Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL***

Las muestras de HDL fueron obtenidas por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma, ajustando la densidad del mismo a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugando por 2 horas 30 minutos a 100000 r.p.m. con el fin de separar las lipoproteínas que contienen apo B. Posteriormente se ajustó nuevamente la densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido y se

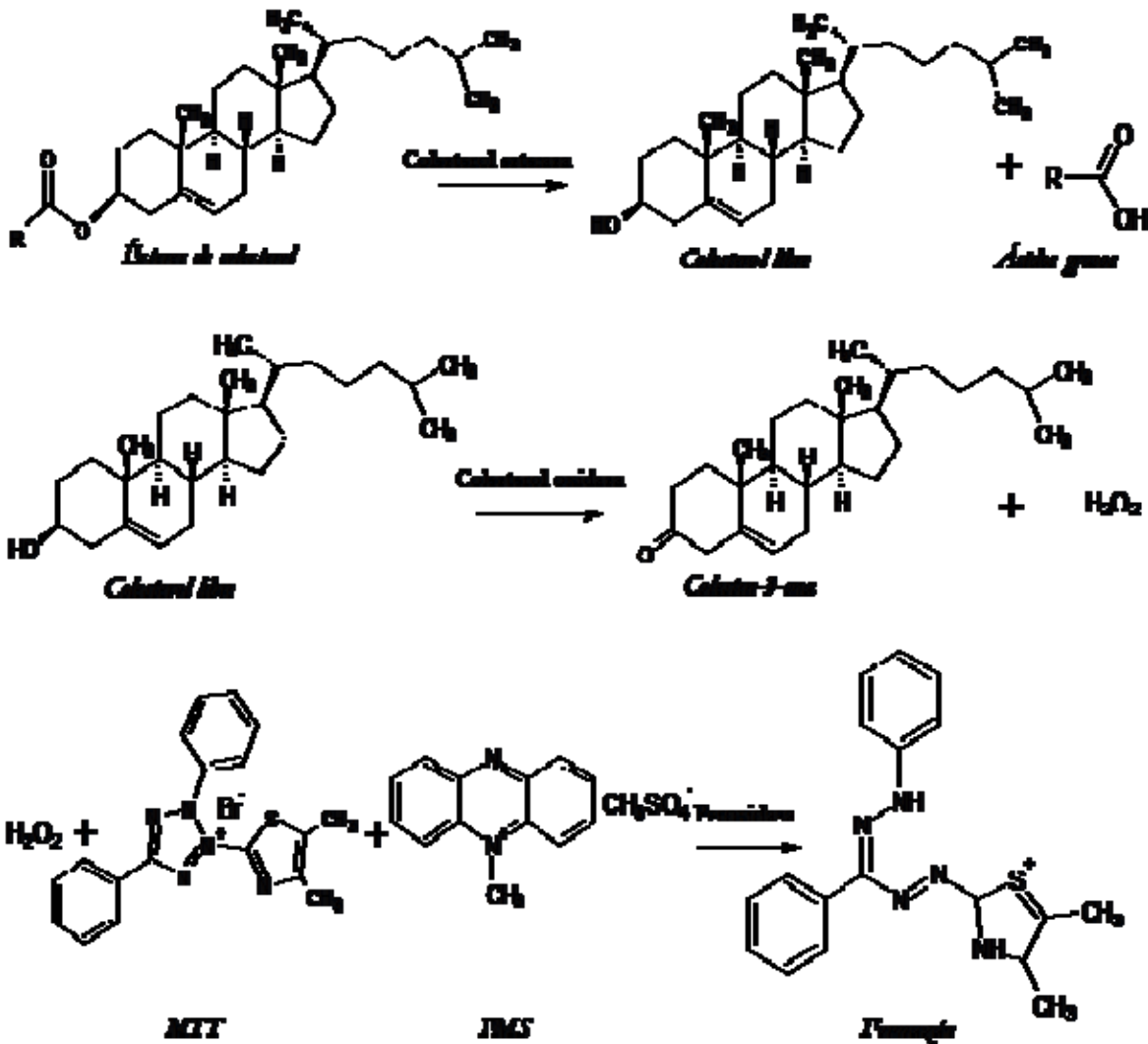
ultracentrifugó por 3 horas a 100000 r.p.m. para aislar a las HDL. Bajo estas condiciones se recupera de 80% a 85% de la apo A-I del plasma total. Las HDL se dializaron en solución amortiguadora de Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M, EDTA 3 mM, pH 8.4 (amortiguador TBE).

Las subpoblaciones de HDL se separaron por su tamaño en electroforesis en gradiente de 3 a 30 % de poliacrilamida en condiciones nativas, detallado en el apéndice 2. Las HDL separadas en el gel, fueron analizadas por su radio hidrodinámico, utilizando como referencia los marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina de 17 nm, ferritina de 12.2 nm, catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK).<sup>35</sup> De esta manera, se determinó la proporción de cada subpoblación de HDL por su radio conocido (HDL<sub>2b</sub> 10.58-12.36 nm, HDL<sub>2a</sub> 9.94-10.58 nm, HDL<sub>3a</sub> 8.98-9.94, HDL<sub>3b</sub> 8.45-8.98 nm, HDL<sub>3c</sub> 7.90-8.45 nm).<sup>36</sup> Posteriormente se obtuvo el densitograma (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad) de las bandas correspondientes a colesterol y proteína para su análisis. Los geles fueron teñidos inicialmente con el reactivo revelador de colesterol desarrollado en este trabajo, su composición y condiciones de reacción se detallan en la sección de resultados. Tras la decoloración de la tinción de colesterol, los geles de poliacrilamida fueron teñidos con una solución de colorante azul de Coomassie R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua, este colorante se asocia a proteínas.



### Determinación de colesterol.

Para realizar la detección selectiva de colesterol sobre el gel de poliacrilamida se empleó una mezcla enzimática compuesta de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa.<sup>37-39</sup> El producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas es  $H_2O_2$  cuya presencia se evidenció con dos sales como aceptores de electrones: azul de tetrazolium (MTT) y fenazin metasulfato (FMS).<sup>40</sup> El producto de reacción se observó por densitometría óptica. Las reacciones acopladas se esquematizan en la figura 4.



**Figura 4.** Esquema de las reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol. El formazán fue analizado por densitometría óptica en un intervalo de longitud de onda de 520 a 570 nm.

#### ***Inmunotransferencia.***

Las muestras de HDL, separadas en gel nativo con gradiente de 3 a 30% de poliacrilamida para proteínas de alto peso molecular, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas específicamente empleando un anticuerpo anti-HDL y un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Se empleó *o*-diaminobencidina que genera bandas color marrón por la reacción catalizada por la peroxidasa en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El procedimiento experimental se detalla en el Apéndice 3.

#### ***Análisis estadístico.***

En la comparación de las cuantificaciones por contenido de proteína y de colesterol, la evaluación de las diferencias significativas se realizó empleando la prueba paramétrica t de Student no pareada.

Para la evaluación del efecto del tratamiento con TZD se compararon los valores obtenidos antes y durante el tratamiento por la prueba t de Student pareada. Mientras que el análisis de la TA se realizó por la comparación con un grupo control pareado por sexo y edad usando la prueba t de Student no pareada.

Los análisis de correlación bivariada de Pearson se realizaron con el programa SPSS 16.0. Los datos están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar.

En todos los casos se consideraron diferencias significativas los valores de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS.

### *Determinación de componentes y condiciones del método*

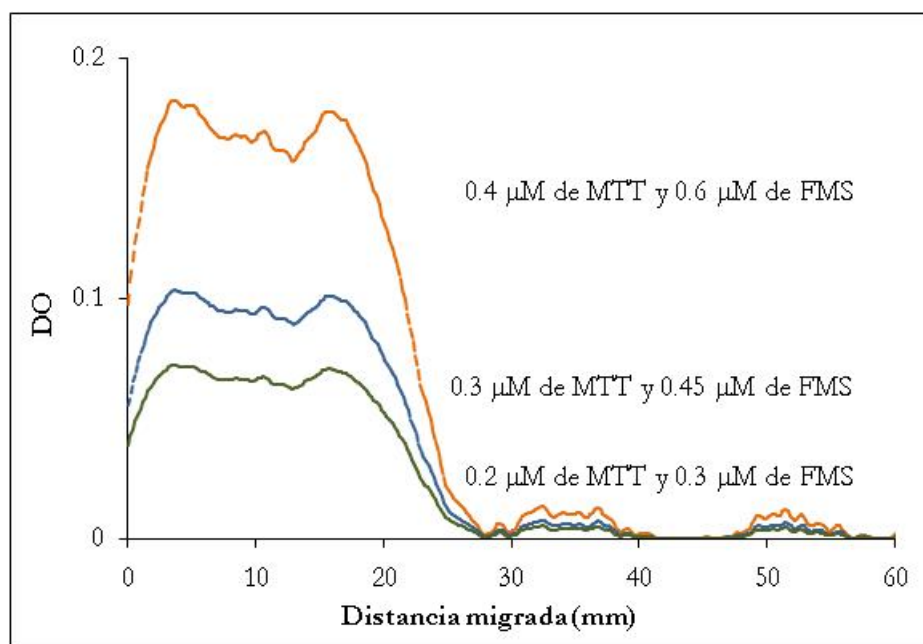
La formulación del reactivo para la cuantificación de colesterol en fase semisólida se realizó con una mezcla enzimática en solución amortiguadora PBS (NaCl 150 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM a pH 7.4). Las enzimas empleadas para cuantificar la presencia de colesterol fueron colesterol oxidasa, colesterol esterasa y peroxidasa. Además se agregó colato de sodio 3 mM, Tritón® 100X 0.1% para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas, y las sales fenazina metasulfato (FMS) y azul de tetrazolium (MTT) como aceptores de electrones.<sup>40</sup> Las concentraciones finales de las enzimas, el FMS y el MTT se presentan en la sección de resultados, debido a que fueron determinadas por análisis experimental.

Como agentes viscosantes se compararon agar y carboximetilcelulosa. Se escogió a la carboximetilcelulosa como viscosante para ensayos posteriores debido a que no requiere calentamiento para su solubilización, a diferencia del agar. Se evaluaron las concentraciones de 0.4%, 1%, 1.2% y 2% m/v, de las cuales se seleccionó cualitativamente la concentración de 1.2%. En estas condiciones la viscosidad generada es idónea para que el reactivo se disperse sobre la superficie del gel, asegurando un contacto homogéneo entre el reactivo y el substrato, al mismo tiempo que se evita al máximo la formación de burbujas que producen artefactos al momento de revelar.

La tinción se realizó por contacto del reactivo con el gel de poliacrilamida a 37°C. Durante la incubación se monitoreó la reacción por comparación cualitativa del desarrollo

de la coloración, tanto para la muestra como para el fondo del gel de poliacrilamida. Las observaciones se realizaron desde 30 min hasta 2h; el contraste de la coloración muestra-fondo fue mejor en el tiempo de 1h con respecto a los demás tiempos considerados (datos no mostrados). La aparición de una banda con coloración violeta fue indicativa de la presencia de colesterol cuantificado indirectamente por la precipitación de una sal insoluble de formazán.<sup>40</sup>

La cantidad de la sal insoluble de formazán, empleada para cuantificar indirectamente la presencia de colesterol, se determinó por medio del análisis de densitometría óptica. Se realizaron diferentes ensayos variando las concentraciones de MTT y FMS para determinar las condiciones óptimas de la tinción. El análisis se realizó por comparación de los densitogramas. Las concentraciones analizadas fueron seleccionadas de acuerdo a lo reportado en la literatura.<sup>40</sup>



**Figura 5.** Densitogramas comparativos de la tinción de colesterol con diferentes concentraciones de las sales de tetrazolium. Se separó la misma cantidad, en proteína, para cada muestra de HDL y posteriormente se tiñeron con las cantidades de MTT y FMS indicadas en la figura.

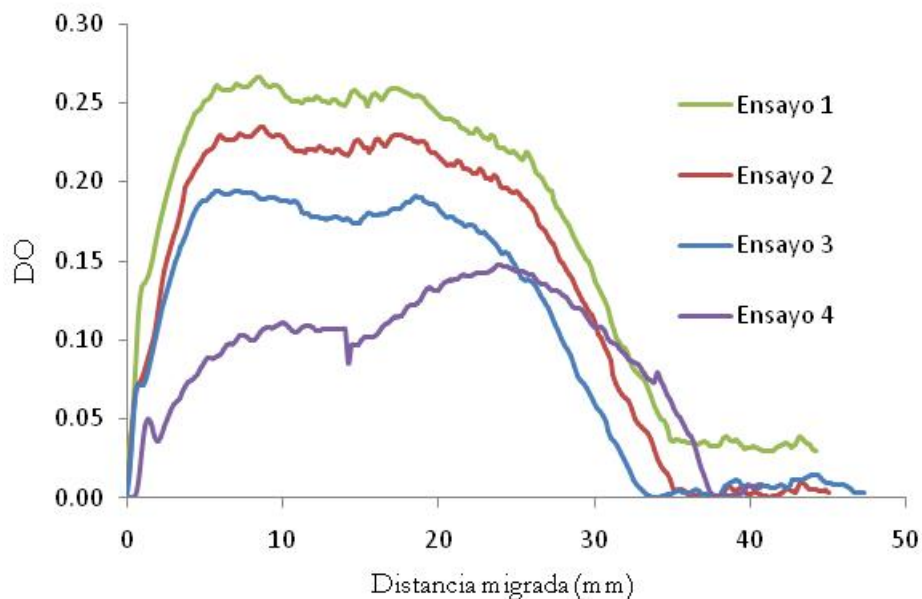
El ensayo se realizó con la misma muestra de HDL revelada con las tres concentraciones de reactivo, obteniéndose una mayor absorbencia para las concentraciones más altas y decreciendo proporcionalmente a la cantidad de las sales. Se seleccionaron las concentraciones 0.4  $\mu\text{M}$  de MTT y 0.6  $\mu\text{M}$  de FMS, debido a que mostraron una mejor resolución de la señal, así como una mejor definición de la banda. Concentraciones superiores de cualquiera de estos dos reactivos provocaron un fondo con una coloración muy intensa, impidiendo la obtención del densitograma (resultados no mostrados).

Para determinar la concentración mínima necesaria de enzimas para la reacción, se realizaron ensayos variando proporcionalmente las mismas, tomando como referencia inicial la concentración empleada en la determinación con el reactivo comercial, que se realiza en fase líquida.<sup>37-39</sup> Las concentraciones empleadas se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Concentraciones experimentadas para la mezcla de enzimas incluidas en el reactivo de revelado para la cuantificación de colesterol en fase semisólida.

<b>Enzima</b>	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>	<b>Ensayo 4</b>
Colesterol esterasa	0.3 $\mu\text{U/mL}$	0.15 $\mu\text{U/mL}$	0.075 $\mu\text{U/mL}$	0.038 $\mu\text{U/mL}$
Colesterol oxidasa	0.2 $\mu\text{U/mL}$	0.1 $\mu\text{U/mL}$	0.05 $\mu\text{U/mL}$	0.025 $\mu\text{U/mL}$
Peroxidasa	1.0 $\mu\text{U/mL}$	0.5 $\mu\text{U/mL}$	0.25 $\mu\text{U/mL}$	0.125 $\mu\text{U/mL}$

En la figura 6 se presentan los densitogramas generados en los ensayos con diferentes concentraciones de enzimas. Las concentraciones empleadas son las que se detallan en el cuadro 4.



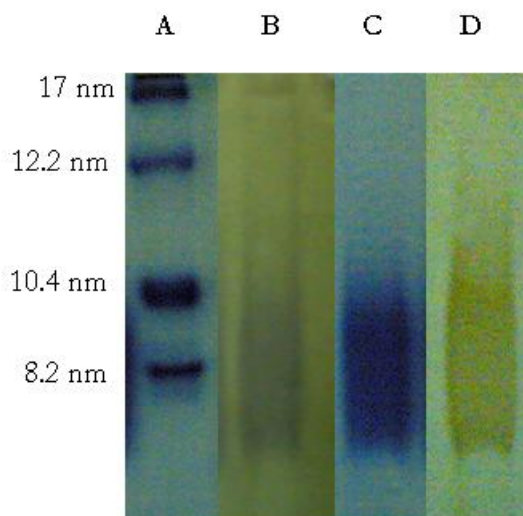
**Figura 6.** Densitogramas comparativos de la tinción de colesterol con diferentes concentraciones de enzimas.

Las enzimas presentes en el reactivo permiten la determinación específica de colesterol, por lo que su concentración es importante para asegurar la reacción. Como se observa en la figura 6, la concentración de las enzimas influye directamente en la intensidad de la señal para la muestra y el fondo. De este modo se seleccionaron las concentraciones del ensayo 3, pues la intensidad de la muestra y la coloración con el fondo permiten la clara interpretación del resultado.

La tinción con azul de Coomasie en las muestras de HDL genera una banda ancha, difusa y continua entre las distancias de migración correspondientes a 7.2 y 12 nm. Sin embargo, tras la tinción de colesterol, la banda de algunas muestras de HDL comienza en distancias correspondientes a diámetros mayores a 17 nm. Se destaca que la absorbancia observada en esta zona es equiparable al máximo obtenido en el densitograma. Estos datos sugieren la existencia de una subclase de HDL con un alto contenido en colesterol y bajo en proteína.

Debido a ello se realizó la determinación por el contenido en proteína, teñida con azul de Coomasie y reacciones de inmunoafinidad, además de la determinación de colesterol, de un grupo de muestras que presentaban esta anormalidad.

Los resultados de este estudio se presentan en la figura 7, con las imágenes de la tinción por colesterol y proteína (con colorante y anticuerpos) para un muestra.



**Figura 7.** Las imágenes mostradas pertenecen al análisis realizado para la misma muestra. En la imagen 6A se presenta la migración de las proteínas empleadas como referencia (marcador de peso molecular) para el análisis por subpoblaciones. La muestra de HDL fue teñida por su contenido en colesterol como se observa en 6B, con la sal azul brillante de Coomassie 6C, así como la determinación con anticuerpos específicos contra HDL (6D).

### ***Evaluación del método.***

Una vez formulado el reactivo y determinadas las condiciones de reacción, se realizaron las determinaciones por el contenido en colesterol y en proteína para un grupo de muestras provenientes de los sujetos sanos seleccionados.

En el Cuadro 5 se presentan los datos de las características antropométricas y las concentraciones en plasma de lípidos y glucosa de los sujetos control. Estos valores se ubican dentro de los parámetros considerados normales.

**Cuadro 5.** A) Características antropométricas. B) Concentraciones de lípidos y de glucosa en plasma de los 38 sujetos normales incluidos en el estudio.

**A**

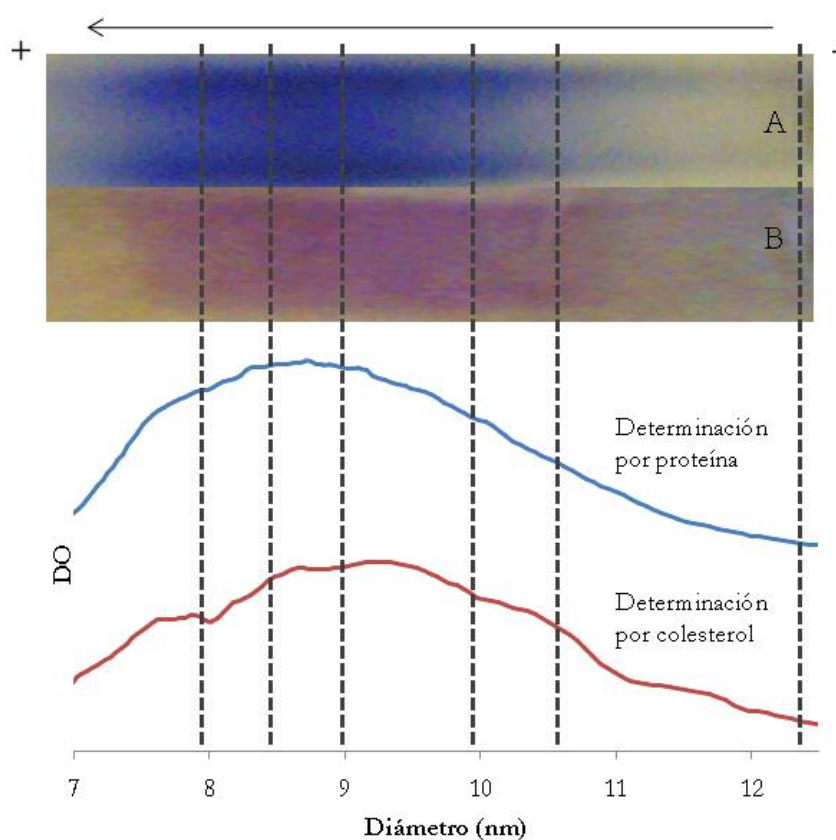
<b>Peso (Kg)</b>	<b>Talla (m)</b>	<b>IMC (Kg / m<sup>2</sup>)</b>
71.7 ± 16.8	1.57 ± 0.10	29 ± 7

**B**

<b>Glucosa (mg/dL)</b>	<b>Triacilgliceroles (mg/dL)</b>	<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	<b>C-HDL (mg/dL)</b>	<b>C-LDL (mg/dL)</b>
88.5 ± 8.3	176.6 ± 77.9	206.2 ± 45.3	48.6 ± 12.2	129.3 ± 38.9



Las HDL aisladas y separadas de cada una de las muestras de plasma fueron cuantificadas por su contenido en colesterol y proteína tras obtener el densitograma correspondiente. En la figura 8 se muestra el análisis por densitometría óptica, de una muestra representativa del grupo de sujetos sanos, por su contenido en colesterol y en proteína.

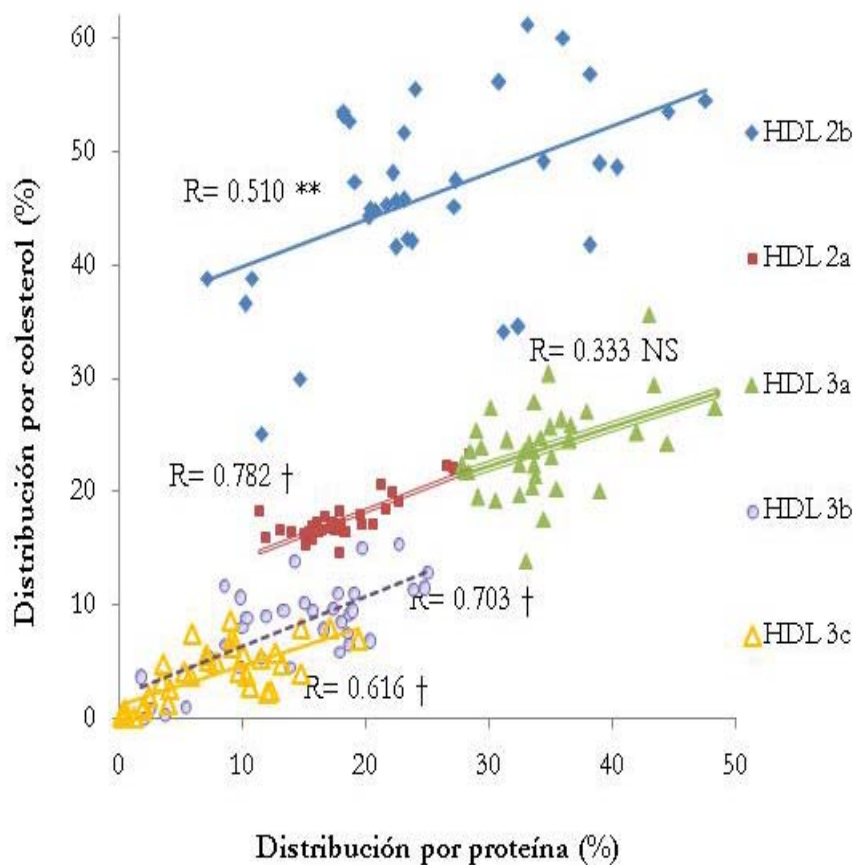


**Figura 8.** Distribuciones de las subpoblaciones de HDL. Los densitogramas presentan las distribuciones determinadas por proteína con azul de Coomassie y por colesterol con el reactivo en fase semisólida. Las imágenes son ejemplos de la migración de una muestra, donde A es la determinación por proteína y B por colesterol. En la escala del gráfico se presentan líneas de división para definir los intervalos de diámetro de cada subclase. Se indican el cátodo y el ánodo y la flecha muestra el sentido de la migración.

Por medio de la integración parcial del densitograma se calcula el porcentaje de cada subpoblación en función del área bajo la curva. La integración se realiza dentro de los

intervalos correspondientes a los radios conocidos de las subpoblaciones de HDL. A este perfil se le denomina distribución relativa.

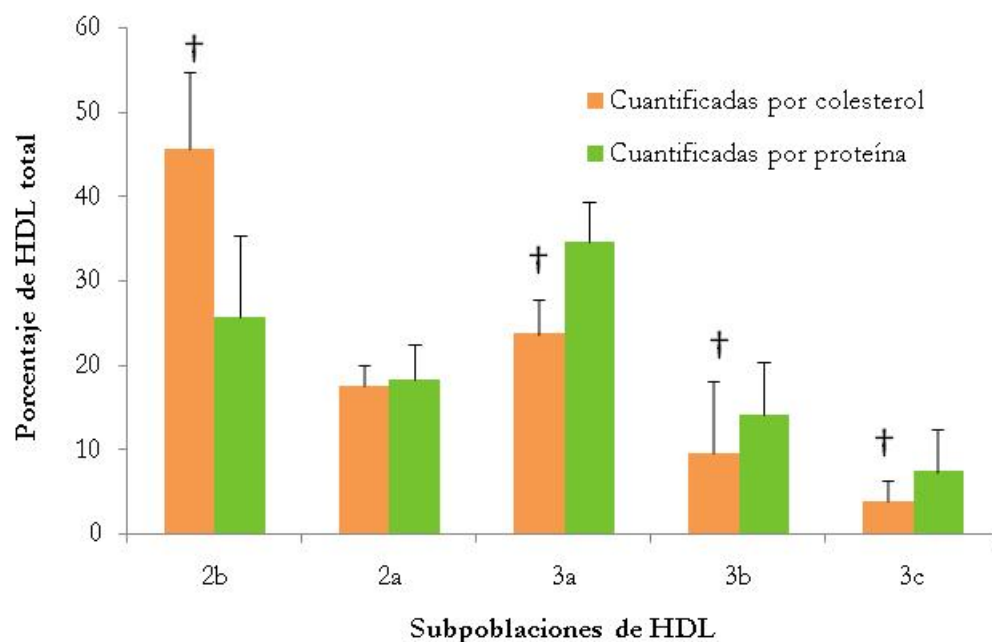
En la figura 9 se presenta el análisis de correlación existente entre las determinaciones realizadas por el contenido en colesterol y en proteína.



**Figura 9.** Correlación entre los métodos de determinación de la distribución relativa. Coeficiente de correlación de Pearson.  $**p < 0.01$ ,  $^{\dagger} p < 0.001$ , NS no significativo.

Las correlaciones entre ambos métodos son estadísticamente significativas, salvo para las HDL<sub>3a</sub>, sin embargo las correlaciones presentan coeficientes con valores relativamente bajos, sugiriendo que las determinaciones no son equivalentes.

En la Figura 10 se muestra la comparación de las distribuciones relativas de HDL al ser cuantificadas por su contenido en colesterol y en proteína

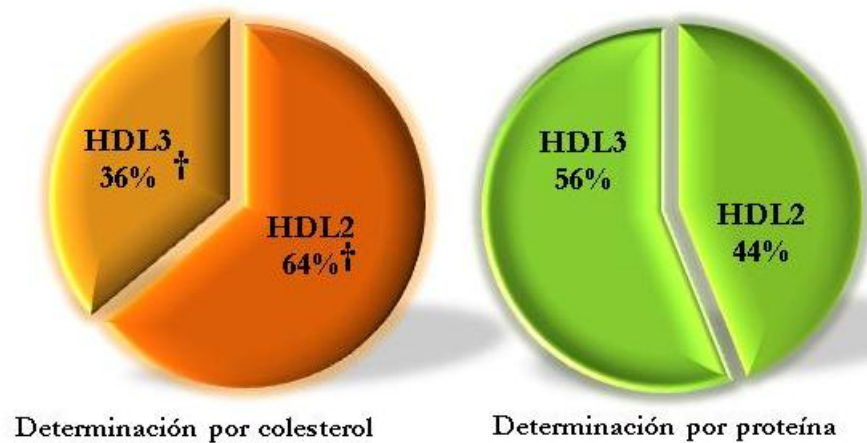


**Figura 10.** Comparación de las distribuciones relativas de HDL cuantificadas por su contenido en colesterol y en proteína.

Los valores son expresados como la media  $\pm$  DE. Prueba t de Student †  $p < 0.001$

Las HDL<sub>2b</sub> presentan una mayor proporción determinada por colesterol que por proteína ( $p < 0.0001$ ). Mientras que para las subpoblaciones HDL<sub>3a</sub> ( $p < 0.0001$ ), HDL<sub>3b</sub> ( $p < 0.0001$ ) y HDL<sub>3c</sub> ( $p < 0.001$ ) la proporción es menor por colesterol que por proteína. Esto indica que las determinaciones por ambos métodos conducen a diferentes resultados.

La figura 11 presenta la comparación entre las distribuciones relativas para las subpoblaciones HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. La proporción de las HDL<sub>2</sub> es el promedio de la suma de las subpoblaciones HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub> de cada individuo, así como las HDL<sub>3</sub> son el promedio de la suma de las HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> individuales.



**Figura 11.** Comparación de las distribuciones relativas determinadas por ambos métodos. Se expresan los valores como la media para cada grupo. Prueba t de Student vs determinación por proteína †p<0.001

Como se observa en la figura 11, la determinación por colesterol disminuye considerablemente ( $p < 0.0001$ ) la proporción de las HDL<sub>3</sub>, a comparación de la determinación por proteína. Además, la proporción de ambas subpoblaciones se invierte de un método a otro, es decir, las HDL más abundantes determinadas por proteína son las más escasas por colesterol. Es evidente que, en la determinación por colesterol, las HDL<sub>2</sub> son casi el doble de la proporción de las HDL<sub>3</sub>, mientras que por proteína la proporción es

similar entre ellas. Estas observaciones diferencian a los métodos en comparación, indicando que ambas metodologías conducen a resultados diferentes e incluso opuestos.

Además de realizar el análisis por densitometría de las muestras es posible obtener dos parámetros referentes a la composición de las lipoproteínas aplicando esta nueva metodología. El primero es la proporción de colesterol presente en cada subclase de HDL con respecto a la proteína, por el cálculo del cociente colesterol por proteína (C/P). El segundo parámetro es la concentración plasmática de colesterol de cada subpoblación. El cálculo de C-HDL de cada subclase se realizó considerando la concentración plasmática de C-HDL como 100% y el porcentaje de cada subpoblación determinada por colesterol. Estos valores están expresados en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Cocientes de la distribución relativa cuantificada por colesterol entre proteína (C/P) y la concentración de colesterol asociado a cada subpoblación.

<b>Método de determinación</b>	<b>HDL<sub>2b</sub></b>	<b>HDL<sub>2a</sub></b>	<b>HDL<sub>3a</sub></b>	<b>HDL<sub>3b</sub></b>	<b>HDL<sub>3c</sub></b>
Colesterol/ Proteína	2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.6	0.6 ± 0.4
Concentración (mg / dL)	21.7 ± 6.8	8.3 ± 2.2	11.4 ± 3.5	4.8 ± 5.6	1.8 ± 1.3

La proporción de colesterol con respecto a proteína es menor en las HDL de menor tamaño. En las HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>2a</sub> existen proporciones de 2:1 y 1:1 entre la cantidad de colesterol y proteína HDL; en las HDL de menor tamaño se observa una composición predominantemente proteica. La concentración de colesterol asociado a las HDL<sub>2</sub> representa aproximadamente el 62% del C-HDL total. Esto indica claramente que las

subpoblaciones de HDL<sub>2</sub> contienen una mayor proporción de colesterol y esto les permite transportar en plasma una mayor cantidad de este lípido.

La cantidad y distribución de la grasa corporal han sido estrechamente asociadas con los desórdenes metabólicos. Asimismo, se ha observado que el sobrepeso se relaciona directamente con la prevalencia de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2; ambas alteraciones pueden converger en el desarrollo de hipoalfalipoproteinemias, de modo que se consideran marcadores del síndrome metabólico, proaterogénico *per se*.<sup>41,42</sup> Diversos estudios han mostrado que la obesidad, determinada como el índice de masa corporal (IMC), eleva el riesgo relativo de desarrollar EAC.<sup>43</sup>

Debido a ello, se realizó el análisis de correlación con las distribuciones relativas y el cociente C/P, con el IMC. Los resultados se presentan en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Análisis de correlación del IMC con las distribuciones relativas y el cociente C/P. En este cuadro se presentan los coeficientes de correlación y valores de significancia estadística entre el IMC con las proporciones relativas de cada subpoblación determinadas por colesterol, proteína y el cociente entre las ambas determinaciones.

Método de determinación	Valor estadístico	HDL <sub>2b</sub>	HDL <sub>2a</sub>	HDL <sub>3a</sub>	HDL <sub>3b</sub>	HDL <sub>3c</sub>
Colesterol	Coficiente (R)	-0.309	0.013	<b>0.433</b>	0.007	<b>0.357</b>
	Significancia (p)	0.067	0.939	<b>0.008</b>	0.970	<b>0.033</b>
Proteína	Coficiente (R)	-0.315	<b>-0.404</b>	0.034	<b>0.368</b>	<b>0.436</b>
	Significancia (p)	0.058	<b>0.013</b>	0.842	<b>0.025</b>	<b>0.007</b>
C/P	Coficiente (R)	<b>0.410</b>	<b>0.554</b>	0.148	-0.090	-0.152

Significancia (p)	<b>0.015</b>	<b>0.001</b>	0.395	0.609	0.384
----------------------	--------------	--------------	-------	-------	-------

Las HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3c</sub>, determinadas por colesterol, presentan asociaciones positivas con el IMC, por lo que en sujetos con IMC bajo (menor riesgo de EAC) existe una escasa proporción de estas subpoblaciones. Por otra parte, en la determinación por proteína el tamaño de las partículas afecta drásticamente a la correlación analizada. Las distribuciones de HDL<sub>2b</sub> presentan una tendencia negativa que no alcanza significado estadístico; sin embargo la correlación con el cociente C/P sugiere que en sujetos con mayor IMC se presenta una mayor proporción de colesterol con respecto a proteína en esta subfracción HDL<sub>2b</sub>. De igual forma el análisis muestra que sujetos con elevados IMC presentan una menor proporción de proteína-HDL<sub>2a</sub> con respecto al colesterol.

Es interesante que las HDL<sub>3c</sub> presenten una correlación positiva con significado estadístico por ambos métodos con el IMC, sugiriendo que es la subfracción más impactada por la obesidad. En contraste, las HDL<sub>2b</sub> presentan correlaciones negativas que no alcanzan significado estadístico por ambos métodos.

Para comenzar a explorar los nichos de aplicación de la determinación de la concentración plasmática del colesterol de las diferentes subfracciones de HDL, realizamos un análisis de correlación simple con los parámetros que representan factores de riesgo cardiovascular, el IMC y el C-HDL. Los resultados del análisis estadístico realizado se presentan en el cuadro 8. Además presentamos el análisis de correlación entre el colesterol de las subfracciones y el cociente colesterol/proteína con el fin de establecer cuál es la posible interdependencia entre ambos parámetros.

**Cuadro 8.** Valores estadísticos de correlación con la concentración de colesterol plasmático asociado a cada subclase.

<b>Variable 2</b>	<b>Valor estadístico</b>	<b>C-HDL<sub>2b</sub></b>	<b>C-HDL<sub>2a</sub></b>	<b>C-HDL<sub>3a</sub></b>	<b>C-HDL<sub>3b</sub></b>	<b>C-HDL<sub>3c</sub></b>
<b>IMC</b>	Coeficiente (R)	<b>-0.364</b>	-0.203	0.028	-0.105	0.216
	Significancia (p)	<b>0.029</b>	0.235	0.870	0.541	0.207
<b>C-HDL</b>	Coeficiente (R)	<b>0.721</b>	<b>0.811</b>	<b>0.809</b>	<b>0.385</b>	0.191
	Significancia (p)	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.020</b>	0.265
<b>Cociente C/P por subclase</b>	Coeficiente (R)	0.307	-0.244	<b>0.518</b>	<b>0.845</b>	0.111
	Significancia (p)	0.068	0.151	<b>0.001</b>	<b>0.000</b>	0.519



En el cuadro 8 se observa que el C-HDL<sub>2b</sub> mantiene una asociación negativa con el IMC, es decir, a mayor índice de masa corporal, menor la concentración plasmática de colesterol-HDL<sub>2b</sub>

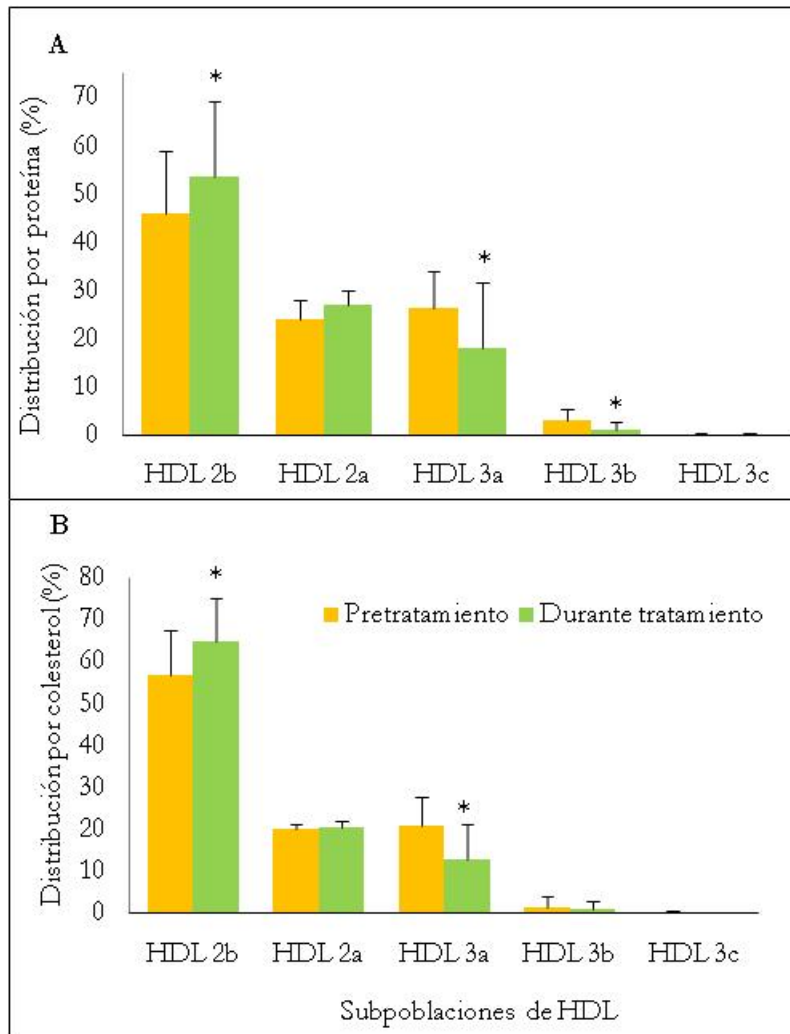
A pesar de que el C-HDL de las subclases depende directamente del C-HDL no existe una correlación con el C-HDL<sub>3c</sub>; es posible que el aporte de las HDL<sub>3c</sub> al C-HDL sea mínimo debido a que su composición es prioritariamente proteica. Por otra parte, la concentración de colesterol de las HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub> se asocia directamente al cociente C/P, es decir, a más colesterol plasmático en estas subclases es mayor la proporción colesterol/proteína en estas mismas partículas.

### ***Efecto del tratamiento con TZD.***

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento con pioglitazona aumenta la síntesis de apo A-I (PR) y su catabolismo (FCR) a proporciones cercanas al doble con respecto a un grupo control.<sup>29</sup> El incremento simultáneo en ambos parámetros induce que el C-HDL muestre sólo un cambio modesto en las determinaciones, sin cambios significativos en la concentración de apo A-I en plasma. Además, el tratamiento con pioglitazona promueve una modificación en la distribución de los tamaños de HDL según se ha determinado por proteína-HDL.<sup>29</sup> Estos datos sugieren que el tratamiento con TZD genera una modificación en la proporción colesterol/ proteína en las HDL, lo cual no ha sido demostrado. Debido a esto es necesario estudiar las modificaciones en los parámetros de distribución determinados por ambos componentes y la proporción entre ellos para cada subclase, lo que sólo es posible con la metodología propuesta para la determinación de la distribución relativa por colesterol.

Ambos grupos de conejos tratados con tiazolidinedionas fueron comparados con sus respectivos parámetros pretratamiento.

En la figura 12 se presentan las distribuciones relativas determinadas por proteína y colesterol, se compara la determinación durante el tratamiento con pioglitazona con la determinación antes del tratamiento.



**Figura 12.** Distribuciones relativas. La figura 12A presenta la determinación por el contenido de proteína y la figura 12B la determinación por el contenido de colesterol en el grupo de conejos tratados con pioglitazona. T de Student contra pretratamiento \*p < 0.05

Las distribuciones relativas determinadas por ambos métodos muestran tendencias semejantes, aunque la determinación por colesterol arroja porcentajes para HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>

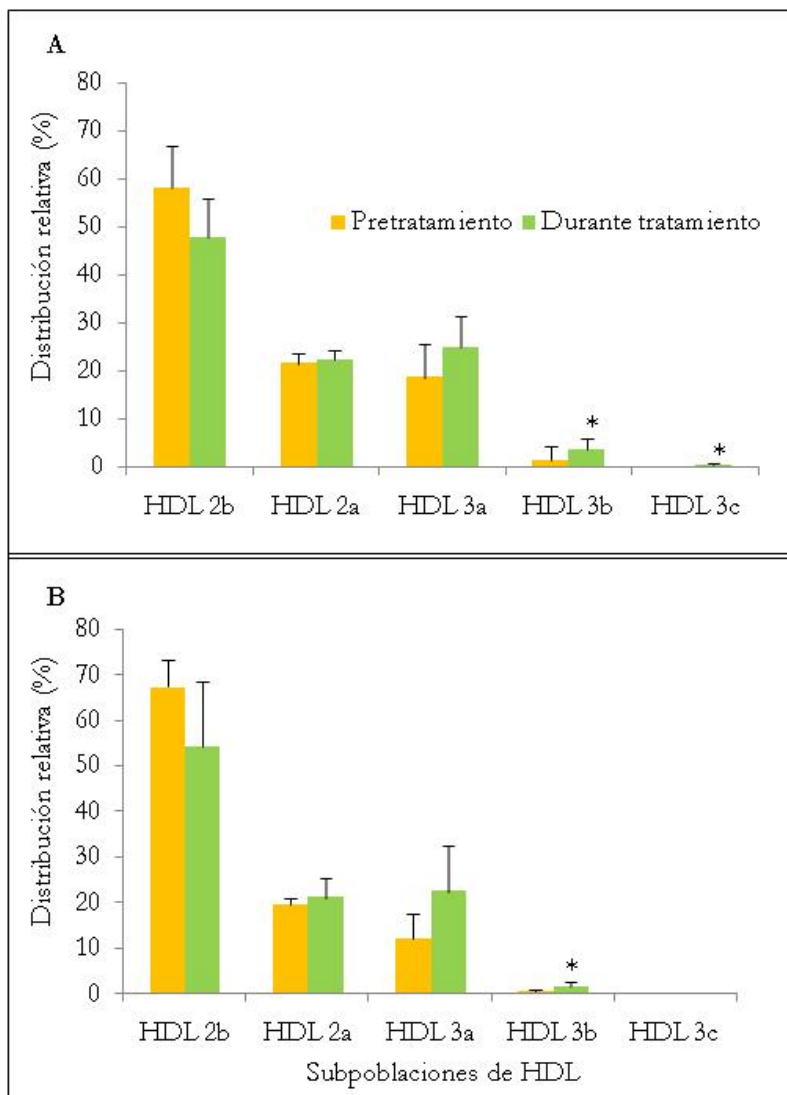
menores en comparación con el método de cuantificación por proteína. El cambio para las HDL<sub>3b</sub> observado con la determinación por proteína carece de significado estadístico en la determinación de colesterol.

Con las distribuciones relativas determinadas con ambas metodologías se calculó el cociente C/P y el C-HDL de cada subpoblación para las muestras antes y durante el tratamiento. Los resultados obtenidos en el grupo tratado con pioglitazona se presentan en el Cuadro 9. Se observa que no existen cambios significativos en el cociente C/P ni las concentraciones de colesterol asociadas a cada subpoblación con el tratamiento con pioglitazona. Sin embargo se observa un aumento considerable, aunque no alcanza significado estadístico, en el C-HDL<sub>2b</sub>.

**Cuadro 9.** Proporción de colesterol con respecto a proteína y concentración plasmática de colesterol asociado a cada subclase de HDL del grupo tratado con pioglitazona. T de Student \*p < 0.05 contra los datos pretratamiento

<b>Determinación</b>		<b>HDL<sub>2b</sub></b>	<b>HDL<sub>2a</sub></b>	<b>HDL<sub>3a</sub></b>	<b>HDL<sub>3b</sub></b>	<b>HDL<sub>3c</sub></b>
Antes del tratamiento	Colesterol/ Proteína	1.34±0.29	0.83±0.12	0.75 ±0.12	0.39 ±0.46	0.66 ±0.51
	Concentración (mg / dL)	11.91±1.91	4.31±0.62	4.51±2.05	0.38± 0.64	0.08± 0.12
Durante el Tratamiento	Colesterol/ Proteína	1.20± 0.17	0.80± 0.13	1.17± 1.06	1.31± 1.73	1.21± 1.18
	Concentración (mg / dL)	17.90± 9.83	5.43± 3.39	2.07±1.07	0.06± 0.05	0.02± 0.02

En lo que concierne a la rosiglitazona, la otra tiazolidinediona comercial, la distribución relativa de los conejos tratados con este fármaco determinada por proteína y por colesterol se presenta en la figura 13.



**Figura 13.** Distribuciones relativas. La figura 13A presenta la determinación por el contenido de proteína y la figura 13B la determinación por el contenido de colesterol en conejos tratados con rosiglitazona. T Student contra los datos pretratamiento \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  .

El tratamiento con rosiglitazona muestra un impacto en las HDL de menor tamaño, aumentando su proporción; sin embargo, la determinación por el contenido en colesterol

tiene una menor resolución para determinar a las HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>. Donde las HDL<sub>3c</sub> muestran significado en la determinación por proteína y no por colesterol.

De igual forma se calculó el cociente C/P y la concentración plasmática de colesterol asociado a cada subclase de las HDL. Estos datos se muestran en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Datos de la proporción colesterol contra proteína y concentraciones plasmáticas de colesterol por subpoblaciones. T de Student \* p < 0.05 contra los datos pretratamiento

<b>Determinación</b>		<b>HDL<sub>2b</sub></b>	<b>HDL<sub>2a</sub></b>	<b>HDL<sub>3a</sub></b>	<b>HDL<sub>3b</sub></b>	<b>HDL<sub>3c</sub></b>
Antes del tratamiento	Colesterol/ Proteína	1.18± 0.15	0.92± 0.12	0.63± 0.21	2.34± 2.69	4.60± 4.36
	Concentración (mg / dL)	20.04± 7.09	5.94± 2.22	4.21± 2.92	0.16± 0.20	0.07± 0.04
Durante el Tratamiento	Colesterol/ Proteína	1.07± 0.14	0.94± 0.15	0.92± 0.27	0.54± 0.50	0.40± 0.35
	Concentración (mg / dL)	10.89± 4.83*	3.84± 0.76	3.94± 1.39	0.32± 0.26	0.03± 0.03

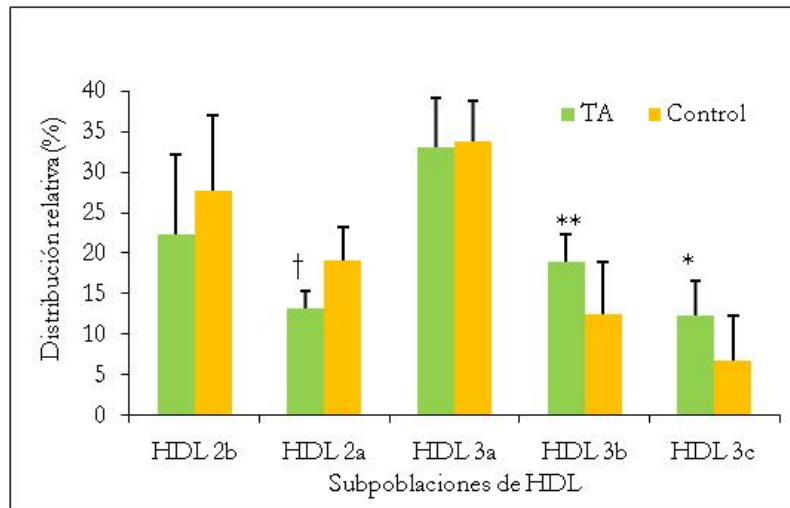
Partiendo de la base de que el cociente C/P es un indicador de la composición química de las HDL, se puede deducir de los resultados presentados en la tabla 10 que la composición de estas lipoproteínas no se modifica durante el tratamiento. A pesar de la ausencia de cambios en la composición, el C-HDL<sub>2b</sub> disminuye aproximadamente a la mitad. Interesantemente, la pioglitazona tiene el efecto contrario; el C-HDL<sub>2b</sub> aumenta un 50%, aunque esta diferencia no alcanza significado estadístico.

### *Arteritis de Takayasu.*

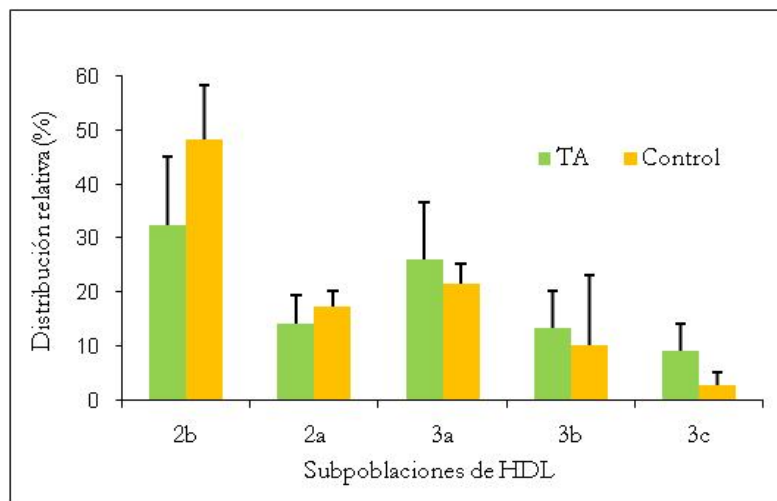
La arteritis de Takayasu es un padecimiento que afecta la función endotelial. Considerando que una de las funciones de las HDL es mejorar el funcionamiento del endotelio vascular favoreciendo la síntesis de NO, la distribución, características y función de las HDL son parámetros de interés en la TA.<sup>41</sup> Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que en esta patología existe una distribución diferente a la que presentan sujetos sin evidencia de desarrollo de ateroma, ni padecimientos asociados a dislipidemias.<sup>32</sup>

En este trabajo se realizó la determinación de las distribuciones relativas por ambas metodologías en pacientes con TA. El análisis se realizó comparando la información de los pacientes contra un grupo control pareado por edad y sexo.

En la figura 14 y 15 se encuentran las distribuciones relativas determinadas por el contenido en proteína y colesterol respectivamente.



**Fig 14.** Distribución relativa determinada por el contenido de proteína. Determinación por el contenido en proteína. T de Student \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  †  $p < 0.001$  contra grupo control.



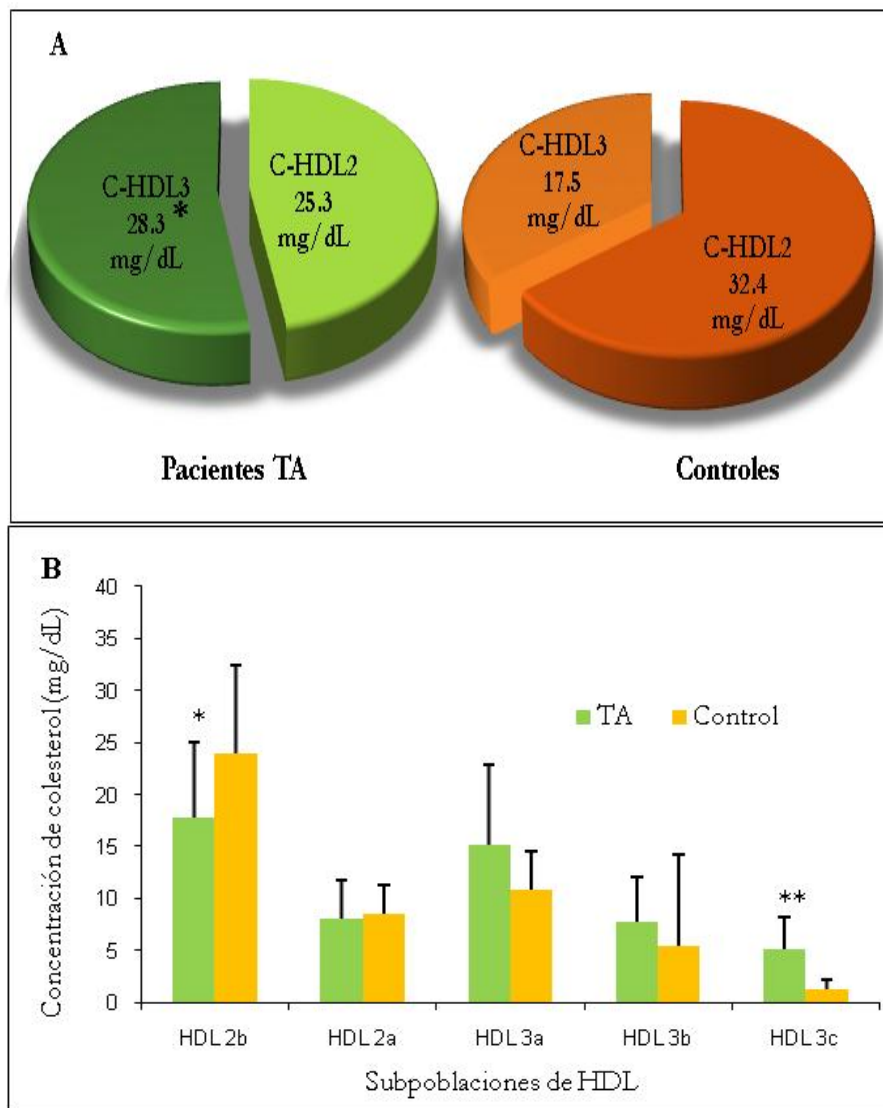
**Fig 15.** Distribuciones relativas determinadas por el contenido en colesterol. T de Student \*\* $p < 0.01$  contra grupo control.

Las distribuciones relativas muestran diferencias significativas con el grupo control, y tales diferencias se observan con ambos métodos. La determinación por proteína muestra diferencias significativas para las HDL<sub>2a</sub> y HDL<sub>3b</sub> que no puede determinarse por el



contenido en proteína. Mientras que las HDL<sub>2b</sub> son diferentes al grupo control sólo en la determinación por colesterol.

En la figura 16 se presenta la comparación de los parámetros de colesterol asociado a cada subpoblación de HDL, así como la comparación de las concentraciones C-HDL<sub>2</sub> y C-HDL<sub>3</sub> para ambos grupos.



**Figura 16.** Concentraciones plasmáticas C-HDL determinadas por subpoblaciones. La figura 16A muestra las distribuciones tomando en consideración a las HDL como dos subpoblaciones HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. La figura 16B considera a las cinco subpoblaciones de HDL

identificadas por su diámetro hidrodinámico. T de Student contra grupo control \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ .

El C-HDL en pacientes con TA muestra una clara asociación a las lipoproteínas de menor tamaño. Además el C-HDL<sub>2</sub>, calculado como la suma de C-HDL<sub>2b</sub> y C-HDL<sub>2a</sub>, es inferior al C-HDL<sub>3</sub>. Esta situación no se observa en sujetos del grupo control. En el grupo de pacientes con TA el C-HDL<sub>2b</sub> es significativamente menor (78%), siendo la subpoblación con mayor concentración de colesterol en sujetos normales, mientras que las HDL<sub>3c</sub> tienen un contenido significativamente mayor de colesterol, que representa aproximadamente 160% del C-HDL<sub>3</sub> del grupo control.

La proporción de proteína y colesterol se compara con el cociente de la distribución relativa para las subpoblaciones. La comparación entre grupos se presenta en el cuadro 11.

**Cuadro 11.** Cociente proteína y colesterol (C/P) de las diferentes subclases HDL para ambos grupos.

Subpoblación	HDL <sub>2b</sub>	HDL <sub>2a</sub>	HDL <sub>3a</sub>	HDL <sub>3b</sub>	HDL <sub>3c</sub>
TA	1.48 ± 0.52	1.05 ± 0.36	0.79 ± 0.29	0.69 ± 0.31	0.73 ± 0.29
Control	1.88 ± 0.63	0.92 ± 0.15	0.65 ± 0.12	0.84 ± 0.98	0.67 ± 0.54

La composición de las HDL no presenta diferencias significativas con respecto al grupo control, sugiriendo que las diferencias en cuanto a las distribuciones relativas se deben al número de lipoproteínas presentes en el plasma.

## DISCUSIÓN.

Con este trabajo hemos desarrollado una metodología que permite la determinación y cuantificación de las diferentes subclases de HDL de acuerdo a su contenido de colesterol; además caracterizamos las diferencias obtenidas por la metodología propuesta con la determinación por proteína.<sup>35,36</sup>

Los alcances de esta metodología pueden ser muy importantes en el ámbito de la evaluación del riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular y/o diabetes tipo 2. Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado una asociación inversa e independiente entre el C-HDL y el riesgo de EAC, relacionando así a las HDL con un efecto protector.<sup>21,44</sup> Sin embargo, existen sujetos con hipoalfalipoproteinemia severa (C-HDL < 15 mg/dL) que no presentan historial clínico o antecedentes familiares de EAC.<sup>45-47</sup> Estas observaciones sugieren que el valor de C-HDL no es suficiente para evaluar el riesgo de EAC o el efecto protector de las HDL. Por esta razón, se ha propuesto que las subpoblaciones de HDL tienen diferente actividad ateroprotectora. En este sentido, algunos grupos de investigación han reportado que pacientes con EAC tienen niveles de C-HDL<sub>2</sub> menores que los sujetos control, asociando a esta subpoblación con un mayor potencial antiateroscleroso.<sup>10-12</sup> Por otra parte, las hipoalfalipoproteinemias que no cursan con EAC mencionadas anteriormente presentan una proporción muy elevada de HDL pequeñas medidas por su contenido proteico. Además, estudios *in vitro* demuestran que las HDL pequeñas son los mejores aceptores primarios del colesterol excedente de las células periféricas y que acarrean la mayor proporción de paraoxonasa-1<sup>18,19</sup>, enzima a la que se han atribuido propiedades antiaterogénicas.<sup>48</sup> En su conjunto, todos estos resultados son

paradójicos. Debido a que no existe punto de comparación entre los sistemas de separación y detección empleados hasta el momento, planteamos la necesidad de desarrollar una metodología que permita la determinación por colesterol, además de la ya existente que se basa en la detección por proteína, de las diferentes subclases de HDL. Esta propuesta podría contribuir a conciliar los resultados entre los estudios epidemiológicos y los estudios *in vitro* concernientes a cuál es la subfracción HDL con mayor potencial antiateroscleroso. Por lo anterior nuestra hipótesis de partida ha sido que las determinaciones por el contenido en colesterol o en proteína de las subclases de HDL conducen a resultados diferentes.

Inicialmente nos enfocamos al diseño de un método apropiado para nuestros fines. Existen diversos métodos para determinar a las subclases de HDL, entre los que destacan la resonancia magnética nuclear<sup>12,17,42</sup> y la electroforesis en doble dimensión con revelado de las subclases de HDL por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti apo AI.<sup>49</sup> Sin embargo ambos métodos presentan una relación estrecha con la electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) como la que hemos aplicado en el presente estudio. Por lo tanto, decidimos que el método a desarrollar debía separar a las HDL por PAGE. Esta condición nos condujo a proponer el empleo de un reactivo que revelara el colesterol sobre el gel de poliacrilamida. La alternativa era electrotransferir las HDL a una membrana de nitrocelulosa y revelar sobre ella. Esta alternativa la descartamos porque implicaba pasos adicionales al método y dificultaba el revelado de proteína HDL sobre la membrana. El empleo de una mezcla enzimática en solución acuosa con el gel de poliacrilamida para revelar el colesterol no era viable porque el reactivo no mantiene un contacto estático con el sustrato. Cuando intentamos sumergir el gel en la mezcla de reacción, las bandas que se obtenían eran incuantificables porque el fondo adquiría un color muy intenso y el color

sobre la banda era muy tenue, en los casos en que se obtuvo algo (datos no mostrados). Debido a esto, hemos propuesto una mezcla enzimática en fase gel, esto permite el contacto adecuado entre las enzimas y el substrato, brinda el medio acuoso para que se lleven a cabo las reacciones de revelado y se puede retirar fácilmente para realizar el análisis por densitometría óptica.

Posteriormente, se realizaron ensayos para seleccionar el agente viscosante para el reactivo, empleando agarosa y carboximetilcelulosa. La agarosa dio resultados satisfactorios porque provee una superficie de contacto homogénea y se retira con facilidad del gel de poliacrilamida. Sin embargo, la solución de agarosa debe mezclarse en caliente (aproximadamente 40 °C) con la mezcla enzimática y se corre el riesgo de inactivar parcialmente a las enzimas con esta manipulación. En cambio, la carboximetilcelulosa se disuelve en frío y tiene todas las otras ventajas de la agarosa. Por todo lo anterior, se seleccionó carboximetilcelulosa como agente viscosante.

A continuación, establecimos la proporción adecuada de enzimas que permitiera revelar el colesterol sobre el gel de poliacrilamida. A nuestro conocimiento, no existen trabajos previos que hayan ensayado reactivos de este tipo previamente. En consecuencia, la cantidad inicial de cada enzima a incluir en el reactivo fue fijada tomando como referencia la concentración de enzimas empleada en la determinación de colesterol en plasma disponible comercialmente (Randox®). Asimismo, la concentración de FMS y MTT la establecimos con base en trabajos previos de nuestro grupo de investigación.<sup>40</sup> A partir de estas cantidades realizamos los ensayos para establecer una proporción adecuada de enzimas y aceptores de electrones que se presentan en la sección de resultados. Los criterios principales para la elección de las diferentes concentraciones fue la relación señal-

fondo y la economía de enzimas; fueron seleccionadas aquellas concentraciones que permitieron obtener los densitogramas más definidos y con la menor cantidad de enzimas, mismas que se presentan en la sección de resultados.

Una vez desarrollado el reactivo y determinadas las condiciones de reacción se aplicó a muestras de sujetos normales y de diferentes situaciones metabólicas que potencialmente cursan con modificaciones en la distribución de tamaños de HDL.

En las muestras de sujetos sanos los resultados demuestran claramente que las distribuciones relativas generadas por la determinación de colesterol y de proteína tienen diferencias significativas para la mayoría de las subpoblaciones de HDL. Las proporciones de las HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> son drásticamente diferentes según el componente que se utilice para la cuantificación. Además, las correlaciones entre las determinaciones presentan valores relativamente pequeños, indicando que ambos métodos generan diferente información. Esto implica que los perfiles generados con la determinación de uno u otro componente son diferentes.

Considerando las diferencias respecto a la subfracción de HDL con mayor potencial antiaterogénico y nuestros resultados, podemos sugerir que el método de determinación de las subclases de HDL aplicado en los estudios epidemiológicos<sup>10-12</sup> e *in vitro*<sup>18-19,21</sup> haya condicionado el resultado final.

El método que hemos desarrollado presenta varias ventajas más allá de comenzar a dar una respuesta a la paradoja mencionada; permite cuantificar la concentración de colesterol de cada subclase de HDL y estimar la composición de cada subclase de HDL. La cuantificación del colesterol de cada subclase de HDL implica un valor real en masa de las

lipoproteínas; una medida similar se ha obtenido en la determinación de colesterol por precipitación selectiva, sin embargo la cuantificación de las 5 subclases puede generar información relevante para el campo de la salud. Por ejemplo, la cuantificación de colesterol para HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> mostraría la diferencia en las HDL<sub>3</sub> presentada por los pacientes con TA, no obstante la cuantificación de todas las subclases permite identificar a las subpoblaciones HDL<sub>2b</sub> y HDL<sub>3c</sub> como las más afectadas. Además, la composición relativa de las HDL revela que las HDL<sub>2</sub> contienen más colesterol que proteína, mientras que las HDL<sub>3</sub> presentan la proporción opuesta. Esta es la primera vez que se demuestra esta característica en las subclases de HDL. Debido a esta relación, las técnicas que evalúan el contenido de colesterol son menos sensibles para determinar a las subpoblaciones de HDL pequeñas.

Los resultados obtenidos con los grupos de conejos tratados con TZD son una clara evidencia respecto a que el bajo contenido de colesterol de las HDL pequeñas afecta la sensibilidad de la determinación. Ambos fármacos inducen cambios significativos en las HDL<sub>3</sub> al ser determinadas por proteína, exceptuada la subpoblación HDL<sub>3a</sub>, aunque en la determinación por el contenido en colesterol de estas subpoblaciones sus cambios son indetectables. Los grupos tratados, tienen cambios con significado estadístico en dos de las tres subpoblaciones de HDL<sub>3</sub> cuando se determinan por proteína, sin embargo cuando son determinadas por colesterol la subpoblación alterada de menor tamaño carece de relevancia estadística.

El C-HDL de cada subclase está calculado a partir del C-HDL total y la distribución relativa determinada por colesterol. Sin embargo, los resultados no muestran correlación entre este parámetro y el C-HDL<sub>3c</sub>, además de tener una correlación relativamente pequeña

con el C-HDL<sub>3b</sub>. Debido a los resultados del análisis de correlación es posible proponer que la identificación de las HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub> únicamente por la determinación de este componente provoca una detección poco sensible.

Como se ha mencionado previamente, las HDL de menor tamaño presentan una composición relativamente rica en proteína, ya que presentan los menores valores de C/P. Este parámetro de composición relativa muestra una asociación directa con los valores de C-HDL de las subpoblaciones para las HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub>. De este modo, en estas subpoblaciones, la cantidad de proteína en su estructura es inversamente proporcional al C-HDL que se les asocia. Bajo este razonamiento, situaciones en las que exista una elevada proporción de proteína HDL<sub>3</sub> presentarán valores pequeños de C-HDL<sub>3</sub>. Cabe recordar que las HDL<sub>3</sub> determinadas por proteína han sido caracterizadas como lipoproteínas antiaterogénicas,<sup>8,18,19</sup> del mismo modo que se ha observado que menores valores de C-HDL<sub>3</sub> se asocian a un menor riesgo relativo de EAC.<sup>10-12</sup>

La determinación de colesterol desarrollada genera una banda indicativa de colesterol en una gama de tamaños superiores a los descritos para las HDL, región que no se tiñe al determinar proteína. La presencia de esta banda sugiere la existencia de partículas con un alto contenido de colesterol y escaso de proteína. En este sentido se ha reportado que sujetos con deficiencia de CETP pueden generar partículas HDL de un diámetro mayor a los establecidos convencionalmente.<sup>50</sup> Por esta razón, decidimos investigar si esta determinación demostraba la presencia de HDL de gran tamaño muy pobres en proteína, o bien se trataba de un artefacto del método. Los resultados obtenidos con la inmunotransferencia demostraron que no existe proteína HDL en esta zona. Esto descarta la existencia de HDL de mayor tamaño.



Para establecer las posibles implicaciones de la determinación desarrollada en la evaluación de riesgo de EAC decidimos analizar la correlación entre los resultados obtenidos por esta metodología con un factor que predisponga al desarrollo de la aterosclerosis. El sobrepeso, que puede evaluarse como el  $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$ , es un factor de riesgo de EAC, además de ser un indicador de resistencia a la insulina.<sup>41-43</sup> Trabajos previos han demostrado que la resistencia a la insulina correlaciona con las HDL<sub>3</sub>, al ser determinadas por proteína.<sup>42</sup> Por esta razón decidimos realizar un análisis estadístico para observar si una tendencia moderada hacia IMC superiores afecta también la distribución de las HDL, así como su composición relativa y C-HDL de cada subclase. Nuestros resultados muestran que el cociente C/P de las HDL<sub>2</sub> se asocia directamente al IMC, de modo que las HDL<sub>2</sub> con un mayor contenido de colesterol con respecto a proteína pueden ser un marcador de riesgo de EAC y esto podría implicar una disfunción. Únicamente el C-HDL<sub>2b</sub> tiene una correlación significativa con el IMC, como se recordará, el C-HDL<sub>2</sub> se considera ateroprotector<sup>10-12</sup>, y sus mayores niveles se encontraron en sujetos con menores IMC.

Con respecto a las distribuciones relativas, existe una correlación inversa y significativa entre las HDL<sub>2a</sub> determinadas por proteína con el IMC, mientras que el análisis realizado con la determinación por colesterol no tiene significado estadístico. Los resultados sugieren que, al correlacionar sólo un componente determinado y el cociente C/P, la composición de las HDL<sub>2a</sub> es más rica en colesterol en sujetos con mayores IMC. Adicionalmente, las HDL<sub>3a</sub> y HDL<sub>3b</sub> presentan correlaciones positivas con el IMC por colesterol y proteína respectivamente, sus determinaciones complementarias carecen de significado estadístico y representan menos del 10%; la disparidad en estos valores nos permite sugerir que ambos métodos resultan complementarios.

Estudios previos han empleado a la arteritis de Takayasu como un modelo de disfunción vascular y se ha mostrado su asociación con las HDL.<sup>32</sup> En el presente trabajo comprobamos que la distribución relativa por proteína tiene mayores niveles de HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, además de una menor proporción de HDL<sub>2b</sub>. Las lipoproteínas de pacientes con TA también presentan una distribución anormal determinada por colesterol ya que las HDL pequeñas transportan una mayor proporción y cantidad del lípido. A pesar de mostrar distribuciones notablemente diferentes al grupo control, la proporción de sus componentes no presenta diferencias, de modo que la composición es normal en estas HDL.

Por otra parte, las HDL<sub>3</sub> presentan una mayor proporción de proteína y asocian una mayor cantidad de colesterol. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que una mayor proporción de proteína-HDL<sub>3</sub> está asociada a una mayor función vascular.

En resumen, en este trabajo hemos desarrollado una metodología que permite cuantificar todas las subpoblaciones de las HDL con procedimientos convencionales generando información sobre su composición. Demostramos que la composición química de las HDL varía entre las subpoblaciones, lo cual impide asociar directamente la cantidad de cualquier componente con el número de lipoproteínas en circulación. Esto se ve reflejado en la incompatibilidad de los resultados cuando las determinaciones se realizan por moléculas diferentes. En este orden de ideas, se han analizado muestras de grupos con alteraciones en la distribución determinada por proteína para identificar las variaciones con esta metodología y sus posibles implicaciones en la EAC. Asimismo, el desarrollo del presente estudio sirve como antecedente para el planteamiento de nuevos proyectos de investigación.

## **PERSPECTIVAS.**

El método desarrollado en el presente estudio se aplicará para el análisis de las distribuciones y composición de las HDL en sujetos cardiópatas o con diabetes tipo 2; estos sujetos presentan las alteraciones lipoproteicas más importante y son los que tienen la aplicación clínica de mayor interés.

Por otra parte, el desarrollo de esta metodología en los diferentes substratos que componen a las lipoproteínas, permitirá una caracterización más detallada de las HDL y sus posibles implicaciones en la funcionalidad de las partículas. Permitirá el análisis detallado de los cambios de composición de las HDL en diferentes situaciones metabólicas, facilitando la comprensión de la reestructuración dinámica que sufren estas lipoproteínas intravascularmente.

En el ámbito del desarrollo tecnológico, las estrategias metodológicas aplicadas en este estudio, se aprovecharán para la determinación de los fosfolípidos y triacilgliceroles de las HDL. También es factible llevar esta metodología al campo de la histología para la tinción específica de colesterol, y posiblemente de otros lípidos.

## BIBLIOGRAFÍA.

---

1. Nelson DL, Cox MM Principles of Biochemistry. 4a edición USA 2004 pp. 820-827.
2. Voet D, Voet J. Biochemistry 2a. edición.USA 1995. pp. 690-704
3. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-416.
4. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. *Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán* 1989; 2: 22-28.
5. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27.
6. Barter PJ, Rye K. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996, 7: 82 -87.
7. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161: 245-254.
8. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 1992, 31: 11112 – 11117.
9. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, et.al. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 1981; 22: 339-358.

10. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B. Associations of HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1098-1105.
11. MJ Stampfer, FM Sacks, S Salvini, et. al. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991, 325: 373 - 381
12. David S. Freedman, James D. Otvos, Elias J. Jeyarajah, et. al. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1046 -1053.
13. Cheung MC y Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. *J. Biol Chem* 1984; 259: 12201-12209..
14. Luc G, Fruchart JC. New methods in lipid research. *Presse Med* 1994; 23(31): 1446-1449
15. Hua F, Maeda S, Seishima M, et al. Subfractionation of serum high density lipoproteins and its clinical significance. *Rinsho Byory* 1996; 44(8): 802-806.
16. Asztaloz BF, Lefevre M, Foster TA, Tulley R, et. al. Normolipidemic subjects with low HDL cholesterol levels have altered HDL subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1885-1893.
17. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991; 37/3: 377-386.
18. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1881-1888.

19. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, et. al. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277: 4301-4308.
20. Secretaría de Salud Información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección General de Epidemiología.
21. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et. al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124:S11-S20.
22. Huesca C, Luc G, Duhal N, et.al. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI an AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5:64
23. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, et.al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med.* 1999; 341:410-418.
24. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, et. al. Effects of maximal doses of atorvastatin on small dense low-density lipoprotein cholesterol levels. *Am J Cardiol* 2008, 101(3): 315-318.
25. Goldstein LB. Statins for stroke prevention. *Curr Atheroscler Rep* 2007; 9 (4); 305-311.
26. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, et. al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 717-726.

27. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which thiazolidinediones enhance insulin action. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 9-13.
28. Yki-Javinen H. Drug Therapy: Thiazolidinediones. *N Eng J Med* 2004; 351: 1106-1118.
29. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, et. al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis* 2005; 181: 233-240.
30. Meave A, Soto ME, Reyes P, et. al Pre-Pulseless Takayasu's Arteritis Evaluated with <sup>18</sup>F-FDG Positron Emission Tomography and Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Angiography. *Tex Heart Inst J.* 2007; 34(4): 466-9.
31. Lupi HE, Sánchez TG, Marcushamer J, et al. Takayasu's: Clinical study of 107 cases. *Am Heart J.* 1977; 93: 94-103.
32. Espindola Zavaleta N, Soto López ME, Carreón Torres E, et.al. Endothelial dysfunction is associated to low paraoxonasa-1 activities and abnormal high-density lipoprotein subclasses distribution in Takayasu's arteritis. *Clin Chim Acta.* En revision.
33. Gamboa R, Regalado JC, Huesca-Gómez C, et al. Actividades paraoxonasa y arilesterasa bajas en sujetos mexicanos con enfermedad arterial coronaria. *Arch Cardiol Mex* 2008 en prensa.
34. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
35. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, et. al. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990; 31: 1131-1139.

36. Huesca-Gómez C, Carreón-Torres E, Nepomuceno-Mejía T, Sánchez-Solorio M, Galicia-Hidalgo M, Mejía AM, Montañó LF, Franco M, Posadas-Romero C, Pérez-Méndez O. Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin: cholesterol acyltransferase to HDL size distribution. *Endocrin Res* 2004; 30: 403-415.
37. Song H, Tietz NW, Tan C. Usefulness of serum lipase, esterase and amylase estimation in the diagnosis of pancreatitis- a comparison. *Clin Chem*. 1970; 16(4):264-268.
38. Kassirer JP. Clinical evaluation of kidney function- glomerular function. *N Eng J Med* 1971; 12: 285.
39. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1975; 21(5): 1D-432D.
40. Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, et.al. Renal interstitial adenine is increased in angiotensin II- induced hypertensive rats. *AM J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jan; 294(1): F84-92.
41. Pérez-Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch Cardiol Mex* 2004; 74(1):53-67.
42. Pérez-Méndez O, Torres TM, Posadas RC, et. al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17-22.
43. Kawamoto R, Ohtsuka N, Ninomiya D, et. al. Association of obesity and visceral fat distribution with intima-media thickness of carotid arteries in middle-aged and older persons. *Intern med*. 2008; 47(3): 143-9.
44. Gordon D, Rifkind BM. Current concepts: high density lipoproteins –the clinical implications of recent studies. *N Engl J. Med*. 1989; 321: 1311-1315.



45. Pérez-Méndez O, Bruckert E, Franceschini G, et.al. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 2000; 148: 317-325.
46. El Khalil L, Majd Z, Bakir R, et al.: Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483.
47. Perez-Mendez O, Castro G, Fruchart J, et. al. Kinetic and metabolic studies of apo A-I and apo A-II in a hypoalphalipoproteinemic patient (Abstract). *Eur J Neurol (suppl 2)* 1995; 72:77
48. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et. al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101:1581-1590.
49. Asztalos BF. High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL atherosclerosis treatment study. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19:385-391
50. Arai T, Tsukada T, Munaset T, et al. Particles size analysis of high density lipoprotein in patients with genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Clin Chim Acta* 2000; 301 (1-2): 103-117.

## APÉNDICE 1

### Determinación de proteínas por el método de Lowry.<sup>31</sup>

#### FUNDAMENTO.

En medio alcalino los aminoácidos de las proteínas se unen a los iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), formando un complejo azul, que absorbe a 750 nm. La sensibilidad de esta coloración incrementa al adicionar el reactivo de Folin Ciocalteus. El uso de SDS como detergente permite exponer las zonas hidrófobas de las proteínas.

#### SOLUCIONES

- ◆ -Solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ : 20 % en  $\text{H}_2\text{O}$
- ◆ -Solución de tartrato de Na y K: 1 g +  $\text{CuSO}_4$ :0.5g
- ◆ -Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- ◆ -Solución de SDS al 10%
- ◆ -Solución patrón de albúmina: 1 mg/mL
- ◆ -Solución A. Preparar al momento
  - 1 volumen de tartrato de Na y K
  - 1 volumen de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
  - 2 volúmenes de NaOH
  - 2 volúmenes de SDS
  - 2 volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}$

#### TÉCNICA

##### CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA ( $\mu\text{L}$ )	0	0	0	0	0	0	20
ST ( $\mu\text{L}$ )	0	10	20	40	80	100	0
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	100	90	80	60	20	0	80

Se agrega 1 mL de solución A y se mezclan las soluciones. Las soluciones de reacción se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, al término de este tiempo se agregan 500  $\mu$ L de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Esta mezcla de reacción se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se analiza espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

### **DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia con los datos de la curva patrón. Interpolar la absorbancia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

## APÉNDICE 2

### Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

#### SOLUCIONES

#### *SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA*

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

**A**= Tris 0.09 M + Ac. Borico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

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

**C**= persulfato de amonio 10%

	<b>3%</b>	<b>30%</b>
<b>Volumen total</b>	5 mL	5 mL
<b>Solución A</b>	500 µL	500 µL
<b>Solución B</b>	300 µL	3 mL
<b>H2O destilada</b>	4.2 mL	750 µL
<b>Glicerol</b>	---	750 mL
<b>Temed</b>	<b>4 mL</b>	<b>4 mL</b>
<b>Solución C</b>	<b>20 µL</b>	<b>20 µL</b>

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se colocan por separado en los compartimientos de la cámara generadora de gradiente y se mezclaron lenta y progresivamente con agitación constante mientras se va vertiendo entre las placas para formar el gel.

Una vez polimerizado el gel, éste se precorre 15 min a 60 V para estabilizarlo. A continuación se cargan las muestras de la siguiente manera:

- 1) Depositar 25 µg de proteína HDL/ 2 µL de amortiguador de muestra en cada carril.
- 2) Depositar un marcador de alto peso molecular en uno de los carriles del gel.

La separación electroforética se realizó primero durante 30 min a 70 V para permitir la entrada de las muestras al gel. Al término de este periodo, la separación se continuó durante 22 h a 180 V.

Al final del tiempo de migración, el gel se desmolda y se tiñe según el método seleccionado (proteína o colesterol)

### **APÉNDICE 3**

#### **Inmunotransferencia.**

##### **SOLUCIONES.**

###### **Solución de pretratamiento**

25 mM Tris + 0.2 mM Glicina + 20 % Metanol pH= 8.3

###### **Solución de saturación (TBS)**

20 mM Tris / HCl + 0.5 M NaCl + 3 % albúmina sérica bovina (BSA) pH= 7.5

###### **Solución para anticuerpo**

20 mM Tris / HCl + 0.5 M NaCl + 1 % BSA pH=7.5

###### **Solución amortiguadora de fosfatos**

8.6 mM NaHPO<sub>4</sub> + 1.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH= 7.6

##### **TÉCNICA.**

- ❖ Hidratar membranas PVDF BIORAD® y papel filtro en la solución de pretratamiento por aproximadamente 15 minutos.
- ❖ Transferir a 25 mA durante 2 horas en cámara semiseca BIORAD®.
- ❖ Saturar la membrana en solución TBS por 1 hora en agitación.
- ❖ Incubar membrana con anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-HDL de humano SIGMA® en solución para anticuerpo durante 12 horas a 4°C.
- ❖ Lavar la membrana de nitrocelulosa con solución TBS por aproximadamente 2 horas.
- ❖ Incubar con anticuerpo anti- IgG de cabra acoplado con peroxidasa SIGMA® por 4 horas a 37°C
- ❖ Lavar la membrana en solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.1% por 45 minutos
- ❖ Incubar en solución amortiguadora de fosfatos con *o*-diaminobencidina al 30% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%

##### **DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Las imágenes fueron analizadas por densitometría óptica (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad) y analizadas por comparación con los diámetros de las proteínas del marcador de alto peso molecular como se explica en la sección de resultados.