



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

Maestría en Investigación en Salud

Estandarización de la doble dimensión para la evaluación del perfil proteómico de las pequeñas y densas partículas de colesterol (sd-
LDL) en personas con y sin diabetes

Tesis presentada por:

IB. Sushally Guadalupe Uc Colli

En opción al grado:

Maestra en Investigación en Salud

Directores de Tesis

Dr. Julio César Lara Riegos

Dr. Julio César Torres Romero

Mérida, Yucatán, México, 2019



UADY

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

"Luz, Ciencia y Verdad"

*Posgrado Institucional en
Ciencias de la Salud*

PICSA/105/19
22 de octubre de 2019.

La tesis "Estandarización de la doble dimensión para la evaluación del perfil proteómico de las pequeñas y densas partículas de colesterol (sd-LDL) en personas con y sin diabetes", presentada por la IB. Sushally Guadalupe Uc Colli, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Investigación en Salud, ha sido aprobada en su contenido científico y en cuanto al cumplimiento de los establecido en el Plan de Estudios vigente del Posgrado Institucional en Ciencias de la Salud.

ATENTAMENTE



UADY
POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD
DR. JULIO CESAR TORRE
COORDINADOR DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

c.c.p. Archivo

Av. Itzaes x 59 y 59 A. Facultad de Medicina. C.P. 97000 Mérida, Yucatán, México.
Tel. (999) 9240554, 9233297 Ext. 36163. <http://www.pics.uady.mx>

Agradecimientos académicos

Al **Dr. Julio César Lara Riegos** por brindarme la oportunidad de incorporarme al laboratorio y por proporcionarme las condiciones adecuadas para terminar el proyecto a tiempo. Así como el apoyo en cuestiones académicas y personales.

Al **Dr. Julio César Torres Romero** por brindarme la oportunidad de realizar el proyecto. Además de la ayuda en las cuestiones académicas y administrativas, pero sobretodo por el apoyo moral en los momentos difíciles.

Al **Dr. Héctor Rubio Zapata, Dra. Guadalupe Escalante, M en C. Mario Ramírez, Dra. Glendy Polanco, Dra. Elda Pacheco**, gracias por las recomendaciones, sugerencias y el interés mostrado hacia este trabajo.

Al **M.I.S. Antonio Euan Canto** por las incontables horas de apoyo dentro y fuera del laboratorio. Por brindarme tu amistad y el apoyo incondicional en los buenos y malos momentos durante el posgrado.

A los chicos del **Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular: Luis, Armin, Franco, Juan, Karina** por la amistad y la ayuda brindada en el laboratorio.

A mis compañeros de maestría, por brindarme su amistad y apoyarme en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Dedicatorias

A mi madre Enna Colli

El apoyo incondicional que me has brindado ha permitido que siga adelante en todas mis metas. A pesar de tener un trabajo demandante supiste estar presente en todos los momentos importantes de mi vida, eres símbolo de fortaleza y perseverancia. Eres una gran mamá y aunque siempre estuvimos solas nuestra familia es la mejor que pude haber tenido. Gracias por no dejar que me rindiera en los momentos difíciles. Espero que siempre estés orgullosa de mi.

A Robert Sosa

El amor incondicional que me has brindado me ha permitido continuar en los momentos difíciles. A lo largo de estos dos años me has brindado tu apoyo y consejos para poder tomar mejores decisiones.

A mi abuelo

A más de 20 años de tu partida tus enseñanzas siguen guiándome para ser una mejor persona. Siempre te seguiré queriendo.

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Índice

I	Resumen.....	1
II	Introducción.....	3
I.1	Antecedentes	3
II.1.1	Composición de los complejos lipoproteicos	3
II.1.2	Familias de lipoproteínas y su rol en el metabolismo de lípidos.....	4
II.1.2.1	Quilomicrones (CM).....	4
II.1.2.2	Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	5
II.1.2.3	Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	5
II.1.2.4	Lipoproteínas de alta densidad (HDL).....	5
II.1.3	Implicaciones de las lipoproteínas en el metabolismo.....	6
II.2	Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad (sd-LDL)	7
II.2.1	Fisiopatología de las sd-LDL	8
II.2.2	Dislipidemia diabética	11
II.3	Metodologías para el estudio de las lipoproteínas	12
II.3.1	Electroforesis de lipoproteínas	13
II.3.2	Estudios proteómicos	14
II.3.3	Estudios proteómicos a lipoproteínas.....	15
III	Hipótesis	19
IV	Objetivo general.....	19
IV.1	Objetivos específicos	19
V	Material y métodos.....	20
V.1	Tipo y diseño de estudio.....	20
V.2	Definición de las variables y escalas de medición.....	20
V.3	Criterios.....	20

V.4	Fuentes y recolección de la información.....	21
V.5	Consideraciones bioéticas.....	21
V.6	Metodología.....	22
V.6.1	Obtención de muestra sanguínea y análisis clínicos.....	24
V.6.2	Obtención de las sd-LDL por medio del método de precipitación con sales divalentes (Heparina-MgCl ₂).....	24
V.6.3	Estandarización de la electroforesis en geles de poliacrilamida para la doble dimensión.....	25
V.6.3.1	Primera dimensión en condiciones nativas.....	25
V.6.3.2	Segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes.....	26
VI	Resultados.....	27
VI.1	Primera dimensión.....	27
VI.2	Segunda dimensión.....	31
VI.3	Análisis del perfil proteómico de las muestras en paciente con <i>DM</i> y personas sanos.....	37
VI.3.4	Preparación del pool con los sueros las personas.....	37
VI.3.5	Primera dimensión.....	38
VI.3.6	Segunda dimensión.....	41
VII	Discusiones.....	44
VIII	Conclusiones.....	49
IX	Perspectivas del trabajo.....	50
X	Referencias bibliográficas.....	51
XI	Anexos.....	59
XI.1	Anexo 1. Consentimiento informado.....	59
XI.2	Anexo 2. Encuesta.....	61
XI.3	Anexo 3. Dictamen del Comité de Ética e Investigación.....	63

XI.4	Anexo 4. Figuras complementarias	64
XI.5	Anexo 5. Soluciones	66

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de las lipoproteínas.....	4
Figura 2. Síntesis de las sd-LDL.....	10
Figura 3. Diagrama metodológico.....	22
Figura 4. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 3%.	28
Figura 5. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 6% con alto voltaje.....	29
Figura 6. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 6%, 80 V por 6 h.....	30
Figura 7. Gel preparativo en gradiente del 4-20 % SDS-PAGE.....	33
Figura 8. Gradiente SDS-PAGE 4-20% con banda de sd-LDL recortada.....	34
Figura 9. Comparación de la resolución de bandas en un gel SDS-PAGE al 8 y 12%..	35
Figura 10. Perfil proteómico de las sd-LDL en el pool de personas dislipidémicas..	36
Figura 11. Primera dimensión en condiciones nativas con muestras clínicas (imagen representativa).....	40
Figura 12. Réplicas técnicas de los grupos evaluados.....	42
Figura 13. Imagen representativa de la segunda dimensión en geles SDS-PAGE al 8%.....	43

Índice de cuadros

Cuadro 1. Estudios previos para determinar la estructura o componentes de las lipoproteínas.....	16
Cuadro 2. Variables y definciones operacionales	20
Cuadro 3. Datos clínicos de los grupos de estudio	38

I Resumen

En años recientes el estudio de las pequeñas y densas partículas de colesterol de baja densidad (sd-LDL) ha cobrado importancia debido que estos complejos se encuentran en mayores concentraciones en personas con elevado riesgo cardiovascular, ya sea por dislipidemia o por complicaciones de otras enfermedades como la *diabetes mellitus* (DM). La cuantificación de estas lipoproteínas permite estimar mejor el riesgo cardiovascular; sin embargo, se desconoce como se encuentran conformadas y su implicación fisiopatológica en el desarrollo de estos padecimientos. Se ha observado que, al existir deficiencias de insulina las sd-LDL aumentan su concentración, aunque no se sabe a detalle cual es la vía por la cual son sintetizadas ni su composición proteica. El estudio de las proteínas que conforman estos complejos resulta de gran importancia para determinar como interactúan en el metabolismo para poder hallar una correlación entre su presencia y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Las herramientas proteómicas permiten estudiar a un conjunto de proteínas en cierto momento, para ello se utilizan técnicas como la cromatografía, la espectrometría de masas y los ensayos de doble dimensión para la separación e identificación de las proteínas de interés, así como de sus isoformas. Los estudios de las sd-LDL se han enfocado en la asociación de las concentraciones de estas con el riesgo cardiovascular, por lo cual la evaluación de las proteínas que contienen podría ayudar a generar herramientas para el diagnóstico y posibles dianas terapéuticas de enfermedades cardiovasculares. Los ensayos proteómicos mencionados poseen la desventaja de requerir de equipos costosos, por lo que en el presente proyecto se estandarizó un método de doble dimensión a partir de un sistema de mini geles para la evaluación del perfil proteómico de las sd-LDL. La separación de los complejos lipoproteicos de la primera dimensión se basó en la capacidad de migración de las sd-LDL en geles nativos por su densidad en regiones específicas, para que a partir de esas zonas en el gel recuperar dichos complejos y realizar un ensayo de doble dimensión en condiciones desnaturizantes para observar las fracciones proteicas presentes. El perfil proteómico obtenido por la metodología estandarizada en el presente trabajo permitió la visualización de al menos 7 bandas proteicas con pesos de entre 55 y

240 kDa. Al probar la metodología estandarizada con muestras de personas con *DM* y compararlo con el perfil de individuos con valores lipídicos normales se encontraron cambios en la presencia de algunas bandas proteicas, resaltando la variación de intensidad en las bandas P>250 y P95, así como la presencia de una banda de aproximadamente 36 kDa (P36) en personas con *DM*. Estas variaciones en la presencia o ausencia de las bandas y su intensidad sugieren el posible intercambio y agregación de proteínas no estructurales a las sd-LDL bajo ciertas condiciones no fisiológicas, en este caso a periodos de hiperglucemia, lo cual las convierte en potenciales biomarcadores.

II Introducción

I.1 Antecedentes

II.1.1 Composición de los complejos lipoproteicos

Las lipoproteínas son complejos que se encargan de transportar lípidos insolubles sintetizados en diversos tejidos hacia otros donde pueden ser metabolizados o almacenados.¹ Se encuentran conformadas por moléculas hidrofóbicas en el núcleo, particularmente triglicéridos y ésteres de colesterol, estabilizados por fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas (figura 1).¹ Se dividen en diferentes familias que difieren entre sí en las concentraciones de las partículas que las conforman, así como de las proteínas que contienen. Son capaces de reconocer receptores específicos y sufren diversas modificaciones en los tejidos, además de que pueden ser reutilizadas dependiendo del tipo de lipoproteína.^{2,3} También se encuentran implicadas en el metabolismo de lípidos, mecanismos de inflamación, entre otros. Los altos niveles de colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) y un bajo nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-c) son relacionados con riesgo cardiovascular.^{1,4}

La parte proteica de las lipoproteínas se denominan apoproteínas o apolipoproteínas. Son importantes constituyentes de las lipoproteínas debido a que juegan un rol importante en el transporte de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y ciertos tipos de vitaminas no solubles a través del intestino, hígado y tejidos periféricos.⁵ Las apoproteínas presentes en los complejos lipoproteicos pueden ser de dos tipos: integrales o periféricas. Las primeras se encuentran unidas a las membranas de las lipoproteínas de forma constitutiva, mientras que las segundas a pesar de encontrarse en la superficie de los complejos pueden ser intercambiadas de un complejo a otro.⁶

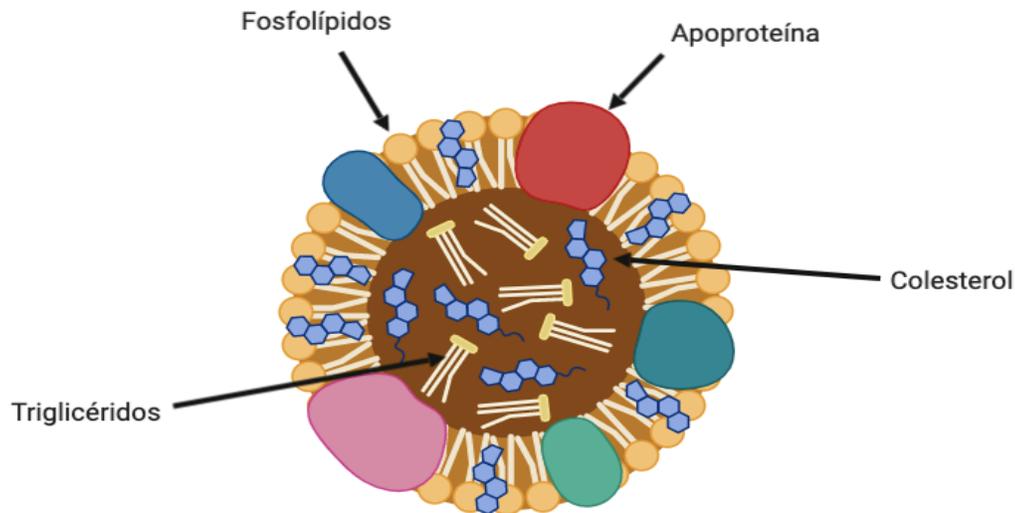


Figura 1. Estructura de las lipoproteínas. Las lipoproteínas cuentan con un núcleo compuesto de colesterol esterificado y triglicéridos. Su membrana se conforma de fosfolípidos y apoproteínas que se encargan de reconocer receptores específicos y dar soporte a la estructura.¹

II.1.2 Familias de lipoproteínas y su rol en el metabolismo de lípidos

II.1.2.1 Quilomicrones (CM)

Son partículas con altas concentraciones de triglicéridos (TG), en su mayoría provenientes de la ingesta, suelen ser transportados a tejidos periféricos y al hígado. Poseen un diámetro de entre 100 y 1200 nm. Contienen apoproteínas como la A-I, A-II, A-IV, A-V, B48, C-II, C-III y E. La ApoB-48 se caracteriza por ser el centro estructural, encontrándose presente una sola en cada quilomicrón. El tamaño de estas lipoproteínas depende de la cantidad de grasa que se ingiere de la dieta diaria. La remoción de los triglicéridos de los quilomicrones da como resultado una molécula con mayor contenido de colesterol incrementando el riesgo aterogénico.^{7,8}

II.1.2.2 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Son partículas producidas por el hígado ricas en triglicéridos, cuyo diámetro de 45-100 nm. Contienen apoproteínas como B-100, C-I, C-II, C-III y E. Cada partícula de VLDL posee una molécula de ApoB-100, siendo esta su principal componente estructural. Al igual que los quilomicrones su tamaño varía dependiendo de la cantidad de triglicéridos que posean. Al perder triglicéridos estas moléculas se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), siendo estas partículas pro aterogénicas^{7,8}

II.1.2.3 Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las LDL son una fracción de lipoproteínas heterogéneas que poseen una densidad de entre 1.006 y 1.063 g/mL, incluyendo a las IDL. En su membrana poseen una ApoB-100. Son las principales transportadoras de colesterol y se les considera el grupo más aterogénico.⁹⁻¹¹ Las LDL poseen distintas subfracciones que difieren entre sí en tamaño, carga, densidad y su composición química.^{9,12}

La ApoB-100 presente en la membrana de las LDL posee una cadena de 4536 residuos de aminoácidos. Contiene aproximadamente el 5% de carbohidratos en su estructura incluidos la manosa, galactosa, xilosa y ácido siálico.⁶

II.1.2.4 Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas con diferente densidad, tamaño, movilidad electroforética y contenido de apoproteínas. En su membrana poseen apoproteínas como ApoA-I y ApoA-II, las cuales son requeridas para la correcta biosíntesis de las HDL. ApoA-I es sintetizado en el hígado y en el intestino; es la proteína de mayor cantidad en las HDL. ApoA-II se sintetiza en el hígado y conforma el 20% de las proteínas de las HDL, encontrándose presente en dos tercios del total partículas de HDL, siendo estas apoproteínas integrales.¹³ También poseen apoproteínas periféricas como ApoC y apoE altamente intercambiables entre las HDL, CM y VLDL.

Estas lipoproteínas juegan un papel importante en el transporte de colesterol, teniendo propiedades biológicas que generan protección contra enfermedades cardiovasculares. Se ha reportado que inhiben la generación de lípidos proinflamatorios así como la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales.¹³

II.1.3 Implicaciones de las lipoproteínas en el metabolismo.

Los CM se encargan de recoger las grasas del intestino provenientes de la dieta, el reconocimiento de este proceso es gracias a la ApoB-48. Los triglicéridos contenidos en el núcleo de los CM son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol por medio de la lipoproteína lipasa con apoC-II como cofactor, produciendo remanentes de los quilomicrones, complejos de menor tamaño. El hígado se encarga de reconocer estos remanentes y de removerlos, con este paso se da por finalizado el transporte exógeno de la grasa. Con respecto a la parte endógena del transporte de grasa, el hígado se encarga de sintetizar y secretar a los complejos de VLDL ricos en triglicéridos, los cuales poseen en su membrana a la ApoB-100. En el plasma, los triglicéridos transportados por las VLDL son degradados a ácidos grasos libres y colesterol por la lipasa utilizando a ApoC-II como cofactor. Los remanentes de VLDL pasan a IDL. Algunas partículas IDL se remueven por medio de la interacción de ApoE con el receptor de LDL en la superficie del hígado. Los triglicéridos contenidos a en las IDL pueden ser hidrolizados por la lipasa hepática, produciendo complejos de LDL. Estos últimos son removidos por medio de la interacción de ApoB-100 con el receptor de LDL.^{9,11,14}

En el caso de las HDL, estas se producen en el hígado y el intestino, conteniendo en su membrana principalmente ApoA-I. Las HDL recién generadas interaccionan con células periféricas para recolectar colesterol no esterificado, dando lugar a los HDL maduras. Este colesterol es transportado al hígado y transferido a lipoproteínas que contengan a ApoB en su superficie por medio de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP).¹⁴

Cualquier desbalance entre la ingesta de calorías o en el transporte de lípidos en el organismo genera anomalías en el perfil lipídico de las personas, dando lugar a distintos padecimientos como las hiperlipoproteinemias, aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares. Entre las causas más comunes de estos desbalances se encuentra la *diabetes mellitus*, donde la deficiencia de insulina genera la movilización excesiva de ácidos grasos del tejido adiposo, así como una disminución en la eliminación de los CM, VLDL y LDL, dando lugar a la hipercolesterolemia e hipertriglicerinemia.⁶

II.2 Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad (sd-LDL)

De todas las subfracciones de LDL, las sd-LDL son las fracciones que han sido aceptadas como factor de riesgo para eventos cardiovasculares por el Tercer Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP III).^{9,15-18} En años recientes, se ha estudiado la variabilidad de estas moléculas de forma cuantitativa ya que da una idea más precisa para estimar el riesgo cardiovascular, debido a que su concentración es proporcional a la cantidad de partículas de LDL circulantes.¹⁹

Aún se desconoce por qué el aumento de estas subfracciones aumenta el riesgo cardiovascular; sin embargo, se han propuesto diversos mecanismos para determinar por qué son un factor de riesgo, entre ellos destaca el hecho de que las sd-LDL poseen una menor afinidad por el receptor de LDL, facilidad de entrada a las arterias, gran capacidad de mantenerse en ellas por su unión a proteoglicanos, por su susceptibilidad a ser oxidados y por su prolongada vida media.^{20,21} Debido a su tamaño poseen una menor cantidad de colesterol en su interior, provocando un incremento en el número de partículas aterogénicas.²²⁻²⁵ Aún se desconoce el mecanismo por el cual se generan las sd-LDL, la teoría más aceptada apunta a que diversos precursores de estas lipoproteínas son secretados por el hígado o a su síntesis por medio de modificaciones lipolíticas.⁹

La presencia de las subfracciones de LDL depende tanto de factores genéticos como de factores ambientales. En el caso de las sd-LDL, han sido relacionadas con un alto nivel de triglicéridos y con (*DM*) o síndrome metabólico.²² Las personas con

DM poseen un alto riesgo de enfermedades cardiovasculares, relacionadas con la presencia de las sd-LDL. Además de su susceptibilidad a la oxidación, las sd-LDL pueden volverse más aterogénicas debido a que son más propensas a ser glucosiladas tanto en personas con *DM*, como en personas sanas.²⁶

II.2.1 Fisiopatología de las sd-LDL

Diversas características han sido asociadas con el aumento de las sd-LDL, incluidos la resistencia a insulina, la hipertensión y bajas concentraciones de HDL. Este vínculo puede ser explicado debido a los efectos que tienen la insulina y los TG en la producción y secreción de VLDL, la actividad de la lipasa hepática y el cambio en las moléculas de LDL ricas en triglicéridos a partículas más densas y aterogénicas.^{14,27}

La insulina es un importante regulador de las concentraciones de VLDL en el plasma, se encarga de regular el flujo de sustratos para la síntesis de triglicéridos en el hígado, suprimiendo la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo.²⁷ Sin embargo, cuando existe resistencia a insulina, la liberación de ácidos grasos aumenta, promoviendo la producción de triglicéridos y a su vez estimulando la secreción de la ApoB y VLDL. La incapacidad de la insulina para detener la liberación de ácidos grasos hace que la producción de VLDL no pueda ser regulada, aumentando la acumulación de grasa en el hígado.²⁸ Por otro lado, la hiperinsulinemia también se encuentra asociada con los niveles bajos de HDL y altos niveles de las sd-LDL.²⁸

La propuesta con mayor aceptación para la síntesis de las sd-LDL es a través de las modificaciones en el metabolismo de lípidos causados por enfermedades como la *DM*, en donde se incrementan la síntesis y secreción de VLDL, lo cual conlleva a un incremento en la producción de sd-LDL y pequeñas partículas de HDL, una combinación que incrementa el riesgo cardiovascular. La resistencia a insulina causa un alto nivel de ácidos grasos libres en el plasma ocasionando que el hígado aumente la captación de estos, incrementando la producción de triglicéridos,

inhibiendo la hidrólisis de ApoB e incrementando la producción y secreción de partículas de VLDL ricas en triglicéridos.²⁰

La CETP provoca un intercambio mayor de triglicéridos en LDL y HDL, dando como resultado lipoproteínas enriquecidas en triglicéridos y reducidas en colesterol. Éstas se convierten en partículas más pequeñas y densas mediante la acción de la lipasa hepática. Las LDL ricas en triglicéridos se hidrolizan aumentando las sd-LDL. Por otro lado, las HDL ricas en triglicéridos también son modificadas por la lipasa hepática, produciendo moléculas de HDL más pequeñas, las cuales se eliminan con mayor facilidad a través de los riñones, lo que contribuye a la disminución de las HDL-C y de la ApoA-I. Estas anomalías en la vía VLDL-IDL-LDL a menudo se manifiestan por la tríada dislipidémica compuesta de niveles altos de triglicéridos, aumento de las sd-LDL y bajos niveles de HDL-C (figura 2).^{14,20}

Si bien la presencia de sd-LDL es un factor de riesgo para las enfermedades coronarias, los estudios realizados hasta fecha no han podido establecer una correlación entre el tamaño de las LDL y la severidad o tipo de padecimientos cardiacos.^{23,29} Una opción para determinar cómo las lipoproteínas influyen en algún padecimiento es por medio del estudio del complejo como tal y de sus componentes proteicos. Para ello se han utilizado diferentes técnicas de separación como las electroforesis, las cuales permiten separar en condiciones nativas al complejo y determinar si existe algún cambio en su diámetro; y en condiciones desnaturalizantes para observar sus fracciones proteicas y el tamaño que estas presentan.

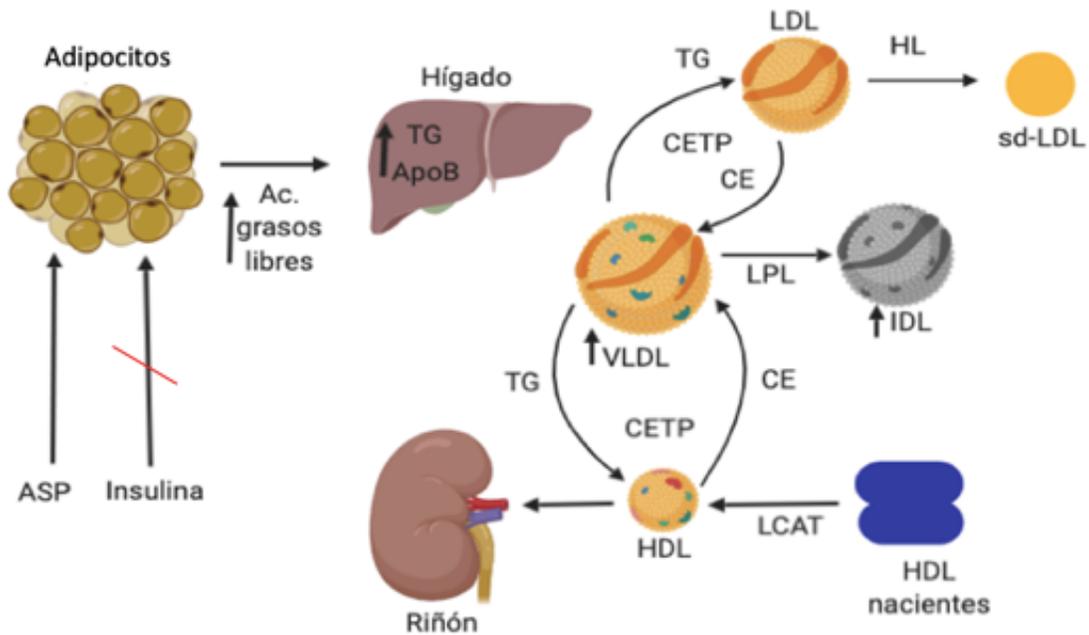


Figura 2. Síntesis de las sd-LDL. La elevación en el flujo de las ácidos grasos libres son resultado de la resistencia a insulina, dando lugar al incremento de triglicéridos (TG), apolipoproteína B y las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad). A su vez ocurre un incremento en el intercambio de triglicéridos y colesterol entre las VLDL y las LDL (lipoproteínas de baja densidad). La lipasa hepática (HL) produce la hidrólisis de las LDL generando sd-LDL. Mientras tanto, las HDL (lipoproteínas de alta densidad) sufren modificaciones en su tamaño, ocasionando que puedan ser eliminadas fácilmente por vía renal. Estos cambios dan como resultado la triada dislipidémica.²⁰ ASP, Proteína estimuladora de la acilación. LCAT, Lectina-colesterol-acil-transferasa. CE, colesterol esterificado, CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol. LPL, lipoproteína lipasa.

II.2.2 Dislipidemia diabética

La *diabetes mellitus* (*DM*) es un conjunto de trastornos metabólicos caracterizado por la hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. En estado crónico este padecimiento puede causar daños a largo plazo en distintos órganos como los ojos, corazón, riñones, venas, etc. La *DM* es considerada como un padecimiento degenerativo con grados variables de predisposición hereditaria, caracterizada por periodos prolongados de hiperglucemia que afectan el metabolismo de grasas, lípidos y carbohidratos. Sus principales síntomas son: la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, visión borrosa y polifagia.³⁰ La *DM* es considerada un problema de salud pública a nivel mundial y se estima que para el año 2030 habrá cerca de 366 millones de personas viviendo con *DM*, lo que repercutirá en la economía de los países, principalmente de los que se encuentran en vías de desarrollo.³¹ México se encuentra entre los primeros 10 países con un mayor número de personas que viven con *DM* y durante los últimos cinco años se ha convertido en la primera causa de muerte en la población mexicana.³¹ En el estado de Yucatán la *DM* es la primera causa de muerte y se encuentra relacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, las cuales ocupan el 4 lugar en la misma lista. A nivel mundial las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en los países industrializados siendo la población de mayor riesgo a padecer los adultos, los fumadores, las personas con hipertensión y la obesidad.
32,33

La dislipidemia se encuentra asociada con la resistencia a insulina y ésta a su vez con el riesgo aterogénico.³⁴ Se ha observado que las personas con *DM* tienen un aumento en los niveles de triglicéridos en plasma, bajos niveles de HDL e incremento de las sd-LD.²⁸ Este aumento de las sd-LDL representa un grave peligro para las personas con *DM*, ya que acelera el proceso de la formación de las placas aterogénicas.^{28,35} Las personas con *DM* pueden no presentar concentraciones elevadas de LDL, y aún así tener incrementada la fracción sd-LDL, aumentando las cantidades de apolipoproteína B y con ello el riesgo de padecer de enfermedades cardiovasculares.³⁶ Al respecto, en el estudio realizado por Hirano y

colaboradores,³⁷ se observó que las personas con *DM* presentaban un nivel más elevado de sd-LDL, en comparación con personas sanas; esta mismo hallazgo fue reportado en personas con padecimientos cardiacos, lo cual implica que estos padecimientos se encuentran estrechamente vinculados entre sí.

II.3 Metodologías para el estudio de las lipoproteínas

Las lipoproteínas juegan un rol importante en el metabolismo, no solo por el metabolismo de lípidos sino también por su interacción con otros metabolitos, como es el caso de insulina y células del sistema inmune. Debido a esto, a lo largo de los años se han utilizado diferentes metodologías para su estudio, dentro de las que destacan su cuantificación, tanto del complejo en total como de las apoproteínas estructurales relacionadas a cada familia; y la determinación de su diámetro. La cuantificación de la concentración de complejos lipoproteicos, así como la medición de los niveles de colesterol y triglicéridos bajo ciertas condiciones ha ayudado a determinar el papel que juegan en distintos padecimientos como en los eventos cardiovasculares. Este tipo de mediciones puede llevarse a cabo mediante resonancia magnética nuclear, inmunoensayos. Las concentraciones obtenidas han servido para establecer correlaciones entre, por ejemplo, los niveles de sd-LDL y el riesgo cardiovascular; y entre las HDL como factor de protección.^{16,38-39}

El análisis del tamaño de las LDL y la medición de las concentraciones de triglicéridos y HDL han permitido realizar asociaciones entre ciertos padecimientos, como la hiperlipidemia y la influencia génica.⁴⁰ Los métodos de medición de las LDL han ido evolucionando con los años. Estos han pasado desde la ultracentrifugación y la electroforesis, las cuales permiten la separación de lipoproteínas por su densidad para luego ser cuantificadas por un método complementario; sin embargo, estos suelen ser tardados y en ocasiones inexactos; hasta métodos más directos como las precipitaciones químicas e inmunoseparaciones realizadas con kits disponibles en el mercado. Este tipo de separaciones permiten evadir el paso de la ultracentrifugación. Por último se encuentran los métodos separación homogéneos

que consisten de diferentes detergentes y otros compuestos químicos que permiten el bloqueo o solubilización de otras lipoproteínas diferentes a las LDL.⁴¹

La evaluación de estos métodos así como plantear nuevas estrategias del uso de dos o más tipos de separación puede dar lugar a una metodología que permita un mejor aislamiento de las LDL, facilitando el estudio y la caracterización de sus diferentes subclases.

II.3.1 Electroforesis de lipoproteínas

El aislamiento de las HDL en la década de los 60, permitió el análisis de las propiedades que poseen sus diversas subfracciones. Desde entonces, la mayor parte de los estudios realizados a lipoproteínas se centran en la división de las fracciones de estos por medio de centrifugaciones secuenciales, así como de electroforesis que permitan por medio de su capacidad de migración su identificación a través de geles de agarosa o poliacrilamida, siendo esta última una de las más utilizadas para dicho propósito.⁴² Debido a su diámetro, las lipoproteínas suelen ser separadas en capilares usando concentraciones bajas de poliacrilamida para tener un proceso más rápido; con la desventaja de requerir equipos especiales para su utilización.⁴³ Estas electroforesis permiten la separación de los complejos lipoproteicos para la fenotipificación de lipoproteinemias. En el caso de las LDL, las pruebas de migración electroforética permiten su diferenciación de las HDL por medio del tamaño. Las diferencias en tamaño de las subfracciones de las LDL han permitido relacionarlas con diversos grados de riesgo cardiovascular.⁴³⁻⁴⁵

A pesar de que estas pruebas permiten la asociación de las LDL o sus subfracciones con el riesgo cardiovascular, aún existe la necesidad de desarrollar métodos para el análisis de las múltiples proteínas presentes en dichos complejos. La identificación de las proteínas permitiría determinar el papel que juegan en el desarrollo de enfermedades.

II.3.2 Estudios proteómicos

Los estudios proteómicos se definen como el análisis de los complejos proteicos presentes en las células u organismo bajo condiciones específicas; permitiendo su identificación y caracterización para obtener una mejor visión de su función e integración con otras proteínas a nivel celular.⁴⁶ No sólo permite la detección de las proteínas sino que también permite la identificación de varias isoformas de las mismas. Esta herramienta puede facilitar la identificación de biomarcadores útiles para el diagnóstico de enfermedades, así como de la respuesta farmacológica de las personas. En la actualidad este tipo de estudios ha logrado identificar algunos biomarcadores para algunos padecimientos cardiovasculares, como la aterosclerosis, la isquemia miocárdica y la hipertrofia ventricular.⁴⁷ El objetivo de encontrar este tipo de marcadores es que puedan ser identificados con facilidad de muestras como suero, plasma y orina, proporcionando diagnósticos rápidos y confiables.⁴⁸

El desarrollo de un estudio proteómico se divide en varias partes, como la separación de las proteínas de interés por medio de ensayos bidimensionales, el análisis de la imagen obtenida, la aplicación de técnicas como la espectrometría de masas, técnicas electroforéticas y de herramientas bioinformáticas para la correcta identificación y caracterización de las proteínas. La separación bidimensional de proteínas consiste en separar en la primera dimensión a las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico y en segunda instancia por su peso molecular. Las coordenadas obtenidas serán únicas para cada proteína. La separación por medio de isoelectroenfoque consiste en depositar las muestras en un gradiente de pH inmovilizado en geles de poliacrilamida, garantizando la reproducibilidad. En la segunda dimensión la tira de pH con las proteínas es depositada en un gel SDS-PAGE para separar a las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Una vez finalizada la electroforesis se procede al análisis de los geles por medio de softwares como PD-QUEST, MELANIE, Z3 y Z400.^{47,49}

En el caso de la separación por medio de espectrometría de masas, este se utiliza como complemento para identificar los péptidos de las proteínas obtenidas en un

ensayo bidimensional. Este método consiste en digerir enzimáticamente la proteína en fragmentos específicos para la correcta identificación de la proteína de interés. También es común el uso de técnicas cromatográficas, muchas veces empleando micromatrices proteicas para separar solamente las proteínas de interés. Los ensayos cromatográficos se basan en el análisis de las proteínas digeridas por medio de enzimas, ofreciendo un panorama más amplio de su composición.^{47,49,50}

Las técnicas mencionadas se basan en el uso de instrumentos y equipos especializados y de alto costo, a los cuales muchas veces los laboratorios no tienen acceso. Esto conlleva a que el diagnóstico sea tardado y de costos elevados para el procesamiento de dichas muestras.

II.3.3 Estudios proteómicos a lipoproteínas

El análisis proteómico aplicado a complejos lipoproteicos contribuye a la comprensión de la complejidad de su estructura para determinar el papel que juegan estos en los procesos fisiológicos y patológicos en el metabolismo de lípidos.^{19,51} En los últimos años, los estudios proteómicos enfocados a lipoproteínas han revelado un escenario complejo del funcionamiento de las apoproteínas y proteínas presentes las lipoproteínas, demostrando que cada grupo de estos complejos presenta diversas funciones difíciles de anticipar.¹⁹

Se han realizados diversos análisis proteómicos para determinar la variación en las estructuras de diversas lipoproteínas, principalmente en las VLDL y LDL. Krauss y Burke (1982)⁵², realizaron un análisis para la identificación de las subfracciones de las LDL en plasma partiendo de su separación por medio de ultracentrifugación y electroforesis para determinar sus diferencias metabólicas y propiedades patológicas. También se han realizado análisis proteómicos de las VLDL y LDL, mediante el uso de espectrometría de masas y una doble dimensión por medio de isoelectroenfoque, y el acoplamiento de cromatografía líquida acoplada a ionización por electroespray.^{12,25} Así mismo, el estudio realizado por Sódar y colaboradores (2016)⁴ identificaron posibles marcadores de riesgo cardiovascular en las LDL por medio de microscopía electrónica y citometría de flujo.⁴ En el cuadro 3 se mencionan

los resultados de los estudios mencionados. Todos estos estudios tenían en común el uso de un pool de suero con las muestras de personas para lograr alcanzar la cantidad necesaria de lipoproteínas para su correcta visualización en los resultados.

Cuadro 1. Estudios previos para determinar la estructura o componentes de las lipoproteínas

Estudio	Número de personas	Año	Resultados	Autores
Aplicación de un electroforetograma para determinar las fracciones de las LDL.	12	1982	Se observaron diversas subfracciones de las LDL que difieren en diámetro y composición.	Krauss y Burke ⁵²
Aplicación de una técnica de isoelectroenfoque para dividir las proteínas de las LDL en fracciones y poder describirlas con mayor claridad.	6	2009	Presencia de proteínas PC1 asociada a las lipoproteínas VLDL y LDL, lo cual hace apreciar la capacidad de estas lipoproteínas para producir agentes oxidantes.	Banfi et al., ²⁵
Análisis proteómico de lipoproteínas con carga negativa.	10 "pool" o conjunción de muestras homogéneas.	2010	Las LDL negativas tuvieron un mayor número de componentes (composición anormal de lípidos).	Bancells et al., ¹²
Aplicación de técnicas para el aislamiento de	3	2016	Co-purificación y asociación <i>in vitro</i> de LDL con	Sódar et al., ⁴

vesículas
extracelulares.

vesículas
extracelulares y
su interferencia
con el análisis de
vesículas
extracelulares
con LDL.

La utilidad de la electroforesis para clasificar los desórdenes lipídicos especialmente en la clasificación de las hiperlipoproteinemias es bien conocida. Para ello han sido utilizados diferentes modalidades y porcentajes de geles para determinar la cantidad y calidad de las lipoproteínas asociadas al riesgo de enfermedades vasculares. Sin embargo, estas electroforesis se basan más en la densidad y estructura del complejo lipoproteico que en la estructura del tipo de lípidos o proteínas presentes en el mismo. Los estudios de doble dimensión a partir de geles nativos y SDS-PAGE han demostrado ser efectivos para identificar y caracterizar complejos proteicos abriendo la posibilidad de utilizarlos como método para el diagnóstico rápido de cambios en proteínas sin tener que recurrir a costosos equipos.⁴⁴

En los últimos años, las sd-LDL han sido blanco de diversos estudios debido a su presencia en personas con problemas cardiovasculares y a su relación con las personas con *DM* pero aún se desconocen los mecanismos de su síntesis y función. Además, al ser considerados como predictores de las enfermedades cardiovasculares, se han desarrollado diversas técnicas para su aislamiento y cuantificación, y aunque los métodos de separación han resultado efectivos, aún se desconoce cómo se encuentran formados y su variación bajo diversas condiciones fisiológicas como la hiperglucemia.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado el estudio bioquímico de las sd-LDL, reportando los componentes de variabilidad biológica a corto plazo usados para estimar las especificaciones de calidad, índice de individualidad y valores de referencia para el ensayo de precipitación de sd-LDL en población yucateca sana.⁵³ Sin embargo, el componente proteico no ha sido analizado en estas moléculas. Por

lo anterior, la estandarización de una metodología sencilla a partir del uso de geles nativos para la separación de los complejos proteicos y una segunda dimensión en geles SDS-PAGE, para el análisis del perfil proteómico de las sd-LDL resulta importante para comprender su interacción en los mecanismos fisiopatológicos y su relación con la enfermedad cardiovascular. Así como para la identificación de un posible biomarcador que permita un diagnóstico del riesgo cardiovascular.

III Hipótesis

La estandarización de una metodología de doble dimensión a partir de geles nativos y SDS-PAGE permitirá la comparación del perfil proteico asociado a las sd-LDL entre personas con y sin *DM*.

IV Objetivo general

Estandarizar un método de doble dimensión para la visualización y comparación del perfil proteómico de las sd-LDL en personas con y sin *DM*.

IV.1 Objetivos específicos

- Estandarizar la primera dimensión para la separación de la fracción de las sd-LDL en mini geles nativos.
- Estandarizar la segunda dimensión para la separación de las especies proteicas asociadas a la fracción de sd-LDL en geles desnaturalizantes.
- Aplicar el ensayo bidimensional estandarizado para el análisis proteómico de las muestras clínicas de personas con y sin *DM*.

V Material y métodos

V.1 Tipo y diseño de estudio

Se llevó a cabo la estandarización de una metodología que permite en análisis descriptivo del perfil proteómico de las sd-LDL, para comparar el cambio entre el perfil de bandeo de las proteínas presentes en las sd-LD de personas con y sin *DM*.

V.2 Definición de las variables y escalas de medición

Cuadro 2. Variables y definciones operacionales

Variable	Definición operacional	Tipo	Categoría	Indicador
Perfil proteómico de las sd-LDL	Modificación en la migración o expresión de proteínas involucradas en el complejo lipoproteico en el gel de electroforesis bidimensional (Nativo/SDS-PAGE)	Cualitativa	Dicotómica	Presencia de bandas en distintas posiciones en el gel de poliacrilamida.

V.3 Criterios

Criterios de inclusión en el grupo de personas con *DM*

- Personas con *DM* diagnosticada con niveles de hemoglobina glicada mayores a 7%.
- Dislipidemia, con valores de triglicéridos mayores a 150 mg/dL y niveles de colesterol por encima de 200 mg/dL.
- Niveles de sd-LDL con una variación biológica interindividual mayor a 20%.⁵³
- Ser mayor de 18 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de inclusión en grupo sin DM

- Personas aparentemente sanos con niveles de hemoglobina glicada menores a 6.5.
- Perfil lipídico con valores dentro de los rangos considerados como normales (niveles de triglicéridos y colesterol menores a 150 mg/dL y 200 mg/dL, respectivamente).
- Niveles de sd-LDL con una variación biológica interindividual menor al 20%.⁵³
- Ser mayor de 18 años.
- Haber firmado el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Presentar alguna discapacidad que impida que el paciente pueda tomar sus propias decisiones.

V.4 Fuentes y recolección de la información

En el caso de las personas se realizaron encuestas y toma de muestras.

Para la elaboración del documento se utilizó la información proveniente de artículos científicos, libros y documentos de páginas oficiales, como es el caso de los datos en materia de salud correspondientes al estado.

V.5 Consideraciones bioéticas

La presente tesis se derivó del proyecto titulado Bienestar comunitario: proyecto de capacitación para la autogestión de la salud de las personas con DT2 y sus familias, en la comunidad de Tixcaltuyub y Yaxcabá, el cual fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación con el número de registro 09/17.

V.6 Metodología

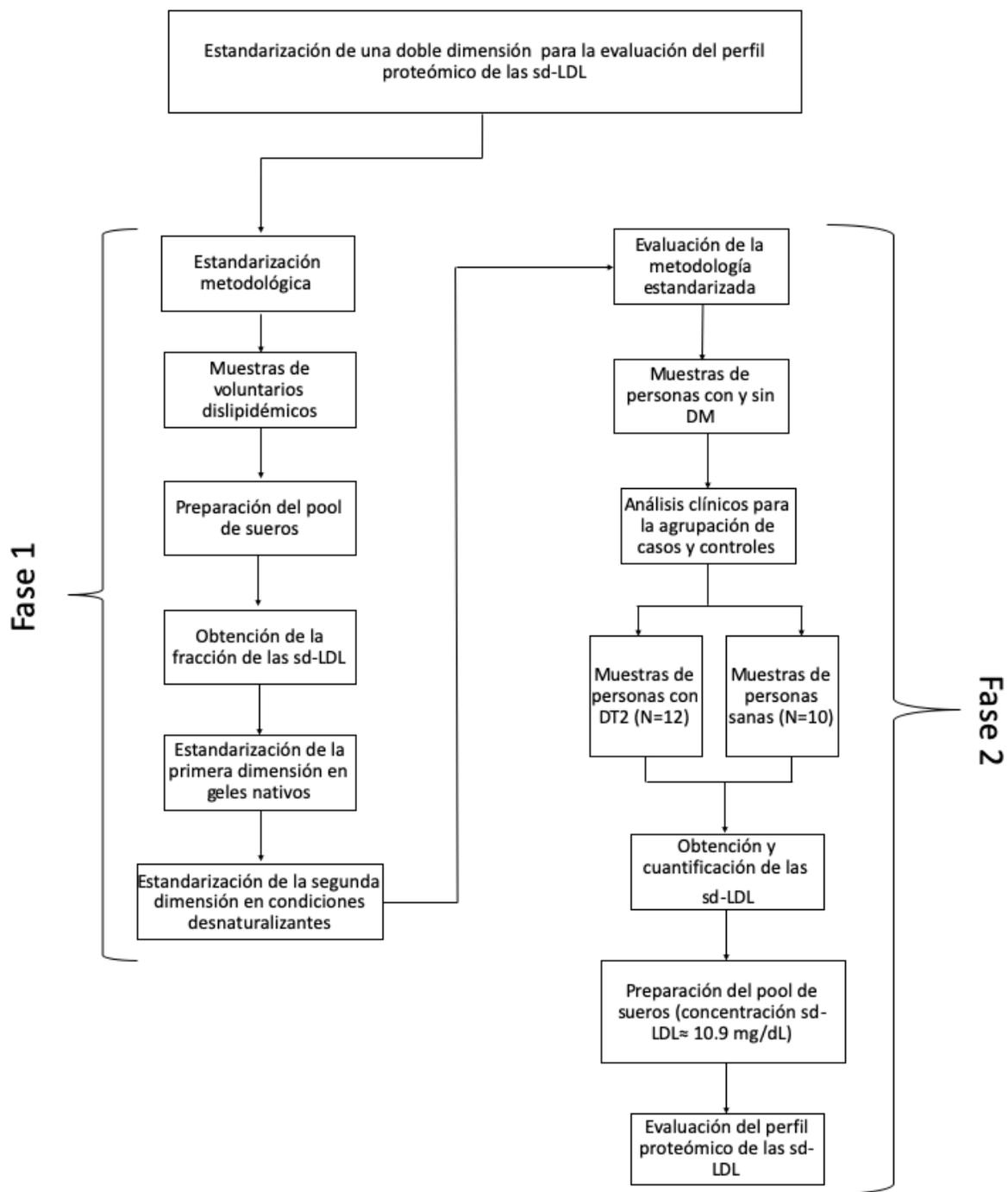


Figura 3. Diagrama metodológico.

La metodología del presente proyecto constó de dos partes, la primera fue la estandarización de la doble dimensión para la evaluación del perfil proteómico de las sd-LDL; mientras que en la segunda parte del proyecto se llevó a cabo la evaluación del método estandarizado utilizando muestras clínicas de personas con y sin *DM* (figura 3).

El proceso de estandarización (fase 1) se llevó a cabo con muestras de personas dislipidémicas y se obtuvieron las condiciones adecuadas para la primera dimensión en condiciones nativas, donde se separó a los complejos lipoproteicos, y la segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes donde se separaron las proteínas presentes en los complejos.

Terminada la estandarización se llevó a cabo la evaluación del perfil proteómico de personas con y sin *DM* (fase 2). Se escogió a las personas con *DM* debido a que suelen presentar mayores concentraciones de las sd-LDL. Cada grupo fue seleccionado de acuerdo a sus perfiles lipídicos y niveles de glucosa en sangre.

V.6.1 Obtención de muestra sanguínea y análisis clínicos

Se recolectaron muestras sanguíneas de personas con 10-12 horas de ayuno por medio de una venopunción en el brazo. Se recolectó sangre suficiente para tres tipos de tubos, un tubo con anticoagulante (EDTA) y dos tubos para suero con gel separador. Cada tubo fue etiquetado con el nombre del paciente y el folio asignado. Una vez obtenidas las muestras los sueros fueron separados y depositados en tubos para centrifuga de 1.5 mL.

Se envió una alícuota de 400 μ L de suero de cada uno de las personas al laboratorio de análisis clínicos de servicio a la comunidad de la Facultad de Química para la determinación bioquímica de seis elementos (glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, urea y creatinina), de igual manera, los tubos con EDTA se utilizaron para el análisis de hemoglobina glicada (A1c).

V.6.2 Obtención de las sd-LDL por medio del método de precipitación con sales divalentes (Heparina-MgCl₂)

Para la cuantificación de las sd-LDL se empleó el método de precipitación descrito por Hirano y cols. modificado⁵⁴ en el Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química UADY. Para ello se utilizó una solución precipitante compuesta por heparina de sodio (150 u/mL; cuadro 3) y cloruro de magnesio (90 mmol/mL) (ver anexo 5).

Las muestras fueron procesadas dependiendo de sus niveles de triglicéridos. En el caso del grupo de personas con *DM* dislipidémicos se realizó una dilución con buffer de fosfatos pH 8.5 (ver anexo 5) para obtener una concentración de triglicéridos en la muestra de 100 mg/dL y de esta forma evitar interferencias con el método de precipitación.⁵⁵ Se mezcló el suero de las personas con la solución precipitante, para ello se tomaron 300 μ L del suero y 300 μ L de la solución precipitante. Las mezclas se incubaron a 37 °C por 10 minutos, posteriormente se colocaron en un baño de hielo durante 15 minutos y por último fueron centrifugadas a 12,000 rpm

por 20 minutos a una temperatura de 5°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante y se envió para su análisis al Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad de la Facultad de Química UADY para la cuantificación de las sd-LDL.

V.6.3 Estandarización de la electroforesis en geles de poliacrilamida para la doble dimensión

V.6.3.1 Primera dimensión en condiciones nativas

La electroforesis se define como el transporte de moléculas cargadas a través de un solvente por medio de un campo eléctrico. Es un método rápido, simple y sensible para separar proteínas y ácidos nucleicos. La movilidad de las moléculas dependen de su carga neta, el tamaño y forma, la fuerza iónica y las propiedades de la matriz en la cual migran las muestras (agarosa o poliacrilamida).⁵⁶ En el presente trabajo, la primera dimensión se realizó mediante una electroforesis en condiciones nativas, en la cual se mantiene la conformación, las subunidades de interacción y la actividad biológica de las proteínas. Para ello se recolectaron muestras de voluntarios con dislipidemia para la preparación del pool de sueros con volúmenes iguales de los sueros de cada voluntario, una vez mezclados se procedió a obtener la fracción de sd-LDL por medio del método de precipitación salina previamente mencionado. Una vez obtenida la fracción de las sd-LDL, se procedió a realizar una electroforesis en mini geles de 7mm en condiciones nativas con un gel al 3% a 80 V por 3 h, con base a lo descrito por Hirano y colaboradores.⁵⁴ Al término de la electroforesis se procedió a la tinción del gel con PageBlue™ por 1h y posteriormente se dejó desteñir el gel por 1h en agitación con agua destilada hasta visualizar el patrón correspondiente a las lipoproteínas incluyendo las sd-LDL.⁵⁴

V.6.3.2 Segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes

La segunda dimensión del método se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, en el cual se utilizó un detergente iónico como el dodecilsulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar las proteínas, quedando cargadas negativamente y de esta forma separarlas en el gel por su tamaño.⁵⁶

De acuerdo con la literatura, se decidió probar dos estrategias para la obtención del patrón proteico proveniente de la separación nativa de la fracción de las sd-LDL. La primera estrategia fue probar con el carril completo y la segunda probar sólo con recortar la banda de la región perteneciente a las sd-LDL del gel nativo. En ambos la fracción del gel nativo fue sometido a tratamiento con luz UV y buffer de Laemmli con β -mercaptoetanol 2X (Anexo 5).

Para determinar la concentración de gel que permitiera la visualización de mayor cantidad de proteínas, se procedió de inicio a utilizar un gradiente del 4-20% con un programa de electroforesis de 80 V por 20 min para el empaquetamiento de la muestra y 100 V por 90 minutos más. Para el carril completo de muestra se preparó un gel preparativo y en el caso de la banda recortada se trabajó con un gel de pozos individuales, ambos geles en gradiente. Una vez depositado el carril o la banda, según sea el caso, en el gel SDS-PAGE, se procedió a sellar con agarosa al 0.5%. Para la visualizar las bandas se utilizó la tinción con nitrato de plata.

Para el corrimiento electroforético en geles de concentraciones al 8 y 12%, de manera independiente, se realizó el mismo proceso previamente mencionado, modificando sólo en las condiciones de voltaje y tiempo en la etapa de separación: los programas de electroforesis para cada gel fue de 80 V, 118 minutos y 80 V, 125 min respectivamente. En los geles de la segunda dimensión se utilizó el marcador de peso molecular Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladders.

VI Resultados

VI.1 Primera dimensión

Con el fin de poder reproducir el corrimiento electroforético en condiciones nativas de las lipoproteínas, en especial de las sd-LDL, sin necesidad del uso de sistemas de capilares, se montó el sistema de electroforesis en mini-geles de poliacrilamida al 30% ratio 29:1, ya que es la más utilizada para este tipo de ensayos. Como se muestra en la figura 4, con el sistema de mini geles y una concentración al 3% fue posible reproducir los resultados obtenidos por Hirano y colaboradores en 2003 donde se muestra el patrón de migración del sobrenadante con sd-LDL, donde se identificó a las lipoproteínas (VLDL, LDL y HL) presentes en la fracción analizada.⁵⁴

El patrón ilustrado es similar al que se ha identificado utilizando sistemas de capilares, lo que indica que la primera dimensión en mini-geles es funcional, sin embargo, la manipulación de estos tipos de geles resulta complicada por la consistencia acuosa del gel. Por ello, se evaluó una concentración al 6%; sin embargo, las primeras pruebas realizadas en geles al 6% mostraron una menor definición de las bandas en la región de interés (figura 5). A pesar de ello, debido a su fácil manejo, se optó por realizar otras pruebas con la concentración al 6%. Se encontró que al bajar el voltaje y aumentar el tiempo de la electroforesis se podía obtener una mejor definición de las bandas, siendo este similar al reportado para las lipoproteínas. La tinción con PageBlue™ permitió la correcta visualización de las bandas por lo que se decidió mantenerlo como método de tinción para la primera dimensión en condiciones nativas (figura 6).

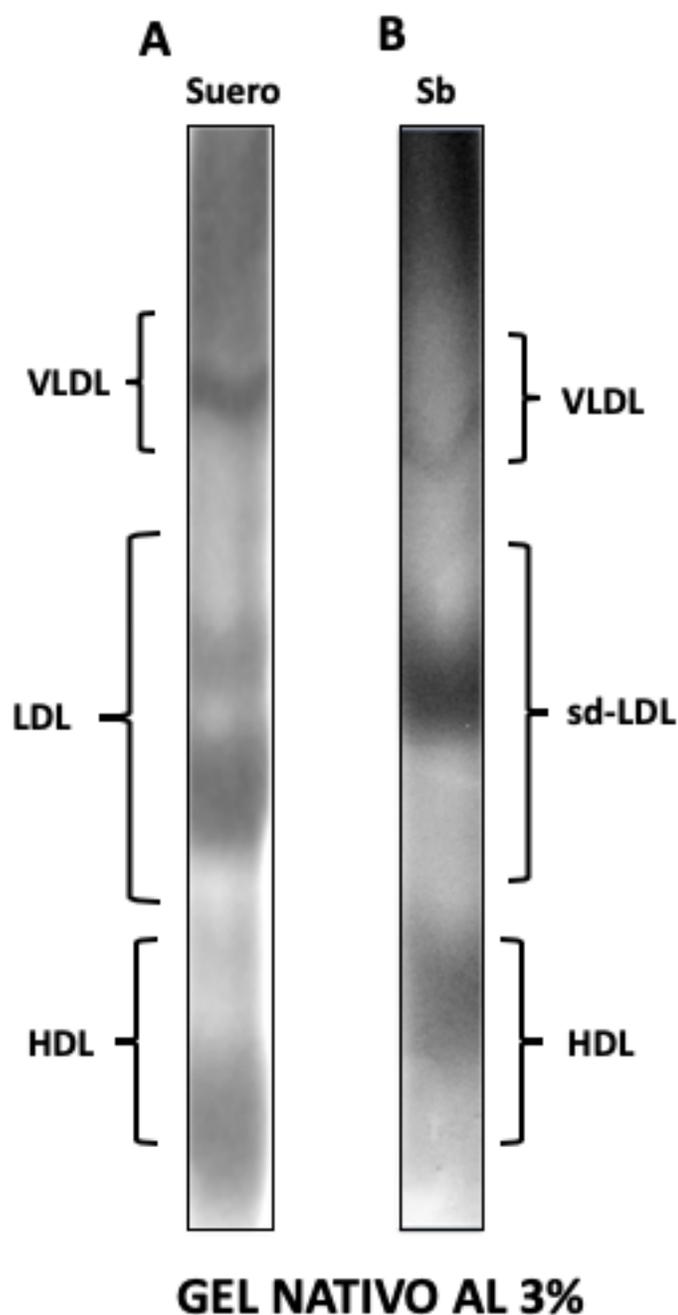
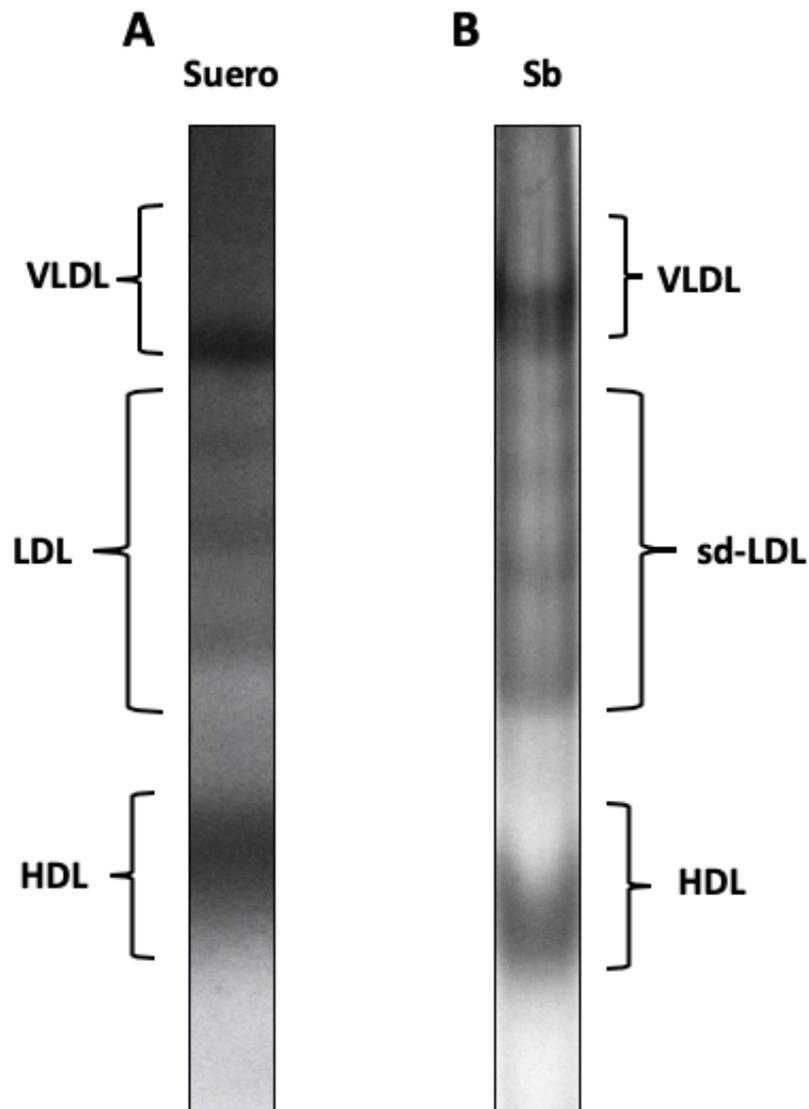


Figura 4. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 3%. A) Patrón de bandeo obtenido con un pool de suero de voluntarios dislipidémicos (suero). B) Patrón de bandeo obtenido del sobrenadante (Sb) después de realizar el método de precipitación con sales divalentes. En la región central se encuentra la banda perteneciente a las sd-LDL. Tinción con PageBlue™. VLDL, Lipoproteínas de muy baja densidad; LDL, Lipoproteínas de baja densidad; sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad; HDL, Lipoproteínas de alta densidad.



GEL NATIVO AL 6%

Figura 5. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 6% con alto voltaje. A) Patrón de bandeo obtenido al utilizar el suero de los voluntarios dislipidémicos (suero). B) Patrón de bandeo perteneciente a la fracción recuperada de sd-LDL del método de precipitación con sales divalentes (Sb). VLDL, Lipoproteínas de muy baja densidad; sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad; HDL, Lipoproteínas de alta densidad.

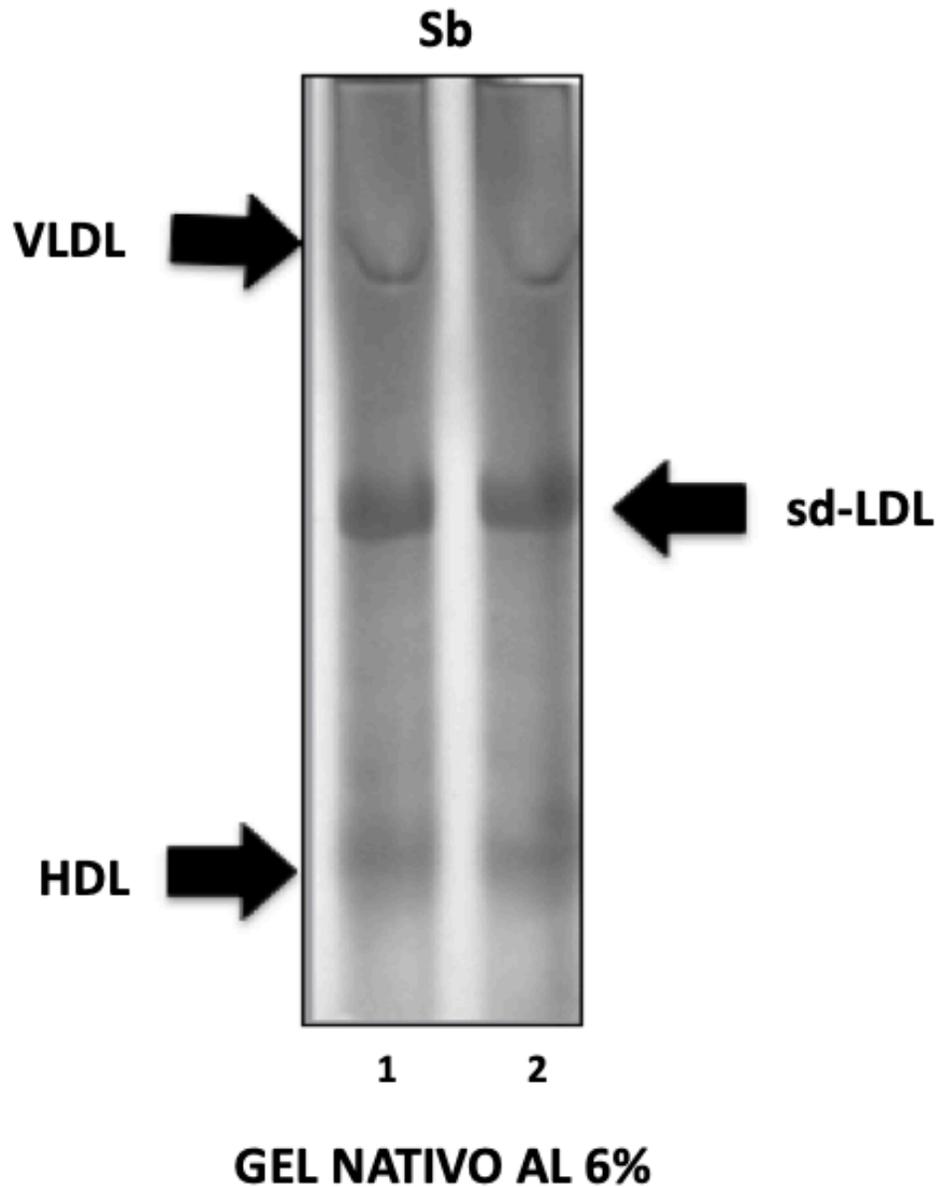


Figura 6. Migración electroforética de las sd-LDL en geles de poliacrilamida al 6%, 80 V por 6 h. Al aumentar el tiempo de electroforesis y disminuir el voltaje se puede reproducir el patrón obtenido en un sistema de mini geles, mejorando la facilidad de manipulación del gel. Carril 1 y 2 duplicados de muestras de sd-LDL (Sb). VLDL, Lipoproteínas de muy baja densidad; sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad; HDL, Lipoproteínas de alta densidad.

VI.2 Segunda dimensión

Una vez obtenido el patrón de bandeo adecuado, se procedió a determinar las condiciones para la segunda dimensión. Se probaron geles desnaturizantes en gradiente del 4-20%, recortando el carril de la muestra por completo, además recibieron distintos tratamientos con luz UV por 15 min y buffer de Laemmli 2x, incubando a 37° C por 30 minutos; el primero para asegurar la formación de enlaces covalentes y no perder moléculas que pudieran estarse uniendo de forma débil a las proteínas y el segundo para desnaturizar las proteínas presentes en las sd-LDL. A pesar de la obtención de bandas proteicas en los geles preparativos, no se podía observar la presencia de la apoB-100, la cual es la proteína específica de las sd-LDL (figura 7). En el gradiente en el cual se utilizó la banda recortada de sd-LDL con el tratamiento de luz UV y buffer de Laemmli se pudo observar, al igual que en el gel preparativo, que la mayor parte de las proteínas se encontraba en las regiones de 8 y 12%, aunque la visualización de las proteínas era de baja resolución al teñirse con PageBlue™ (figura 8).

Con base en los resultados anteriores se decidió a probar geles al 8% y 12% por separado para determinar cual de ellos tendría una mejor resolución de las bandas de proteínas. Estas pruebas fueron realizadas con la banda, a la cual se le dio tratamiento con luz UV por 15 min y se le agregó buffer de Laemmli 2x (anexo 5) en proporción 1:1 con respecto al volumen de muestra utilizado para la primera dimensión (20 µL de muestra), después de agregar el buffer se agitó por 10 segundos y se incubó por 30 minutos a 37° C (figura 9).

Los geles al 8% presentaron una mejor resolución en las bandas proteicas. En el gel al 12% se puede observar que no se encuentran bandas con pesos moleculares con menores a 36 kDa, por lo cual, durante la electroforesis al 8% se dejó salir el frente de bandeo con los marcadores de menor peso, de esta forma las bandas de proteína tendrían un mayor espacio para separarse durante su migración hacia el frente de corrida. Con esto se estableció que la mejor opción para la electroforesis de la segunda dimensión es a partir de un gel desnaturizante al 8%, 80V por 120

minutos. Además de que la tinción con plata presentó mejores resultados que la tinción con PageBlue™, por su mayor sensibilidad al momento de teñir las proteínas.

Una vez terminada la estandarización se identificaron las proteínas visualizadas en los geles al 8% y se nombraron de acuerdo a sus pesos de ~240, ~120, ~95, ~80, ~70 y ~36 kDa, a los cuales se les denominó P240, P120, P95, P80, P70 y P36, respectivamente (figura 10).

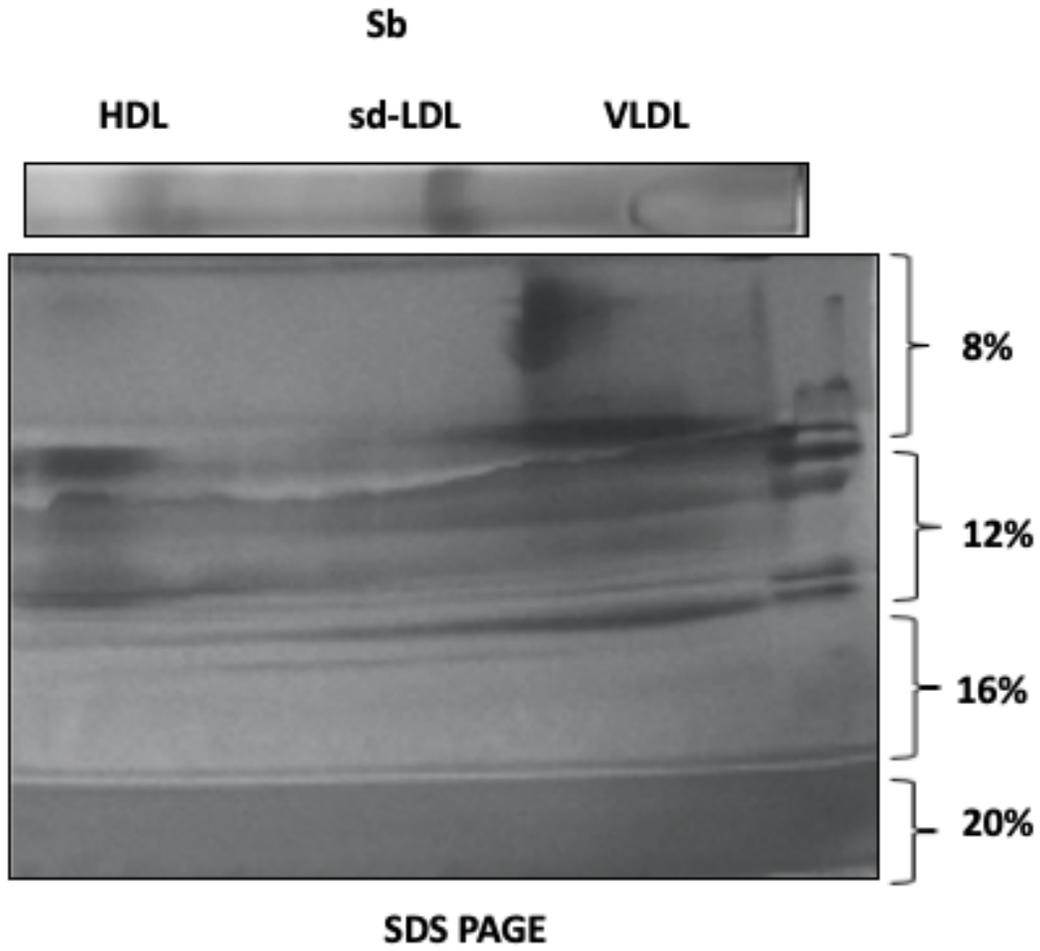


Figura 7. Gel preparativo en gradiente del 4-20 % SDS-PAGE. El carril recortado del gel nativo (Sb) fue recortado y recibió tratamiento con luz uv y buffer de Laemmli. Después del tratamiento se colocó en la parte superior del gel SDS-PAGE preparativo y se selló con agarosa. Se observa un patrón de bandeo con poca nitidez en las regiones del gel al 8 y 12%. Tinción con PageBlue™. HDL, Lipoproteínas de alta densidad; sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad; VLDL, Lipoproteínas de muy baja densidad.

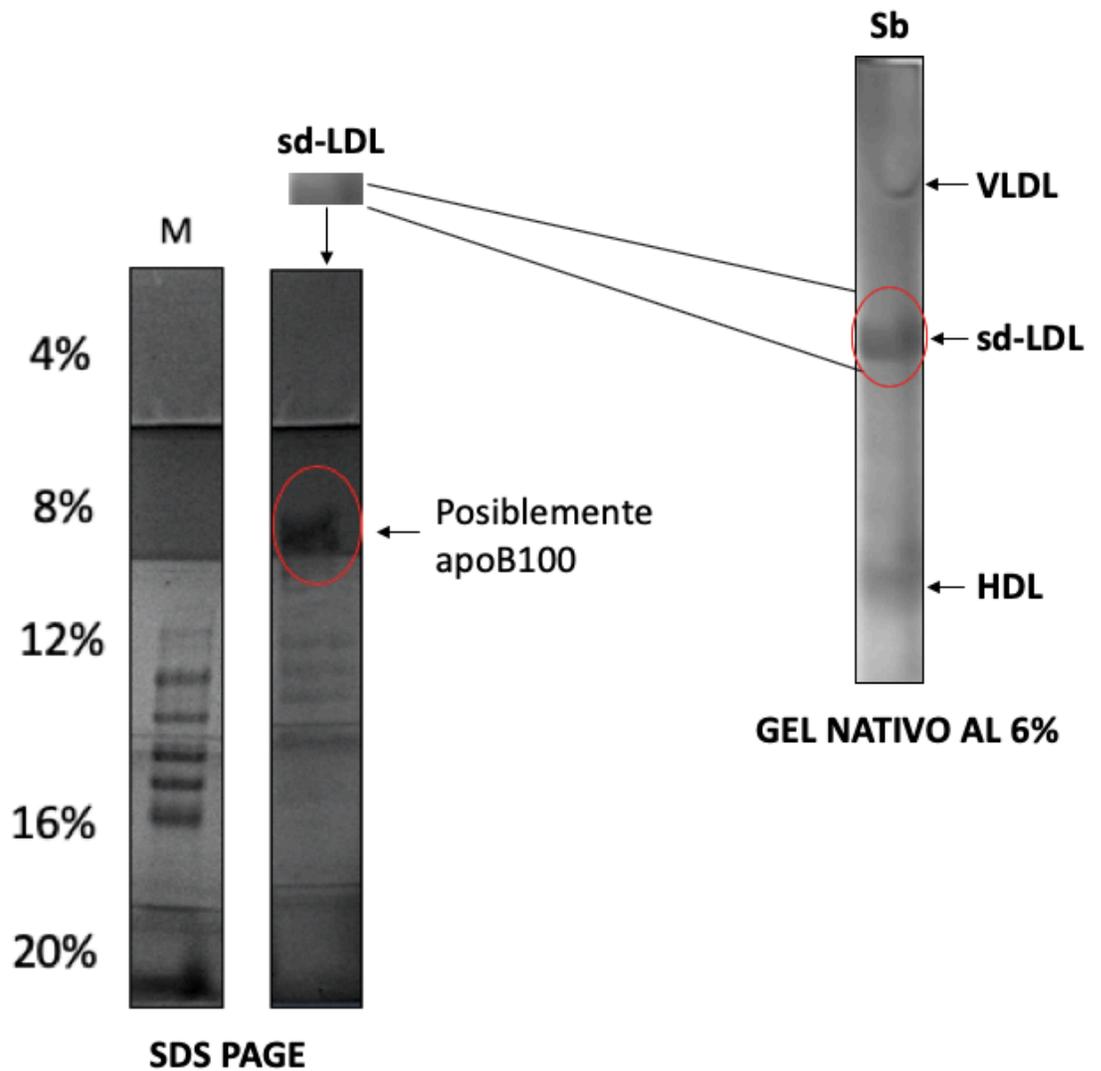


Figura 8. Gradiente SDS-PAGE 4-20% con banda de sd-LDL recortada. En la columna M, marcador de peso molecular en distintas concentraciones del gel. En la columna sd-LDL, se usó la banda de sd-LDL obtenida en el gel nativo (primera dimensión). En la región de 8% se observa una proteína de alto peso molecular (en rojo), posiblemente apoB-100, apoproteína presente en las sd-LDL. Tinción con PageBlue™. sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad.

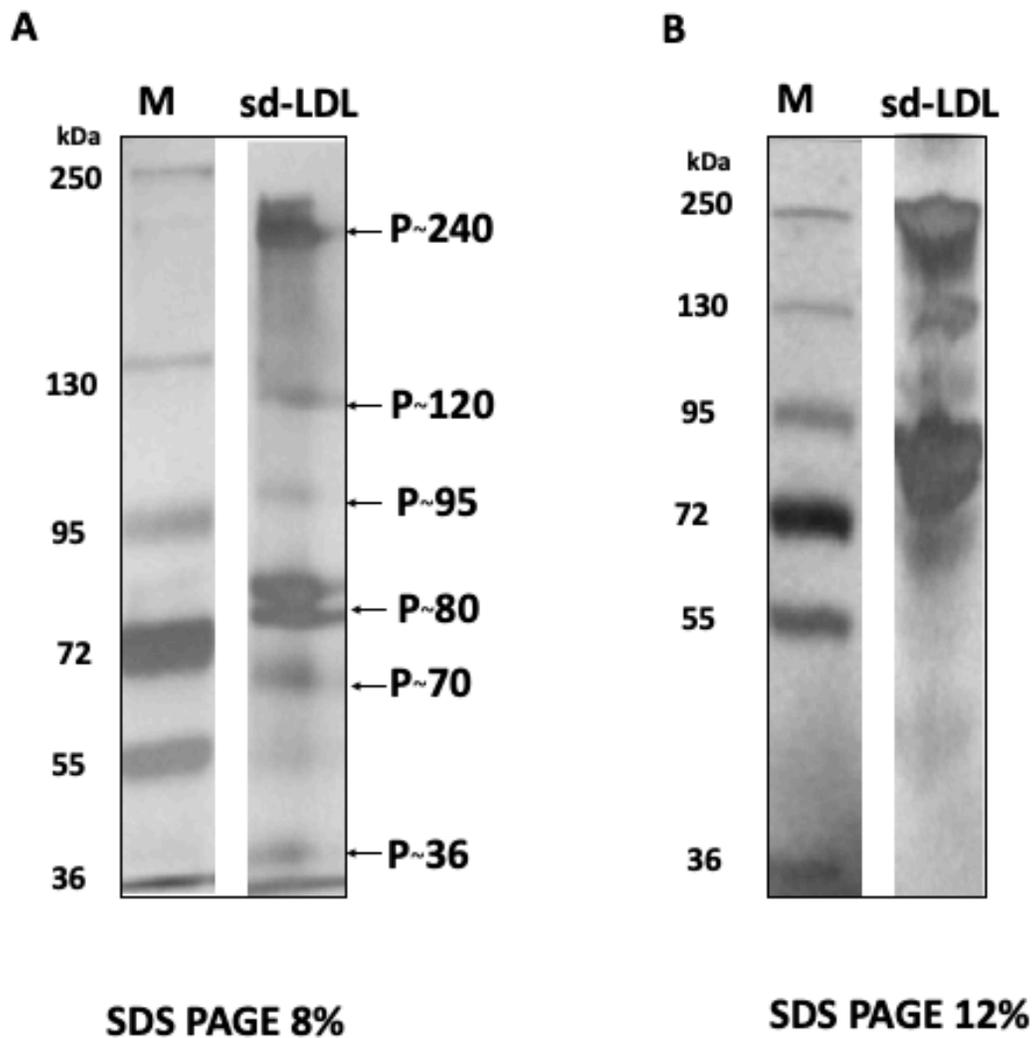


Figura 9. Comparación de la resolución de bandas en un gel SDS-PAGE al 8 y 12%. A) M, marcador de peso molecular; sd-LDL, banda del gel nativo. Resolución de bandas proteicas provenientes de las sd-LDL en SDS PAGE al 8%. **B)** M, marcador de peso molecular; sd-LDL, banda del gel nativo. Resolución de bandas proteicas en SDS PAGE al 12%. Tinción con nitrato de plata. El marcador de peso molecular se expresa en kDa, P indica proteína. sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad.

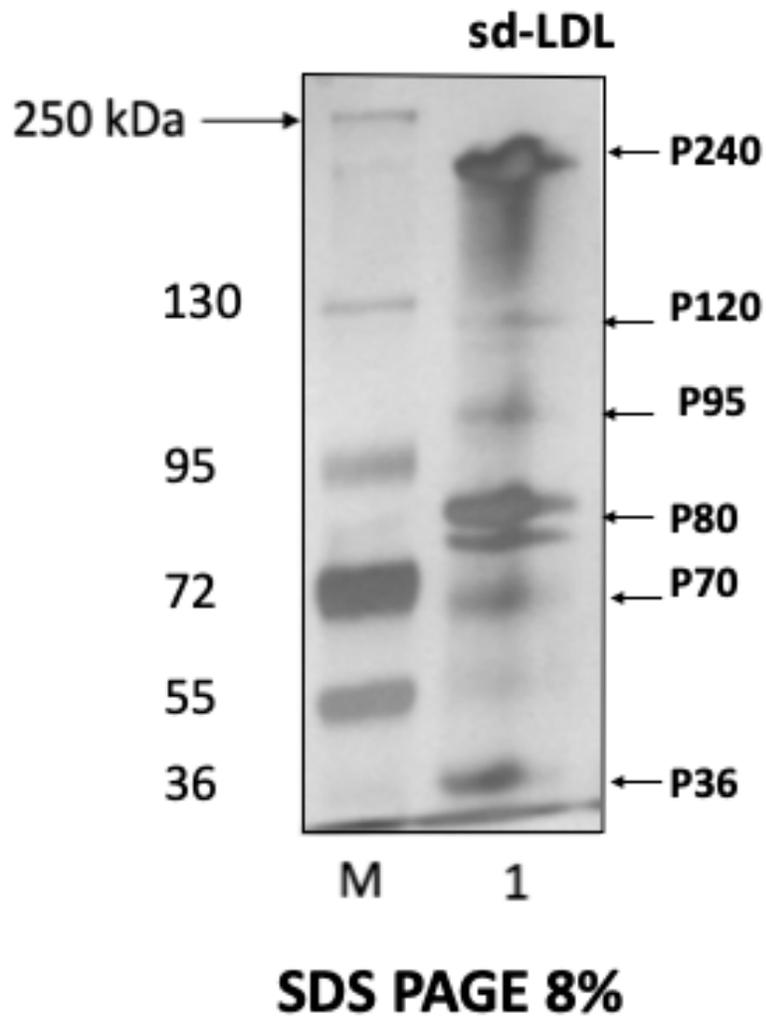


Figura 10. Perfil proteómico de las sd-LDL en el pool de personas dislipidémicas. M, marcador de peso molecular, en kDa. Carril 1, proteínas presentes en las sd-LDL provenientes del pool de voluntarios dislipidémicos para la estandarización de la doble dimensión. sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad.

VI.3 Análisis del perfil proteómico de las muestras en paciente con *DM* y personas sanos

VI.3.4 Preparación del pool con los sueros las personas.

Los resultados de los análisis clínicos se utilizaron para poder clasificar a las personas dentro del grupo de personas sin *DM* o del grupo con *DM*. Se tomaron en cuenta los valores de la hemoglobina glicada (mayor a 7 en el caso del grupo de personas con *DM* y menor a 6.5 en el grupo sin *DM*), así como el perfil lipídico y los niveles de glucosa (cuadro 3). Con el objetivo de obtener dos grupos para cada condición se tomaron en cuenta las concentraciones de sd-LDL para asignar los grupos. En cada grupo se realizó una subdivisión para dos réplicas biológicas y tres repeticiones técnicas. En ambos casos se agruparon de acuerdo a las concentraciones de sd-LDL. Las personas con mayores concentraciones se asignaron a los subgrupos 1, mientras que las personas con menores concentraciones se asignaron para los subgrupos 2, tanto en la caso de las grupo sin *DM* como en el caso de las personas con *DM*. Se mezclaron los sueros de 6 personas para cada réplica biológica del grupo de personas con *DM*, mientras que para el grupo de personas sin *DM* se utilizaron 5 muestras por réplica. Cada réplica biológica tuvo un total de 3 repeticiones técnicas. Con las concentraciones de sd-LDL obtenidas de los resultados de los análisis clínicos de cada paciente se calculó el volumen de muestra a tomar para que todos aportaran la misma cantidad de sd-LDL. La preparación del *pool* de entre cinco y seis personas fue con el objetivo de poder obtener la cantidad necesaria de sd-LDL, así como de obtener un panorama general de las proteínas presentes en un grupo de personas, mientras que las dos repeticiones independientes del *pool* para poder tomar en cuenta la variabilidad interindividual de las personas (réplicas biológicas).¹²

Así mismo se calculó la cantidad necesaria de suero a tomar para que cada muestra aportara la misma cantidad de sd-LDL en todos los subgrupos. Posteriormente se realizaron los pool de sueros y se realizó el método de precipitación para obtener las sd-LDL. Con las condiciones ya establecidas para el análisis de doble dimensión se procedió a preparar el pool de personas con *DM* y el de las personas sin *DM*.

Para el grupo de personas sanas el promedio de Ac1 fue de 6.09% quedando dentro del rango normal para este parámetro, además de que presentaron niveles normales en sus perfiles lipídicos. Por el contrario, las personas con *DM* presentaron en Ac1 un promedio del 11%, mientras que mostraban un perfil lipídico anormal.

Cuadro 3. Datos clínicos de los grupos de estudio

	DM (N=12)	SN (N=10)
Glucosa (md/dL)	223.75 ± 64.87	102.75 ± 15.12
Colesterol (mg/dL)	202.33 ± 29.72	138.09 ± 21.38
Triglicéridos (mg/dL)	242.91 ± 104.67	74.50 ± 34.80
HDL-C (md/dL)	40 ± 7.66	48.67 ± 5.53
LDL-C (g/dL)	114.16 ± 26.15	76.46 ± 19.54
sd-LDL (mg/dL)	115.45 ± 24.56	17.19 ± 6.05
A1c (%)	11.006 ± 1.77	6.09 ± 0.60

DM: Grupo de personas con *diabetes mellitus*.

SN: Grupo de personas sin *DM*.

VI.3.5 Primera dimensión.

Después de realizar las mezclas de los sueros se procedió a obtener el sobrenadante a través del método de precipitación salina y se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas en geles al 6%. Una vez polimerizado el gel se procedió a cargar la muestra, utilizando 18 μ L de cada pool y 2 μ L de buffer de carga Coral 10x. Al terminar de cargar las muestras en el gel se realizó la electroforesis a 80 V por 6 h. Al terminar cada gel fue teñido con PageBlue™. Al finalizar la tinción, se retiró el colorante y se dejaron los geles destiñendo en agua una hora para poder observar con mayor claridad la separación proteica y poder cortar la banda perteneciente a las sd-LDL.

En la figura 11 pueden observarse las diferencias entre ambos grupos de estudio. En el caso del grupo de las personas sin *DM* se pudo apreciar que la banda de las sd-LDL se encontraba de forma más compacta en comparación con la del grupo

con *DM*, además de que en el frente de corrida (parte inferior del gel), la banda de las HDL se podía observar con facilidad. Por el contrario, las personas con *DM* presentaban en la parte superior del gel la banda perteneciente a las VLDL, mientras que en la zona central se encontraba la región de las sd-LDL. Sin embargo, no se podía apreciar la banda correspondiente a las HDL.

En ambos grupos las bandas de sd-LDL fueron recortadas y sometidas al tratamiento con luz UV y buffer de Laemmli 2X para posteriormente colocarse en el gel desnaturizante al 8%.

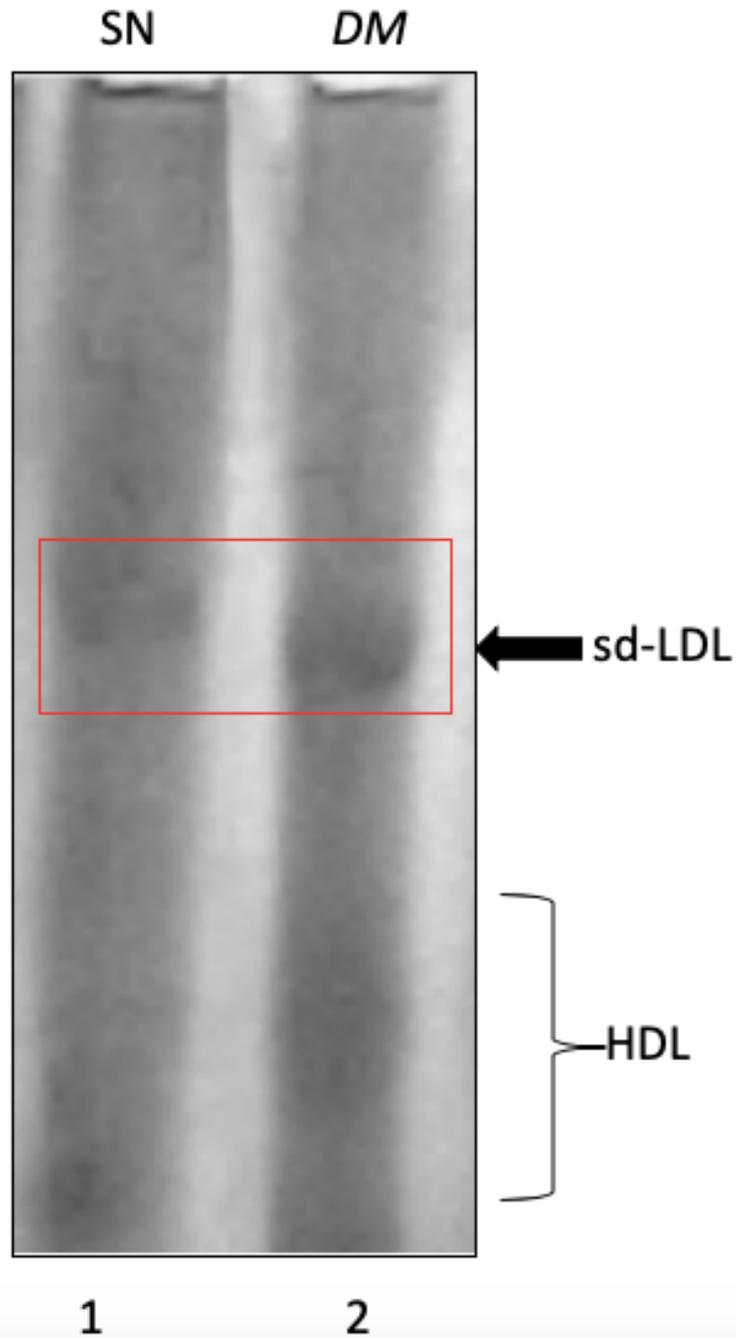


Figura 11. Primera dimensión en condiciones nativas con muestras clínicas (imagen representativa). Patrón de bandeado obtenido con el pool de las muestras clínicas de las personas del grupo sin *DM* (SN, carril 1) y del grupo con personas con *DM* (*DM*, carril 2). En ambos carriles puede observarse en la región central la banda perteneciente a las sd-LDL (en rojo). Tinción con PageBlue™. sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad; HDL, Lipoproteínas de alta densidad.

VI.3.6 Segunda dimensión.

Para la separación de las fracciones obtenidas en el gel nativo (primera dimensión) se realizó el método estandarizado para la segunda dimensión del método en condiciones desnaturizantes en un gel con SDS al 8% y tinción con nitrato de plata. En la figura 12 se muestra las repeticiones de uno de los subgrupos de cada grupo evaluado. Debido a la poca uniformidad de las imágenes de las bandas se procedió a realizar de nuevo las repeticiones, esta vez en el mismo gel para eliminar la probabilidad de errores técnicos en cuanto a la parte electroforética.

Los resultados obtenidos en esta repetición de la segunda dimensión (figura 13) no mostraron diferencias en cuanto a la migración de las proteínas. Por el contrario, el patrón de bandeo difiere entre cada grupo, lo cual indica que existen cambios en cuanto al perfil proteómico entre personas con y sin *DM*. Se observaron diferencias en ambos grupos de estudio en las proteínas P>250, P95 y P36. En P>250 y P95 se encontraron diferencias en la intensidad de las bandas observadas, siendo P>250 mas intensa en en grupo con *DM*, mientras que en P95 posee una menor intensidad en el grupo mencionado.

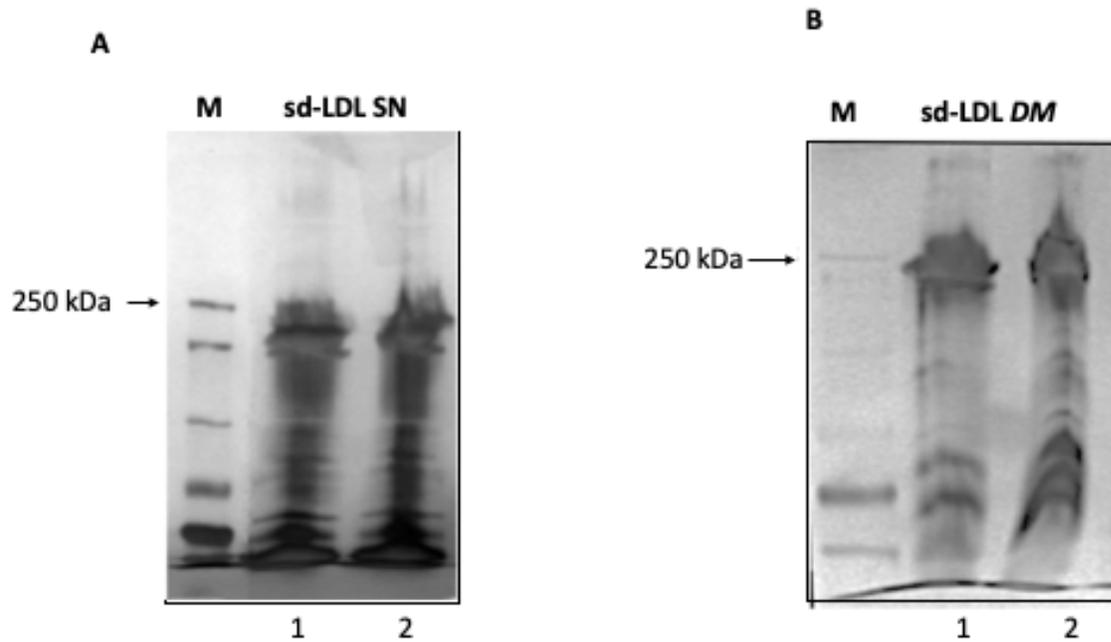


Figura 12. Réplicas técnicas de los grupos evaluados. A) Perfil proteómico de las sd-LDL en personas sin *DM*. Carril M, marcador de peso molecular; carriles 1 y 2, sd-LDL del pool de personas sin *DM* (duplicado). B) Perfil proteómico de las sd-LDL en personas con *DM*. M, marcador de peso molecular en kDa; carriles 1 y 2, sd-LDL del pool de personas con *DM*. sd-LDL, Pequeñas y densas lipoproteínas de baja densidad.

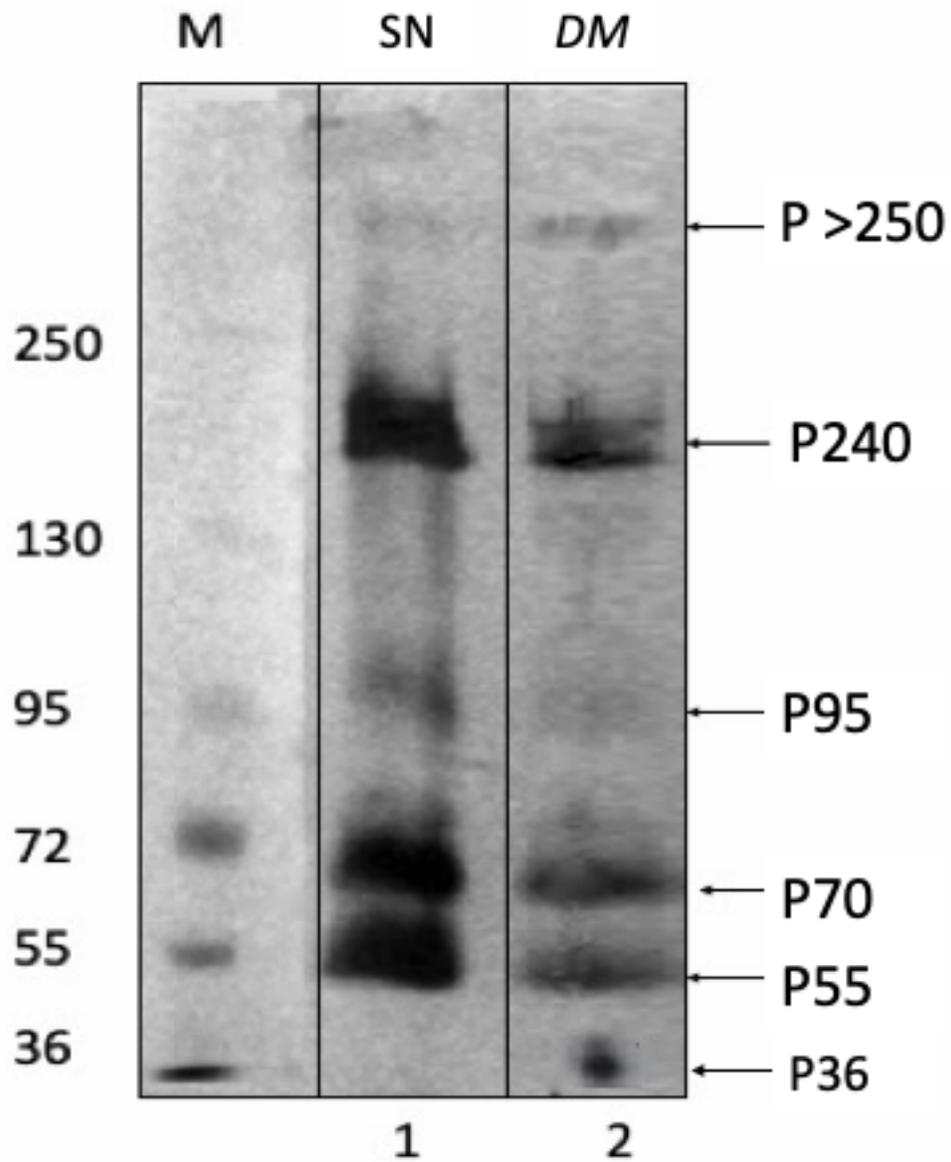


Figura 13. Imagen representativa de la segunda dimensión en geles SDS-PAGE al 8%. En ambos grupos se pudo observar la presencia de bandas proteicas de entre 55 y 240 kDa. M, marcador de peso molecular. En el carril 1 con muestra perteneciente a las personas sin *DM* (SN) las bandas se ven mejor definidas. En el caso de las personas con *DM* (carril 2) se observa la presencia de una banda con un peso molecular mayor a 250 kDa, posiblemente apoB-100 y la presencia de una banda P36. P, abreviatura de proteína.

VII Discusiones

Las sd-LDL han sido blanco de mediciones para la estimación del riesgo cardiovascular. Se desconoce cómo su estructura y composición las vuelven marcador de riesgo; bajo ciertas condiciones, estas lipoproteínas aumentan su concentración aumentando el riesgo cardiovascular. Por lo anterior, el estudio de las proteínas presentes en su membrana podría servir para la identificación de un posible biomarcador de riesgo cardiovascular. El método estandarizado en el presente estudio hace más accesible el análisis en doble dimensión del perfil proteómico de las sd-LDL al realizarse con un sistema de mini geles evitando el uso de equipos especiales como los capilares o la técnica de isoelectroenfoque. La metodología utilizada por Hirano resulta más rápida al trabajar con capilares de geles al 3% para separar a las sd-LDL, sin embargo, nuestra metodología permite obtener los mismos resultados con un sistema de mini geles de mayor accesibilidad, menor costo para la separación de las lipoproteínas, así como una mejor consistencia para el manejo del gel y su posterior uso.

El uso de electroforesis en condiciones nativas permitió la correcta separación e identificación de los complejos pertenecientes a las sd-LDL. Se comprobó que el complejo seleccionado al cortar la banda central del gel nativo son sd-LDL por el patrón de migración y la zona donde estas se alojaron en el gel. Durante las pruebas para estandarizar la primera dimensión se observó la poca estabilidad de las lipoproteínas ya que el aumentar el voltaje para disminuir el tiempo de electroforesis dió como resultado patrones anormales de bandeo o poca nitidez de las bandas.

La metodología propuesta para la segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes permite la visualización de las especies proteicas encontradas en las sd-LDL, permitiendo estimar los pesos aproximados que presentan estas proteínas logrando una identificación parcial de las mismas. En el pool de voluntarios con dislipidemia se pudo observar la presencia de las proteínas P240, P120, P95, P80, P70, P36 (nombre de acuerdo con su peso aproximado). Al igual que lo reportado por Bancells y colaboradores en 2010, en algunas de las repeticiones técnicas no se observó la presencia de algunas proteínas en

comparación con las encontradas durante la estandarización lo cual podría deberse a la baja cantidad de estas en el suero de las personas, como es el caso de ApoJ y ApoF.¹²

La banda P250 se encuentra cercana al peso reportado para la lipoproteína LP, una partícula de LDL unida a una proteína adicional; por lo general contiene a ApoA unida de forma covalente a ApoB. Su estructura le otorga funciones relacionadas con el transporte de lípidos y en su composición estructural.⁵⁷ En cuanto a las proteínas presentes de entre 100 y 120 kDa, son de pesos aproximados a los reportados para la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP), un dímero de una subunidad de P de 58 kDa y una subunidad M de 97 kDa. Cuando se encuentran unidas la proteína ejerce sus funciones entre las que destacan la transferencia de lípidos neutros entre las vesículas. La subunidad P fue indentificada como proteína chaperona de la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la cual facilita la formación de puentes disulfuro durante la biosíntesis de nuevas proteínas. Esta actividad se ve interrumpida al separarse el dímero impidiendo de la formación de complejos funcionales por la falta de plegamiento de las proteínas. Asimismo, la proteína P95 (aproximadamente 95 kDa) podría tratarse de la subunidad M (97 kDa) de MTP.⁵⁸

Las apoproteínas pueden ser glicosiladas bajo ciertas condiciones, aumentando su tamaño, provocando cambios en su migración electroforética. La apoproteína J (ApoJ) en estado altamente glicosilado posee un peso aproximado de entre 75 y 80 kDa, como las proteínas P80 y P70 observadas; mientras que sin glicosilar tiene un peso de entre 35 y 60 kDa. La ApoJ se encuentra relacionada con el envejecimiento, cáncer, procesos degenerativos en riñones y neuronas, daño vascular y diabetes. Su papel en estos procesos aun no ha sido descrito; sin embargo, ApoJ es capaz de unirse a una gran variedad de moléculas biológicas que presentan regiones hidrofóbicas, como lípidos, ApoA-I entre otros, promoviendo el reconocimiento de las LDL con el receptor LDL (LRP2) y favoreciendo su degradación.¹² En la estandarización pudo observarse una proteína P36; las LDL negativas presentan proteínas como la apoE y ApoF, ambas de pesos reportados de 36 kDa, además de

que podría tratarse de una fracción no glicosilada de apoJ. La cercanía de pesos entre estas proteínas supone una limitante para el método planteado, ya que estas proteínas podrían estarse traslapando, dificultando su identificación. A pesar de esto, las proteínas podrían ser identificadas por medio otros métodos, como la espectrometría de masas.^{12,25}

En el caso de P55, en el estudio realizado por Banfi en 2009 se menciona la presencia de la prenilcisteína liasa (PCL1) con un peso aproximado de 56 kDa. Se ha descrito que la PCL1 esta asociada a la modificación de lípidos generando uniones covalentes con otros residuos de cisteína, siendo las proteínas más afectadas aquellas proteínas involucradas en los eventos de regulación en las membranas celulares. La presencia de PCL1 en lipoproteínas pro aterogénicas (en este caso las sd-LDL) generan H₂O₂, induciendo a la oxidación de lipoproteínas, causando que su funcionamiento se vea afectado aumentando el riesgo aterogénico.²⁵

Para evaluar la funcionalidad del método estandarizado se realizó el análisis del perfil proteómico de personas con *DM* como fuente de sd-LDL por las altas concentraciones que presentan y se comparó con el de individuos sin *DM*. Inicialmente se determinaron las concentraciones de estas en las personas de ambos grupos de estudio. Los resultados de la cuantificación demostraron que las personas con *DM* presentan mayores concentraciones de estas subfracciones, concordando con lo reportado por Younis y colaboradores en 2013, quienes encontraron que las personas con *DM* que no tomaban estatinas presentaban las mayores concentraciones de estas moléculas.²⁶ Además, las personas con *DM* presentaron niveles elevados de TG y bajos niveles de HDL, esto se debe a que la regulación de estas lipoproteínas mediada por la insulina se encuentra disminuida en estas personas.³⁴ Estas anomalías en el perfil lipídico de las personas con *DM* aumenta la probabilidad de presentar problemas cardiovasculares.²⁸

Los patrones de migración en los geles de primera dimensión entre las personas con y sin *DM* difieren en el tamaño de la banda perteneciente a las sd-LDL, siendo menor en el segundo grupo, indicando que poseen una menor cantidad de estas

lipoproteínas, concordando con lo encontrado en los análisis clínicos realizados previamente. La banda perteneciente a las HDL no se pudo observar con facilidad en las personas con *DM*, esto podría ser indicativo de su eliminación sistémica por la disminución en el tamaño de estas lipoproteínas.³⁵

En personas con estados prolongado de hiperglicemia las sd-LDL son más propensas que otros complejos lipoproteicos a ser glicosilados, aumentando su tamaño y por lo tanto su migración electroforética. Se encontró una banda mayor a 250 kDa (apoB-100), posiblemente la apoB-100 de 550 kDa la proteína estructural de las sd-LDL en el grupo con *DM* encargada del reconocimiento de las LDL con su receptor, encontrándose el 95% de las LDL.^{4,12} Aunado a esto observó la presencia de las proteínas P240 P95, P70, P55 y P36.

Los resultados de la segunda dimensión dieron un perfil proteómico diferente a algunos perfiles reportados para LDL y para proteínas reportadas en sd-LDL. La ausencia de proteínas reportadas puede deberse a su separación durante la centrifugación en el método de precipitación salina por estar unidas de forma débil con el complejo, a pesar de ello las demás proteínas pudieron permanecer en el complejo gracias al tratamiento con luz UV para la formación de enlaces covalentes entre las proteínas estructurales de las sd-LDL y otras proteínas o moléculas biológicas con uniones temporales. Entre las apoproteínas que han sido reportadas en LDL de carga negativa y sd-LDL que no se observaron en el presente estudio se encuentran la apoA-II, Apo-D, las ApoC- I, II, III y ApoM.^{12,18}

En el perfil proteómico de las personas con *DM* se observó la presencia de la proteína P36 (de aproximadamente 36 kDa), proteína ausente en el grupo sin *DM* lo cual podría sugerir la presencia de apoproteínas como ApoE o ApoF. Al encontrarse sólo en el grupo de personas con *DM* disminuye la probabilidad de ser la estructura no glicosilada de apoJ. ApoE se encarga del reconocimiento de diferentes lipoproteínas, entre ellas la familia de las LDL y su ausencia genera hiperlipidemia. Además, se ha reportado la relación entre los niveles de ApoE y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, pudiendo tener una relación con el hecho de que las personas con *DM* poseen una mayor probabilidad de desarrollar este

padecimiento; mientras que ApoF se ha relacionado con la modulación de las funciones de las LDL inhibiendo su interacción con la CETP, por lo que el intercambio de colesterol esterificado y TG entre las LDL y VLDL es anormalmente bajo cuando la ApoF se encuentra en altas concentraciones. Es por ello que la diferencia de P36 en ambos grupos de estudio sugiere que la futura caracterización y correcta identificación de las proteínas presentes en esa banda podría dar como resultado la identificación de nuevos biomarcadores.^{12,59-64}

Además del cambio que pudieran estar presentando las proteínas encontradas en el perfil analizado, un factor importante que contribuye a aumentar en riesgo aterogénico en las personas con *DM*, es la disfunción endotelial que desarrollan, ocasionando que los grupos carboxilo con carga negativa de las cadenas de galactosaminoglicanos en la matriz extracelular de lugar a la interacción electrostática con ApoB presentes en las LDL. Los cambios en las LDL que llevan a la generación de sd-LDL y el cambio en el tejido endotelial ocasionan que las LDL queden atrapadas en los vasos sanguíneos, generando una lesión aterosclerótica.⁶⁵

La metodología estandarizada presenta ciertas limitantes como la estabilidad de las sd-LDL y la homogeneidad de condiciones en personas con *DM*, debido a las variaciones que presentan en cuanto a las afecciones que sufren como consecuencia del descontrol de los niveles de glucosa.

VIII Conclusiones

Se estableció como condiciones idóneas que permiten la correcta migración y separación de las sd-LDL el corrimiento unidimensional en un sistema de mini geles de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas con un programa electroforético a 80 V por 6 h.

El corrimiento de la banda del gel nativo en condiciones desnaturalizantes en geles al 8%, 80 V por 120 min, permitió la separación bidimensional de las proteínas presentes en los complejos de las sd-LDL, observándose al menos 6 bandas proteicas con pesos de ~240, ~120, ~95, ~80, ~70 y ~36 kDa (P240, P120, P95, P80, P36; respectivamente).

Las proteínas observadas en el ensayo clínico entre personas con *DM* y sin *DM* fueron P240, P120, P95, P80, P70, P55 y P36 variando la intensidad de P>250, P95 y la presencia de P36 en personas con *DM* en comparación con personas sin *DM*, sugiriendo cambios incorporación de proteínas no estructurales a las sd-LDL dependiendo de las condiciones en las que se encuentren las personas. Así como del posible intercambio de apoproteínas entre dichos complejos.

El método de doble dimensión a partir de un sistema de mini geles resulta funcional para determinar el perfil proteómico de las sd-LDL, siendo un método sencillo y sin el uso de equipos de alto costo; el cual podía ser una alternativa para la evaluación de dicho perfil entre casos y controles de enfermedades de interés clínico.

IX Perspectivas del trabajo

Identificar a las proteínas P>250, P~240, P~120, P~95, P~80, P~70, P~55 y P~36 por medio de espectrometría de masas o cromatografía.

Identificar la secuencia de péptidos de cada una de las proteínas encontradas para determinar los cambios que sufren al estar expuestas a altas concentraciones de glucosa en el caso de las personas con *DM*.

Identificar una cadena peptídica altamente conservada en las proteínas de las sd-LDL como posible biomarcador para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares.

X Referencias bibliográficas

1. Lepedda AJ, Nieddu G, Zinellu E, et al. Proteomic analysis of plasma-purified VLDL, LDL, and HDL fractions from atherosclerotic patients undergoing carotid endarterectomy: Identification of serum amyloid a as a potential marker. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–11. doi:10.1155/2013/385214
2. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular*. Panamericana; 2007.
3. Stoney CM. Lipids and Lipoproteins. *Stress Neuroendocrinol Neurobiol*. 2017;2:284–294. doi:10.1016/B978-0-12-802175-0.00028-0
4. Sódar BW, Kittel Á, Pálóczi K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection. *Sci Rep*. 2016;6(April):1–12. doi:10.1038/srep24316
5. Figueroa DM, Gordon EM, Yao X, Levine SJ. *Apolipoproteins as context-dependent regulators of lung inflammation*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-813553-2.00013-0
6. Engelking LR. Lipoprotein Complexes. *Textb Vet Physiol Chem*. 2015:406–410. doi:10.1016/b978-0-12-391909-0.50063-3
7. Feingold KR, Grunfeld C. *Introduction to Lipids and Lipoproteins*.; 2000.
8. Carvajal C. Revisión bibliográfica lipoproteínas: Metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Med Leg Costa Rica -Edición Virtual*. 2014.
9. Hirayama S, Miida T. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2012;414:215–224. doi:10.1016/j.cca.2012.09.010
10. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. 1990;83(1):59–67.

doi:10.1016/0021-9150(90)90131-2

11. Packard C, Caslake M, Shepherd J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): A new look. *Int J Cardiol.* 2000;74(SUPPL. 1):17–22. doi:10.1016/S0167-5273(99)00107-2
12. Bancells C, Canals F, Benítez S, et al. Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res.* 2010;51(12):3508–3515. doi:10.1194/jlr.M009258
13. Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, et al. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs Context.* 2018;7:1–9. doi:10.7573/dic.212525
14. Kwiterovich PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 2000;86(12 A):5–10. doi:10.1016/S0002-9149(00)01461-2
15. Luz PL da, Favarato D, Faria-Neto Junior JR, Lemos P, Chagas ACP. High ratio of triglycerides to hdl-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics.* 2008;63(4):427–432. doi:10.1590/S1807-59322008000400003
16. Tsai MY, Steffen BT, Guan W, et al. New Automated Assay of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol Identifies Risk of Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(1):196–201. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302401
17. Austin MA. Triglyceride, small, dense low-density lipoprotein, and the atherogenic lipoprotein phenotype. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2(3):200–207. doi:10.1007/s11883-000-0021-4
18. Thongtang N, Diffenderfer MR, Ooi EMM, et al. Metabolism and proteomics of large and small dense LDL in combined hyperlipidemia: effects of rosuvastatin. *J Lipid Res.* 2017;58(7):1315–1324. doi:10.1194/jlr.M073882
19. von Zychlinski A, Kleffmann T. Dissecting the proteome of lipoproteins: New

- biomarkers for cardiovascular diseases? *Transl Proteomics*. 2015;7:30–39. doi:10.1016/j.trprot.2014.12.001
20. Mudd JO, Borlaug BA, Johnston P V., et al. Beyond Low-Density Lipoprotein Cholesterol. Defining the Role of Low-Density Lipoprotein Heterogeneity in Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(18):1735–1741. doi:10.1016/j.jacc.2007.07.045
 21. Kwon SW, Yoon S-J, Kang TS, et al. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Yonsei Med J*. 2006;47(3):405–414. doi:10.3349/ymj.2006.47.3.405
 22. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):1069–1077. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303284
 23. Koba S, Hirano T, Ito Y, et al. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart diseases. *Atherosclerosis*. 2006;189(1):206–214. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.002
 24. Packard CJ. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(4):412–417. doi:10.1097/01.mol.0000236367.42755.c1
 25. Banfi C, Brioschi M, Barcella S, et al. Proteomic analysis of human low-density lipoprotein reveals the presence of prenylcysteine lyase, a hydrogen peroxide-generating enzyme. *Proteomics*. 2009;9(5):1344–1352. doi:10.1002/pmic.200800566
 26. Younis NN, Soran H, Pemberton P, Charlton-Menys V, Elseweidy MM, Durrington PN. Small dense LDL is more susceptible to glycation than more buoyant LDL in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(5):343–349.

doi:10.1042/CS20120304

27. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43(9):1363–1379. doi:10.1194/jlr.R200004-JLR200
28. Mooradian A. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009;5(3):150–159. doi:10.1038/ncpendmet
29. Gazi I, Lourida ES, Filippatos T, Tsimihodimos V, Elisaf M, Tselepis AD. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is a marker of small, dense LDL particles in human plasma. *Clin Chem.* 2005;51(12):2264–2273. doi:10.1373/clinchem.2005.058404
30. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36(Supplement_1):S67–S74. doi:10.2337/dc13-S067
31. Rodríguez Bolaños RA, Reynales Shigematsu LM, Jiménez Ruíz JA, Juárez Márquez SA H, M Á. Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo. *Rev Panam Salud Publica.* 2010;28(6):412–420.
32. Yucatán S de S de. *Principales causas de mortalidad hospitalaria.*; 2017. <http://salud.yucatan.gob.mx/wp-content/uploads/2013/05/PRINCIPALES-CAUSAS-DE-MORBILIDAD-2017.pdf>.
33. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM - Mon J Assoc Physicians.* 2006;99(1):1–14. doi:10.1093/qjmed/hci154
34. Brunzell JD, Ayyobi AF. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med.* 2003;115(8 SUPPL. 1):24–28. doi:10.1016/j.amjmed.2003.08.011
35. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(6):1496–1504. doi:10.2337/diacare.27.6.1496

36. Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet*. 2008;371(9626):1800–1809. doi:10.1016/S0140-6736(08)60768-0
37. Hirano T, Ito Y, Koba S, et al. Clinical Significance of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Determined by the Simple Precipitation Method. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(3):558–563. doi:10.1161/01.ATV.0000117179.92263.08
38. Lamarche B, Tchernof A, Mauriège P, et al. Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *J Am Med Assoc*. 1998;279(24):1955–1961. doi:10.1001/jama.279.24.1955
39. Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clin Chem*. 2006;52(9):1722–1727. doi:10.1373/clinchem.2005.059949
40. Vakkilainen J, Pajukanta P, Cantor RM, et al. Genetic influences contributing to LDL particle size in familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(9):547–552. doi:10.1038/sj.ejhg.5200844
41. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem*. 2002;48(2):236–254.
42. Gordon S, Durairaj A, Lu JL, Davidson WS. High-Density Lipoprotein Proteomics: Identifying New Drug Targets and Biomarkers by Understanding Functionality. *Curr Cardiovasc Risk Rep*. 2010;4(1):1–8. doi:10.1007/s12170-009-0069-9
43. Frings CS, Foster LB, Cohen PS. Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel. *Clin Chem*. 1971;17(2):111–114.
44. Camacho-Carvajal MM, Wollscheid B, Aebersold R, Steimle V, Schamel

- WWA. Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Multi-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates. *Mol & Cell Proteomics*. 2004;3(2):176 LP – 182. <http://www.mcponline.org/content/3/2/176.abstract>.
45. Krauss RM. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21(4):305–311. doi:10.1097/MOL.0b013e32833b7756
 46. Yu L-R, Stewart NA, Veenstra TD. Proteomics. En: *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*. Elsevier; 2010:89–96. doi:10.1016/B978-0-12-374934-5.00008-8
 47. López Farré A, Armengol JG, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. *Clin e Investig en Arterioscler*. 2008;20(4):164–172. doi:10.1016/S0214-9168(08)72603-2
 48. Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. A Review of Requirements & Needs †. *J Proteome Res*. 2005;4(4):1086–1097. doi:10.1021/pr050080b
 49. Righetti PG, Campostrini N, Pascali J, Hamdan M, Astner H. Quantitative Proteomics: A Review of Different Methodologies. *Eur J Mass Spectrom*. 2004;10(3):335–348. doi:10.1255/ejms.600
 50. Manuel González-Buitrago J, Ferreira L, Del Carmen Muñiz M. Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Med Clin (Barc)*. 2008;131(11):426–434. doi:10.1157/13126219
 51. Thangthaeng N, Sumien N, Forster MJ, Shah RA, Yan L-J. Nongradient blue native gel analysis of serum proteins and in-gel detection of serum esterase activities. *J Chromatogr B*. 2011;879(5–6):386–394. doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.026
 52. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res*. 1982;23(Ldl):97–104.

53. Lara-Riegos J, Brambila E, Ake-Ku A, et al. Short-term estimation and application of biological variation of small dense low-density lipoproteins in healthy individuals. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(11). doi:10.1515/cclm-2013-0370
54. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res*. 2003;44(11):2193–2201. doi:10.1194/jlr.D300007-JLR200
55. Cavalcante L da S, da Silva EL. Application of a modified precipitation method for the measurement of small dense LDL-cholesterol (sd-LDL-C) in a population in southern Brazil. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(9). doi:10.1515/cclm-2011-0797
56. Thermo Fisher. *Protein gel electrophoresis technical handbook*.; 2015.
57. Mayo Clinic Laboratories. *Lipids and Lipoproteins in Blood Plasma (Serum)*.; 2018.
58. Hussain MM, Rava P, Walsh M, Rana M, Iqbal J. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):14. doi:10.1186/1743-7075-9-14
59. Knouff C, Hinsdale ME, Mezdour H, et al. Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice. *J Clin Invest*. 1999;103(11):1579–1586. doi:10.1172/JCI6172
60. Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:106. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>.
61. Bell RD, Winkler EA, Singh I, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 2012;485(7399):512–516. doi:10.1038/nature11087
62. Genin E, Hannequin D, Wallon D, et al. APOE and Alzheimer disease: a major

gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*. 2011;16(9):903–907.
doi:10.1038/mp.2011.52

63. Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM, Ager R, LaFerla FM. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;64:272–287.
doi:10.1016/j.neubiorev.2016.03.005
64. Lagor WR, Fields DW, Bauer RC, et al. Genetic manipulation of the ApoF/Stat2 locus supports an important role for type I interferon signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;233(1):234–241.
doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.043
65. Afroz R, Cao Y, Rostam MA, et al. Signalling pathways regulating galactosaminoglycan synthesis and structure in vascular smooth muscle: Implications for lipoprotein binding and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2018;187:88–97. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.005

XI Anexos

XI.1 Anexo 1. Consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN
FACULTAD DE QUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MOLECULAR



"Bienestar comunitario: Proyecto de capacitación para la autogestión de la salud en personas con DT2 y sus familias, en la comunidad de Tixcaltuyub, Yaxcabá."

Consentimiento informado

Se solicita su participación en el proyecto de investigación "Bienestar comunitario: Proyecto de capacitación para la autogestión de la salud en personas con DT2 y sus familias, en la comunidad de Tixcaltuyub, Yaxcabá", cuyo propósito es identificar factores genéticos que impacten en el efecto de la terapia con antihiperoglucemiantes, con el objetivo de prevenir posibles reacciones no deseadas al tratamiento de la DT2.

Es de destacar que su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar no habrá represalias de ningún tipo.

¿A quién puedo llamar si tengo preguntas sobre este proyecto?

Si usted tiene preguntas acerca de la recolección de muestras, sus derechos en este proyecto o sobre el almacenamiento de las mismas, contacte a la Facultad de Química, Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular al teléfono 9 22 57 16 ext. 38125

Por favor lea la siguiente información, mediante su elección y firme si usted está de acuerdo:

Estoy de acuerdo:

- En donar una muestra de sangre;
- En que a partir de la muestra se me realicen exámenes bioquímicos como: glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, entre otros, cuyos resultados me serán entregados para evaluar el estado de mi salud.
- En que a partir de la muestra se haga la extracción de ADN para realizar estudios genómicos.

- En que a partir de la muestra se haga una línea celular que permitirá a los investigadores una cantidad ilimitada de ADN y materiales biológicos durante mucho tiempo;
- En que la línea celular y ADN se utilicen tanto en el presente estudio como en otros estudios que se describen en esta forma de consentimiento.
- En que toda la información genética de la muestra sea depositada en bases de datos científicos de libre acceso (públicas) en Internet.

He leído o escuchado toda la información, he hecho todas las preguntas que he tenido, y todas mis preguntas han sido respondidas satisfactoriamente. Soy consciente que dar una muestra es mi decisión.

Acepto que se me realice la toma de muestra de sangre periférica.

Lugar y fecha: _____

Nombre del paciente: _____

Dirección: _____

Firma del paciente: _____

¿Se le otorgó copia al paciente? Sí No

Firma del Investigador: _____

Testigo 1 (firma): _____

Testigo 2 (firma): _____

XI.2 Anexo 2. Encuesta



"Bienestar comunitario: proyecto de capacitación para la autogestión de la salud en personas con DT2 y sus familias, en la comunidad de Tixcaltuyub, Yaxcabá."



Datos personales:

Folio: _____
 Nombre: _____ Fecha de nacimiento: _____
 Ocupación: _____ Estado Civil: _____
 Sexo: _____ Dirección: _____
 Escolaridad: _____ Origen étnico: _____

¿Tiene antecedentes de familiares con diabetes?

Puede escoger varias opciones

- Padre o Madre Hermanos/as
 Abuelos/as Tios/as
 Hijos/as Ninguno
 No sabe

¿Hace cuánto tiempo que tiene diabetes?

6

¿Cuál es su último dato de HbA1c (Hemoglobina Glucosilada)?

¿Tiene usted otras enfermedades además de diabetes? ¿Cuál/es?

Intervenciones médicas

Cirugías: no ___ si ___
 ¿Cuál(es)? _____
 ¿Cuándo? _____
 Transfusiones: no ___ si ___ ¿Cuándo fue la última? _____
 ¿Motivo? _____
 Trasplantes: no ___ si ___
 ¿Trasplante realizado? _____

¿Se hace la prueba del colesterol una vez al año?

Si
 No

Existe historia de:

Coma diabético _____ Neuropatía _____
 Desórdenes de la piel _____ Retinopatía _____
 Enfermedad cardíaca _____
 Enfermedad renal _____ Otras _____
 Enfermedad vascular _____

ANTROPOMETRÍA

EDAD	Estatura	Peso	IMC	Grasa corporal	Masa Musc.	RM Kcal	Edad corporal	Edad metabólica	Grasa visceral	Cintura-Cadera	T/A	FC



Evaluaciones de la adherencia terapéutica

Test Morisky-Green

1. ¿Olvida alguna vez tomar los medicamentos para tratar su enfermedad?
2. ¿Toma los medicamentos a las horas indicadas?
3. Cuando se encuentra bien, ¿deja de tomar la medicación?
4. Si alguna vez le sienta mal, ¿deja usted de tomarla?

XI.3 Anexo 3. Dictamen del Comité de Ética e Investigación



Número de registro: 09/17
(Asignado por la Secretaría del Comité de Ética e Investigación)

"COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN"
DICTAMEN

Fecha: 04 de Diciembre de 2017

MCES. María Ermila Moo Mezeta

PRESENTE

Por la presente se le informa que su protocolo con número de registro 09/17, titulado Bienestar comunitario: proyecto de capacitación para la autogestión de la salud de las personas con DT2 y sus familias, en la comunidad de Tixcacaltuyub y Yaxcabá, a realizarse en Tixcacaltuyub, Yaxcabá, Yucatán, fue evaluado por el Comité de Ética e Investigación, el cual emitió el dictamen:

Aprobado
 Condicionado con modificaciones mayores**
 Condicionado con modificaciones menores*
 Diferido ***

Atentamente


M.S.P Ligia María Rosado Alcocer

Nota: ***Favor de atender el dictamen en un tiempo no mayor a dos meses.
**Favor de atender el dictamen y regresar el manuscrito en 20 días naturales.
*Favor de atender el dictamen y regresar el manuscrito en 15 días naturales.

Cop. Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación
Cop. Archivo

NOTA: El tiempo de validez de este dictamen será de dos años una vez que haya sido Aprobado
Calle 90 S/N entre 59 y 59-A, espaldas del Hospital O'Horán, CP. 97000, Apdo. Postal 0971, Mérida, Yuc., Méx.
Tel. 928-52-50, Fax. (999) 924-22-16

F-FENF-SAC-14/REV: 04

XI.4 Anexo 4. Figuras complementarias

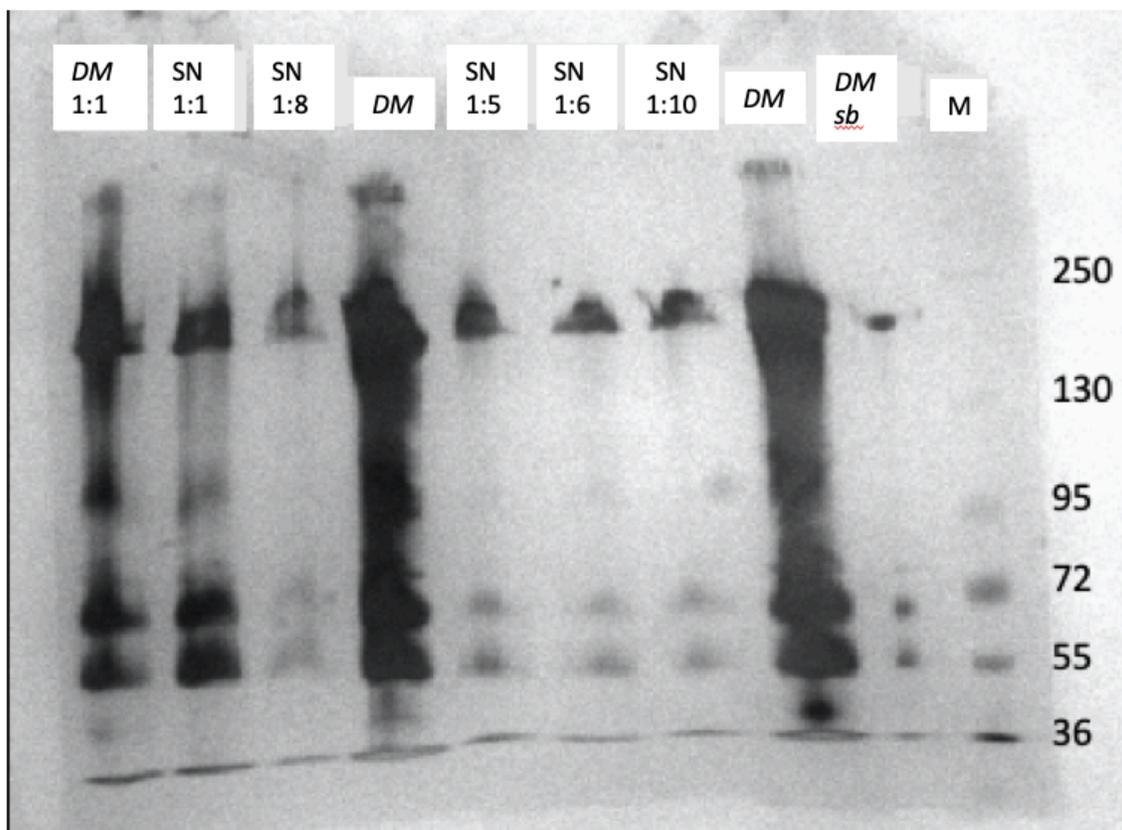


Figura Anexa 4-1. Gel SDS-PAGE AL 8%. Corrimiento del pool de personas sin *DM* (SN) y personas con *DM* (*DM*) en el mismo gel.

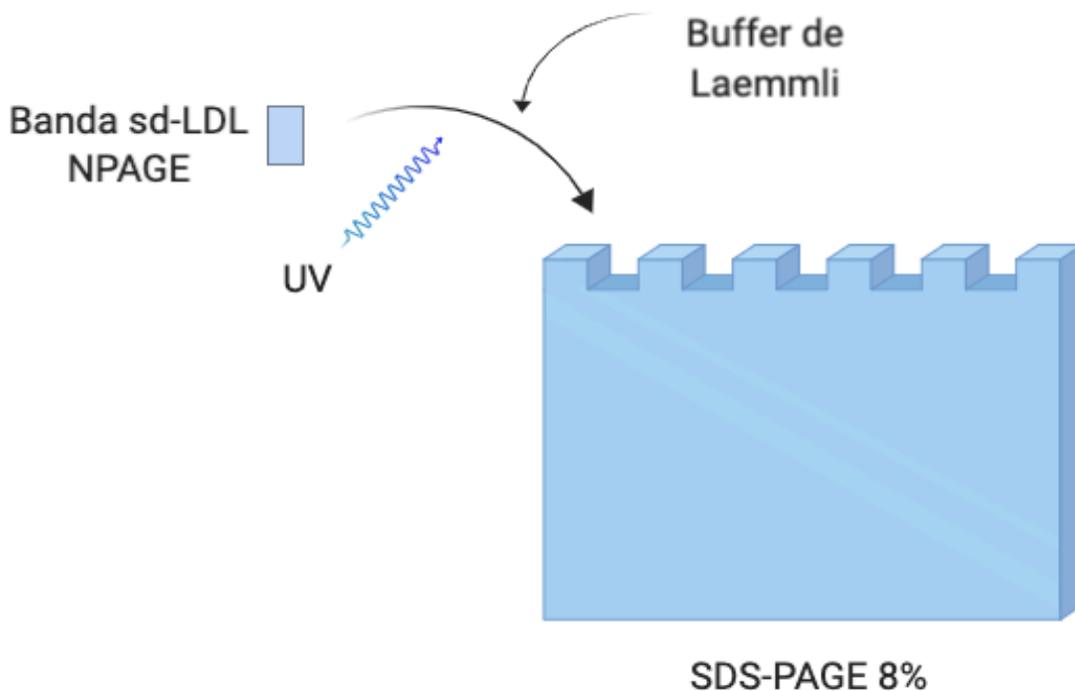


Figura anexa 4-2. Diagrama metodológico de la segunda dimensión. La banda recortada de las sd-LDL proveniente del gel en condiciones nativas recibió tratamiento con luz UV y buffer de Laemmli. Posteriormente la banda fue insertada en los pozos del gel desnaturizante al 8% y se selló con agarosa al 0.5% para evitar que la banda se salga de su lugar. La electroforesis fue llevada a cabo en las condiciones establecidas

XI.5 Anexo 5. Soluciones

Solución precipitante

Heparina sódica (1000 U/mL) 7.5 mL

Cloruro de magnesio 1M 4.5 mL

Aforar a 50 mL con agua destilada y almacenar a 4°C.

Buffer de fosfatos pH 8.5

Fosfato monopotásico 13.6 g

Fosfato dipotásico 17.4g

Disolver en 100 mL de agua destilada y ajustar a pH 8.5 con HCl 1M.

Acrilamida-bisacrilamida al 30% (29:1)

Acrilamida 29.2 g

N'N-bis-metilenacrilamida 0.8 g

Agua destilada 100 mL

Almacenar a 4°C.

Persulfato de amonio (PSA) al 10%

Persulfato de amonio 100 mg

Agua destilada 1 mL

Almacenar a -20°C.

SDS al 10%

SDS	1 g
Agua destilada	10 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

Tris HCl 1.5 M pH 8.8

Tris	18.15 g
------	---------

Disolver en 50 mL de agua destilada, ajustar pH con HCl y aforar a 100 mL.
Almacenar a 4°C.

Tris HCl 0.5 M pH 6.8

Tris	6 g
------	-----

Disolver en 50 mL de agua destilada, ajustar pH con HCl y aforar a 100 mL.
Almacenar a 4°C.

Buffer de corrimiento SDS 5X pH 8.3

Tris	7.5 g
Glicina	36 g
SDS	5 g

Disolver en 250 mL de agua destilada, ajustar pH con HCl y aforar a 500 mL.
Almacenar a 4°C.

TBE 10X

Trizma base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5 M pH 8	40 mL

Aforar a 1000 mL con agua destilada y esterilizar.

Buffer de Laemmli 2x (10 mL)

Tris HCl 1M, pH 6.8	1 mL
SDS 10%	4 mL
Glicerol	2 mL
β -mercaptoetanol	2.5 mL
Azul de bromofenol	500 μ L

Una vez preparado a -20 °C protegido de la luz.

