

Determinación de ácido siálico sobre lipoproteínas de baja densidad aisladas por precipitación selectiva. Propuesta de índices de composición*

► Adriana Elena Scoccia¹, María Silvana Molinuevo², Ana María Cortizo³

-
1. Licenciada en Farmacia y Bioquímica.
 2. Farmacéutica y Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.
 3. Doctora en Ciencias Bioquímicas. Miembro de la carrera de Investigación Científica y Técnica de la CICPBA.

* Cátedra de Bioquímica Patológica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen

El objetivo de este estudio fue optimizar la determinación de ácido siálico en LDL aislada por precipitación selectiva y establecer relaciones entre componentes que puedan ser indicadores de aterogenicidad. Se empleó polivinilsulfato disuelto en polietilenglicol como reactivo precipitante, se ajustaron las condiciones de los lavados para garantizar la ausencia de otras proteínas del suero y se solubilizó la LDL en 5% de NaCl. Se determinó apoB, colesterol, proteínas y se optimizó la cuantificación de ácido siálico según el método de Warren modificado por Sobenin y col. Se realizó la evaluación del método analítico adaptado en cuanto a precisión intra- e inter-ensayos (CV 8 y 9% respectivamente), linealidad (hasta 7 nmol de ácido siálico/tubo); efecto de los lavados; especificidad; ausencia de interferencia de blancos de reactivo precipitante; ensayo de recuperación (entre 88 y 120%). Los resultados obtenidos sobre 30 muestras de personas normolipémicas de ambos sexos (edades entre 30 y 65 años) expresados como media \pm SEM fueron: colesterol $3,8 \pm 0,2$ mmol/l, ácido siálico $34,7 \pm 2,7$ μ mol/l, ApoB $1,27 \pm 0,09$ μ mol/l, proteínas $1,57 \pm 0,08$ g/l. Índices de composición: ácido siálico/colesterol: $9,24 \pm 0,48$ mmol/mol, ácido siálico/apoB $34,4 \pm 3$ mol/mol y ácido siálico/proteína $39,6 \pm 1,31$ μ mol/g. Son necesarios estudios clínicos que permitan evaluar los alcances de los índices de composición propuestos como posibles indicadores de aterogenicidad.

Palabras clave: ácido siálico * lipoproteínas de baja densidad * aterogénesis.

Summary

SIALIC ACID DETERMINATION IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN ISOLATED BY SELECTIVE PRECIPITATION. INDEX OF COMPOSITION

The aim of this study was to optimize the sialic acid determination in LDL isolated by selective precipitation and to establish ratios between components as possible indicators of atherogenicity. Polyvinil sulfate in poly-ethilenglycol was used as precipitation reactive, washed conditions were fixed to avoid contamination with serum proteins and the resulting LDL was dissolved in 5% NaCl. ApoB, cholesterol and protein were assessed. Sialic

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL

ISSN 0325-2957

acid was optimized by the method of Warren modified by Sobenin et al. Analytical method was analyzed: intra and inter assay precision was 8 and 9% respectively; linearity up to 7 nmol of sialic acid/tube; the effect of washes; specificity; no interferences of the precipitating reactive; and the recuperation was between 88-120%. The results obtained on 30 samples from normolipidemic subjects of both sexes (30-65 years old) expressed as means \pm SEM were: cholesterol 3.8 ± 0.2 mmol/l, sialic acid 34.7 ± 2.7 μ mol/l, ApoB 1.27 ± 0.09 μ mol/l, proteins 1.57 ± 0.08 g/l. Indexes of composition: sialic acid/cholesterol: 9.24 ± 0.48 mmol/mol, sialic acid/ApoB 34.4 ± 3 mol/mol and sialic acid/protein 39.6 ± 1.31 μ mol/g. Additional clinical studies are needed in order to evaluate the possible application or the proposed index of atherogenicity.

Key words: sialic acid * low density lipoprotein * atherogenesis.

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad de alta prevalencia de la cual se han estudiado extensamente sus manifestaciones clínicas y sus consecuencias, sin embargo, el mecanismo bioquímico subyacente permanece aún desconocido. Las nuevas teorías postulan que las placas ateroscleróticas se forman a partir de células enriquecidas con lípidos derivados de las lipoproteínas plasmáticas (1), entre las cuales las de baja densidad (LDL) son consideradas las de mayor potencial aterogénico. Este mecanismo sería mediado a través de los receptores *scavenger* que reconocen y toman partículas de LDL previamente modificadas (2)(3).

Diversas modificaciones sobre las LDL pueden contribuir a su aterogenicidad: oxidación, agregación, formación de complejos inmunes, glicación, desialilación, entre otras (2)(4). Varios estudios han propuesto que el nivel de ácido siálico en LDL puede jugar un rol en su aterogenicidad (4-6). Se ha observado una fuerte correlación negativa entre la capacidad de la LDL para estimular la acumulación intracelular de lípidos en células en cultivo, y su contenido en ácido siálico. Por otro lado, el contenido en ácido siálico de LDL aislada de pacientes con enfermedad arterial coronaria resulta ser de 2 a 3 veces menor que el encontrado en sujetos sanos. Más recientemente se ha observado que la inhibición de la síntesis del colesterol por tratamientos con estatinas incrementa la relación ácido siálico/apoB en las partículas aisladas de LDL; este efecto es proporcional a la disminución en el contenido de apoB y colesterol en la LDL (7).

El ácido siálico es un componente de gangliósidos y de apo B100 de la partícula de LDL (8). La alta carga de superficie asociada con el ácido siálico en hidratos de carbono juega un rol importante en la prevención de la agregación lipoproteica y podría ejercer inhibición electrostática de las interacciones de la lipoproteína con proteoglicanos arteriales (9)(10). Diversos estudios han demostrado que la desialilación no es un artefacto que ocurre durante el aislamiento de la partícula, este pro-

ceso puede tener lugar mientras la LDL permanece en circulación, como paso primario de la modificación aterogénica (6)(11)(12). De esta manera se inicia una cascada de cambios sucesivos en la partícula de LDL que incluyen pérdida de lípidos, reducción del tamaño de las partículas, incremento de carga electronegativa y peroxidación lipídica.

Por lo anteriormente expuesto, sería importante disponer de métodos confiables, tanto de fraccionamiento de LDL, como de ensayos para la determinación del contenido en ácido siálico en dichas partículas.

La LDL puede ser aislada por diferentes métodos que incluyen ultracentrifugación secuencial y en gradiente de densidad (método de referencia), cromatografía, electroforesis y precipitación selectiva (13)(14). Los métodos de precipitación selectiva, más accesibles que la ultracentrifugación, son usados ampliamente en los laboratorios clínicos y correlacionan bien con el método de referencia (14). Recientemente, se ha propuesto un método simple para medir la susceptibilidad a la oxidación de LDL aislada por precipitación selectiva con polímeros anfipáticos (15).

Por otro lado, el contenido de ácido siálico en LDL aislada muestra una gran dispersión; esto se puede atribuir a los diferentes métodos empleados en su cuantificación. Los ensayos colorimétricos se basan en oxidación con periodato y posterior reacción del producto con ácido tiobarbitúrico (método de Warren), otros emplean la reacción con resorcinol (método de Svennerholm) y también existen métodos enzimáticos y desarrollo de productos con absorción en el UV (16-20).

En el presente trabajo se seleccionó el método de Warren que emplea hidrólisis ácida, ataque oxidativo con periodato y una reacción de color de los productos con ácido tiobarbitúrico. Se adoptó la modificación de Sobenin y col. (16) que consiste en la sustracción colorimétrica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las muestras sometidas a todos los procedimientos excepto al tratamiento oxidativo con periodato. Entre los productos detectados en esta reacción, el malondialdehído (producto de lipoperoxidación) se

puede sustraer colorimétricamente para cuantificar sólo el ácido siálico de las partículas de LDL.

El propósito de este trabajo fue optimizar la determinación de ácido siálico sobre LDL aislada por precipitación selectiva, establecer relaciones con los contenidos de ApoB, colesterol y proteínas en la fracción precipitada que aporten información de composición relativa y así proponer indicadores de aterogenicidad.

Materiales y Métodos

MUESTRAS

Se estudió una serie de 30 personas de ambos sexos (entre 30 y 65 años), normolipémicos según los criterios Alfediám (21) y sin enfermedad detectada sobre la base de los análisis químicos clínicos. El suero obtenido de sangre venosa después de un ayuno de 12 h se conservó en heladera (2-10 °C) hasta 48 h.

MATERIALES

LDL Colesterol, reactivo precipitante: sulfato de polivinilo 10 g/ml en polietilenglicol (PM 600) al 25%, pH 6,7 y Colestat enzimático provistos por los laboratorios Wiener. Ácido tiobarbitúrico (Merck). 1,1,3,3-tetrametoxipropano (malondialdehído, MDA) (Sigma Co. St. Louis, MO, USA) se usó como estándar. Placas de IDR (Diffu-plate) provistas por Biocientífica S.A. Hydragel ApoA1/ApoB (SEBIA) provisto por EMSA S.A.

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico y se emplearon sin ulterior purificación.

MÉTODOS

Aislamiento de LDL: Se empleó el reactivo precipitante del equipo de LDL-Colesterol (Wiener) según indicaciones del fabricante; se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con reactivo precipitante una y dos veces empleando cada vez el mismo volumen que se usó al precipitar y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Las partículas de LDL en el precipitado se solubilizaron en una solución de NaCl 5%, empleando para tal fin un volumen equivalente a la muestra original.

Caracterización de LDL aislada por precipitación selectiva: Una alícuota de la muestra de LDL aislada se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa como se describe previamente (15). Sobre otra alícuota se determinó el contenido de ácido siálico por el método de Warren modificado por Sobenin y col. (16). También se determinó el contenido de colesterol por un método enzimático; ApoB por inmunodifusión radial (DIFFUPLATE) y por electroinmunodifusión (Hydragel ApoA1/B SEBIA) y el contenido de proteínas por el método de Bradford (22).

Determinación de ácido siálico: Se utilizaron dos alícuotas de la muestra de LDL (50 µl) (una para "ensayo" y otra para "corrección"). Se agregaron 100 µl de SO_4H_2 0,2 N, y las muestras se incubaron a 80 °C durante 1 h, al final de lo cual se enfriaron a 20 °C durante 20 min. Se agregaron 20 µl de reactivo periodato (IO_4Na 0,2 M en PO_4H_3 9 M) a los tubos para "ensayo" o 20 µl de PO_4H_3 9 M a los tubos de "corrección". Se mezclaron e incubaron durante 20 min a 20 °C. Al final de este período, se agregaron 100 µl de reactivo m-arsenito (AsO_2Na 10% en SO_4H_2 0,1 N con SO_4Na_2 0,5 M) y se mezcló vigorosamente hasta desaparición del color amarillo parduzco generado en la reacción. La formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se estimó agregando 250 µl de reactivo (Ácido tiobarbitúrico 0,6% en SO_4Na_2 0,5 M). Después de calentar en un baño María hirviendo durante 30 min, se enfrió a 20 °C, se extrajo con 2 ml de butanol, y las muestras se centrifugaron 5 min a 1500 rpm para separar las fases. El pigmento rosa generado en la fase orgánica se estimó por absorción a 532 nm. Se preparó una curva de calibración con MDA como estándar. Los resultados se expresaron como nmoles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por tubo de reacción. Los TBARS generados en los tubos de "corrección" se sustrajeron de los tubos de "ensayo", obteniendo así los nmoles de ácido siálico/100 µl de muestra. Alícuotas del reactivo precipitante se sometieron al mismo procedimiento descrito anteriormente y se usaron como "blanco" de reacción.

Ensayo de recuperación: Se agregaron 0,5 y 1 nmol de estándar a una alícuota de las LDL resuspendidas y a continuación se realizó la determinación de ácido siálico, por duplicado.

Ensayo de linealidad: Se ensayaron por duplicado volúmenes crecientes de la muestra de LDL resuspendida (de 20-150 µl) para analizar la linealidad de la reacción del ácido siálico con el periodato.

Precisión intraensayo: Se aplicó el procedimiento completo a alícuotas de la misma muestra incluyendo la precipitación selectiva (n = 10), y a alícuotas de lipoproteína solubilizada luego de un único procedimiento de precipitación (n = 20).

Precisión interensayo: Se realizaron procedimientos independientes dentro de los tiempos de estabilidad de la muestra (n = 20).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media ± SEM. El análisis estadístico se realizó por el *test* de Student; los

valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. La correlación entre parámetros se evaluó a través del coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se realizaron determinaciones de ácido siálico sobre una muestra sometida a un único procedimiento de precipitación y redisolución. El CV fue 5,8%. Cuando se aplicó el procedimiento completo a alícuotas de la misma muestra, incluyendo la precipitación selectiva, el CV fue 8%.

PRECISIÓN INTERENSAYOS

Se evaluó la misma muestra sometida al procedimiento completo, en veinte ensayos sucesivos. El CV fue 9%.

CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN DE LDL AISLADA

Las LDL aisladas por precipitación selectiva se sometieron a una electroinmunodifusión para ApoB y ApoA1. No se detectó la presencia de ApoA1 en estas muestras. La cuantificación de ApoB en las partículas de LDL por electroinmunodifusión y por inmunodifusión radial mostró una muy buena y significativa correlación lineal ($y = 1,12x - 13,25$, $r = 0,84$, $n = 15$, $p < 0,001$). La electroforesis en gel de agarosa para proteínas mostró una banda en posición beta y sólo trazas de proteínas luego del segundo lavado de la LDL precipitada (Fig. 1), sugiriendo muy poca contaminación con proteínas plasmáticas.

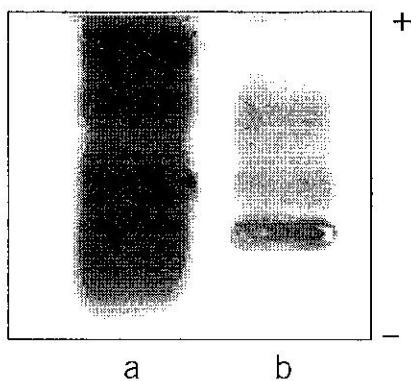


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de un suero entero (a) y la fracción de LDL precipitada (b). Las muestras se tiñeron con Coomassie Blue.

EFFECTO DE LOS LAVADOS

La LDL precipitada fue lavada 1 ó 2 veces con solución precipitante antes de ser solubilizada. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas en la LDL resuspendida. Se observó que el primer lavado disminuyó el contenido de proteínas de la muestra de LDL resuspendida significativamente (60%), mientras que el segundo lavado sólo redujo un 5% más el contenido de proteínas de la LDL. De tal manera, se adoptó la realización de dos lavados de la LDL aislada por precipitación selectiva antes de su solubilización con NaCl 5%. Por otro lado, el contenido de ácido siálico, apoB y colesterol en la LDL no varió luego de cada lavado respecto a la lipoproteína solubilizada sin lavar.

ENSAYO DE RECUPERACIÓN

Con el objeto de asegurar la recuperación de un estándar, se agregó una cantidad fija del estándar a diferentes alícuotas de LDL redisolta y se ensayó por duplicado. La recuperación varió entre 88 y 120%.

LINEALIDAD

Volúmenes crecientes de LDL solubilizada se sometieron al proceso oxidativo. Como puede verse en la Figura 2, la reacción de TBARS fue lineal hasta 7 nmolles/tubo.

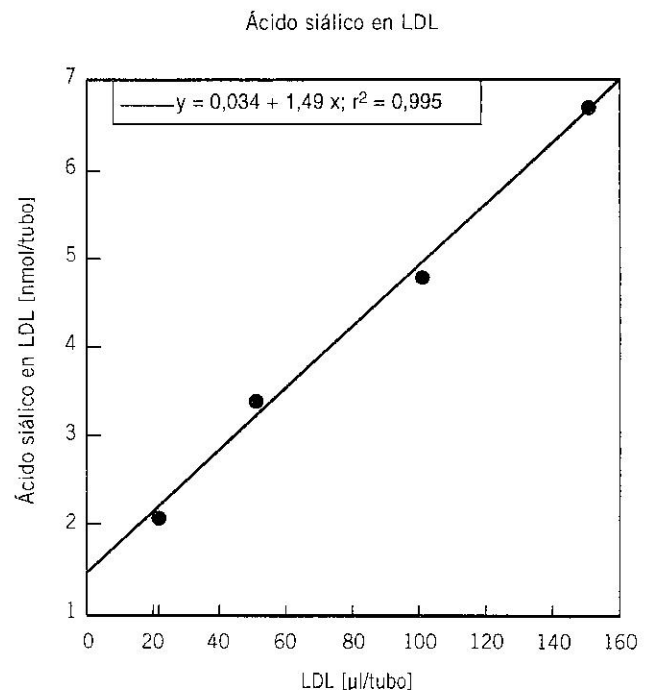


Figura 2. Linealidad de la reacción del ácido siálico con periodato en la fracción de LDL precipitada, medido a través de la colorimetría de TBARS.

COMPOSICIÓN DE LDL AISLADA POR PRECIPITACIÓN SELECTIVA

Se analizó la composición de las partículas de LDL aisladas por precipitación selectiva de 30 muestras de sujetos normales. La Tabla I muestra los datos de composición obtenidos. Sobre la base de estos resultados se elaboraron una serie de índices de composición de las partículas de LDL, que pueden ser indicadores de aterogenicidad (Tabla II).

Tabla I. Composición de LDL aislada por precipitación selectiva	
Colesterol	3,8 ± 0,2 mmol/l
Ácido siálico	34,7 ± 2,7 µmol/l
ApoB	1,27 ± 0,09 µmol/l
Proteínas	1,57 ± 0,08 g/l
Los resultados representan la media ± SEM (n = 30).	

Tabla II. Índices de composición de LDL aislada por precipitación selectiva	
Ácido siálico/colesterol	9,24 ± 0,48 mmol/mol
Ácido siálico/ApoB	34,4 ± 3,0 mol/mol
Ácido siálico/proteína	39,6 ± 1,31 µmol/g
Los resultados representan la media ± SEM (n = 30).	

Discusión

Los métodos de precipitación selectiva de LDL como alternativa accesible de la ultracentrifugación (método de referencia) han sido ampliamente estudiados y son de uso estandarizado en el laboratorio de bioquímica clínica para medir colesterol-LDL con precisión aceptable (CV < de 5%) (13). En particular, el agente precipitante seleccionado en este estudio, polivinilsulfato en presencia de EDTA y polietilenglicol metiléter como acelerador, demostró una muy buena correlación estadística ($r = 0,96$) con respecto a la ultracentrifugación, si se excluyen pacientes con Hiperlipoproteinemia Tipo III y aquellos con triglicéridos que superen los 8 mmol/l. Además, se demostró una buena recuperación analítica del colesterol de las distintas fracciones respecto al colesterol del suero entero, lo que implica que los reactivos de precipitación no interfieren en la determinación de colesterol (14).

La especificidad de la precipitación de proteínas se pone en evidencia por la electroforesis revelada para proteínas (Fig. 1), donde se observan sólo leves trazas

de proteínas cuando se redissuelve el precipitado luego del segundo lavado; esto se complementa en cuanto a especificidad de precipitación lipoproteica con los resultados de la tinción con colorantes de lípidos presentados por R. I. Coniglio (23) y con la ausencia de apo AI en la electroinmunodifusión para apo AI/B en el precipitado redissuelto. La concentración salina en el medio de redissolución fue usada por R. I. Coniglio (23), con eficacia en medio tamponado.

La aplicación del método seleccionado para la determinación de ácido siálico se inicia con una etapa de hidrólisis, previa al ataque oxidativo, para incluir en la cuantificación la fracción ligada glicosídicamente, ya que el periodato cliva y oxida entre alcoholes vecinales y al escindir entre C6 y C7 da como producto un ácido urónico de seis carbonos que es el precromógeno para la reacción de color con el ácido tiobarbitúrico (24).

Los métodos colorimétricos para cuantificar ácido siálico no tienen alta especificidad; dichos reactivos reconocen sustancias interferentes como el MDA generado por lipoperoxidación y la fructosa liberada desde las proteínas glicosiladas no enzimáticamente. La modificación del método original de Warren permite detectar y descontar la presencia del MDA siempre que las muestras de LDL fraccionada sean conservadas a 4 °C hasta dos días. En cuanto a la inespecificidad frente a la fructosa, el coeficiente de extinción molar es despreciablemente bajo en los métodos basados en el ácido tiobarbitúrico, en tanto es significativo en los métodos que emplean resorcinol, lo que no los hace recomendables en población diabética.

Los métodos de inmunoprecipitación empleados para determinar ApoB fueron concordantes entre sí, lo que sugiere conservación de los sitios de unión a anticuerpos policlonales de distinta fuente. No obstante, se observó que los picos de electroinmunodifusión eran muy afinados, lo cual se podría atribuir a la diferente matriz proteica del precipitado redissuelto en comparación con el suero.

El cociente hallado entre el contenido de ácido siálico y la proteína en LDL, está en buena concordancia con los datos reportados por Sobenin y col., quienes obtuvieron un valor de $40,3 \pm 2,7$ nmol/mg ($n = 45$) sobre LDL aislada por ultracentrifugación, en una población general. Ellos también observaron un descenso significativo en este índice en pacientes diabéticos; habiendo cuantificado el ácido siálico por el método de Warren modificado y las proteínas por el método de Lowry (16). Dado que cada partícula de LDL tiene una sola molécula de ApoB-100 y considerando la variabilidad de los otros componentes, referir el contenido de un componente a los moles de apo B, hace posible un conocimiento estequiométrico de composición de las partículas de LDL. De tal manera, la relación de ácido siálico/apoB-100 reportada en el presente trabajo (Tabla II) serviría como un índice de

composición y como un indicador de riesgo aterogénico. Por otro lado, se ha evaluado también la relación molar ácido siálico/ colesterol. En un estudio preliminar reportado previamente (25), se ha observado un descenso significativo en esta relación en LDL aislada por precipitación selectiva en pacientes con Diabetes mellitus Tipo II. Esta observación podría asociarse con la presencia de partículas más aterogénicas en la población diabética.

Las expectativas de aplicaciones clínicas planteadas enfatizan la necesidad de disponer de métodos estandarizados para que la interpretación sea confiable. El método desarrollado responde a las exigencias de evaluación analítica y es posible llevarlo a cabo en un laboratorio de química clínica sin equipamiento complejo. Los indicadores de composición propuestos requieren continuar con la evaluación clínica en cuanto a su potencial aporte sobre modificaciones aterogénicas de las partículas de LDL en circulación y respuesta a tratamientos.

CORRESPONDENCIA

Dra. ADRIANA E. SCOCCIA
Bioquímica Patológica
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata
47 y 115 - 1900 LA PLATA - Argentina
Tel: 0221-4235333 int. 49
Fax: 0221-4223409
E-mail: ascoccia@netverk.com.ar

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Biocientífica S.A. y a los laboratorios Wiener por la generosa donación de equipos diagnósticos utilizados en el presente estudio.

Referencias bibliográficas

1. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 341-90.
2. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance [minireview]. *J Biol Chem* 1997 issue of august 22; (34): 20963-6.
3. Schwartz CJ, Valente AJ. Atherogenesis and Coronary Heart Disease: cellular mechanisms. En: Alberti KGMM, De Fronzo RA, Keen H, Zimmer P, editors. *International textbook of Diabetes Mellitus*. 2nd. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1997. p. 1535-41.
4. Ruelland A, Gallou G, Legras B, Paillard F, Cloarec L. LDL sialic acid content in patients with Coronary Artery Disease. *Clin Chim Acta* 1993; 221: 127-33.
5. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Morriset JD, Gotto AM Jr, Guevara JG Jr. Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic acid rich and ~poor low density lipoprotein from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res* 1993; 34: 365-75.
6. Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma. Possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification. *Atherosclerosis* 1998; 138: 183-95.
7. Lindbohm N, Gylling H, Miettinen TE, Miettinen TA. Statin treatment increases the sialic acid content of LDL in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2000; 151: 545-50.
8. Millar JS. The sialylation of plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 2001; 154: 1-13.
9. Millar JS, Anber V, Shepherd J, Packard ChJ. Sialic acid-containing components of lipoproteins influence lipoprotein-proteoglycan interactions. *Atherosclerosis* 1999; 145: 253-60.
10. Anber V, Millar JS, Mc Connell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of very-low density, intermediate-density, and low-density lipoproteins with human arterial wall proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2507-14.
11. Bartlett AL, Stanley KK. All low density lipoprotein particles are partially desialylated in plasma. *Atherosclerosis* 1998; 138: 237-45.
12. Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA, Boytsova EY, Bovin NV, Orekhov AN. Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2001; 159: 103-15.
13. Rifai N, Warnick R, Mc Namara JR, Belcher JD, Gristead GF, Franz ID Jr. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clin Chem* 1992; 38 (1): 150-60.
14. Demacker PN, Hijmans AG, Brenink Meijer BJ, Jansen AP, van't Laar A. Five methods for determining low density lipoprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30 (11): 1797-800.
15. Scoccia AE, Molinuevo MS, McCarthy AD, Cortizo AM. A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clin Pathol* 2001; 1(1): [7 screens]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
16. Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Optimization of the assay for sialic acid determination in low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1998; 39: 2293-9.
17. Melajärvi N, Gylling H, Miettinen TA. Sialic acids and the metabolism of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1996; 37: 1625-31.
18. Lindbohm N, Gylling H, Miettinen TA. Sialic acid content of low density lipoprotein and its relation to lipid concentrations and metabolism of low density lipoprotein and cholesterol. *J Lipid Res* 2000; 11: 1110-7.
19. Orekhov AN, Tertov VV, Sobenin IA, Smirnov VN, Via DP, Guevara J Jr., et al. Sialic acid content of human low density lipoproteins affects their interaction with cell receptors and intracellular lipid accumulation. *J Lipid Res* 1992; 33: 805-17.

20. Crook M, Haq M, Tutt, P. Evaluation of three assays for the determination of serum total sialic acid. *Clin Biochem* 1993; 26 (6): 449-54.
21. Guerci B, Aneebi H, Meyer L, Durlach V, Zegler O, Nicolás JP, et al. Increased ability of LDL from normolipidemic type II diabetic women to generate peroxides. *Clin Chem* 1999; 45:9: 1439-48.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
23. Coniglio RI. Valores de colesterol en lipoproteínas de baja densidad determinados analíticamente. Comparación con la estimación por cálculo. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 1989; 23 (2): 201-10.
24. Bhavanandan VP, Ringler NJ, Gowda DC. Identification of the glycosidically bound sialic acid in mucin glycoproteins that reacts as "free sialic acid" in the Warren assay. *Glycobiology* 1998; 6 (11):1077-86.
25. Cortizo AM, Heffes D, Castilla IC, Scoccia AE, Molinuevo MS. Determinación de ácido siálico en lipoproteínas de baja densidad y en orina de pacientes diabéticos tipo II. Libro de resúmenes del sexto Congreso Nacional Bioquímico CUBRA VI 2001; Trabajo libre N° 29.

Aceptado para su publicación el 6 de febrero de 2003