



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

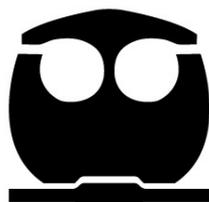
**DESARROLLO DE UN MÉTODO ENZIMÁTICO EN
FASE SEMISÓLIDA PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE ESFINGOMIELINA EN LAS SUBCLASES DE
HDL: EFECTO DE LA DIETA BAJA EN FRUCTOSA
EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO**

T E S I S

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

PRESENTA

MIRIAM MARLENE MARTÍNEZ RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2011



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 JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

SECRETARIO ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MENDEZ

1er. Suplente LUZ MARÍA DEL ROCÍO VALDES GÓMEZ

2° Suplente TERESA NERI GÓMEZ

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

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
Asesor del tema

Miriam Marlene Martínez Ramírez
Sustentante

INDICE

RESUMEN	11
ABREVIATURAS	13
ANTECEDENTES	15
LIPOPROTEÍNAS	15
CUADRO 1: CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN BASE A SU DENSIDAD DE FLOTACIÓN Y MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA.....	16
LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)	17
ENFERMEDAD ATEROSCLEROSA CORONARIA	19
ETAPAS DEL PROCESO ATEROGÉNICO.....	19
METABOLISMO DE LAS HDL (TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL)	20
FIGURA 2. TRANSPORTE REVERSO DEL COLESTEROL.....	23
SUBPOBLACIONES DE LAS HDL	24
FUNCIÓN ESTRUCTURAL Y METABÓLICA DE LOS LÍPIDOS DE HDL	28
ESFINGOMIELINA: ESTRUCTURA QUÍMICA	30
ESFINGOMIELINA Y ENFERMEDAD ATEROSCLEROSA CORONARIA	30
MECANISMO POR EL CUAL LA ESFINGOMIELINA PUEDE PROMOVER LA FORMACIÓN DEL ATEROMA.....	31
ESFINGOMIELINA, CERAMIDA Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	32
ESFINGOMIELINA Y ÓXIDO NÍTRICO	34
ESFINGOMIELINA Y SUBCLASES DE HDL	
LOCALIZACIÓN	34
INTERACCIÓN CON LCAT	35
SÍNDROME METABÓLICO	36
CUADRO 4. IDENTIFICACIÓN CLÍNICA DEL SÍNDROME METABÓLICO (ATP III)....	36
LA INGESTA EXCESIVA DE FRUCTOSA COMO POSIBLE CAUSA DEL SÍNDROME METABÓLICO	38

HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
PACIENTES.....	41
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	41
ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	41
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN FASE SEMISÓLIDA.....	42
AISLAMIENTO DE HDL.....	42
AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE HDL.....	42
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA (EM) EN LAS SUBPOBLACIONES	
DE HDL EN FASE SEMISÓLIDA.....	43
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE REACCIONES ENZIMÁTICAS	
PARA LA DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN FASE SEMISÓLIDA.....	43
DETERMINACIÓN DE COMPONENTES Y CONDICIONES DEL MÉTODO.....	44
CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE ENZIMA ESFINGOMIELINASA.....	44
ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO EN FASE SEMISÓLIDA.....	45
LINEALIDAD Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD ÓPTIMA DE	
MUESTRA (HDL).....	45
REPRODUCIBILIDAD.....	45
REPETIBILIDAD.....	46
ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA PARA DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA	
EN FASE LÍQUIDA.....	46
CUANTIFICACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN SUERO.....	46
DONADORES DE ELECTRONES.....	47
ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO EN FASE LÍQUIDA PARA LA	
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN SUERO.....	48
MUESTRA BIOLÓGICA.....	48
DETERMINACIÓN DE CANTIDAD DE ENZIMA.....	48
CANTIDAD DE MUESTRA.....	48
CANTIDAD DE REACTIVO DE COLOR.....	48

TIEMPO DE INCUBACIÓN.....	48
BLANCOS Y CONTROLES.....	49
LINEALIDAD.....	49
CUADRO 5. CURVA PATRÓN PARA DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN FASE LÍQUIDA.....	49
USO DE COLATO DE SODIO COMO TENSOACTIVO.....	49
REPETIBILIDAD.....	50
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA DE HDL.....	50
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA (EM) DE HDL (MÉTODO INDIRECTO).....	51
ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA DETERMINAR ESFINGOMIELINA DE HDL.....	51
DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MUESTRA (VOLUMEN DE SLPB)	52
ENSAYOS DE REPRODUCIBILIDAD.....	52
BLANCOS Y CONTROLES	52
APLICACIÓN DEL FACTOR DE CORRECCIÓN PARA EL SOBRENADANTE DE APO B	52
EVALUACIÓN DEL MÉTODO EN FASE SEMISÓLIDA Y EN FASE LÍQUIDA.....	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53

RESULTADOS.....	55
DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA EN FASE SEMISÓLIDA.....	55
ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA PARA DETERMINACIÓN DE ESFINGOMIELINA	
EN FASE LÍQUIDA.....	61
APLICACIÓN DEL MÉTODO EN FASE SEMISÓLIDA Y EN FASE LÍQUIDA.....	71
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PERFIL BIOQUÍMICO DE LOS SUJETOS DE	
ESTUDIO.....	73
EFFECTO DE LA DIETA BAJA EN FRUCTOSA EN LA ESFINGOMIELINA	
PRESENTE EN LAS SUBPOBLACIONES DE HDL.....	73
FIGURA 8. COMPARACIÓN DE LAS DISTRIBUCIONES RELATIVAS DE HDL	
CUANTIFICADAS POR SU CONTENIDO EN ESFINGOMIELINA PRE Y POST	
TRATAMIENTO DIETA BAJA EN FRUCTOSA.....	73
APLICACIÓN DEL MÉTODO EN FASE LÍQUIDA: EFECTO DE LA DIETA BAJA	
EN FRUCTOSA EN LA ESFINGOMIELINA SÉRICA Y DE HDL.....	76
CUADRO 13. CONCENTRACIÓN DE EM SÉRICA, ASOCIADA A LAS	
LIPOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN APO B (SOBRENDANTE) Y ASOCIADA A HDL	
PRE Y POST TRATAMIENTO.....	76
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, PERFIL	
BIOQUÍMICO Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS SUBPOBLACIONES DE HDL	78
CUADRO 14. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LAS SUBCLASES DE HDL CON	
RESPECTO A LAS VARIABLES CLÍNICAS PRESIÓN ARTERIAL Y DELTA DE	
ESFINGOMIELINA SÉRICA.....	78
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES.....	88
BIBLIOGRAFIA.....	89
ANEXO 1: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	103
ANEXO 2: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES	
NATIVAS.....	107

RESUMEN

Desarrollo de un método enzimático en fase semisólida para la cuantificación de esfingomielina en las subclases de HDL: efecto de la dieta baja en fructosa en pacientes con Síndrome Metabólico

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. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) evitan la formación del ateroma por su papel central que desempeñan en el transporte reverso de colesterol (TRC), protegen a las LDL contra la oxidación, favorecen la función endotelial y regulan de respuesta inflamatoria.

Las HDL se han separado por cinco subclases de acuerdo a su radio hidrodinámico en gel de gradiente de poliacrilamida. La determinación de los tamaños HDL puede ser de un gran apoyo diagnóstico en la evaluación del riesgo cardiovascular y de enfermedades relacionadas. Estudios recientes indican que las subclases HDL correlacionan de manera negativa con progresión de la enfermedad coronaria independientemente del C-HDL y de otros lípidos plasmáticos y algunos estudios muestran que las HDL pequeñas predicen la enfermedad cardiovascular recurrente, aunque aún existe gran controversia al respecto.

Se ha sugerido que las propiedades antiaterosclerosas de las HDL dependen de su composición química. Uno de los componentes de la HDL son los fosfolípidos, los cuales se encuentran en la parte exterior de la partícula. Un fosfolípido clave en el metabolismo de las HDL es la esfingomielina (EM). La EM es el segundo fosfolípido más abundante en el plasma de los mamíferos, alcanzando hasta un 18% del total de los fosfolípidos plasmáticos.

Datos experimentales en cultivos celulares y estudios en animales sugieren una asociación tanto de la esfingomielina (EM) y la ceramida (un metabolito de la EM) en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis. La EM y la ceramida han sido aisladas de placas ateroscleróticas tanto de humanos como de animales. Los niveles de EM en plasma en ratones apo E knock-out (aterosclerosos) son 4 veces más grandes que en los ratones silvestres, y esto puede explicar en parte el incremento de aterosclerosis en estos animales.

Esos datos sugieren que la EM puede jugar un rol promotor en el desarrollo de la aterosclerosis. A pesar de los numerosos datos que asocian los niveles de EM con aterosclerosis en animales, existen pocos datos en humanos, por tanto la medición de EM puede proveer nuevos enfoques en la aterogénesis humana, por tanto el contar con técnicas sensibles y fiables para su cuantificación son de considerable importancia (Hojjati et al, 2005). Sin embargo, no se han descrito cuáles de las subclases de las HDL transportan más EM y la vectorizan eficientemente a la célula. Esto sólo es posible averiguarlo con métodos que sean capaces de cuantificar la EM tanto en suero como en las subclases de HDL.

En este contexto se enmarca el presente proyecto; en el cual se desarrollo un método enzimático-colorimétrico en fase semisólida para cuantificar la esfingomielina presente en cada subclases de HDL. El método en fase líquida sirvió para cuantificar la esfingomielina sérica y de HDL total. La estrategia consiste en realizar reacciones enzimáticas acopladas que al final produzcan H_2O_2 y esta reaccione con un donador de electrones que genere un producto colorido siendo éste analizable por densitometría óptica. Posteriormente también se desarrollo un método en fase líquida para la cuantificación de EM en líquido, de tal forma que ambos métodos sean complementarios y cuantitativos.

Después del desarrollo de los métodos se evaluaron en muestras de pacientes con síndrome metabólico, ya que estos pacientes presentan dislipidemias, una de ellas, bajos niveles de colesterol de HDL, por lo que se esperan cambios en la composición lipídica de estas lipoproteínas. Se ha postulado que la alta ingesta de fructosa añadida en la dieta posiblemente es una causa del síndrome metabólico, por tanto, adicionalmente, los pacientes con síndrome metabólico fueron sometidos a una dieta baja en fructosa, siendo las muestras pre tratamiento su autocontrol.

ABREVIATURAS

ABCA-1:	Transportador de membrana dependiente de ATP
Apo:	Apolipoproteínas
Apo B/Er:	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E
ATP III:	Tercer informe del Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación del Colesterol sobre detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en los adultos.
CETP:	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
C-HDL:	Colesterol de HDL
CT:	Colesterol total
DM:	Diabetes Mellitus
EAC:	Enfermedad aterosclerosa coronaria
EM:	Esfingomiélin
EMasa:	Esfingomiélinasa
ENSANUT:	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FMS:	Fenazina metasulfato
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia
IMC:	Índice de masa corporal
LacCer:	Lactosil ceramida
LCAT:	Lecitina colesterol acilo transferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox:	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LH:	Lipasa hepática
Lp:	Lipoproteínas
LPL:	Lipoproteína lipasa
MTT:	Azul de Tetrazolium
NO:	Óxido nítrico

NOs:	Óxido nítrico sintasa
PAGE:	Electroforesis en gradiente de poliacrilamida
PAS:	Presión arterial sistólica
PAD:	Presión arterial diastólica
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
Qm:	Quilomicrón
RMN:	Resonancia magnética nuclear
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
sLpB:	Sobrenadante de las lipoproteínas que contienen apo B
SM:	Síndrome metabólico
S1P:	Esfingosina 1 fosfato
SR-BI:	Receptor scavenger clase B tipo I
Tg:	Triacilgliceroles
TRC:	Transporte reverso del colesterol
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

ANTECEDENTES

Lipoproteínas

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidos por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (apo). Los lípidos anfipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. Los lípidos no polares son insolubles en un el plasma y en consecuencia se sitúan en el interior de las lipoproteínas, evitando así las interacciones con grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables. La estabilidad fisicoquímica de la monocapa está dada por las apolipoproteínas que estabilizan e integran los componentes internos y de superficie. De esta manera se constituye el complejo funcional que transporta y metaboliza los lípidos en el plasma (Voet D. y Voet J, 1995; Pérez-Méndez O, 2004).

Clasificación de las lipoproteínas

La composición y características de las lipoproteínas son muy variables, y dependen de su origen y metabolismo. Las diversas características bioquímicas de las lipoproteínas permiten diferenciarlas en poblaciones que suelen interactuar constantemente. La clasificación más aceptada se basa en su densidad de flotación generando cinco clases de lipoproteínas, la cual se presenta en el cuadro 1. También se muestran algunas de sus propiedades, como tamaño y movilidad electroforética.

Cuadro 1: Clasificación de las lipoproteínas en base a su densidad de flotación y movilidad electroforética. Lp: Lipoproteína, Apos: apolipoproteínas, Tg: triglicéridos.

Lipoproteína	Abreviatura	Densidad de flotación (g/mL)	Composición	Movilidad electroforética	Tamaño (nm)
Quilomicrones	Qm	Menor a 0.94	Alto contenido en Tg. Apos: B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Son las Lp de mayor tamaño	Origen	Mayor a 70
Lipoproteínas de muy baja densidad “Very Low Density Lipoproteins”	VLDL	0.94 < d < 1.006	Principalmente Tg, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.	Pre-beta	30-70
Lp de densidad intermedia “Intermediate Density Lipoproteins”	IDL	1.006 < d < 1.019	Colesterol y Tg, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.	Pre-beta Beta	20-30
Lipoproteínas de baja densidad “Low Density Lipoproteins”	LDL	1.019 < d < 1.063	Alto contenido en colesterol y apo B-100.	Beta	18-30
Lipoproteínas de alta densidad “High Density Lipoproteins”	HDL	1.063 < d < 1.210	Alto contenido en proteínas y fosfolípidos y colesterol. Su principal Apo es la A-I, además contiene apo A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.	Alfa	5-12

Adaptado de Aguilar-Salinas C *et al*, 1989.

La mayoría de las clases de lipoproteínas están compuestas de varias subclases que se diferencian por su diámetro, densidad, composición, y funcionalidad biológica.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son partículas esféricas o discoidales de alta densidad hidratada (1.063-1.21 g/mL) debido a su alto contenido de proteínas, ya que en comparación con las otras lipoproteínas, presentan la mayor proporción proteica (45-55% de su masa seca). La fracción proteica de las HDL puede estar compuesta por diversas apolipoproteínas, como la apo A-II, C-I, C-II, C-III y E, cuyas características se presentan en el cuadro 2.

La apo A-I es la apolipoproteína más abundante de las HDL (Asztalos y Schaefer, 2003; Barter *et al*, 2003) En el interior de las HDL se encuentran los lípidos hidrofóbicos (triglicéridos y ésteres de colesterol); en el exterior se encuentran

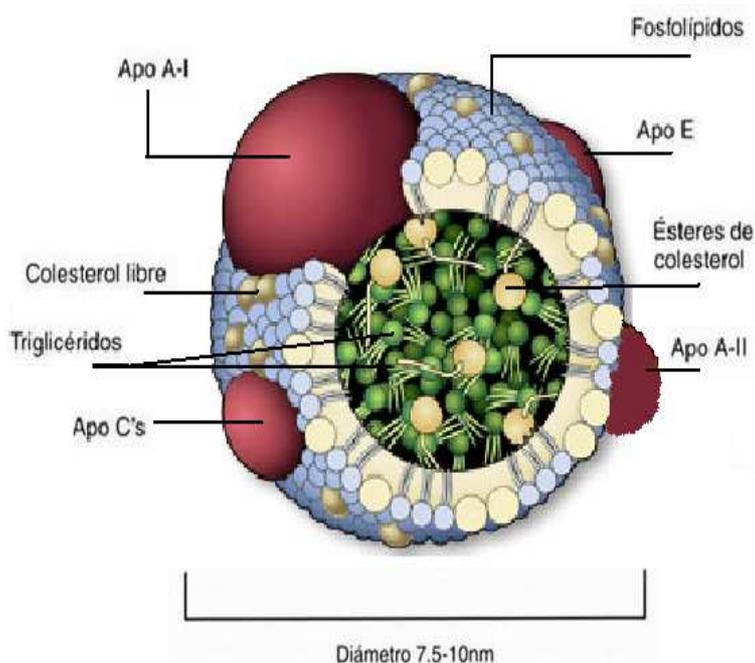


Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de las HDL

los lípidos anfipáticos (colesterol libre y fosfolípidos) que forman una pseudomicela lipídica, la cual es estabilizada por las apolipoproteínas, (ver fig.1). Su tamaño es de 5-12 nm.

La biosíntesis de las HDL inicia con la síntesis hepática y secreción de la apo A-I al sistema vascular, la cual se asocia fácilmente con fosfolípidos generando una estructura discoidal que puede captar colesterol llamadas partículas pre β (Castro *et al*, 1992). La apo A-I además de su función estructural es indispensable para la salida de colesterol de las células periféricas, la primera etapa del transporte reverso de colesterol (TRC) que se detalla posteriormente. La apo A-I también desempeña la función de coenzima de la lecitina: colesterol acil transferasa (LCAT), enzima clave en el TRC.

Cuadro 2. Características de las apolipoproteínas. (Modificado de Toledo-Ibelles, 2008).

Apo	P.M.	Localización	Sitio de síntesis	Función
A-I	29,016	HDL, Qm	Intestino Hígado	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula la salida del colesterol.
A-II	14,414	HDL	Intestino Hígado	Proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	HDL, Qm	Intestino	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula la salida de colesterol.
B-100	512,723	VLDL, LDL	Hígado	Ligando para receptor de LDL
B-48	240,800	Qm	Intestino	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
C-III _{0,1,2}	8,800	HDL, VLDL, Qm	Hígado	Inhibidor de la LPL
E _{2,3,4}	34,145	VLDL, HDL	Hígado	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula la salida de colesterol.

Apo: Apolipoproteína, P.M: Peso molecular, 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.

Las HDL tienen un papel importante en el tratamiento de la enfermedad aterosclerosa coronaria, ya que son partículas anti-aterosclerosas como veremos posteriormente.

Enfermedad Aterosclerosa Coronaria

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) es la enfermedad con más morbimortalidad en países desarrollados. En México es la segunda causa de muerte en la población adulta, después de la Diabetes Mellitus (SSA, 2008). En el Distrito Federal, la EAC es la tercera causa de mortalidad en personas en edad productiva (INEGI, 2008). Los años de discapacidad secundarios a esta enfermedad representan una pérdida significativa en la capacidad productiva individual y poblacional. Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la aterosclerosis, así como las medidas para prevenir sus complicaciones son importantes para combatir este problema de salud pública (Trejo-Gutiérrez, 2001).

La aterosclerosis se caracteriza por el engrosamiento de la pared arterial de vasos grandes y medianos debido a la formación de la placa de ateroma. La formación de la placa provoca el estrechamiento del lumen del vaso y, por tanto, la reducción del aporte sanguíneo a órganos como el corazón o el cerebro. La placa aterosclerótica puede presentar una rotura y causar un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación, y provocar un episodio vascular isquémico agudo, es decir, infarto o evento vascular cerebral.

Etapas del proceso aterogénico

El proceso de formación del ateroma comienza como consecuencia de una lesión al endotelio, que puede derivarse de numerosos factores, como dislipidemia, consumo de tabaco, hipertensión, colesterol elevado, diabetes, así como el incremento de la producción de radicales de oxígeno (ROS). Las lipoproteínas aterogénicas circulantes, como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se internalizan hacia la íntima cuando aumenta la permeabilidad de la pared debido a la disfunción endotelial. Una vez allí, bajo un ambiente de estrés oxidativo ocurre la peroxidación de lípidos presentes en las LDL, por lo que sus receptores celulares no pueden reconocerlas y se acumulan y agregan en el espacio extracelular. Este fenómeno hace desencadenar una respuesta inflamatoria que atrae linfocitos y monocitos desde el torrente sanguíneo. Estas células se adhieren al endotelio mediante moléculas de adhesión, y penetran hacia el espacio intimal por acción de diversas quimiocinas (Faxon *et al*, 2004). La adhesión de los leucocitos al endotelio requiere también la reducción de los valores de óxido nítrico (NO) (Lorenzo *et al*, 2009). En la íntima, los monocitos se diferencian a macrófagos

para fagocitar las LDL oxidadas. La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos tiene como consecuencia la acumulación de estos en el citoplasma del macrófago, denominados células espumosas (Brown y Goldstein, 1983). 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 más tempranas del ateroma.

Metabolismo de las HDL (Transporte Reverso del Colesterol)

El metabolismo intravascular de las HDL se conoce generalmente como transporte reverso del colesterol (TRC), que es el intercambio dinámico de componentes lipídicos en el torrente sanguíneo. En este proceso 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 (Von Eckardstein *et al*, 1994; Barter *et al*, 2003).

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 (Aguilar-Salinas C *et al*, 1989; Toledo-Ibelles, 2008).

Nombre	Función	Origen
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 ₂ y lipoproteínas que contienen apo B	Tejido adiposo, hepático, intestino delgado

Receptores y proteínas de membrana		
SR-BI	Receptor para las HDL para intercambiar colesterol entre los hepatocitos y las células	Hepatocito, tejido esteroideogénico
ABCA-1	Modulación de la salida de colesterol y fosfolípidos. Favorece la maduración de HDL.	Hígado, macrófagos e intestino.
Apo-B/E r	Receptor para lipoproteínas que contienen apo B y E. Incrementa la salida de colesterol vía 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.

Las apolipoproteínas recién sintetizadas por el hígado son secretadas al torrente sanguíneo y adquieren lípidos como colesterol y fosfolípidos de los tejidos periféricos. Las HDL tipo pre β captan colesterol libre de las células periféricas principalmente por interacción con el transportador de membrana ABCA-1 dependiente de ATP presente en el hígado, macrófago e intestino (Brunham *et al*, 2006).

Cuando las HDL pre β captan el colesterol libre se convierten en partículas HDL₃, que son partículas pequeñas, ricas en apolipoproteínas y con pocos lípidos. Las HDL₃ se convierten en partículas esféricas o HDL grandes, pues aumentan su tamaño con la esterificación e internalización del colesterol libre; este proceso está catalizado por la enzima lecitina: colesterol acilo transferasa (LCAT). La LCAT cataliza la transferencia de un ácido graso proveniente de la fosfatidilcolina (lecitina) al colesterol libre presente en las HDL.

Las HDL resultantes tienen mayor tamaño y una menor densidad con respecto a las HDL₃, por lo que las denominamos HDL₂, que tienen dos posibilidades de interacción, con CETP o con el receptor “scavenger” clase B tipo I (SR-BI) (Figura 2).

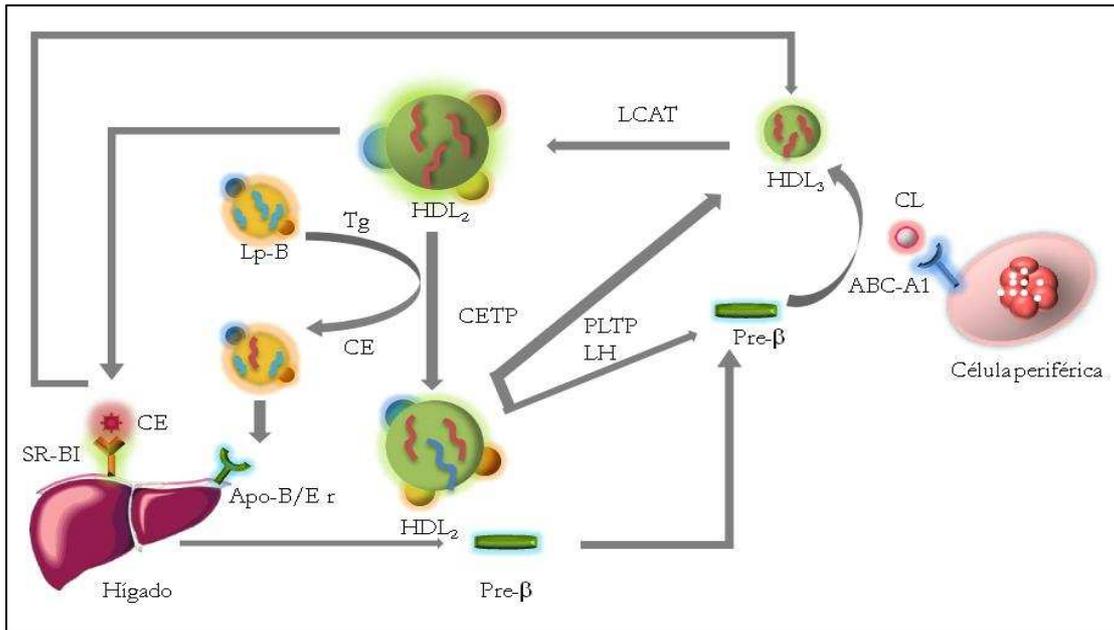


Figura 2. Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL, lipoproteínas de baja densidad y Qm, Quilomicrones). Tg: triacilglicerol; LCAT: Lecitina colesterol acil transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia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

La interacción con el SR-BI en hepatocitos es el mediador de la remoción selectiva de ésteres de colesterol de las HDL para su eliminación. Esta interacción no afecta a la proteína, ya que la HDL cambia su estructura y regenera partículas HDL₃, que pueden continuar con la salida de colesterol.

Por otro lado, los ésteres de colesterol asociados a las HDL₂ son intercambiados por triacilglicerol con las diferentes lipoproteínas que contienen apo B; este intercambio es facilitado por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), proteína plasmática sintetizada en tejido adiposo, hepático e intestino delgado. Además, para mantener una estructura estable. Las apo Cs y E se transfieren a los quilomicrones y VLDL. La lipasa hepática (LH) hidroliza triglicéridos y fosfolípidos de las HDL, generando una partícula remanente que puede ser remodelada por la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP) en partículas pre-β y HDL₃, ambas con capacidad de reiniciar el ciclo de captación de colesterol. Es así como el colesterol de los tejidos

periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares (Barter y Rye, 1996).

Varios estudios demuestran que existe una relación inversa entre la EAC y el colesterol de HDL. Estudios epidemiológicos indican que valores elevados de HDL en plasma están fuertemente correlacionados con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular (Assmann *et al*, 1996), por ejemplo, si se incrementa en 20 mg/dL el colesterol de HDL, se ha demostrado que existe una reducción del 50% en el riesgo coronario (Kannel, 1983). El TRC es uno de los mecanismos que explica mejor el papel cardioprotector de las HDL.

Las HDL poseen múltiples propiedades antiaterogénicas que incluyen el transporte reverso de colesterol, protección a las LDL contra la oxidación, preservación de la función del endotelio vascular, regulación de la expresión de moléculas de adhesión y de los procesos de coagulación y fibrinolíticos que participan en el proceso ateroscleroso (Pérez-Méndez, 2004), por lo que las HDL se consideran partículas antiaterogénicas y por ello es importante conocer más de su composición así como de su funciones antiaterosclerosas.

Subpoblaciones de las HDL

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 ya que se ha postulado que las subclases de HDL tienen diferentes funciones fisiológicas, pues son grupos de partículas estructural y funcionalmente diferentes (Von Eckardstein *et al*, 1994; Castro *et al*, 1992; Rye *et al*, 2009). Por lo anterior, se ha postulado que no todas las subpoblaciones son capaces de inhibir la aterosclerosis en la misma medida, como se discutirá más adelante (Pérez-Méndez *et al*, 1995).

Se han propuesto diversos métodos de aislamiento y separación de las lipoproteínas y, se han generado diferentes subclasificaciones, todas ellas útiles debido a la información que aportan. Estos métodos se basan esencialmente en la determinación

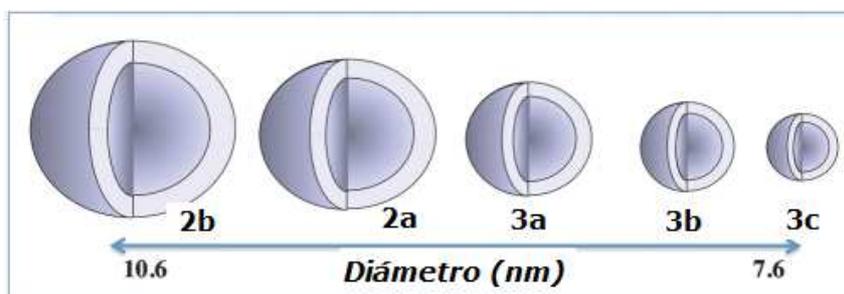
de alguno de los componentes estructurales de las lipoproteínas. A continuación se describen algunos de estos métodos y la clasificación resultante.

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 30% 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 irregulares denominadas HDL α_1 , HDL α_2 y HDL α_3 (Asztaloz *et al*, 1997). Además, se observa una pequeña fracción de HDL que migran en fracción pre- β que se separa en dos bandas denominadas pre β_1 y pre β_2 . Destacan las partículas pre β_1 compuestas esencialmente de fosfolípidos y apo A-I. Estas partículas desempeñan un papel muy importante en la captación de colesterol de las células periféricas como se menciona anteriormente en transporte reverso del colesterol. Las HDL migran en su mayoría dentro de la fracción α del plasma, por lo que algunos autores las identifican como α -lipoproteínas (Pérez- Méndez, 2004).

Densidad de flotación.- Cuando las HDL son fraccionadas por ultracentrifugación, se separan típicamente en dos sub fracciones mayores con base en la densidad de flotación (r): HDL₂ ($1.063 < r < 1.12$ g/mL) y las HDL₃ ($1.12 < r < 1.21$ g/mL). Las HDL₂ son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL₃ están formadas principalmente por fosfolípidos y proteínas (Chapman *et al*, 1981).

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. Posteriormente, las HDL son separadas con base en su diámetro hidrodinámico por electroforesis en gel de gradiente de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. 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 HDL2b con diámetros de 9.7-12 nm, HDL2a, de 8.8-9.7 nm, HDL3a 8.2-8.8 nm, HDL3b 7.8-8.2 nm y HDL3c de 7.2-7.8 nm. 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 (Ver figura 3).



Característica	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
Diámetro (nm)	9.7-12	8.8-9.7	8.2-8.8	7.8-8.2	7.2-7.8
Densidad(g/mL)	1.099	1.107	1.123	1.155	1.186
Lípidos de superficie	<i>mol/mol HDL</i>				
Fosfolípidos	130	140	120	45	25
Colesterol libre	70	40	25	15	10
Lípidos del "núcleo"	<i>mol/mol HDL</i>				
Colesterol esterificado	180	160	140	70	40
Triglicéridos	30	20	15	10	5
Contenido (%)					
Proteína total	35	40	45	55	65
Lípidos totales	65	60	55	45	35

Figura 3. Heterogeneidad en las propiedades fisicoquímicas de HDL en sujetos sanos normolipémicos. Se muestra la clasificación de las HDL por su densidad de flotación en conjunto con su radio hidrodinámico. Modificado de Kontush y Chapman, 2006, (cuadro); imagen modificada de Rye *et al.* 2009.

Las partículas plasmáticas de HDL son altamente heterogéneas en su metabolismo y actividad biológica (ver fig 3) (Asztalos y Schaefer, 2003; Barter *et al*, 2003). Las subclases HDL correlacionan de manera negativa con progresión de la enfermedad coronaria independientemente del C-HDL y de otros lípidos plasmáticos (MacLean *et al*, 2000).

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado claramente una asociación inversa e independiente entre el C-HDL y el riesgo de EAC relacionando así a las HDL con un efecto cardioprotector (Pérez-Méndez *et al*, 2000). Sin embargo, existen sujetos con colesterol-HDL muy por debajo de los valores de referencia (hipoalfalipoproteinemia severa, C-HDL < 15 mg/dL) que no presentan historial clínico o antecedentes familiares de EAC (Pérez-Méndez *et al*, 2000; Elkhilil *et al*, 1997). Estos hallazgos sugieren que la concentración del C-HDL no es suficiente para evaluar el

riesgo de EAC o el efecto protector de las HDL. Por esta razón, se ha propuesto en estudios recientes que las subpoblaciones de HDL tienen diferente actividad ateroprotectora, por lo que su análisis, así como la caracterización de su composición química puede mejorar la capacidad de evaluar el riesgo de EAC (Von Eckardstein *et al*, 2001).

Es bien sabido que los padecimientos cardiovasculares se acompañan de distribuciones de tamaños de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) anormales. En este sentido, estas anomalías pueden ser más que un biomarcador, sino que pueden tener una relación directa con el desarrollo de la enfermedad (Kontush *et al*, 2003; Pérez-Méndez *et al*, 2008).

A pesar del gran potencial clínico que tiene la determinación de tamaños de las HDL, su uso no se ha generalizado porque existe gran controversia acerca de cuál es la fracción más ateroprotectora. La mayoría de los estudios epidemiológicos muestran que los pacientes con EAC tienen bajos niveles plasmáticos de HDL grandes con respecto a los sujetos control, (subclases 2b y 2a) (Festa *et al*, 2005; Garvey *et al*, 2003; Van der Steeg *et al*, 2008) asociando a esta subpoblación con un mayor potencial antiateroscleroso (Stampfer *et al*, 1991; Lamarche B *et al*, 1997; Freedman *et al*, 1998).

Paradójicamente, en un metaanálisis reciente se demostró que a más colesterol-HDL, acompañado de partículas HDL grandes, mayor el riesgo cardiovascular (Van der Steeg *et al*, 2008). Estos resultados son similares a los observados con el fármaco experimental torcetrapib, un inhibidor de la CETP que aumenta los niveles plasmáticos de colesterol-HDL, incrementando la proporción de HDL2 pero que se asoció a un incremento de mortalidad y morbilidad cardiovasculares (Brousseau ME *et al*, 2004; Barter *et al*, 2007). Por lo tanto, un C-HDL plasmático elevado, asociado a un aumento del tamaño de estas lipoproteínas no siempre es cardioprotector.

En contraste, los pacientes con hipoalfalipoproteinemias que no desarrollan EAC mencionadas anteriormente presentan una proporción muy elevada de HDL pequeñas (HDL3a, 3b y 3c) que fueron cuantificadas por su contenido proteico. Además, estudios *in vitro* demuestran que las HDL pequeñas son los mejores aceptores primarios del colesterol excedente de las células periférica, tienen mayor poder antioxidante y su proporción aumenta en ciertas circunstancias de bajo riesgo cardiovascular (Brooks-

Wilson et al, 1999; Huesca *et al*, 2004, Carreón-Torres *et al*, 2005). En su conjunto, todos estos resultados son paradójicos.

Esta aparente paradoja puede tener una respuesta en la metodología empleada para cuantificar las subpoblaciones de HDL; mientras que los estudios epidemiológicos generalmente han empleado RMN o precipitación selectiva para cuantificar a las subclases de HDL, los otros estudios han utilizado electroforesis en gradiente de poliacrilamida con tinción específica para proteínas. Cabe enfatizar que este método es semicuantitativo y en consecuencia no es totalmente comparable a la RMN que es cuantitativa. Además de la posible implicación del método utilizado para cuantificar a las subclases de HDL, la controversia acerca de cuál la fracción más ateroprotectora puede radicar en que el tamaño no es una característica suficiente para subclasificar a las HDL. En otras palabras, a un mismo tamaño de partícula, pueden corresponder diferentes tipos de HDL que pueden diferir entre ellas por su composición lipídica como se detalla a continuación.

Función estructural y metabólica de los lípidos de HDL

Se ha postulado que la composición lipídica de las subclases de HDL puede ser un indicativo del metabolismo de esta familia de lipoproteínas. Cuando las HDL son separadas por su tamaño, es posible que aún existan diferencias en base al contenido de lípidos entre subclases de un mismo diámetro hidrodinámico; estas diferencias son resultado de circunstancias fisiopatológicas (Pérez-Méndez, 2004). Si esto es así, entonces la cuantificación de los lípidos presentes en las subpoblaciones de HDL puede proporcionar mas información acerca de cual subclase tiene mayor potencial antiaterogénico con el propósito de utilizar a las subclases de HDL como una herramienta adicional para establecer el riesgo coronario. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que pacientes pediátricos con síndrome metabólico presentan HDL pobres en colesterol en asociación con HDL pequeñas tipo 3b y 3c ricas en triglicéridos [García-Sánchez *et al*, 2011].

El contenido de fosfolípidos es otro factor determinante en el metabolismo de las HDL y sus efectos dependen en gran medida de la naturaleza de la cabeza polar (Pérez-Méndez *et al*, 2007; Carreón-Torres *et al*, 2008). Las HDL ricas en fosfatidilcolina son

más eficientes en promover la salida de colesterol en comparación con las HDL nativas. La fosfatidilcolina se deposita en la placa aterosclerosa por medio de las HDL y esto contribuye a solubilizar el colesterol contribuyendo así al eflujo de colesterol desde la placa (Fukuda *et al* 2008).

La carga eléctrica de la superficie de las partículas de HDL determina el metabolismo de estas lipoproteínas y depende en gran parte de los grupos químicos ionizables de los fosfolípidos de superficie, en particular de la fosfatidilserina. Este fosfolípido, tiene un papel central en la formación de las HDL en los compartimentos intracelulares sugiriendo que la carga eléctrica negativa de superficie adicional aportada por la fosfatidilserina en las HDL es crucial para interacción de la apo AI con la interface lipídica de las lipoproteínas (Chung *et al*, 2005).

Otro fosfolípido clave en el metabolismo de las HDL es la esfingomielina. La esfingomielina es el esfingolípido más común y segundo fosfolípido más abundante en el plasma de los mamíferos, después de la fosfatidilcolina, alcanzando hasta un 18% del total de los fosfolípidos plasmáticos. En las lipoproteínas la proporción esfingomielina/fosfatidilcolina es variable, siendo las HDL las que poseen el cociente más bajo (Lane *et al*, 1991).

Hay muchos estudios que han sugieren que la esfingomielina puede jugar un papel promotor en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, inclusive, se ha propuesto un mecanismo por el cual la esfingomielina puede promover la formación del ateroma, como se verá mas adelante. Sin embargo, no se han descrito cuáles de las subclases de las HDL transportan más EM y la vectorizan eficientemente a la célula, en parte, por que no existe método alguno para cuantificar la esfingomielina asociada a cada una de las subclases de HDL, por ello surge la necesidad de desarrollar un método que permita determinarlo.

Actualmente se desconoce cuales subclases de HDL contribuyen con una mayor cantidad de fosfolípidos y cómo se altera el contenido de fosfolípidos de las diferentes subclases de HDL en la EAC y otras circunstancias fisiopatológicas de riesgo cardiovascular.

Esfingomielina

Un fosfolípido clave en el metabolismo de las HDL es la esfingomielina (EM). La concentración típica de EM en suero humano es de 25-60 mg/dL (Schlitt *et al*, 2005). Los esfingolípidos no se encuentran en forma libre en el plasma, sino que se asocian con lipoproteínas y son particularmente abundantes en las LDL.

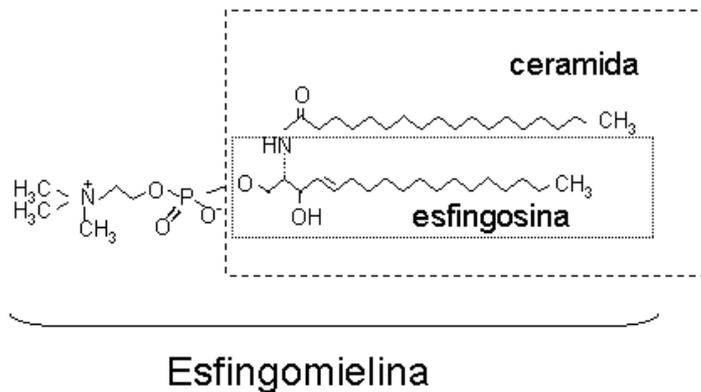


Figura 4. Estructura química de la esfingomielina, ceramida y esfingosina

La esfingomielina está formada por tres motivos estructurales principales: una base de cadena larga, la esfingosina, un ácido graso de longitud variable unido al carbono-2 de la cadena base y fosforilcolina como grupo hidrofílico unido al carbono-1

(Furtherman y Hannun, 2004) (ver Figura 4). El ácido graso de longitud variable unido a la esfingosina forma la familia de ceramida, una molécula hidrofóbica cuya producción es incrementada bajo estímulos de estrés.

Los esfingolípidos tienen muchas funciones biológicas, incluyendo la regulación la dinámica de las membranas celulares formando parte de los microdominios llamados “lipid rafts”, participan como elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Además, también participan en el metabolismo de lípidos. Actualmente la esfingomielina se ha implicado en la patogénesis de la aterosclerosis, como veremos a continuación.

Esfingomielina y Enfermedad Aterosclerosa Coronaria.

El papel de los esfingolípidos en la patogénesis y progresión de la aterosclerosis es un área de investigación activa (Tabas, 2004; Bismuth *et al*, 2008). Datos experimentales en cultivos celulares y estudios en animales sugieren una asociación tanto de la esfingomielina (EM) y la ceramida (un metabolito de la EM) en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis (Alewijnse, 2008).

La EM y la ceramida han sido aisladas de placas ateroscleróticas tanto de humanos como de animales (Smith, 1960; Schissel *et al*, 1996; Devlin *et al*, 2008). Las lesiones ateroscleróticas humanas y animales son ricas en EM (Hoff *et al*, 1985; Guyton *et al*, 1996). Los niveles de EM en plasma en ratones apo E knock-out (aterosclerosos) son 4 veces más grandes que en los ratones silvestres (Jeong *et al*, 1998), y esto puede explicar en parte el incremento de aterosclerosis en estos animales (Plump *et al*, 1995). La proporción EM/fosfatidilcolina fue incrementada 5 veces en VLDL de conejos hipercolesterolémicos (Devlin *et al*, 2008).

Recientemente, se demostró que la administración de miriocina, un inhibidor de la síntesis de EM en ratones apo E knock-out disminuyó dramáticamente los niveles de EM, incrementando los de PC, que disminuyó el área de la lesión aterosclerótica (Hojjati *et al*, 2005; Park *et al*, 2004). La mayoría de los esfingolípidos identificados en la placa aterosclerótica parecen ser sintetizados *de novo* (Mukhin *et al*, 1995; Hojjati *et al*, 2005).

Esos datos sugieren que la EM puede jugar un rol promotor en el desarrollo de la aterosclerosis. A pesar de los numerosos datos que asocian los niveles de EM con aterosclerosis en animales, existen pocos datos en humanos. Estudios transversales han mostrado una asociación entre los altos niveles de EM en plasma y aterosclerosis subclínica (Nelson *et al*, 2006) y EAC (Jiang *et al*, 2000), por lo que el nivel plasmático de EM es relativamente un nuevo biomarcador (Yeboah *et al*, 2010), por tanto la medición de EM puede proveer nuevos enfoques en la aterogénesis humana así como en varios modelos animales, por tanto el contar con técnicas sensibles y fiables para su cuantificación son de considerable importancia (Hojjati *et al*, 2005).

Mecanismo por el cual la esfingomielina puede promover la formación del ateroma

Andrieu-Abadie y Levade *et al*, 2002 fueron los primeros en revelar la posible participación de la ruta ceramida/esfingomielina en la aterogénesis a través de un efecto mitogénico en las células del músculo liso vascular.

Las células endoteliales de la arteria coronaria, cuando cubren la lesión aterosclerótica, secretan esfingomielinasa (EMasa). La secreción de enzimas es reforzada por citocinas pro-inflamatorias atrogénicas (Marathe *et al*, 1998). La EMasa

secretada hidroliza la EM retenida en la superficie de las lipoproteínas aterogénicas formando ceramida (Auge *et al*, 1996).

Estudios recientes Bancells *et al*, (2009) han demostrado que la agregación de las LDL favorece su adhesión a los proteoglicanos de la matriz del espacio subendotelial, promoviendo la formación de la placa ateromatosa. En este sentido, las ceramidas tienen una fuerte tendencia a la auto-agregación, lo que puede contribuir a la agregación de las LDLs enriquecidas con ceramida (Holopainen, Lemmich *et al*, 2000). De esta manera, las EMsas contribuyen al proceso ateromatoso, catalizando la formación de ceramida a partir de las LDL ricas en EM y promoviendo en consecuencia la permanencia de estas lipoproteínas en el ateroma. En respaldo a esto, se ha demostrado que la esfingomielinasa promueve in vitro la agregación de LDLs (Schissel *et al*, 1996).

Los estudios en pacientes y modelos experimentales confirman la presencia de EMasa en las lesiones ateroscleróticas. Se ha observado en estudios in vitro, que la esfingomielina asociada a LDL oxidadas se hidroliza 6.5 veces más que la EM asociada a LDL nativas (Grandl *et al*, 2006).

Esfingomielina, ceramida y especies reactivas de oxígeno

La ceramida endógena se genera principalmente a partir de la esfingomielina por la hidrólisis inducida por la EMasa, y también puede ser generada de *novo* por la acción de la ceramida sintasa (Huwiler A *et al*, 2000).

Tanto la producción de ceramida como su función, están involucradas en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen H₂O₂, superóxido y radicales hidroxilo. Como ya se ha mencionado anteriormente, las citocinas inflamatorias podrían activar la EMasa y aumentar la producción de ceramida, metabolito que favorecería el incremento de ROS. En este sentido, algunos estudios han sugerido que el estrés oxidativo inducido por el proceso de isquemia-reperfusión en el corazón, pueden ser consecuencia de algunos metabolitos de la EM (Hernández *et al* (2000), Pchejetski *et al*, 2007).

Por otra parte, la ceramida tiene muchas funciones biológicas mediadas por ROS como molécula señal. Estudios recientes han demostrado que la ceramida estimula la producción de ROS en las células endoteliales humanas (Li *et al*, 2002). La producción de superóxido incrementó 4 veces cuando las células musculares lisas aórticas fueron incubadas con lactosilceramida (LacCer) (Chatterjee, 1998).

La ceramida puede jugar un papel importante en la lesión de reperfusión/isquemia, ya que es responsable de provocar daño celular (Pchejetski *et al*, 2007; Bielawska *et al*, 1997). Desde hace tiempo se sabe que la acumulación de ceramida conduce a la muerte celular y la apoptosis; paradójicamente, la esfingosina-1-fosfato (S1P) es un promotor del crecimiento y supervivencia de las células (Spiegel *et al*, 2003).

La S1P ha demostrado influir positivamente en la supervivencia de células cardíacas durante los períodos de isquemia-reperfusión (Jin *et al*, 2004). De hecho, la preincubación S1P se ha demostrado ser útil para prevenir la mortalidad de los cardiomiocitos inducida por la hipoxia (Vessey *et al*, 2009; Bandhuvula *et al*, 2011).

En el contexto del daño cardíaco por isquemia reperfusión, estudios recientes *in vitro* han demostrado que las HDL inducen la supervivencia de las células después de un estrés (Rong Tao *et al*, 2010). Este efecto cardioprotector de las HDL se debe al aporte de S1P que reciben los cardiomiocitos por parte de estas lipoproteínas (Tao *et al* 2010).

La S1P estimula la proliferación de células musculares lisas y endoteliales, lo que contribuye al engrosamiento de la pared vascular y estabilización de la placa (Yatomi *et al*, 2000).

Aunque la agregación de las LDL es importante para la progresión del ateroma en sus etapas tempranas, aún hace falta demostrar otros posibles mecanismos por los que la EM puede promover la progresión del ateroma, pues aunque hay fuerte evidencia clínica de la relación de EM con la EAC, los mecanismos aún son desconocidos.

Esfingomielina y Óxido Nítrico

Otra función importante de los esfingolípidos tiene que ver con aterosclerosis es la inducción de la síntesis de óxido nítrico (NO). El NO es producido por la óxido nítrico sintasa (NOs), es uno de los mecanismos regulatorios más importantes en la homeostasis vascular. Las HDL son las lipoproteínas plasmáticas que acarrean la mayor cantidad de esfingosina 1 fosfato (S1P). Por otra parte, muchos efectos biológicos de las HDL, como la inducción de la producción de NO endotelial, vasodilatación y cardioprotección, son parcialmente mediados por S1P. Aproximadamente la mitad de los efectos de HDL en la inducción de NOs endotelial ocurre vía receptores de S1P (Nofer *et al*, 2004).

En general, múltiples efectos de las HDL en células endoteliales, como la migración, proliferación, integridad del endotelio y angiogénesis son mediados en parte por la S1P en HDL (Sattler y Levkau, 2009). Por otra parte, la S1P en HDL inhibe las respuestas pro-inflamatorias, como la generación de especies reactivas de oxígeno. Por el contrario, el estrés oxidativo inducido por ceramida puede ser la razón principal por sus efectos en la reducción de la biodisponibilidad de NO y la disfunción endotelial, ya que la ceramida puede estimular la producción de anión superóxido en las células vasculares (Bhunja *et al*, 1997; Harada-Shiba *et al*, 1998; Li *et al*, 2002).

Esfingomielina y subclases de HDL

Localización

La EM tiene propiedades anfífilicas similares a la fosfatidilcolina. Debido a las fuertes interacciones de Van der Waals entre la EM y el colesterol no esterificado, estos lípidos se asocian en la capa superficial polar de las lipoproteínas. La proporción EM/fosfatidilcolina varía entre las lipoproteínas, siendo las HDL las que poseen el cociente más bajo (Lane *et al*, 1991)

Interacción con LCAT

Mientras que la EM es el principal fosfolípido estructural importante en HDL, la esfingosina-1-fosfato (S1P), un metabolito de la EM, es también un factor determinante del contenido de colesterol esterificado, ya que inhibe a la lecitina:colesterol acil transferasa (LCAT) *in vitro* (Subbaiah *et al*, 2006).

La S1P disminuye la fluidez de la monocapa de fosfolípidos de superficie, impidiendo la activación de la LCAT por la apo-AI y en consecuencia inhibe la actividad de esta enzima (Subbaiah y Liu, 2003; Rye *et al*, 1996). Este lípido bioactivo puede por tanto impactar el metabolismo intravascular de las subclases de HDL (Kontush *et al*, 2007). Mediante este efecto se puede retardar la maduración de las HDL y en consecuencia los altos niveles de EM se relacionan con hipoalfalipoproteinemia (bajos niveles de colesterol de HDL).

Actualmente, no se han descrito cuáles de las subclases de las HDL transportan más EM y la vectorizan eficientemente a la célula, ya que no hay metodología alguna que cuantifique la EM en las subclases de HDL.

Es importante recordar que el papel de la EM en la aterogénesis no está bien descrito, y los estudios en humanos son muy escasos. Aunque la importancia de la EM es obvia, no hay métodos simples, rápidos y sensibles para su cuantificación a excepción de un nuevo método propuesto del cual realizaremos una adaptación para determinar los niveles séricos de EM (Reza Hojjati y Xian-Cheng, 2006). Para cuantificar la esfingomielina asociada a cada una de las subclases de HDL no existe método alguno; por lo tanto, en este trabajo pretendemos desarrollar el método de cuantificación de la EM en las subclases de HDL. Este método permitirá en lo futuro describir cuáles de las subclases de HDL transportan más EM, así como mostrar cual es la implicación metabólica de este fosfolípido y su papel en la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC).

Síndrome metabólico

Clásicamente se atribuía a la Diabetes Mellitus el desarrollo temprano de macroangiopatía así como también con el desarrollo de aterosclerosis precoz en las arterias coronarias, de los miembros inferiores y del encéfalo. Sin embargo, en 1984 se comprobó que las complicaciones cardiovasculares eran frecuentes tanto en los diabéticos recién diagnosticados como en los pacientes que vivían con diabetes desde hacía muchos años (Jarret *et al* 1984). De esta manera surgió la hipótesis de la existencia de un terreno común que favorecía la aparición, más o menos simultánea, de diabetes y de enfermedad cardiovascular.

En 1988 Reaven describió, con el nombre de Síndrome X, un cuadro caracterizado por la agrupación de factores de riesgo cardiovascular (aumento de triglicéridos con disminución de colesterol HDL, hipertensión arterial y obesidad abdominal) asociado a resistencia a la insulina. En su hipótesis, la resistencia a la insulina juega el papel principal y la obesidad es un factor predisponente (Horacio Carbajal, Martin R. Salazar, 2009).

Actualmente estas alteraciones se agrupan dentro del denominado síndrome metabólico. En el tercer informe del Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación del Colesterol sobre detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en los adultos (ATP III) se define clínicamente este síndrome por la presencia de 3 de 5 criterios clínicos simples que se muestran en el cuadro 4:

Cuadro 4. Identificación clínica del síndrome metabólico (ATP III)

Factor de riesgo	Nivel definitorio
Perímetro de la cintura	≥ 102 cm en el varón ≥ 88 cm en la mujer
triglicéridos	≥ 150 mg/dL
colesterol de HDL	< 40 mg/dL
presión arterial	$\geq 130/85$ mm Hg
glucosa en ayuno	> 110 mg/dL

El síndrome metabólico, definido en general de acuerdo a los criterios del ATPIII, se asocia a un riesgo 3-5 veces mayor de enfermedad cardiovascular, un riesgo 5 veces mayor de desarrollar diabetes tipo 2 (Grundy, 2006; ESH y ESC, 2007; Bloomgarden, 2002), una mayor frecuencia de manifestaciones tempranas de daño a órganos blanco tales como microalbuminuria, disminución del filtrado glomerular, hipertrofia y disfunción ventricular izquierda, rigidez arterial y engrosamiento de la pared de la carótida y aumento en el nivel de los marcadores de inflamación (ESH y ESC, 2007).

Debido al actual aumento de cifras de obesidad y de sedentarismo en las naciones en desarrollo, el síndrome metabólico se ha convertido en una situación muy frecuente; en Estados Unidos está afectada la cuarta parte de la población, lo que equivale a alrededor de 47 millones de habitantes con SM (Ford *et al*, 2002).

Aún con los criterios diagnósticos más exigentes, 25% de la población de los países occidentales padece síndrome metabólico. En México, una gran proporción de la población presenta este padecimiento, el cual es considerado como predictor de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular, las dos principales causas de mortalidad en población adulta en México. De acuerdo a datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), la prevalencia nacional de síndrome metabólico en la población mexicana de adultos de 20 años de edad y más, de acuerdo con el ATP III es de 36.8% (Rojas *et al*, 2010).

El síndrome metabólico produce hipoalfalipoproteínemia (bajos niveles de plasmáticos de colesterol de HDL), alteración en los tamaños de HDL (Pérez-Méndez *et al*, 2004) y cambios de la composición química de las subclases de HDL (García-Sánchez *et al*, 2011). Por ello decidimos probar el método en muestras de pacientes con síndrome metabólico, que tienen alto riesgo de EAC con alteraciones de lipídicas y distribución de las subpoblaciones de HDL.

Recientes estudios sugieren que una ingesta excesiva de fructosa podría ser una causa específica del síndrome metabólico (Havel *et al*, 2005; Nakagawa *et al*, 2006).

La ingesta excesiva de fructosa podría ser una causa específica del síndrome metabólico

La fructosa es un azúcar que está presente en miel y frutas, pero la fuente más importante de fructosa en la dieta son las bebidas con azúcares añadidos, como la alta fructosa (una mezcla de fructosa y glucosa presente en algunos refrescos y bebidas azucaradas). Estudios experimentales han mostrado que la ingesta excesiva de fructosa puede inducir todas las características del SM en ratas (Roncal *et al*, 2009). Interesantemente, los efectos de la fructosa que inducen el SM en animales son independientes de la ingesta calórica (Nakagawa *et al*, 2006; Roncal *et al*, 2009, Reungjui *et al*, 2007).

Estudios clínicos (Stanhope y Havel, 2008; Stanhope *et al*, 2009; Teff *et al*, 2009; Perez-Pozo *et al*, 2010) y epidemiológicos (Dhingra *et al*, 2007; Johnson *et al*, 2007) sugieren que la ingesta excesiva de fructosa puede causar el SM. En particular, Stanhope *et al* administraron fructosa a 34 adultos sanos, que subsecuentemente desarrollaron hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina así como acumulación de grasa intra abdominal; éstos efectos no fueron observados con dietas basadas en glucosa (Stanhope *et al*, 2009). En apoyo a esto, Perez-Pozo *et al* administraron 200 g de fructosa diariamente a hombres sanos durante dos semanas y notaron incrementos significativos en presión arterial, triglicéridos, peso corporal, así como resistencia a la insulina con un decremento significativo en los niveles de colesterol de HDL (Perez-Pozo *et al*, 2010).

Considerando que la EM participa en el desarrollo del ateroma, situación fisiopatológica asociada al síndrome metabólico, es posible que una dieta baja en fructosa repercuta tanto en la concentración de esfingomielina en plasma como en la distribución de la misma en las diferentes fracciones lipoprotéicas.

HIPÓTESIS

La restricción del consumo de fructosa en pacientes con síndrome metabólico inducirá modificaciones de los niveles de esfingomielina plasmática, de LDL y de HDL totales, así como cambios en la proporción relativa de esfingomielina de las subclases de HDL.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un método enzimático en fase semisólida para determinar la esfingomielina de las subclases de HDL en pacientes con síndrome metabólico antes y después de una restricción dietética de fructosa.

Objetivos particulares

- Estandarizar un método en fase líquida para determinar la concentración plasmática de esfingomielina.
- Desarrollar un método enzimático en fase semisólida para determinar la concentración plasmática de la esfingomielina de las subclases de HDL
- Determinar los niveles plasmáticos de esfingomielina total y de las subclases de HDL en pacientes con síndrome metabólico antes y después de la intervención dietética consistente en una restricción parcial de fructosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

La muestra biológica utilizada fue suero y plasma obtenidos de un grupo de 50 pacientes adultos con síndrome metabólico, sin tratamiento alguno. Se tomaron muestras basales (pre tratamiento). Posteriormente fueron sometidos a una dieta baja en fructosa. Después de seis semanas de tratamiento, se hizo otra toma de muestra (post tratamiento).

Obtención de muestras

Después de un ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosa colectadas en tubos que contenían EDTA como anticoagulante para plasma y en tubos sin anticoagulante para suero. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos. Posterior a esto, se separó el suero o plasma del paquete globular y fue almacenado a -70°C hasta el momento de su análisis.

Análisis de laboratorio

Determinación de la concentración plasmática de lípidos.- Las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT) y colesterol asociado a HDL (C-HDL) y triacilgliceroles (Tg), se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales Randox® (Reino Unido).

Para la determinación del C-HDL, se precipitaron a partir de plasma de manera selectiva, las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL) con un reactivo comercial que contiene heparán sulfato de manganeso a razón de 100 µL de plasma por 250 µL de reactivo precipitante. Se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. En el sobrenadante contiene a las HDL totales.

La determinación de proteínas totales se realizó por el método de Lowry (ver apéndice 1)

Determinación de esfingomielina en fase semisólida

Se determinó la proporción relativa de esfingomielina en las subclases de HDL así como su contenido de proteína en los dos grupos de muestras para establecer si existen diferencias significativas en estos parámetros antes y después de la intervención dietética.

Aislamiento de HDL

Las muestras de HDL fueron obtenidas por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma, de acuerdo al siguiente esquema de separación:

1. Ajuste de densidad del plasma a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugación por 2 horas 30 minutos a 100000 rpm. En este paso se separan las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, LDL, IDL) las cuales flotan a esta densidad (sobrenadante). En la fase inferior se recuperan las HDL con otras proteínas plasmáticas.
2. Ajuste de densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido. Ultracentrifugación por 3 h a 100000 r.p.m.- A esta densidad flotan las HDL.
3. Ajuste del sobrenadante con solución de KBr a densidad 1.25g/mL-. Este paso se disminuye la cantidad de albúmina residual que está presente con las HDL.

Posterior al aislamiento, 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).

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL.-

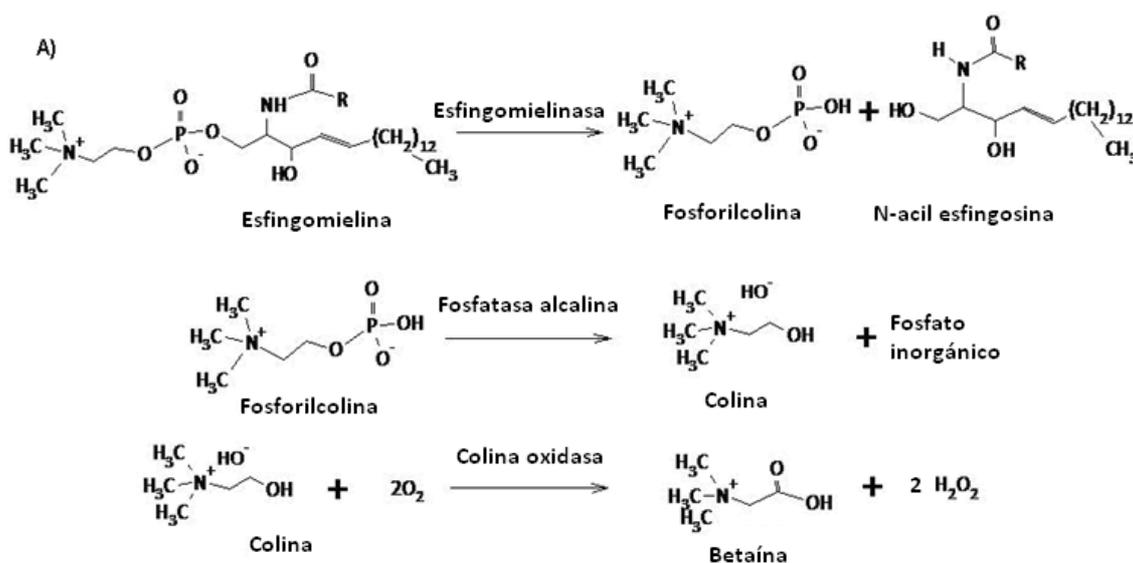
Las subclases de HDL se separaron por su tamaño en electroforesis en gradiente de 3 a 30% de poliacrilamida en condiciones nativas, colocando en cada pozo el equivalente a 25 µg de proteína por pozo, 22 horas/ 180 V (ver apéndice 2). Las HDL separadas en gel fueron analizadas por su radio hidrodinámico, utilizando como referencia los marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina, 17nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK). Se realizó la tinción de los geles con el reactivo revelador de EM desarrollado en este trabajo, se destiñieron según se detalla más adelante, y a continuación se volvieron a teñir con azul de Coomassie que es específico para proteínas. La proporción relativa de cada

subpoblación de HDL se determinó por su radio hidrodinámico conocido (HDL_{2b} 10.50-12.36 nm, HDL_{2a} 9.94-10.58nm, HDL_{3a} 8.98-9.94 nm, HDL_{3b} 8.45-8.98 nm, HDL_{3c} 7.90-8.45nm) tanto en el gel teñido por proteínas como por EM como se detalla a continuación.

Determinación de esfingomielina (EM) en las subpoblaciones de HDL en fase semisólida

Para realizar la detección selectiva de esfingomielina sobre el gel de poliacrilamida se empleó una mezcla enzimática compuesta de esfingomielinasa, fosfatasa alcalina, colina oxidasa y peroxidasa en solución amortiguadora Tris 50mM, CaCl₂ 0.66 mM pH 8 (Reza Hojjati y Jiang, 2006), colato de sodio 3 mM y Tritón® 100X 0.1%, así como carboximetil celulosa como agente viscosante (Figura 5A).

El producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas es H₂O₂, el cual es proporcional a la esfingomielina presente en la muestra. El H₂O₂ reacciona con el MTT (color amarillo) formando un producto soluble de color azul (formazán) en una reacción catalizada por la peroxidasa (figura 5B). El FMS forma un complejo con el formazán de color azul que es insoluble y precipita en el gel. El producto de reacción colorido se analizó por densitometría óptica. La composición y detalles acerca del desarrollo y condiciones ensayadas del método se muestran en la sección de resultados del método en fase semisólida.



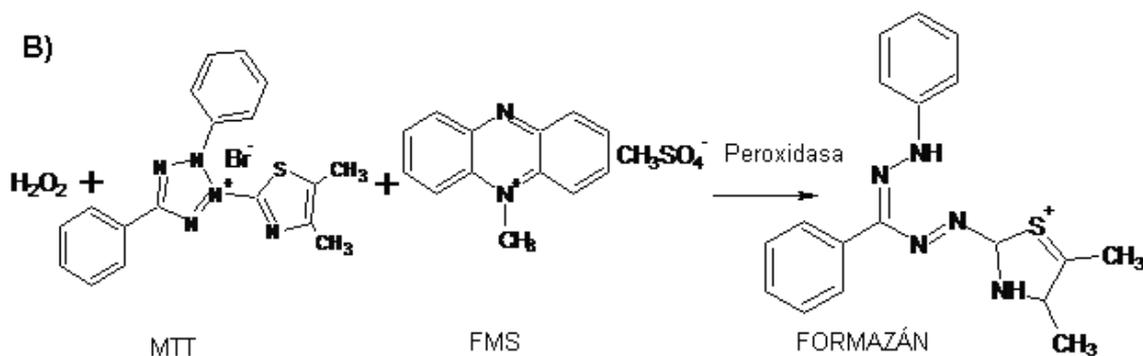


Figura 5. Esquema de la secuencia de reacciones enzimáticas para la determinación de esfingomielinea en fase semisólida. El formazán fue analizado por densitometría óptica en un intervalo de longitud de onda de 520 a 570 nm.

Después la tinción por esfingomielinea, el gel se destiñó con solución decolorante (ácido acético al 10%, 25% de metanol y 65% de agua), para su posterior tinción con solución del colorante Azul de Coomasie R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua. Después de cada tinción, se obtuvo el densitograma correspondiente (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994, Bio-Rad) de las bandas correspondientes a esfingomielinea y proteína para su análisis.

Determinación de componentes y condiciones del método

Determinación de la concentración óptima de enzima esfingomielinasa (EMasa)

Se ensayaron 0.25 U/mL, 0.125 U/mL y 0.0625 U/mL de Emasa. En un gel de gradiente de 3 a 30% de poliacrilamida, se colocó en cada pozo el volumen de HDL (μ L) equivalente a 25 μ g de proteína. Se realizó la electroforesis en condiciones nativas como lo indica el anexo 2. Después de equilibrar el gel con buffer Tris 50 mM $CaCl_2$ 0.66mM, se cortaron tres carriles los cuales se tiñeron con el reactivo revelador de esfingomielinea desarrollado en el presente trabajo que contenía las concentraciones antes mencionadas (un carril por concentración).

Se evaluó primeramente cuales unidades de enzima eran capaces de revelar el gel mediante inspección visual. Posteriormente se realizaron los densitogramas correspondientes para seleccionar la concentración mínima de enzima que fuera capaz

de revelar la muestra, donde la respuesta analítica fuera considerable y no hubiera diferencia significativa al pasar de una concentración a otra (sensibilidad del método). Las concentraciones de las otras enzimas utilizadas en la determinación fueron: colina oxidasa 0.25 U/mL, fosfatasa alcalina 5 U/mL y peroxidasa 3.12 U/mL. Dichas concentraciones están basadas en el estudio de Toledo-Ibelle *et. al*, 2010.

Estandarización del método en fase semisólida

Linealidad y determinación de la cantidad óptima de muestra (HDL)

Se ensayó el volumen (μL) de HDL equivalente a 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 μg de proteína (revelado con EMasa 0.0625 U/mL) aplicando la prueba de determinación de EM en fase semisólida como se detalló anteriormente, utilizando posteriormente la tinción con Azul de Coomassie R250. Se realizaron las gráficas correspondientes de densidad óptica contra cantidad (en μg) de proteína, con el fin de conocer el intervalo lineal de respuesta. Para determinar la cantidad óptima de muestra a utilizar, se utilizará la cantidad mínima de muestra que sea parte del intervalo lineal tanto de proteína como de lípido.

Reproducibilidad

Para los ensayos de reproducibilidad se utilizó como muestra biológica un pool control de HDL, del cual se realizaron alícuotas y fueron refrigeradas. Quince de estas alícuotas se trabajaron como muestras individuales, las cuales fueron procesadas en tres días diferentes. A partir de ellas se realizó el aislamiento y análisis de las subpoblaciones de HDL con tinción por lípido esfingomielina y azul de Coomassie de acuerdo a lo antes descrito (un gel por día con 5 muestras cada uno). Posteriormente se obtuvo el densitograma correspondiente a cada una de estas muestras. De cada una se realizó el análisis del área bajo la curva correspondiente a cada una de las subpoblaciones de HDL teñidas por esfingomielina. Posteriormente, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del área bajo la curva de las 15 muestras para cada subpoblación de HDL procesadas en tres días diferentes.

Repetibilidad

Para los ensayos de repetibilidad se utilizó como muestra biológica un pool control de HDL, del cual se realizaron alícuotas que se conservaron a 4°C. Quince de estas alícuotas se trabajaron como muestras individuales, las cuales fueron procesadas bajo las mismas condiciones (analista, día, aparato, laboratorio). A partir de ellas se realizó el aislamiento y análisis de las subpoblaciones de HDL con tinción por lípido esfingomiélinina y azul de Coomassie de acuerdo a lo antes descrito (un gel con 5 muestras cada uno).

Posteriormente se obtuvo el densitograma correspondiente a cada una de estas muestras. De cada una se realizó el análisis del área bajo la curva correspondiente a cada una de las subpoblaciones de HDL teñidas por esfingomiélinina. Posteriormente, se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del área bajo la curva de las muestras para cada subpoblación de HDL. El método es reproducible si el coeficiente de variación es menor o igual a 5%.

Adaptación de la técnica para determinación de esfingomiélinina en fase líquida.

Cuantificación de esfingomiélinina en suero

Estos son los cuatro pasos de la cuantificación enzimática de los niveles de esfingomiélinina en suero:

1. La esfingomiélinasa alcalina hidroliza la esfingomiélinina a fosforilcolina y n-acilesfingosina
2. La fosfatasa alcalina genera colina a partir de fosforilcolina
3. la colina es utilizada para generar peróxido de hidrógeno en la reacción catalizada por la colina oxidasa y
4. se genera peróxido de hidrógeno, el cual es utilizado junto con un donador de electrones para generar un compuesto colorido que se puede cuantificar espectrofotométricamente (figura 1A).

Donadores de electrones

Se probaron inicialmente dos donadores de electrones en un ensayo preliminar, realizando determinaciones cualitativas en celda, esto es 2 μL de peróxido de hidrógeno concentrado más 1mL de reactivo de color y 2 μL de peroxidasa como catalizador. Los donadores son:

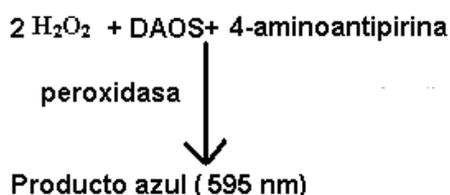
- a) azul de tetrazolium (MTT), 4 mg /mL
- b) 4-amino antipirina 0.73mM y fenol 0.73 mM

Tanto el MTT como la combinación de 4-amino antipirina y fenol no se emplearon en la formulación final del reactivo como donadores de electrones debido a la baja sensibilidad con las muestras, tal como se muestra en la sección de resultados.

A continuación se utilizó como donador de electrones el N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, sal sódica (DAOS) en combinación con la 4-amino antipirina, mostrando buena sensibilidad.

El DAOS se utilizó para nuestro estudio como donador de electrones en concentración de 0.73 mM en combinación con 4-amino antipirina 0.73 mM.

El peróxido de hidrógeno reacciona con el DAOS y 4-aminoantipirina, así como peroxidasa, como catalizador, para generar un producto azul colorido con una longitud de onda de máxima absorción de 595 nm. Las reacciones enzimáticas involucradas son las mismas que en el método en fase semisólida (ver figura 1A). La reacción con el donador de electrones para la fase líquida se muestra a continuación:



La solución amortiguadora de reacción fue Tris base 50mM con CaCl_2 0.66 mM, pH=8.2, Tritón 100X al 2% como tensoactivo.

Estandarización del método en fase líquida para la determinación de esfingomielina en suero

Muestra biológica

Se probó inicialmente plasma como muestra biológica. Sin embargo, debido a problemas asociados a la muestra y al buffer que se detallan en resultados y discusión, se utilizó suero para la determinación.

Determinación de cantidad de enzima

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 estudio de Reza Hojigatti y Xian-Cheng Jiang, 2006 en fase líquida.

Las concentraciones de esfingomielinasa que se probaron fueron 0.3125, 0.625, 0.9375, 1.25 y 1.5625 mU/ μ L de esfingomielinasa, utilizando como sustrato 14 μ L de estándar de esfingomielina. La concentración de enzimas en fase líquida son: colina oxidasa 1.25 μ U/ μ L, fosfatasa alcalina 25 μ U/ μ L y Peroxidasa 20 μ U/ μ L.

Cantidad de muestra. Se colocó en un pozo de microplaca 5, 10, 15 y 20 μ L de muestra, y el volumen se completó a 20 μ L con buffer Tris 50 mM CaCl₂ 0.66 mM pH=8. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de reactivo de color con enzimas y se incubó por espacio de una hora a 37°C. Se leyó la placa en un lector de microplaca espectrofotométrico a 595 nm. El ensayo fue realizado por duplicado.

Cantidad de reactivo de color. Se probaron 100 y 200 μ L de reactivo de color con enzimas.

Tiempo de incubación: Se realizó una reacción en microplaca por triplicado utilizando 20 μ L de suero y 200 μ L de reactivo de color con enzimas, incubando a 37°C. Se realizaron lecturas a los 30 minutos, 1, 1.5 y 2 horas utilizando un lector espectrofotométrico de microplacas. Se eligió el tiempo donde la respuesta fue máxima y la reacción fue estable.

Blancos y controles:

- Blanco de suero: 20 μL suero + 200 μL buffer Tris CaCl_2
- Blanco reactivo de color con enzimas: 20 μL agua + 200 μL reactivo de color con enzimas. Para cuantificar la producción de color por oxidación propia del reactivo
- Sólo buffer: 220 μL de buffer Tris CaCl_2 . Para cuantificar la absorción propia de la microplaca y el buffer.

Linealidad.-Se realizó un ensayo preliminar para determinar el intervalo lineal de respuesta (curva patrón) de acuerdo a lo mostrado en el cuadro 1. La curva se realizó por triplicado. El método es lineal si el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 en las curvas individuales así como en la promedio.

Cuadro 5. Curva patrón para determinación de esfingomielina en fase líquida

STD (μL)	0	4	6	8	12	16	18	22	26	30
Buffer (μL)	30	26	24	22	18	14	12	8	4	0
Reactivo de color con enzimas (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentración STD (mg/mL)	0	0.06	0.1	0.13	0.2	0.26	0.3	0.36	0.43	0.5

Preparación del estándar: Se pesó con exactitud 5 mg de esfingomielina (Aldrich) y se disolvió en 10 mL de etanol. Se adicionó tritón al 2%. El estándar tiene una concentración de 0.5 mg/mL o 50 mg/dL.

Uso de colato de sodio como tensoactivo

Para la determinación de esfingomielina en fase semisólida, el reactivo diseñado tiene en su composición colato de sodio, así como también se utiliza en la determinación de otros lípidos en fase semisólida (García-Sánchez C. *et al*, 2011; Toledo-Ibelle P. *et al*, 2010).

Para la determinación de esfingomielina en fase líquida no hay reporte alguno en la literatura que mencione el uso de colato de sodio (kit Sphingomyelin Assay de

Cayman Chemical y Sphingomyelin Assay de Echelon), por tanto se realizó un ensayo para determinar la utilidad de usar colato de sodio en la fase líquida.

Se realizaron 3 curvas patrón con estándar de esfingomielina (0, 0.05, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.35 mg/mL). Posteriormente se adicionaron 200 μ L de reactivo de color con enzimas; para la primera curva sin colato, la segunda con 6 mM de colato de sodio y la última con 60 mM de colato de sodio y se incubó por espacio de una hora a 37°C. Se leyó la placa en un lector de microplaca espectrofotométrico a 595 nm. El ensayo fue realizado por duplicado.

Adicionalmente se probaron 5 y 10 μ L de sobrenadante que contiene las lipoproteínas que contienen apo B (s-LpB) llevados a un volumen final de 20 μ L con agua y adicionando 200 μ L de reactivo de color con enzimas (mismas concentraciones de colato), así como 20 μ L de suero (un pozo por cada concentración). El ensayo fue realizado por duplicado.

Repetibilidad.- Se descongelaron 14 alícuotas del suero control que fueron procesadas como muestras individuales. De cada muestra se tomaron 20 μ L de suero y se colocaron en un pozo de microplaca (por duplicado). Posteriormente se adicionaron 200 μ L de reactivo de color con enzimas y se incubó por espacio de una hora a 37°C. Se leyó la placa en un lector de microplaca espectrofotométrico a 595 nm. El método es repetible si el coeficiente de variación es menor o igual a 5%.

Nota: en todas las placas realizadas se colocaron por duplicado los blancos, controles y curva patrón antes descritos.

Determinación de esfingomielina de HDL

Para la determinación de esfingomielina de HDL se utilizó el mismo aceptor de electrones, concentración de enzimas y condiciones del método en líquido para determinar esfingomielina en suero, variando la muestra biológica, probando las siguientes muestras:

- a) HDL obtenidas utilizando reactivo precipitante comercial (heparán sulfato de manganeso) a razón de 100 μL de plasma por 250 μL de reactivo precipitante. Se dejó en reposo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. En el sobrenadante contiene a las HDL totales. Se colocaron 20 y 40 μL de HDL en un pozo de microplaca y se adicionaron 200 μL de reactivo de color con enzima. Se dejó incubar a 37°C por espacio de 1 hora. Posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas espectrofotométrico a 595 nm.

- b) HDL obtenidas del fase inferior de la primera ultracentrifugación diferencial de acuerdo al primer paso del aislamiento de HDL. Se colocaron 20 y 40 μL de HDL en un pozo de microplaca y se adicionaron 200 μL de reactivo de color con enzima. Se incubó a 37°C por espacio de 1 hora. Posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas espectrofotométrico a 595 nm.

- c) De forma indirecta, utilizando el sobrenadante que contiene las lipoproteínas que contienen apo B (s-LpB) de la primera Ultracentrifugación diferencial de acuerdo al primer paso del aislamiento de HDL. Se colocaron 15 μL de (sobrenadante de Apo B) en un pozo de microplaca más 5 μL de agua y se adicionaron 200 μL de reactivo de color con enzimas. Se incubó a 37 °C por espacio de 1 hora. Posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas espectrofotométrico a 595 nm.

Determinación de esfingomielina (EM) de HDL (método indirecto).-Se asume que toda la EM plasmática se encuentra distribuida en VLDL, LDL e IDL (sLpB) y el resto en HDL, por tanto, si conocemos la concentración de EM en el sLpB, la diferencia entre la concentración plasmática de EM y la EM de las lipoproteínas que contienen apo B es igual a la concentración de esfingomielina de HDL.

Estandarización del método para determinar esfingomielina de HDL

Determinación de la cantidad de muestra (volumen de sLpB)

Se ensayaron el volumen de 5, 10, 15 y 20 μL de sobrenadante.

Ensayos de reproducibilidad.- De un suero control almacenado en congelación a -20°C , se extrajeron 14 alícuotas, las cuales fueron trabajadas como muestras individuales. Se extrajo el sLpB de acuerdo al esquema de aislamiento de HDL (primera fase de la ultracentrifugación diferencial). El volumen inicial del plasma así como el volumen del sLpB extraído fue medido con exactitud.

Se colocaron 15 μL de sLpB más 5 μL de agua en un pozo de microplaca por duplicado. Se adicionaron a cada pozo 200 μL de reactivo de color con enzimas y tensoactivos. Se incubó a 37°C por espacio de 1 hora. Posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de placas espectrofotométrico a 595 nm. El método es reproducible si el coeficiente de variación de las muestras es menor o igual a 5%.

Blancos y controles

En cada placa realizada se colocaron los siguientes blancos y controles, así como la curva patrón por duplicado:

- Blanco sobrenadante: 20 μL sobrenadante diluído + 200 μL buffer Tris CaCl_2 1X
- Blanco reactivo de color con enzimas: 20 μL agua + 200 μL reactivo de color con enzimas. Para cuantificar la producción de color por oxidación propia del reactivo
- Sólo buffer: 220 μL de buffer Tris CaCl_2 . Para cuantificar la absorción propia de la microplaca y del amortiguador.

Aplicación de un factor de corrección para el sobrenadante de Apo B

Debido a que el sLpB se recuperó de forma manual, ésta no es cuantitativa, por tanto la concentración de esfingomielina que se determine del sobrenadante tampoco representa el 100%. En consecuencia, fue necesario aplicar un factor de corrección que incluyó el porcentaje de recuperación del sobrenadante. Esto se realizó como se detalla a continuación:

Se descongeló una alícuota de suero control almacenado a -20°C . De esta muestra se determinó el colesterol total y colesterol de HDL, así como el colesterol-no HDL presente en el sobrenadante. Mediante la diferencia numérica del colesterol total menos colesterol HDL se obtuvo el valor del colesterol no HDL del suero control, que representa el 100% de colesterol no HDL. Posteriormente se determinó el porcentaje que representa el colesterol colectado en el sobrenadante ajustando previamente por el volumen del sobrenadante.

Se calculó para cada muestra el porcentaje de recuperación y fue expresado como una proporción de colesterol no-HDL real/colestero no-HDL recuperado. El número resultante es el factor de corrección (Fc) que fue multiplicado por la concentración de esfingomielina asociada a HDL para obtener la concentración corregida de esfingomielina de HDL.

Evaluación del método en fase semisólida y en fase líquida

Una vez estandarizado el método en fase semisólida y en fase líquida, ambos se evaluaron en pacientes con síndrome metabólico que se sometieron a un tratamiento de una dieta baja en fructosa durante seis semanas.

Se aplicó el método en fase líquida para determinar los niveles séricos de esfingomielina así como la esfingomielina asociada a HDL por el método indirecto anteriormente descrito.

El método en fase semisólida se utilizó para determinar el contenido de esfingomielina en las subpoblaciones de HDL.

Análisis estadístico

Cálculo del tamaño muestral. Basados en el estudio de Festa *et al*, 2005, donde los pacientes que desarrollan Diabetes Mellitus tipo 2 tienen un promedio de concentración de partículas HDL grandes de $4.1 \mu\text{mol/L}$ con una desviación estándar de $0.2 \mu\text{mol/L}$, mientras que las HDL grandes en sujetos control es de $5.1 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$, El cálculo del número de pacientes resulta ser de 50.

El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciencens (SPSS Inc, versión 18.0 para Windows.Chicago, Illinois). Los

valores de las variables clínicas y bioquímicas se expresan como la media \pm desviación estándar. Las variables bioquímicas con distribución no normal se representan como mediana con rango intercuartilar (percentilas 25 a la 75).

Para determinar si los datos se ajustan a una distribución normal se realizó una prueba de Kolmogorov–Smirnov. La comparación entre variables cuantitativas continuas con una distribución normal se realizó mediante la prueba de t de Student al comparar dos muestras con distribución normal. Las variables con una distribución no normal se les realizó una transformación logarítmica para poder aplicar las pruebas paramétricas correspondientes.

Se realizó un análisis de correlación bivariada de Pearson para evaluar la interdependencia entre la concentración de C-HDL y el porcentaje relativo así como la concentración de esfingomielina en cada una de las subclases de HDL y algunas variables bioquímicas de los pacientes.

En todos los casos los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Determinación de esfingomielina en fase semisólida

Componentes y condiciones del método

La formulación del reactivo para la cuantificación de esfingomielina en fase semisólida se realizó con una mezcla enzimática en solución amortiguadora Tris 50 mM, CaCl₂ 0.66 mM, pH 8.2. Las enzimas empleadas para cuantificar la presencia de esfingomielina fueron esfingomielinasa, fosfatasa alcalina, colina oxidasa y peroxidasa. Las concentraciones finales de las enzimas se presentan posteriormente.

Además se agregó colato de sodio 3 mM y Tritón 100 X al 0.1% para exponer a los fosfolípidos embebidos en la estructura de las lipoproteínas, y las sales fenazina metasulfato (FMS) 0.6 μM y azul de tetrazolium (MTT) 0.4 μM como donadores de electrones.

Como agente viscosante se empleó carboximetilcelulosa al 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 sustrato, 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 de esfingomielina desarrollado en este trabajo 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 minutos hasta 2 horas; el contraste de la coloración muestra-fondo fue mejor en el tiempo de 1 hora con respecto a los demás tiempos considerados (datos no

mostrados). La aparición de una banda con coloración violeta fue indicativa de la presencia de esfingomiélinas cuantificada indirectamente por la precipitación de la sal insoluble de formazán, que se determinó por medio del análisis de densitometría óptica.

Concentración óptima de enzima esfingomiélinasa

Para determinar la concentración mínima necesaria de enzimas para la reacción, para la esfingomiélinasa se realizaron ensayos variando proporcionalmente la concentración de la misma, tomando como referencia inicial la concentración empleada en el estudio de Reza Hojjati et al 2006; las concentraciones empleadas de 0.25 U/mL, 0.125 U/mL y 0.0625 U/mL.

Las concentraciones de las otras enzimas utilizadas en la determinación fueron: colina oxidasa 0.25 U/mL, fosfatasa alcalina 5 U/mL y peroxidasa 3.12 U/mL. Dichas concentraciones están basadas en el estudio de Toledo-Ibelle *et al.*

En la figura 6 (izquierda) se presentan los densitogramas generados en los ensayos con diferentes concentraciones de enzimas. En la figura 6 (derecha) se presenta una imagen de la tinción con reactivo de esfingomiélinas en concentración 0.0625U/mL de EMasa.

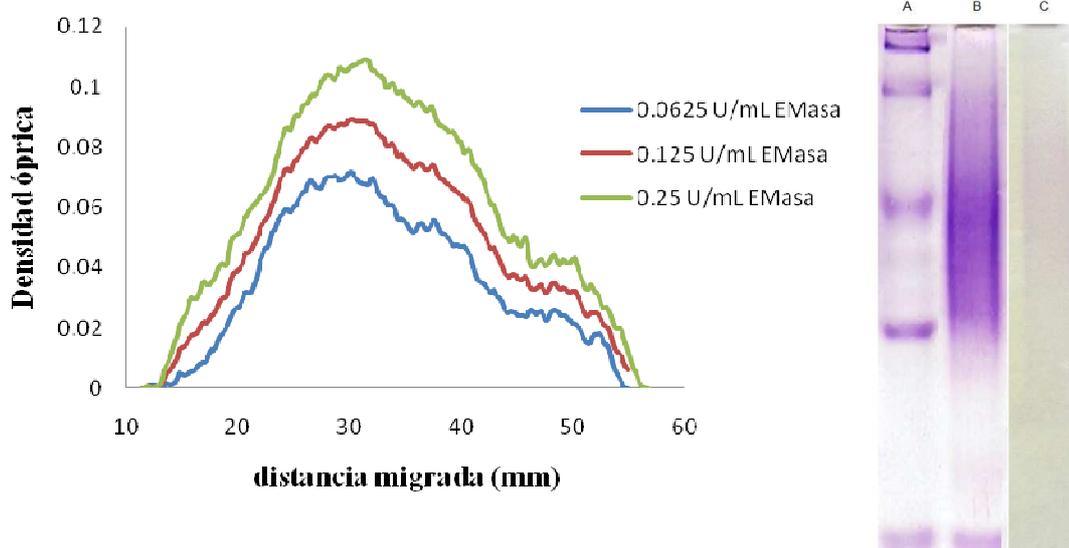


Figura 6. *Izquierda.* Densitogramas comparativos de la tinción de esfingomiélinas con diferentes concentraciones enzima (esfingomiélinasa). *Derecha.* Tinción de una muestra de HDL con reactivo preparado con EMasa 0.0625U/mL. A. Marcadores de peso molecular. B. Tinción por proteína con Azul de Coomasie R250 C. Tinción con el reactivo revelador de esfingomiélinas.

Las enzimas presentes en el reactivo permiten la determinación específica de esfingomielina, por lo que su concentración es importante para asegurar la reacción. Como se observa en la figura 6 (izquierda), la concentración de las enzimas influye directamente en la intensidad de la señal para la muestra y el fondo.

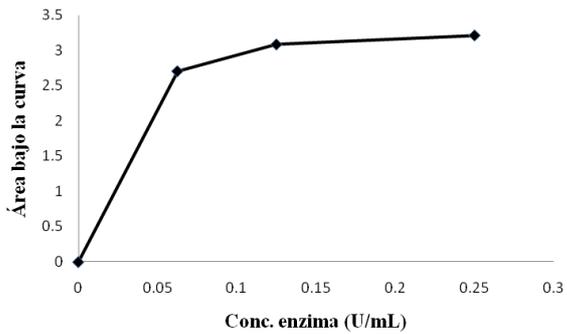


Gráfico 1. Área bajo la curva con respecto a la cantidad de enzima esfingomielinasa.

Para seleccionar la cantidad de enzima esfingomielinasa se realizó un gráfico del área bajo la curva con respecto a la concentración de enzima. Como se puede observar en el gráfico 1, la concentración de EMasa 0.0625 y

0.125 U/mL tienen un área bajo la curva semejante (2.704 y 3.084, respectivamente), mientras que la cantidad de enzima 0.25 U/mL ya está en la meseta de la curva.

De este modo se seleccionó la concentración de esfingomielinasa de 0.0625 U/mL, pues aunque es la concentración más baja de enzima, esta es capaz de revelar adecuadamente el gel y se encuentra en la parte lineal de la curva, adicionalmente, la intensidad de la muestra y la coloración con el fondo permiten la clara interpretación del resultado, teniendo como ventaja adicional el ahorro de reactivo.

Estandarización del método en fase semisólida

Linealidad y determinación de la cantidad óptima de muestra (HDL)

Se ensayó el volumen (μL) de HDL equivalente a 5, 10 15, 20, 25, 50, 75 y 100 μg de proteína (revelado con reactivo en fase semisólida desarrollado en este trabajo, con esfingomielinasa 0.0625 U/mL, y posteriormente con azul de Coomasie R250 para determinar proteínas). Los resultados se muestran en el gráfico 2 (por proteína) y en el gráfico 3 (por esfingomielinina).

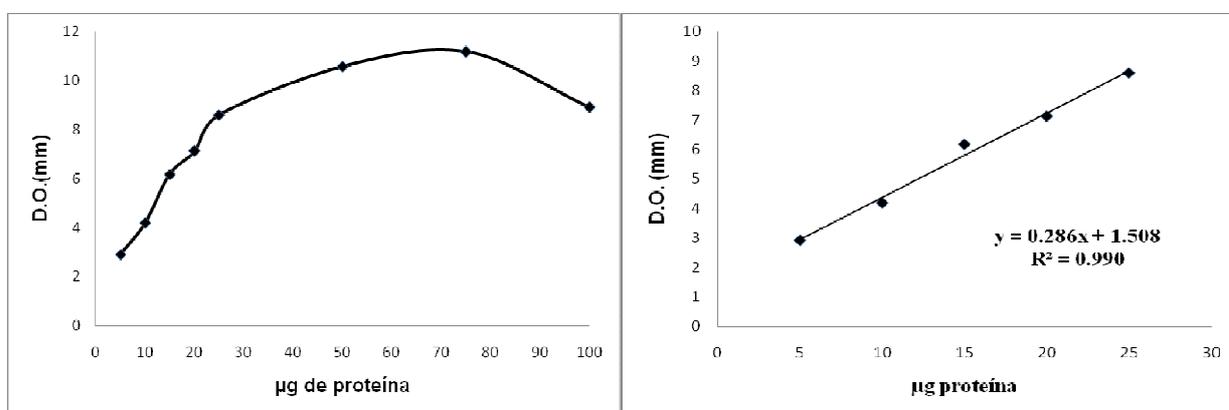


Gráfico 2. En el gráfico de la izquierda se muestra la densidad óptica (D.O.) con respecto a los microgramos de proteína (tinción con Azul de Coomasie R250). Se observa que el proceso es saturable. En el gráfico de la derecha se muestra el intervalo lineal de respuesta, que es el volumen de HDL equivalente a 5-25 μg de proteína.

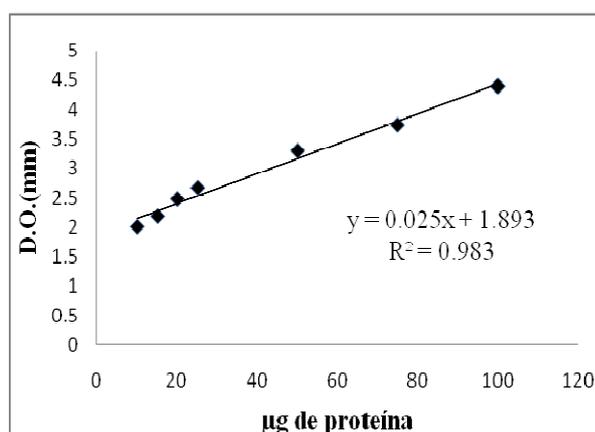


Gráfico 3. En el gráfico se muestra el porcentaje relativo de esfingomielinina contra los microgramos de proteína (tinción con el reactivo en fase semisólida de esfingomielinina, desarrollado en este trabajo). Se observa que de 5 a 100 μg de proteína la determinación es lineal.

Debido a que el método debe ser lineal tanto por la tinción por proteína como por esfingomielina, el rango lineal de respuesta común a ambos es el volumen de HDL equivalente a 5-25 μ g de proteína (método de Lowry). El volumen de HDL para las muestras fue el equivalente a 25 μ g de proteína, ya que es el máximo punto donde el comportamiento es lineal para proteína y para esfingomielina.

Las HDL aisladas y separadas de cada una de las muestras de plasma fueron cuantificadas por su contenido en esfingomielina y proteína tras obtener el densitograma correspondiente.

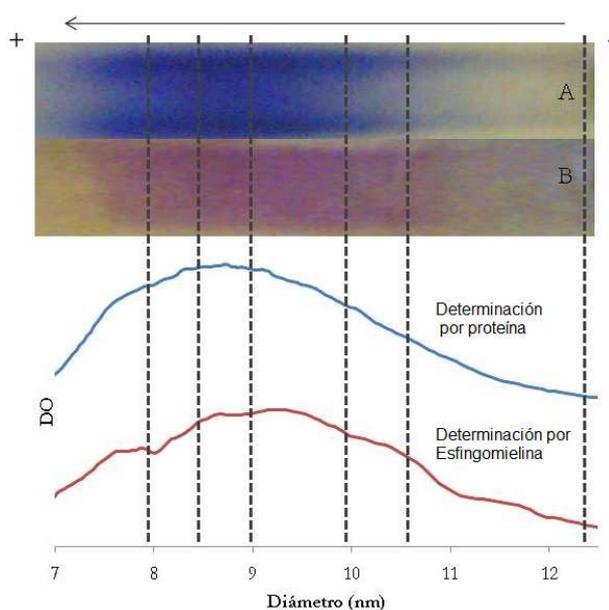


Figura 7. Distribución de las subpoblaciones de HDL.

En la figura 7 se muestra el análisis por densitometría óptica, de una muestra representativa (suero normolipémico), por su contenido en esfingomielina y proteína. Este análisis se realizó únicamente con fines de estandarizar el método en fase semisólida para posteriormente evaluarlo en los sujetos de estudio.

Los densitogramas presentan las distribuciones determinadas por proteína con azul de Coomassie y por esfingomielina (EM) 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 EM. 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.

Reproducibilidad

Para evaluar la variación interensayo, se procesaron en tres días diferentes un total de 15 alícuotas de un pool control de HDL de individuos normolipémicos trabajadas como muestras individuales. En el cuadro 6 (izquierda) se muestra el coeficiente de variación de la proporción relativa de esfingomielina para cada una de las subpoblaciones de HDL.

Repetibilidad

Para evaluar la variación intra ensayo, se procesaron bajo las mismas condiciones (analista, día, aparato, laboratorio) 15 alícuotas de un pool control de HDL de individuos normolipémicos. En el cuadro 6 (derecha) se muestra el coeficiente de variación de la proporción relativa de esfingomielina para cada una de las subpoblaciones de HDL.

<i>Subpoblación</i> <i>HDL</i>	<i>CV</i> <i>Reproducibilidad, n=15</i>	<i>Subpoblación</i> <i>HDL</i>	<i>CV</i> <i>Repetibilidad, n=15</i>
2b	7.1	2b	7.7
2a	6.1	2a	6.5
3a	4.9	3a	6.1
3b	6.3	3b	6.8
3c	7.3	3c	7.6

Cuadro 6 (*izquierda*). Reproducibilidad (variabilidad inter-ensayo) expresada como el coeficiente de variación. Cuadro 6 (*derecha*). Repetibilidad (variabilidad intra-ensayo) expresada como el coeficiente de variación.

Adaptación de la técnica para determinación de esfingomielina en fase líquida.

Cuantificación de esfingomielina en suero

Donadores de electrones

Se probaron tres donadores de electrones, siendo estos a) azul de tetrazolium (MTT) 4 mg /mL; b) 4 amino antipirina 0.73mM y fenol 0.73 mM y posteriormente c) N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina, sal sódica (DAOS) y 4 amino anti pirina.

Inicialmente se utilizó el MTT debido a que es el donador de electrones empleado en la fase semisólida, sin embargo, tiene una baja sensibilidad, ya que al hacerlo reaccionar con 2 μ L de peróxido de hidrógeno concentrado, la absorbancia fue de tan sólo 0.842 (λ = 571 nm). Debido a que la señal obtenida con MTT es muy baja, se empleó a continuación la combinación de 4-amino antipirina y fenol, ya que existe referencia en la literatura en estudios recientes que ese donador es apto para la determinación de esfingomielina en fase líquida en el plasma de pacientes (Joseph Yeboah, Xian-Cheng Jiang *et al*, 2010).

La combinación de 4-amino antipirina y fenol en este ensayo preliminar fue muy buena, ya que al hacerlo reaccionar con 2 μ L de peróxido de hidrógeno concentrado tuvo una alta absorbancia (3.348, λ =486 nm). Al realizar la reacción en microplaca, la coloración obtenida con el estándar era buena (datos no mostrados). Sin embargo, al emplearlo con muestras de suero la coloración generada por las reacciones enzimáticas era muy tenue, y por lo tanto se requería de un donador más sensible que mostrara repuesta con las muestras.

A continuación se utilizó como donador de electrones DAOS en combinación con la 4 amino antipirina, ya que en estudios anteriores de estos mismos autores se utilizó como donador para la determinación de esfingomielina en el método de referencia para el presente trabajo (Reza Hojjati y Xian-Cheng, 2006). El DAOS mostró, a diferencia de la combinación 4-amino antipirina-fenol, una mayor sensibilidad. Esto es importante ya que la esfingomielina no es tan abundante como el colesterol en el plasma.

Como se comentó anteriormente, el DAOS es un reactivo diseñado y utilizado específicamente para la determinación de fosfolípidos en reactivos comerciales (Wako).

Para nuestro estudio se utilizó como donador de electrones en concentración de 0.73 mM en combinación con 4-amino antipirina 0.73 mM. Su longitud de onda de máxima absorción es de 595 nm. Su sensibilidad es buena (de estos tres aceptores fue el único que permitió detectar los niveles de esfingomielina en suero).

Estandarización del método en fase líquida para la determinación de esfingomielina en suero

Muestra biológica

Al emplear un pool de plasma normolipémico en un pozo de microplaca y adicionar solución amortiguadora de Tris 50 mM, CaCl₂ 0.66mM, se observó la aparición de un precipitado blanco el cual interfiere con la lectura. Para probar de manera indirecta si el precipitado que se formaba era fibrina que se formaba por la adición de Ca²⁺ a la reacción, se utilizó suero en lugar de plasma. Efectivamente, al usar suero como muestra biológica no se forma precipitado alguno y la determinación se puede llevar a cabo, por lo cual fue seleccionado como muestra biológica para la determinación de esfingomielina en fase líquida.

Determinación de cantidad de enzima

Las concentraciones de esfingomielinasa que se probaron fueron 0.3125, 0.625, 0.9375, 1.25 y 1.5625 mU/μL de esfingomielinasa, utilizando como sustrato 14 μL de estándar de esfingomielina. En el cuadro 7 se muestran las diversas concentraciones de enzima y la respuesta analítica.

Cuadro 7. Diferentes concentraciones de esfingomielinasa y su respuesta analítica.

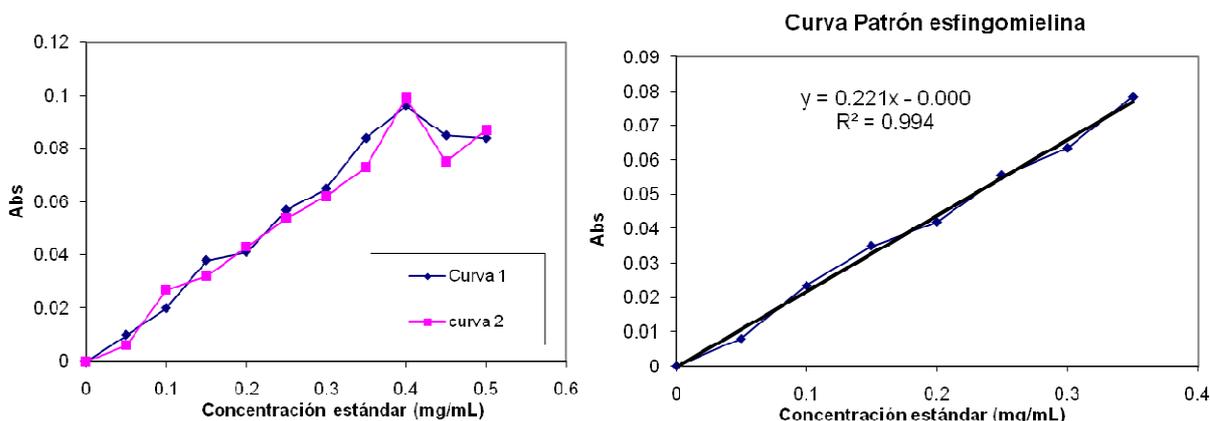
Concentración esfingomielinasa (mU/μL)	Absorbancia
0.3125	0.834
0.625	0.846
0.9375	0.866
1.25	0.869
1.5625	0.862

Como se observa, no hay diferencia significativa al usar las diferentes concentraciones de esfingomieline, por lo cual se seleccionó la de 0.625 mU/ μ L, ya que tiene la misma respuesta analítica y tiene como ventaja adicional el ahorro del reactivo.

Linealidad

Se realizó un ensayo preeliminar para determinar el intervalo lineal de respuesta (curva patrón) de acuerdo a lo mostrado en el cuadro 5 (ver en la sección materiales y métodos) con el fin de conocer hasta que concentración de estándar la respuesta analítica es lineal (gráfico 4, izquierda). Se observa que después de 0.4 mg/mL de estándar la respuesta analítica no es lineal. Posteriormente se eligió el intervalo lineal de respuesta, el cual es la curva patrón (gráfico 4, derecha).

Gráfico 4. izquierda. Intervalo de 0.1-0.6 mg/mL de estándar de esfingomieline y su respuesta analítica. Derecha. Intervalo lineal de respuesta (curva patrón).



Para determinar la linealidad del método, la curva patrón se realizó por triplicado. Como se observa en el gráfico 5 y en el cuadro 8, el método es lineal pues el coeficiente de correlación es mayor a 0.99 en las curvas individuales así como en la promedio.

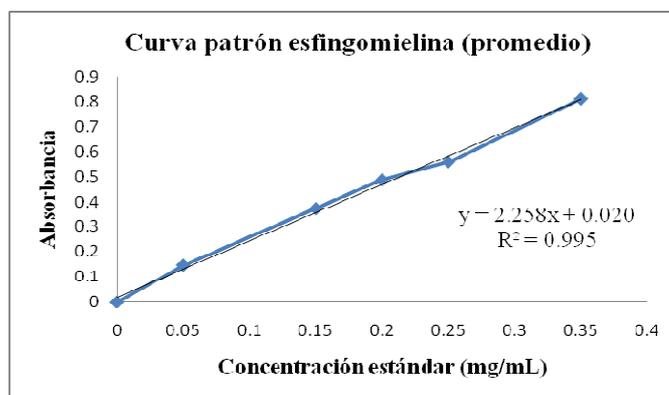
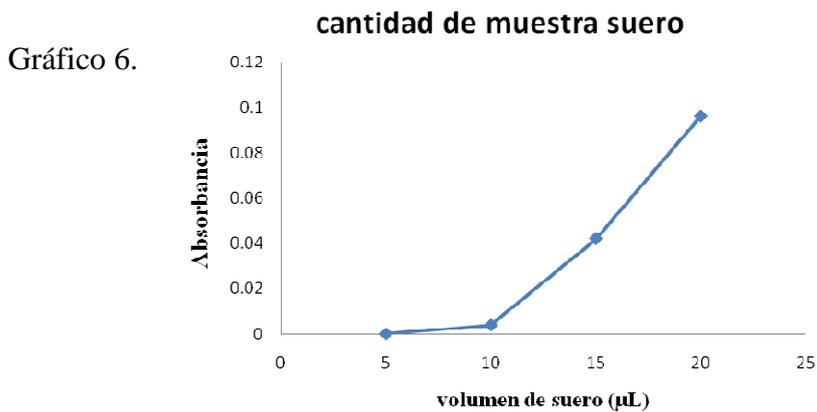


Gráfico 5. Promedio de las curvas patrón de esfingomieline.

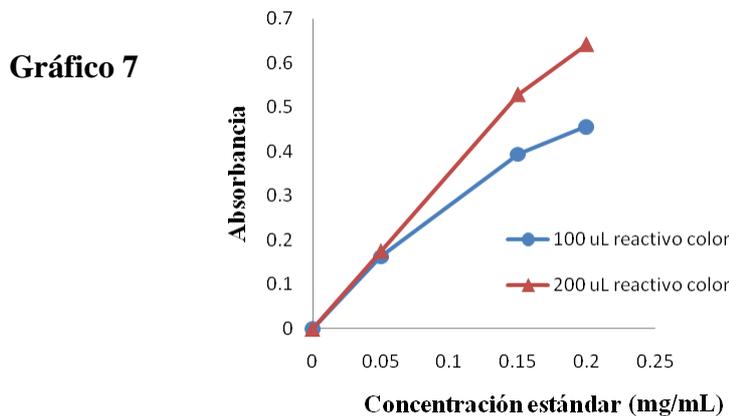
Cuadro 8. Coeficientes de correlación de tres curvas patrón de esfingomielina y la curva promedio.

curva	pendiente	ordenada de origen	coeficiente de correlación
1	2.26	0.020	0.996
2	2.30	0.024	0.995
3	2.21	0.016	0.996
promedio	2.256	0.02	0.995

Cantidad de muestra de suero.- Se ensayaron los volúmenes de 5, 10, 15 y 20 μL de suero. En el gráfico 6 se observa que empleando 5 y 10 μL de muestra la esfingomielina está en niveles no detectables. Se utilizó el volumen de 20 μL de suero ya que la respuesta analítica (abs) está en el rango lineal y los niveles de esfingomielina son detectables.



Cantidad de reactivo de color. Se probaron 100 y 200 μL de reactivo de color con enzimas. Como se puede ver en el gráfico 7, se obtiene una mejor respuesta al trabajar con 200 μL de reactivo de color, por lo que este volumen fue el utilizado para todas las determinaciones posteriores.



Tiempo de incubación: Las observaciones se realizaron desde 30 min hasta 2h; la absorbancia fue máxima al tiempo de 1h y la coloración permaneció estable durante 30 min más (datos no mostrados).

Blancos:

En las determinaciones de esfingomielina en fase líquida es necesario tener los siguientes blancos y controles:

Blanco de suero.- se observó, particularmente en las muestras de los pacientes con síndrome metabólico, que los sueros contribuyen a la absorbancia de manera variable a la longitud de onda utilizada. Adicionalmente, los lípidos presentes en el suero hacen que el pozo se muestre opaco, y aumentando en consecuencia la absorbancia de la muestra. Al adicionar tritón 100X al 2% se solubilizan los lípidos y la absorción intrínseca a este efecto disminuye. Por lo tanto, estándares, muestras y blancos fueron adicionados de tritón 100X al 2%.

Blanco reactivo de color con enzimas: Este blanco se realiza para evaluar la absorción propia del reactivo de color. Ese reactivo debe ser preparado al instante ya que es sensible a la luz. También las enzimas deben ser adicionadas justo antes de llevar a cabo la determinación, ya que se observó que el reactivo comienza a oxidarse ligeramente al adicionar la peroxidasa, pues al agregarla se observaba un incremento paulatino de la coloración del reactivo.

Blanco solo solución amortiguadora.- este blanco permite evaluar la absorción propia de la microplaca y el amortiguador.

El cálculo de la absorbancia corregida para las muestras se realiza como se indica a continuación:

Abs corregida = (Abs muestra – (Abs reactivo de color + (Abs autoblanco — Abs solo buffer)))

Uso de colato de sodio como tensoactivo

Para la determinación de esfingomielina en fase semisólida, el reactivo diseñado tiene en su composición colato de sodio, así como también se utiliza en la determinación de otros lípidos en fase semisólida (García-Sánchez C et al, 2011; Toledo-Ibelles P et al, 2010).

Para la determinación de esfingomielina en fase líquida no hay reporte alguno en la literatura que mencione el uso de colato de sodio (kit Sphingomyelin Assay de Cayman Chemical y Sphingomyelin Assay de Echelon), por tanto se realizó un ensayo para determinar la utilidad de éste en el diseño del reactivo para la fase líquida.

En el gráfico 8 se muestran tres curvas patrón con estándar de esfingomielina; para cada curva se probó una concentración de colato (sin colato, 6.04 mM y 60.4 mM de colato de sodio). Se observa que no hay diferencia significativa *en las curvas patrón* al usar o no colato de sodio.

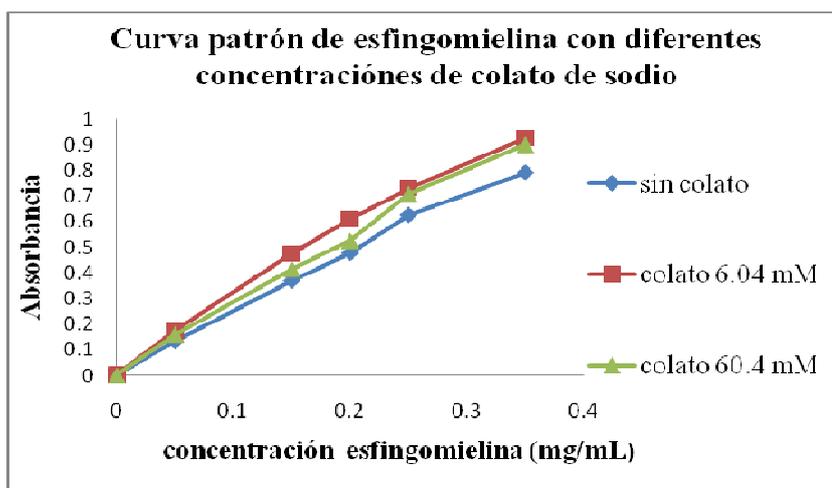


Gráfico 8. Curvas patrón de esfingomielina con diferentes concentraciones de colato de sodio.

También se ensayó el uso de colato para un pool de suero normolipémico (20 μ L) y para el sobrenadante de lipoproteínas que contienen apo B (sLpB, 5 y 10 μ L) para las tres concentraciones de colato. Los resultados se muestran en el cuadro 9 expresados como absorbancia.

Cuadro 9. Efecto del uso de diferentes concentraciones de colato de sodio para muestras de suero y sLpB.

	Sin colato Abs	Colato 6.04 mM Abs	Colato 60.4 mM Abs
suero 20 μ L	0.224	0.071	0.049
sLpB, 10 μ L	0.164	0.078	0.071
sLpB, 5 μ L	0.093	0.000	0.000

Como se observa en el cuadro 9, a diferencia del estándar de esfingomielina, el uso de colato de sodio en la muestra de suero es contraproducente, ya que al usar colato 6.04 mM la absorbancia baja aproximadamente tres veces, mientras que al usar colato de sodio 60.04 mM disminuye 4.5 veces.

Para la muestra de sLpB (10 μ L) el uso de colato disminuyó la absorbancia 2 veces para ambas concentraciones, mientras que para 5 μ L de sLpB la absorbancia es cero. Por tanto, no se adicionó colato de sodio en la formulación del reactivo en fase líquida.

Repetibilidad método en líquido para suero

Para evaluar la variación intra-ensayo, se procesaron bajo las mismas condiciones (analista, día, aparato, laboratorio) 14 alícuotas de un pool de suero control de individuos normolipémicos que fueron procesadas como muestras individuales. En el cuadro 10 se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la proporción relativa de esfingomielina para cada una de las subpoblaciones de HDL.

Cuadro 10. Variación intraensayo (repetibilidad) del método en líquido utilizando suero como muestra biológica.

Promedio	14.3 mg/dL
Desviación estándar	0.205 mg/dL
Coficiente de Variación	2.86
n	14

Como se observa en el cuadro 10, el coeficiente de variación es 2.86, por tanto, la variabilidad del método (intra-ensayo) es aceptable, pues dicha variación es menor al 5%.

Determinación de esfingomielina de HDL

Para la determinación de esfingomielina de HDL se utilizó como aceptor de electrones DAOS y 4-amino antipirina, misma concentración de enzimas y condiciones del método en líquido para determinar esfingomielina en suero, variando la muestra biológica, probando las siguientes muestras:

d) HDL obtenidas utilizando reactivo precipitante comercial (heparán sulfato de manganeso).

El heparán sulfato de manganeso precipita selectivamente por carga a las lipoproteínas que contienen apo B, por lo que al centrifugarlas a 3000 rpm durante cinco minutos se obtiene un precipitado de lipoproteínas que contienen apo B, quedando el sobrenadante las HDL totales. Al utilizar el reactivo desarrollado para la determinación de esfingomielina en suero, y utilizando como muestra biológica las HDL obtenidas con el reactivo precipitante, no se desarrolla una coloración detectable. Posiblemente la cantidad de esfingomielina presente en las HDL es muy baja. Adicionalmente el reactivo precipitante diluye la muestra 2.5 veces, pues se colocan 250 μ L de reactivo precipitante por cada 100 μ L de muestra. Debido a ello se procedió a procesar la muestra de la siguiente manera para cuantificar la EM de las HDL:

e) HDL obtenidas de la fase inferior de la primera ultracentrifugación diferencial según se describe en la sección de materiales y métodos para el aislamiento de lipoproteínas.

En este caso, la absorción en el pozo de microplaca después de corregir por los blancos era muy baja (apenas 0.012, ensayo realizado por triplicado), por lo que concluimos que los niveles de EM presentes en la muestra no son detectables por este procedimiento.

f) De forma indirecta, utilizando el sobrenadante de las lipoproteínas que contienen apo B (sLpB) de la primera Ultracentrifugación diferencial de acuerdo al primer paso del aislamiento de HDL.

La absorbancia en este caso fue de 0.171. La respuesta analítica fue considerable, por tanto, se eligió el sLpB para determinar indirectamente la EM asociada a HDL.

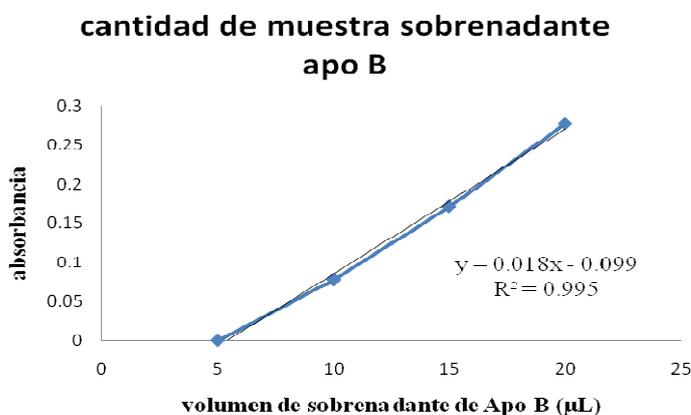
Se asume que toda la EM plasmática se encuentra distribuida en VLDL, LDL e IDL (sLpB) y el resto en HDL, por tanto, si conocemos la concentración de EM en el sLpB, la diferencia entre la concentración plasmática de EM y la EM de las lipoproteínas que contienen Apo B es igual a la concentración de esfingomielina de HDL.

Estandarización del método para determinar esfingomielina de HDL

Determinación de la cantidad de muestra (volumen de sLpB)

Se ensayaron el volumen de 5, 10, 15 y 20 μL de sobrenadante. Como se observa en el gráfico 9, para 5 μL de sobrenadante la esfingomielina no es detectable. En el rango de 10 a 20 μL se observa que la respuesta es lineal, y se podría elegir cualquiera de estos volúmenes.

Gráfico 6



Se seleccionó el volumen de 15 μL de sobrenadante porque es un punto intermedio del intervalo lineal debido a la variabilidad que esperamos en las muestras.

Ensayos de reproducibilidad.- El coeficiente de variación de las muestras del sLpB es 6.9 %, n=14.

Factor de corrección para el sLpB

Debido a que el sLpB se recupera de forma manual, la recuperación no es cuantitativa, por tanto es necesario aplicar un factor de corrección que incluya el porcentaje de recuperación del sobrenadante.

El porcentaje de recuperación se calculó tal y como se describe en la sección “Aplicación de un factor de corrección para el sLpB” de materiales y métodos. Al realizar ésta determinación en cincuenta muestras de pacientes, pre y post tratamiento (n=100), el porcentaje recuperado promedio es del 75.53%, y expresado como el factor de corrección es $F_c = 1.42$.

Aplicación del método en fase semisólida y en fase líquida

Una vez estandarizado el método en fase semisólida y en fase líquida, ambos se utilizaron para evaluar los cambios en esfingomielina de las subclases de HDL en pacientes con síndrome metabólico que se sometieron a un tratamiento durante seis semanas de una dieta baja en fructosa (pre y post tratamiento, n=50).

Características clínicas y perfil bioquímico de los sujetos de estudio

En los cuadros 11 y 12 se presentan los datos de las características antropométricas y perfil bioquímico de los sujetos de estudio, pre y post tratamiento.

Cuadro 11. Características clínicas de los sujetos de estudio.

	Pre- tratamiento (n=50)	Post- tratamiento (n = 50)	T de student
Mujeres/ hombres	40/10	40/10	-
Edad (años)	38.61 ± 6.41	38.61 ± 6.41	-
Peso (kg)	80.56 ± 14.79	77.03 ± 14.32	0.000*
IMC (kg/m²)	32.29 ± 4.95	30.95 ± 5	0.000*
PAS (mm Hg)	109.56 ± 10.27	99.68 ± 5.86	0.000*
PAD (mm Hg)	70.12 ± 5.3	63.61 ± 4.17	0.000*

Los datos se presentan como media ± D.E. IMC = Índice de masa corporal; PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica. * **p <0.01**

Cuadro 12. Perfil bioquímico de los sujetos de estudio

	Pre- Tratamiento (n= 50)	Post- Tratamiento (n = 50)	T de student
Glucosa (mg/dL)	87.5 (84-93)	82 (76.25-88.5)	0.000*
CT (mg/dL)	197.59 ± 36.97	181.36 ± 32.65	0.000*
C-LDL (mg/dL)	156.14 ± 34.47	139.62 ± 31.01	0.006**
C-HDL (mg/dL)			
mujeres	34.73 (30.35-41.25)	41.53 (31.78-51.89)	0.000*
hombres	33.55 (30.07- 34.04)	37 (36.29-39.1)	0.003**
Tg (mg/dL) ^{&}	155.5 (125.5-211.75)	122 (96.75-166.5)	0.000*

Media ± D.E, mediana (rango intercuartilar); CT=Colesterol Total; C-LDL=Colesterol de lipoproteínas de baja densidad; C-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad Tg=Triglicéridos. [&] transformado logarítmicamente para análisis. *p <0.01, **p<0.05

Los pacientes presentan valores promedio de triglicéridos iguales o mayores a 150 mg/dL, colesterol de HDL bajo (mujeres C-HDL<50 mg/dL y hombres < 40 mg/dL), así como obesidad central (mujeres circunferencia cintura mayor a 88cm y hombres mayor a 102 cm, ver cuadro 11). Estos valores se ubican dentro de los parámetros de síndrome metabólico de acuerdo al ATP III.

Se observa en los cuadros 11 y 12 que, a excepción de la edad, *todas las características antropométricas y bioquímicas* después del tratamiento muestran diferencias significativas, teniendo disminución de peso, IMC, PAS, PAD, glucosa, CT, C-LDL y triglicéridos con un aumento también significativo de colesterol HDL.

Evaluación del método en fase semisólida: efecto de la dieta baja en fructosa en la esfingomielina presente en las subpoblaciones de HDL.

Distribución de las subpoblaciones de HDL en sujetos de estudio

Algunos resultados experimentales sugieren que las concentraciones plasmáticas de las subpoblaciones de HDL pueden ser indicativas del metabolismo de esta familia de lipoproteínas, y es muy probable que las subpoblaciones tengan diferentes potenciales antiaterogénicos de acuerdo a su composición de lípidos (Pérez-Méndez O, 2004). Por esta causa se determinó la distribución de tamaños de las HDL por su contenido de esfingomielina mediante electroforesis en gradiente de 3% a 30% condiciones nativas, según se describe en la sección de métodos.

En la figura 8 se muestra la comparación de las distribuciones relativas de HDL al ser cuantificadas por su contenido en esfingomielina aplicando el método en fase semisólida desarrollado en este trabajo a cincuenta muestras de pacientes con síndrome metabólico pre y post tratamiento de una dieta baja en fructosa.

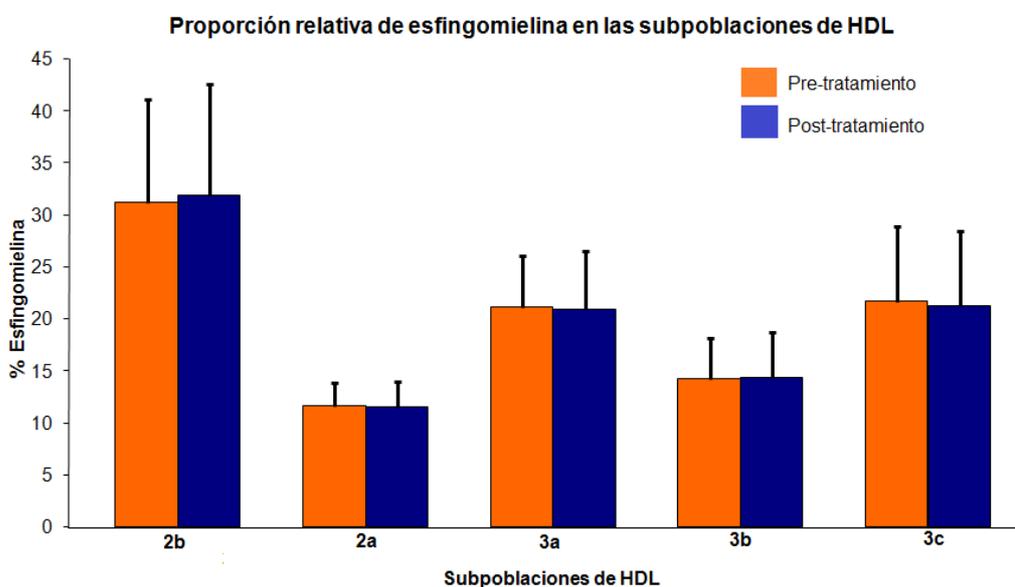


Figura 8. Comparación de las distribuciones relativas de HDL cuantificadas por su contenido en esfingomielina pre y post tratamiento dieta baja en fructosa. Los valores son expresados como la media \pm DE; n=50. Prueba t de Student.

De acuerdo a la figura 8, se observa que no hay cambio alguno en la proporción relativa de esfingomielina en ninguna de las subclases de HDL después del tratamiento (dieta baja en fructosa).

Posteriormente se realizaron análisis de correlación para determinar los parámetros que pueden determinar la proporción relativa de esfingomielina en cada una de las subclases. Para ello se realizaron análisis de correlación bivariada de Pearson entre el contenido de esfingomielina asociada a cada una de las subclases de HDL (porcentaje relativo) y el colesterol-HDL, ambos pre y post tratamiento, respectivamente. Los resultados se muestran en el gráfico 9.

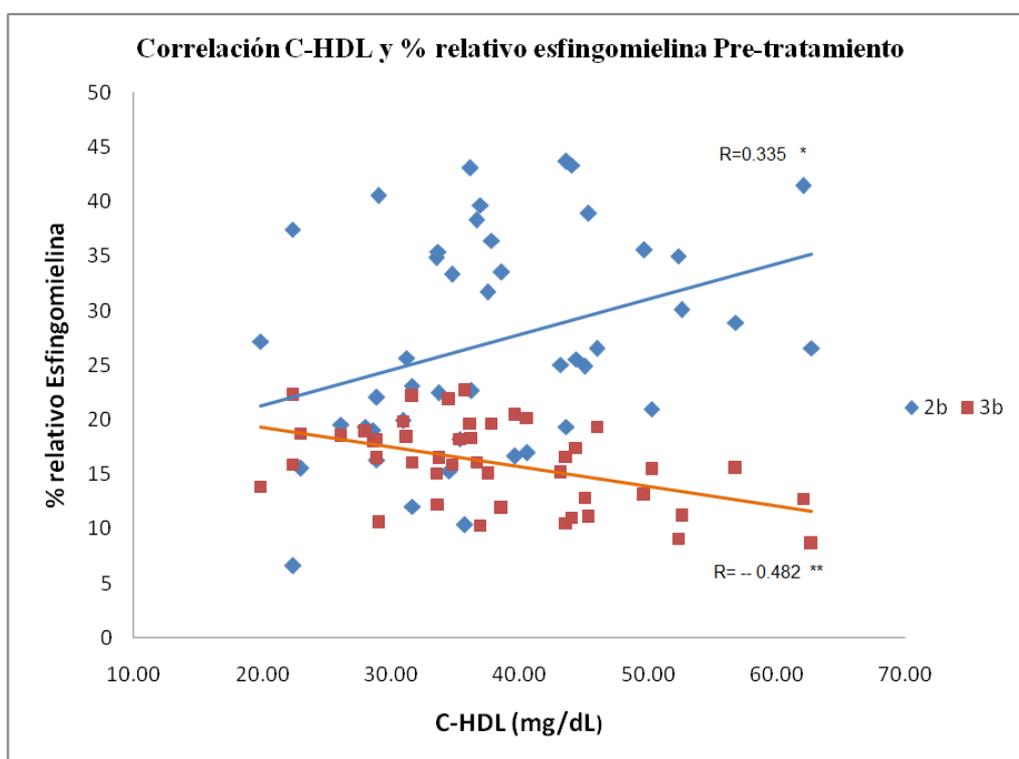


Gráfico 9. Análisis de correlación de C-HDL y el porcentaje relativo de esfingomielina.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Para las muestras pre tratamiento, solo las subclases HDL2b y 3b muestran diferencias significativas (para 2b, $r=0.335$, significancia 0.024, $p<0.05$; para 3b, $r = -0.482$, significancia 0.001, $p<0.01$), tal como se muestra en el gráfico 9. El porcentaje relativo de esfingomielina para la subclase 2b correlaciona de manera positiva con el C-HDL. Por otro lado, para la subclase 3b, esta correlación es negativa.

Con respecto a las muestras post tratamiento, no hay correlación entre contenido de esfingomielina asociada a cada una de las subclases de HDL (porcentaje relativo) y el colesterol-HDL post tratamiento (datos no mostrados).

El método desarrollado en fase semisólida nos permite conocer la proporción relativa de esfingomielina presente en las subclases de HDL. Sin embargo, es importante enfatizar que se trata de un método semi-cuantitativo, por lo que los resultados no se pueden expresar en concentración. Para hacer esto posible y determinar los niveles séricos de esfingomielina asociada a las HDL, utilizamos el método en líquido.

Aplicación del método en fase líquida: efecto de la dieta baja en fructosa en la esfingomielina sérica y de HDL.

Mediante el método en fase líquida es posible determinar la esfingomielina total (sérica). Al cuantificar la esfingomielina presente en el sobrenadante de las lipoproteínas que contienen apo B (sLpB), por diferencia podemos obtener la esfingomielina asociada a HDL, de la siguiente manera:

$$\text{EM de HDL} = \text{EM total (sérica)} - \text{EM Lipoproteínas que contienen apo B}$$

De esta forma determinamos la concentración de esfingomielina asociada a HDL pre y post tratamiento.

En el cuadro 13 se muestra la concentración de esfingomielina del sLpB, la asociada a HDL y los niveles séricos pre y post tratamiento.

Cuadro 13. Concentración de EM sérica, asociada a las lipoproteínas que contienen Apo B (sobrendante) y asociada a HDL pre y post tratamiento.

Concentración			
(mg/dL)			
	Pre Tratamiento n=50	Post-Tratamiento n=50	Prueba T
EM sérica (mg/dL)	19.12 ± 8.86	15.94 ± 6.47	0.019*
EM de Lp que contienen apo B (mg/dL)	8.64 ± 4.34	8.47 ± 4.8	0.85
EM asociada a HDL (mg/dL)	10.47 ± 6.4	7.46 ± 4	0.01*

Prueba T de Student pareada. *p < 0.05

Como se puede observar en el cuadro 13, la concentración de EM sérica disminuyó significativamente después de la restricción de fructosa a expensas de la EM asociada a HDL. Por otra parte, la EM de las lipoproteínas que contienen Apo B no tuvo cambio alguno después del tratamiento.

Posteriormente se realizaron análisis de correlación para determinar los parámetros que pueden determinar la concentración de esfingomielina sérica y asociada a las HDL. Para ello se realizaron análisis de correlación bivariada de Pearson.

Análisis de correlación entre características clínicas, perfil bioquímico y composición química de las subpoblaciones de HDL

Se realizaron análisis de correlación entre el porcentaje relativo de esfingomielina de las subpoblaciones de HDL y su posible relación con algunas variables clínicas como peso, índice de masa corporal (IMC), diámetro de la cintura, presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y bioquímicas como colesterol total, C-HDL, C-LDL, glucosa y triglicéridos con la finalidad de comprender qué parámetros intervienen en el desarrollo de la EAC. Se muestran únicamente los cuadros cuyos parámetros muestran valores de correlación con significado estadístico.

En el cuadro 14 se presenta el análisis de correlación entre las subclases de HDL (pre y post tratamiento) con respecto a las variables clínicas presión arterial sistólica y diastólica (basal y final) así como el delta de esfingomielina sérica.

Cuadro 14. Análisis de correlación entre las subclases de HDL con respecto a las variables clínicas presión arterial y delta de esfingomielina sérica.

	<i>Valor estadístico</i>	ΔEM <i>sérica</i>	<i>Presión Arterial Sistólica basal</i>	<i>Presión Arterial Sistólica final</i>	<i>Presión Arterial Diastólica basal</i>	<i>Presión Arterial Diastólica final</i>
HDL_{2b} <i>Pre tratamiento</i>	Coeficiente r	-0.358*	-0.303*	-0.096	-0.386**	0.031
	Significancia p	0.018	0.041	0.527	0.008	0.837
HDL_{2a} <i>Pre tratamiento</i>	Coeficiente r	-0.124	0.045	0.111	-0.075	0.039
	Significancia p	0.429	0.765	0.462	0.620	0.798
HDL_{3a} <i>Pre tratamiento</i>	Coeficiente r	0.365*	0.269	0.255	0.214	-0.011
	Significancia p	0.016	0.070	0.133	0.153	0.943
HDL_{3b} <i>Pre tratamiento</i>	Coeficiente r	0.527	0.155	0.051	0.256	-0.075
	Significancia p	0.000	0.305	0.737	0.086	0.619
HDL_{3c} <i>Pre tratamiento</i>	Coeficiente r	0.014	0.138	-0.086	0.278	-0.010
	Significancia p	0.929	0.362	0.570	0.061	0.949
HDL_{2b} <i>Post tratamiento</i>	Coeficiente r	-0.400**	-0.379**	-0.106	-0.449**	0.077
	Significancia p	0.008	0.009	0.482	0.002	0.610
HDL_{2a} <i>Post tratamiento</i>	Coeficiente r	-0.115	-0.093	0.014	-0.158	0.104
	Significancia p	0.462	0.538	0.928	0.293	0.490
HDL_{3a} <i>Post tratamiento</i>	Coeficiente r	0.448**	0.214	0.036	0.178	-0.064
	Significancia p	0.003	0.154	0.813	0.237	0.673
HDL_{3b} <i>Post tratamiento</i>	Coeficiente r	0.531	0.131	0.028	0.172	-0.067
	Significancia p	0.000	0.386	0.856	0.252	0.660
HDL_{3c} <i>Post tratamiento</i>	Coeficiente r	-0.038	0.360*	0.112	0.494	-0.062
	Significancia p	0.807	0.014	0.459	0.000	0.682
ΔEM <i>sérica</i>	Coeficiente r	-	0.373*	0.111	0.398**	0.178
	Significancia p		0.011	0.464	0.006	0.237

Los resultados de análisis de correlación muestran que la subclase HDL2b, tanto pre como post tratamiento, correlaciona negativamente con el delta de EM sérica, presión arterial sistólica y diastólica basales (cuadro 14). Asimismo, las HDL3a (pre y post tratamiento) correlacionan positivamente con el delta de EM sérica. La presión arterial sistólica basal correlaciona positivamente con las HDL3c así como con el ΔEM sérica. Este último también correlacionó positivamente con la presión arterial diastólica basal.

DISCUSIÓN

Con este trabajo hemos desarrollado una metodología que permite la cuantificación de las diferentes subclases de HDL de acuerdo a su contenido en esfingomielina; además se adaptó el método en fase líquida que permite determinar los niveles séricos del esfingolípido. Adicionalmente este último se empleó para determinar la concentración de EM asociada a HDL así como a las lipoproteínas que contienen Apo B (VLDL, IDL, LDL). Con base en la información con la que contamos, el método en fase semisólida, así como la aplicación del método en fase líquida para determinar la EM asociada a las HDL son completamente nuevos y no hay referencia alguna en la literatura.

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han mostrado claramente una asociación inversa e independiente entre el C-HDL y el riesgo de EAC relacionando así a las HDL con un efecto cardioprotector (Assmann G *et al*, 1996; Gordon y Rifkind, 1989), aunque se ha sugerido que algunas subpoblaciones son más ateroprotectoras que otras (Asztalos y Schaefer, 2003; Barter *et al*, 2003). Sin embargo, el tamaño de la partícula HDL no es un parámetro suficiente para su clasificación. En el presente estudio se propuso que al separar a las HDL por su tamaño, es posible que aún existan diferencias en base al contenido de lípidos entre subclases de un mismo diámetro hidrodinámico; estas diferencias son resultado de circunstancias fisiopatológicas (Pérez-Méndez, 2004). Por tanto, la cuantificación de los lípidos presentes en las subpoblaciones de HDL puede proporcionar más información acerca de cuál subclase tiene mayor potencial antiaterogénico con el propósito de utilizar a las subclases de HDL como una herramienta adicional para establecer el riesgo coronario.

En este sentido, estudios previos han demostrado que el contenido de fosfolípidos es un factor determinante en el metabolismo de las HDL (Pérez-Méndez *et al*, 2007; Carreón-Torres *et al*, 2008). En un estudio en conejos hipercolesterolémicos, la infusión intravenosa de vesículas de fosfatidilcolina promovió una reducción parcial de los depósitos de colesterol en las lesiones aórticas (Rodríguez *et al*, 1998). Sin

embargo, no hay muchos estudios acerca de otro fosfolípido clave en el metabolismo de las HDL, la esfingomielina.

Actualmente la esfingomielina se ha implicado en desarrollo y progresión de la aterosclerosis, sugiriendo que puede jugar un rol promotor, pero existen pocos datos en humanos, por tanto la medición de EM puede proveer nuevos enfoques en la aterogénesis humana así como en varios modelos animales, por tanto el contar con técnicas sensibles y fiables para su cuantificación son de considerable importancia.

No se han descrito cuáles de las subclases de las HDL transportan más EM y la vectorizan eficientemente a la célula, en parte, porque hasta antes del presente estudio no existía método alguno para cuantificar la esfingomielina asociada a cada una de las subclases de HDL. Asimismo, aunque existe un método para determinar los niveles séricos de EM (Hojjati *et al*, 2005), no hay referencia alguna en la literatura de un método que permita cuantificar la esfingomielina asociada a HDL, por lo cual surgió la necesidad de desarrollar un método que permita determinar ambos parámetros.

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 (Freedman *et al*, 1998; Otvos *et al*, 1991) y la electroforesis en doble dimensión con revelado de las subclases de HDL por inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti apo AI (Asztalos, 2004). Ambos métodos presentan una relación estrecha con la electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) como la que hemos aplicado en el presente estudio. Por 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 la esfingomielina sobre el gel de poliacrilamida. La mezcla enzimática en fase gel permite el contacto adecuado entre las enzimas y el sustrato, 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 estableció la concentración adecuada de enzimas que permitiera revelar la EM sobre el gel de poliacrilamida. Existen muy pocos trabajos previos que hayan ensayado reactivos de este tipo; en nuestro laboratorio se han desarrollado

métodos para cuantificar colesterol total, colesterol libre, fosfolípidos totales, y triglicéridos de las HDL, sin embargo, no existía ninguno capaz de revelar la EM de dichas subclases. 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 EM en plasma (Hojjati *et al*, 2005). A partir de estas cantidades realizamos los ensayos para establecer una proporción adecuada de enzimas 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 mínima cantidad de enzimas; fueron seleccionadas aquellas concentraciones que permitieron obtener los densitogramas más definidos, mismas que se presentan en la sección de resultados.

También se determinó el intervalo lineal de respuesta por proteína así como por esfingomielina, detallado en la sección de resultados. Aunque la determinación por EM es lineal hasta el equivalente a 100 μg de proteína, por proteína lo es hasta 25 μg . Dado que debe ser lineal por ambos, se eligió el equivalente a 25 μg para el método.

En lo referente a reproducibilidad y repetibilidad, el coeficiente de variación está en un rango de 6-7% en las diversas subclases. Es importante señalar que el método utilizado para la separación de las subclases de HDL es el gel en gradiente de poliacrilamida en condiciones nativas, por lo que la variación metodológica aumenta con respecto a los métodos analíticos convencionales, que presentan coeficientes de variación menores al 5%, por lo que el presente método en PAGE es semicuantitativo.

Aunque el método es semicuantitativo, nos proporciona mucha información acerca de la composición química de las subclases de acuerdo a su contenido en esfingomielina, considerando que ningún otro método publicado nos da esos datos.

Con el objetivo de hacer el método cuantitativo en un futuro, así como para determinar los niveles séricos de esfingomielina así como de HDL, se procedió a realizar la adaptación del método en líquido desarrollado originalmente por Hojjati *et al*, 2005.

El método en fase líquida se desarrollo empleando la misma serie de reacciones enzimáticas que en la fase semisólida, sin embargo, era preciso elegir un donador de electrones adecuado. Inicialmente se utilizó el azul de tetrazolium (MTT) debido a que es el donador de electrones empleado en la fase semisólida, sin embargo, no es apto

para utilizarlo como donador en fase líquida pues tiene una baja sensibilidad, de acuerdo a los resultados mostrados. Es interesante destacar que el MTT dió muy buenos resultados en fase semisólida y no en fase líquida.

Se puede pensar que en fase líquida existe mayor contacto entre los reactivos para llevar a cabo la reacción. Sin embargo, recordemos en la fase semisólida no se parte de suero total, sino de HDL purificadas por ultracentrifugación diferencial, y posteriormente separadas, pero también concentradas en gel de gradiente de poliacrilamida, por lo que la reacción es local, y el sustrato (esfingomielina) está más disponible para las enzimas del reactivo.

Por lo anterior, se empleó la combinación de 4-amino antipirina y fenol, ya que existe referencia en la literatura en estudios muy recientes que ese donador es apto para la determinación de esfingomielina en fase líquida en el plasma de pacientes (Yeboah, Xian-Cheng, 2010). Aunque la determinación con un testigo positivo de esfingomielina daba lugar a una reacción cuantificable espectrofotométricamente, al utilizarlo con muestras de suero o plasma esto no sucedía. El estándar es esfingomielina de alta pureza (Sigma), mientras que la muestra (suero) contiene poca esfingomielina con respecto al estándar. Eso significaba que era necesario un donador de electrones más eficiente que el empleo de la combinación 4-aminoantipirina y fenol.

A continuación se utilizó como donador de electrones DAOS en combinación con la 4-amino antipirina como donadores, ya que en estudios anteriores de estos mismos autores se utilizó como donador para la determinación de esfingomielina (Hojjati y Xian-Cheng, 2006). El DAOS mostró, a diferencia de la combinación 4-amino antipirina-fenol, una mayor sensibilidad. Esto es importante ya que la esfingomielina no es tan abundante como el colesterol en el plasma. El DAOS se utilizó para nuestro estudio como donador de electrones en concentración de 0.73 mM en combinación con 4-amino antipirina 0.73 mM.

Con respecto a la muestra biológica, cabe hacer mención que la esfingomielinasa es dependiente de Ca^{2+} (Chatterjee, 1999), por lo que las muestras de plasma-EDTA o citrato son inadecuadas para la determinación de la esfingomielina. Por la misma razón, es necesario adicionar Ca^{2+} en el amortiguador de la reacción. El ión calcio añadido

activa la cascada de coagulación produciendo fibrina en el caso de muestras de plasma, resultando en una turbidez que interfiere en la reacción. Por todo lo anterior, la muestra biológica óptima es suero para la cuantificación de esfingomielina por el método desarrollado.

En lo referente al uso de detergentes se utilizó tritón y se probó el colato de sodio. Este último es un ácido biliar que es parte de los reactivos en todos los estudios con reactivos reveladores de lípidos desarrollados en el laboratorio. Su función es exponer a los lípidos embebidos en la estructura de las lipoproteínas para su mejor detección, sin embargo en los dos reactivos comerciales (Echelon y Cayman) no es parte de la composición del reactivo. Se evaluó su utilidad como se muestra en la sección de materiales y métodos así como en resultados y se observó que, aunque para la curva patrón había una pequeña mejora en la señal, para las muestras es contraproducente, ya que la señal disminuye notoriamente (ver cuadro 9 sección resultados), por lo cual no fue utilizado para la formulación final del reactivo en fase líquida.

Para este método es necesario contar con algunos blancos, uno de ellos, el blanco de suero (20 μ L de suero y 200 μ L de amortiguador) es necesario, sobre todo por la población de estudio (pacientes con síndrome metabólico). Éstos presentan dislipidemias y alto contenido de triacilgliceroles, por lo que en algunos casos el suero se muestra turbio, aun en ayuno, por tanto, dependiendo de la cantidad de lípidos presentes en el suero del individuo presentan diferencias en la absorción y es necesario considerarlas.

El blanco de suero, al igual que para el reactivo de color, debe ser adicionado con tritón al 2%. Con el detergente disminuye significativamente la turbidez de las muestras ya que los lípidos presentes en la misma se emulsionan.

Adicionalmente es importante tener un blanco de reactivo de color con enzimas. Es muy importante la preparación del reactivo de color, que se debe realizar como se detalla en la sección de materiales y métodos, adicionando hasta el momento de su uso la peroxidasa. El reactivo de color (DAOS/ 4-aminoantipirina) en conjunto con los otros componentes del reactivo exceptuando la peroxidasa es casi transparente, mientras que al agregar la peroxidasa el reactivo sufre oxidación generando un color azul. La diferencia del blanco de reactivo de color con enzimas con respecto a la reacción es significativa.

Por último, el método que desarrollamos es reproducible, de acuerdo a los coeficientes de variación obtenidos.

Para la determinación de la esfingomielina asociada a HDL, se realizó una adaptación del método en líquido. En principio esta determinación se intentó realizar con métodos convencionales (precipitación selectiva de lipoproteínas que contienen apo B con reactivo precipitante comercial de heparán sulfato de manganeso), sin embargo los niveles de esfingomielina no eran detectables. Posteriormente probamos con HDL concentradas en el primer paso de la ultracentrifugación diferencial, obteniendo resultados semejantes, por lo que se recurrió a determinarlo de forma indirecta, mediante la diferencia de la EM sérica (total) menos la esfingomielina presente en las lipoproteínas que contienen apo B. Este método fue nuestra elección. Sin embargo, debido a que la recuperación del sobrenadante de lipoproteínas que contienen apo B es manual, fue necesario un factor de corrección detallado en materiales y métodos.

El método en fase líquida es sensible, reproducible, y la adaptación para determinar la EM presente en las HDL, totalmente nueva. Una vez desarrollado los reactivos y determinadas las condiciones de reacción para ambos métodos, se utilizaron para cuantificar la EM en muestras biológicas.

Debido a que el síndrome metabólico produce hipoalfalipoproteínemia (bajos niveles de plasmáticos de colesterol de HDL), alteración en los tamaños de HDL (Pérez-Méndez *et al*, 2004) y cambios de la composición química de las subclases de HDL (García-Sánchez *et al*, 2011), decidimos probar el método en muestras de pacientes con síndrome metabólico, que fueron sometidos a una dieta baja en fructosa.

Se ha propuesto que una de las causas que pueden originar el síndrome metabólico es la ingesta excesiva de productos que contienen azúcar añadido, en particular fructosa, que podrían inducir todas las características de SM. Éste efecto puede ocurrir independientemente de la ingesta calórica. Por lo tanto, una restricción del consumo de este carbohidrato mejoraría los factores de riesgo intrínsecos al síndrome.

Considerando que la EM participa en el desarrollo del ateroma (Alewijnsse, 2008), situación fisiopatológica *asociada* al síndrome metabólico, es posible que una dieta baja en fructosa repercuta tanto en la concentración de esfingomielina en plasma como en la distribución de la misma en las diferentes fracciones lipoprotéicas.

En principio se evaluaron las características antropométricas y bioquímicas de los sujetos de estudio, los cuales presentaron valores promedio de triglicéridos iguales o mayores a 150 mg/dL, colesterol de HDL bajo, así como obesidad central. Estos valores se ubican dentro de los parámetros de síndrome metabólico de acuerdo al ATP III.

Después de la restricción de fructosa, se observaron en todas las características antropométricas y bioquímicas diferencias significativas, teniendo disminución de peso, IMC, presión arterial sistólica y diastólica, glucosa, CT, C-LDL y triglicéridos con un aumento también significativo de colesterol HDL.

Este resultado es congruente con la idea que el síndrome metabólico puede ser causado en parte por la ingesta de grandes cantidades de fructosa añadida, aunque no son resultados definitorios para corroborar esta relación causal. Los pacientes después del tratamiento, restablecieron los niveles de triglicéridos por debajo del nivel de referencia; con respecto a la obesidad central y colesterol de HDL mejoraron su condición clínica, aunque no llegaron a los valores sugeridos por las instituciones de salud, en parte, porque el estudio duró solamente seis semanas, sin embargo la mejoría es evidente.

Por las evidencias anteriores, la restricción de fructosa añadida impacta significativamente todos los factores de riesgo asociados al SM.

Por medio del método en fase semisólida determinamos la distribución de EM en las subclases de HDL. Nuestros resultados demuestran que no hay cambio alguno en la proporción relativa de las subclases de HDL después del tratamiento (dieta baja en fructosa) cuando se determinan por esfingomielina. Resultados similares se observan cuando la proporción relativa de las subclases de HDL se determinan por otros lípidos como los ésteres de colesterol o la fosfatidilcolina (García Sánchez, CCA, 2011). La proporción relativa de las HDL se establece a partir de puntos de corte para el diámetro de las partículas preestablecidos. Cuando una partícula lipoproteica se enriquece

anormalmente con algún lípido, su diámetro se incrementa invariablemente, dando lugar a una lipoproteína de mayor diámetro que en consecuencia se clasifica en otra categoría dentro de las subclases de HDL. En otras palabras, la proporción de ciertos lípidos como los fosfolípidos totales, y aparentemente la EM, se mantiene constante en cada subclase de HDL (García Sánchez, CCA, 2011). Por esta razón, no detectamos un cambio en la proporción relativa de HDL determinada por la tinción enzimática de EM en fase gel asociado a la restricción de fructosa.

Adicionalmente se realizaron análisis de correlación para determinar los parámetros que pueden determinar la proporción relativa de esfingomielina en cada una de las subclases entre éstas y el C-HDL. Se observó que para las muestras pre tratamiento, el porcentaje relativo de esfingomielina para la subclase 2b correlaciona de manera positiva con el C-HDL. Por otro lado, para la subclase 3b, esta correlación es negativa. Las HDL grandes (2b) tienen un mayor contenido de colesterol que las HDL pequeñas (3b), por lo que el colesterol-HDL en plasma está determinado en gran medida por el número de partículas HDL grandes presentes en el plasma. En este orden de ideas, cada partícula HDL tiene un contenido definido de EM, siendo las grandes las que tienen una cantidad mayor. De esta manera se establece la correlación positiva con el colesterol HDL con las HDL2b y negativa con las HDL3b.

Debido a que el método en fase semisólida permite conocer la proporción relativa de esfingomielina presente en las subclases de HDL, pero no los niveles séricos de esfingomielina asociada a las HDL, evaluamos el método en líquido.

Los datos generados con el método en líquido mostraron que la concentración de EM sérica disminuyó después de la restricción de fructosa, así como también la concentración de EM asociada a HDL. Por otra parte, la EM de las lipoproteínas que contienen apo B no tuvo cambio alguno después del tratamiento. A nuestro conocimiento, este es el primer reporte que establece una posible relación importante entre la restricción de fructosa y los niveles séricos de esfingomielina. La etiología de la disminución selectiva que observamos de la EM de las HDL después de la restricción de fructosa es desconocida; no hay una explicación evidente entre ambos hechos, pero si

se trata de una relación causal, las implicaciones de esta observación serían muy importantes. Estudios posteriores enfocados a establecer la posible relación entre el consumo de fructosa y la EM de las HDL están garantizados.

Posteriormente, realizamos el análisis de correlación bivariada de Pearson para determinar los parámetros que pueden determinar la concentración de esfingomielina sérica y asociada a las HDL. Los resultados de análisis de correlación mostraron que la subclase HDL2b, tanto pre como post tratamiento, correlaciona negativamente con las presiones arteriales sistólica y diastólica basales. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han encontrado una relación similar entre las subclases de HDL y la presión arterial (Espinola-Zavaleta *et al*, 2009). Se ha propuesto que las HDL pueden regular la actividad de la óxido nítrico sintasa, en parte a través de su contenido en esfingomielina (Nofer *et al*, 2004). Este mecanismo vincula a las HDL con la presión arterial que de acuerdo a nuestros resultados y los previamente reportados (Espinola-Zavaleta *et al*, 2009), está relacionado con las HDL grandes. La pérdida de dicha correlación después de la intervención podría estar relacionada con la disminución de la cantidad de EM en HDL. La validez de esta hipótesis se tiene que establecer con estudios ulteriores.

Otras correlaciones destacables son las que se observaron entre las HDL2b y las HDL3a basales con el delta de EM sérica. Aparentemente, el nivel de reducción de la EM sérica que se puede alcanzar por la restricción de fructosa es dependiente de manera directa de la proporción relativa de este lípido en las HDL tipo 2b y 3a. Una posible explicación a este hecho radica en que estas dos subclases son las más abundantes en plasma, y en consecuencia, la magnitud de la disminución de EM depende de los tipos de HDL más abundantes.

CONCLUSIONES

En este trabajo hemos desarrollado una metodología que permite cuantificar todas las subpoblaciones de las HDL con procedimientos convencionales generando información sobre su composición en base a su contenido de esfingomielina. Demostramos que la ingesta de fructosa tiene una relación directa con los factores de riesgo característicos del síndrome metabólico, mejorando estas variables clínicas al restringir su consumo. Además, nuestros resultados demuestran que la proporción relativa de EM en las subclases de HDL no varía después de una restricción en fructosa, pero sí así en los niveles séricos de EM y de EM asociada a las HDL. Estos resultados sugieren que la EM de las HDL puede ser un componente del SM, pero no se conocen aún los mecanismos por los cuales se vinculan la EM y el consumo de fructosa.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. Metabolismo normal de las lipoproteínas. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán 1989; 2: 22-28.
- Alewijnse AE, Peter SL. Sphingolipid signalling in the cardiovascular system: good, bad or both? Eur J Pharmacol. 2008; 585:292–302.
- Andrieu-Abadie N; Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. Biochim. Biophys Acta 2002; 1585: 126-134.
- 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.
- Asztalos BF, Lefevre M, Foster TA, Tulley R, et. al. Normolipidemic subjects with low HDL cholesterol levels have altered HDL subpopulations. Arteriocler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1885-1893.
- Asztalos BF y Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? Atheroscler Suppl 2003; 4:21-29
- Auge N, Andrieu N, Negre-Salvayre A, Thiers JC, Levade T, Salvayre R. The sphingomyelinceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation. J Biol Chem 1996; 271:19251–19255.

B

- Bancells C, Benítez S, Jauhiainen M, Ordóñez-Llanos J, Kovanen PT, Villegas S, Sánchez-Quesada JL, Oörni K High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level. J Lipid Res. 2009 Mar; 50(3):446-55.
- Bandhuvula P, Honbo N, Wang GY, Jin ZQ, Fyrst H, Zhang M, Borowsky AD, Dillard L, Karliner JS, Saba JD. S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 May; 300(5):H1753-61.

- Barter P, Kastelein J, Nunn A, y Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* 2003 168:195-211
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007; 357:2109-2122
- Barter PJ, Rye K. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996, 7: 82 -87.
- Bhunia AK, Han H, Snowden A, Chatterjee S. Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272:15642–9.
- Bielawska AE, Shapiro JP, Jiang L, et al. Ceramide is involved in triggering of cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia and reperfusion. *Am J Pathol* 1997;151:1257–63
- Bloomgarden ZT. Obesity, Hypertension, and Insulin Resistance. *Diabetes Care* 2002; 25:2088-97.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345.
- Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004; 350:1505-1515
- Brown MS, Goldstein J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261).
- Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Stael SB, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116:1052-1062.

C

- Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, Fievet C, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand white rabbit. *Atherosclerosis* 2005; 181: 233-240
- Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter Garrido M, Toledo-Ibelles P, Gamboa R, Menjivar M, López Marure R, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolism. *ClinChimActa* 2008
- Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry* 1992, 31: 11112 – 11117.
- Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, y Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum, *J. Lipid Res.* 1981. 22:339-358.
- Chatterjee S. Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1523–33.
- Chatterjee, S., Neutral sphingomyelinase: past, present and future. *Chem Phys Lipids*, 1999. 102, 79-96.
- Chung BH, Franklin F, Liang P, Doran S, Cho BH, Curcio CA. Phosphatidylcholine-rich acceptors, but not native HDL or its apolipoproteins, mobilize cholesterol from cholesterol-rich insoluble components of human atherosclerotic plaques. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1733: 76-89

D

- Devlin CM, Leventhal AR, Kuriakose G, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I. Acid sphingomyelinase promotes lipoprotein retention within early atheromata and accelerates lesion progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1723–1730.
- Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, et al. Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation* 2007, 116:480-488, 2007

E

- Elkhailil L, Majd Z, Bakir R, Perez-Mendez O, Castro G, Poulain P, Lacroix B, et al. Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46: 474-483
- ESH y ESC. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:1105-87.
- Espinola-Zavaleta N, Soto-López ME, Carreón-Torres E, Gamboa R, Mejía AM, Márquez-Velasco R, Bojalil R, Huesca-Gomez C, Reyes PA, Pérez-Méndez O. Altered flow-mediated vasodilatation, low paraoxonase-1 activity, and abnormal high-density lipoprotein subclass distribution in Takayasu's arteritis. *Circ J.* 2009

F

- Faxon D, Fuster V, Libby P, Beckman J, Hiatt W, Thompson R, Topper J, Annes B, Rundback J, Fabunmi R, Robertson R, Loscalzo J. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: Pathophysiology. *Circulation* 2004; 109: 2617-2625.
- Festa A, Williams K, Hanley AJ, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation* 2005; 111: 3465-3472
- Ford ES, Giles WH, Dietz W. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. Findings from The Third National Health and Nutrition Survey. *JAMA* 2002; 287:356
- 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.

- Fukuda M, Nakano M, Miyazaki M, Tanaka M, Saito H, Kobayashi S et al. Conformational change of apolipoprotein A-I and HDL formation from model membranes under intercellular acidic conditions. *J Lipid Res* 2008; 49: 2419-2426
- Furtherman AH; Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*. 2004. 5, 777-782.

G

- García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, Cruz-Robles D, Carreón-Torres E, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2011 Jan 30; 412(3-4):292-8.
- Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes*, 2003; 52: 453-642
- Gordon D, Rifkind BM. Current concepts: high density lipoproteins –the clinical implications of recent studies. *N Engl J. Med*. 1989; 321: 1311-1315.
- Grandl M, Bared SM, Liebisch G, et al. E-LDL and Ox-LDL differentially regulate ceramide and cholesterol raft microdomains in human Macrophages. *Cytometry A* 2006;69: 189–91
- Grundy SM. Metabolic Syndrome: Connecting and Reconciling Cardiovascular and Diabetes Worlds. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1093-100.
- Guyton, J. R., and K. F. Klemp. Development of the lipidrich core in human atherosclerosis. *Arterioscler.1996 Thromb. Vasc. Biol*. 16: 4–11.

H

- Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 1998;273:9681–7.
- Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2005; 63: 133-157
- Hernandez OM, Discher DJ, Bishopric NH, Webster K. Rapid activation of neutral sphingomyelinase by hypoxia-reoxygenation of cardiac myocytes. *Circ Res* 2000;86:198–204.
- Hoff, H. F., and R. E. Morton. Lipoproteins containing apo B extracted from human aortas. Structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1985. 454: 183–194.
- Hojjati MR, Li Z, Zhou H, Tang S, Huan C, Ooi E, Lu S, Jiang XC. Effect of myriocin on plasma sphingolipid metabolism and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Biol Chem.* 2005 280(11):10284-9.
- Hojjati, M. and Jiang X.C. 2006. Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 47: 673-676
- Holopainen JM, Lemmich J, Richter F, Mouritsen OG, Rapp G, Kinnunen PK Dimyristoylphosphatidylcholine/C16:0-ceramide binary liposomes studied by differential scanning calorimetry and wide- and small-angle x-ray scattering. *Biophys J* 2000 78:2459–2469.
- Horacio Carbajal, Martín R. Salazar. Tratamiento de la Hipertensión Arterial en Pacientes con Enfermedad Metabólica. Federación argentina de Cardiología en línea, 2003. <http://www.fac.org.ar/1/temas/temas.php?at=17> en julio del 2011.
- Huesca C, Luc G, Duhal N, Lacroix B, Fruchart J, Pérez-Méndez O. Ciprofibrate increases synthesis and catabolism of HDL apo AI and AII in patients with hypertriglyceridemia (Abstract). *Atherosclerosis suppl* 2004; 5: 64
- Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Bioph Acta* 2000; 31(1485):63–99.

I

- INEGI/Secretaría de Salud. DGIS, 2008. Elaborado a partir de base de datos de defunciones 2008 y CONAPO, 2006. Proyecciones de Población de México 2005-2050.

J

- Jarret RJ. Type 2 [non-insulindependent] diabetes mellitus and coronary heart disease-chicken, egg or neither? *Diabetologia* 1984; 26:99-102.
- Jeong, T., S. L. Schissel, I. Tabas, H. J. Pownall, A. R. Tall, and X. C. Jiang. Increased sphingomyelin content of plasma lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice reflects combined production and catabolic defects and enhances reactivity with mammalian sphingomyelinase. *J. Clin. Invest.* 1998.101: 905–912.
- Jiang XC, Paultre F, Pearson TA, Reed RG, Francis CK, Lin M, Berglund L, Tall AR. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2614 –2618.
- Jin ZQ, Goetzl EJ, Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* 2004;110:1980–9.
- Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* , 2007, 86:899-906

K

- Kannel WB. High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1983 Aug 22;52(4):9B-12B.
- 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
- Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Nègre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles:

relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1843-9.

- Kontush A., Chapman, M.J. Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 58:342-374, 2006

L

- Lamarche B, Moorjani S, Cantin B. Associations of HDL₂ and HDL₃ subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1098-1105.
- Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Bagdade JD. Lipoprotein composition and HDL particle size distribution in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus and the effects of probucol treatment. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 120–128.
- Li H, Junk P, Huwiler A, et al. Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002
- Lorenzo, Blanco-Colio, Martín-Ventura, Sánchez-Galán, Ares-Carrasco, Zubir, Egido, Tuñón. Nuevos mediadores implicados en la génesis de la aterosclerosis. *Clin Invest Arterioscl.* 2009; 21:25-33.
- Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

M

- MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Green T, Barakat HA. Lipoprotein subpopulation distributions in lean, obese, and type 2 diabetic women: a comparison of African and white Americans. *Obes Res* 2000; 8: 62-70
- Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, et al. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 1998;273:4081–4088.

- Mukhin DN, Chao FF, Kruth HS. Glycosphingolipid accumulation in the aortic wall is another feature of human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:1607–1615.

N

- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol* 2006; 290: F625–F631.
- Nelson JC, Jiang XC, Tabas I, Tall A, Shea S. Plasma sphingomyelin and subclinical atherosclerosis: findings from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2006;163:903–912.
- Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004; 113:569–81.

O

- Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem.* 1991 Mar; 37(3):377-86.

P

- Park TS, Panek RL, Mueller SB, Hanselman JC, Rosebury WS, Robertson AW, Kindt EK, Homan R, Karathanasis SK, Rekhter MD. Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2004; 110:3465–3471.
- Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, et al. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res* 2007; 100:41–9.
- 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.

- 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
- Perez-Mendez O, Bruckert E, Franceschini G, Duhal N, Lacroix B, Bonte JP, et al. Metabolism of apolipoproteins AI and AII in subjects carrying similar apoAI mutations, apoAI Milano and apoAI Paris. *Atherosclerosis* 2000; 148: 317-325
- Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *ClinChimActa* 2007; 376: 17-22.
- Pérez Méndez Óscar. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? *Arch. Cardiol. Méx.* 2004, vol.74, n.1, pp. 53-67
- Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes.* 2010 Mar; 34(3):454-61.
- Plump and Breslow. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu. Rev. Nutr.* 15: 495–518. 9.

R

- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-607
- Reungjui S, Roncal CA, Mu W, et al. Thiazide diuretics exacerbate fructose-induced metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2724-31.
- Reza Hojjati and Xian-Cheng Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 2006; 47: 672-676
- Rodriguez, J. L., G. C. Ghiselli, D. Torreggiani, and C. R. Sirtori. 1976. Very low density lipoproteins in normal and cholesterol-fed rabbits: lipid and protein composition and metabolism. Part 1. Chemical composition of very low density lipoproteins in rabbits. *Atherosclerosis.* 1995.23: 73–83.

- Rodriguez VA, Klimuk SK, Pritchard PH, Hope MJ. Cholesterol mobilization and regression of atheroma in cholesterol-fed rabbits induced by large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1368:306–320.
- Rojas R, Aguilar-Salinas CA, Jiménez-Corona A, Shamah-Levy T, Rauda J, Avila-Burgos L, Villalpando S, Ponce EL. Metabolic syndrome in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006 *Salud Publica Mex.* 2010; 52 Suppl 1:S11.
- Roncal CA, Reungjui S, Sanchez-Lozada LG, et al. Combination of Captopril and Allopurinol Retards Fructose-Induced Metabolic Syndrome. *American journal of nephrology* 2009;30:399-404
- Rong Tao, Hoover, Honbo, Kalinowski, Alano, Karliner, and Raffain High-density lipoprotein determines adult mouse cardiomyocyte fate after hypoxia-reoxygenation through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 March; 298(3): H1022–H1028.
- Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1996; 271:4243– 4250.
- Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. 2009 The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* Apr;50 Suppl:S195-2009

S

- Sattler K, Levkau B. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc Res* 2009;82:201–11.
- Schissel SL, Tweedie-Hardman J, Rapp JH, Graham G, Williams KJ, Tabas I Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J Clin Invest* 1996. 98:1455–1464.
- Schlitt, Hojjati, von Gizycki, et al. Serum sphingomyelin levels are related to the clearance of postprandial remnant-like particles. *J. Lipid Res.* 2005 46(2), 196-200.
- Smith EB. Intimal and medial lipids in human aorta. *Lancet.* 1960;1: 799–803.

- Stuart Ira Fox, Fisiología, décima edición, Madrid, España, 2008. pp 419-420
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Rev* 2003;4:397–407.
- Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.
- 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
- Stanhope, Schwarz, Keim, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucosesweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1322–1334.
- Stanhope KL, Havel PJ. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 1733S–1737S.
- Subbaiah PV, Horvath P, Achar SB. Regulation of the activity and fatty acid specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by sphingomyelin and its metabolites, ceramide and ceramide phosphate. *Biochemistry*. 2006 Apr 18; 45(15):5029-38.
- Subbaiah PV, Liu M. Role of sphingomyelin in the regulation of cholesterol esterification in the plasma lipoproteins. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J Biol Chem*. 1993; 268:20156 –20163.

T

- Tabas I. Sphingolipids and atherosclerosis: a mechanistic connection? A therapeutic opportunity? *Circulation*. 2004; 10:3400 –3401.
- Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1562–1569.

- Toledo-Ibelles, García-Sánchez, Ávila-Vazzini, Carreón-Torres, Posadas-Romero, Vargas-Alarcón, Pérez-Méndez. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. 2010. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. 1 – 33
- Toledo Ibelles, Paola (2008). 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 fisiopatológicas. (Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Química [en línea] http://p8080132.248.9.9.pbidi.unam.mx:8080/tesdig2/Procesados_tesis_2008/septiembre/0631761/Index.html. Marzo 2011
- Trejo Gutiérrez Jorge F. Estrategias en la prevención primaria de la enfermedad aterosclerosa coronaria. Archivos de Cardiología de México. Vol. 71 Supl. 1/Enero-Marzo 2001:S168-S170

V

- Van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ES, et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for CV risk: the ideal and epic norfolk studies. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 634–642
- Vessey, Luyi Li, Norman Honbo, and Joel S. Karliner. Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and post conditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 October; 297(4): H1429–H1435
- Voet D, Voet J. *Biochemistry* 2a. edición. USA 1995. pp. 690-704
- Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 404-416.
- 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.

Y

- Yatomi Y, Ohmori T, Rile G, Kazama F, Okamoto H, Sano T, Satoh K, Kume S, Tigyi G, Igarashi Y, Ozaki Y 2000 Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 96:3431–3438.
- Yeboah J, McNamara C, Jiang XC, Tabas I, Herrington DM, Burke GL, Shea S. Association of plasma sphingomyelin levels and incident coronary heart disease events in an adult population: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Mar; 30(3):628-33.

ANEXO 1

Determinación de proteínas por el método de Lowry (A. Lowry OH *et al*, 1951).

FUNDAMENTO.

En medio alcalino los aminoácidos de las proteínas se unen a los iones de cobre (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 Na_2CO_3 :	20 % en H_2O
Solución de tartrato de sodio y potasio:	1 g + CuSO_4 :0.5g
Solución de NaOH 0.8 M:	16g en 500 mL H_2O
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 Na_2CO_3
- 2 volúmenes de NaOH
- 2 volúmenes de SDS
- 2 volúmenes de H_2O

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	1	2	3	4	5	6	muestra
MUESTRA (μL)	0	0	0	0	0	0	20
STD (μL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (μL)	100	90	80	60	20	0	80

Agregar 1 mL de solución A y se mezclar las soluciones, incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al término de este tiempo agregar 500 μL de reactivo de Folin previamente diluido en una proporción 1/6. Incubar esta mezcla de reacción

durante 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.

ANEXO 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

SOLUCIONES

Solución amortiguadora de muestra

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

Solución A: Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08M, EDTA 3mM (TBE 1X) pH 8.35

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

Solución C= persulfato de amonio 10%

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

Las soluciones de acrilamida al 3% y 30% se colocan por separado en los compartimentos de la cámara generadora de gradiente y se mezclan lenta y progresivamente con agitación constante mientras se va vertiendo entre las placas para formar el gel en presencia de los catalizadores (Temed y persulfato de amonio, solución C).

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 con 3 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 90 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 esfingomielina).