

21. 87

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTANDARIZACION DE UN ELECTROINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE APOLIPOPROTEINAS SERICAS A - I Y B

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
ROCIO ADRIANA MURCIO FLORES

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

	PAGINA
	INTRODUCCION 3
	OBJETIVOS 8
CAPITULO 1	GENERALIDADES 9
	1.1. LIPOPROTEINAS 9
	1.2. APOLIPOPROTEINAS 19
	1.3. METODOS DE SEPARACION Y CUANTIFICACION DE LAS APOLIPOPROTEINAS SERICAS 32
CAPITULO 2	METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTOS 41
	2.1. RECOLECCION, PROCESAMIENTO Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS 42
	2.2. OBTENCION DE FRACCIONES DE LIPOPROTEINAS SERICAS POR ULTRACENTRIFUGACION PREPARATIVA 43
	2.3. ANALISIS DE LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS SERICAS 43
	2.4. ESTANDARIZACION DEL ELECTROINMUNOENSAYO PARA CUANTIFICAR APO A-I Y APO B 44
CAPITULO 3	RESULTADOS 56
	3.1. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA

	ESTANDARIZACION DE LOS ELECTROINMUNOENSAYOS	60
	3.2. CALIBRACION DEL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO A-I Y APO B	61
	3.3. CONTROL DE CALIDAD INTERNO (VARIANZA EN CONDICIONES OPTIMAS Y VARIANZA EN CONDICIONES DE RUTINA)	64
	3.4. VALORES DE LOS LIPIDOS Y DE LAS APOLIPOPROTEINAS EN LAS MUESTRAS DE LAS 18 MUJERES ANALIZADAS PARA EL ESTUDIO	67
CAPITULO 4	DISCUSION Y CONCLUSIONES	75
	BIBLIOGRAFIA	89
	RESUMEN	97
	ABREVIATURAS	100
	APENDICE A	101
	APENDICE B	102

INTRODUCCION

En los últimos años el estudio de las lipoproteínas plasmáticas ha ampliado el conocimiento sobre el metabolismo y el transporte de los lípidos. Los estudios realizados sobre la estructura y la función de las diversas especies de lipoproteínas ha contribuido a avances significativos en el entendimiento y el manejo de las alteraciones de los lípidos. Todas las lipoproteínas se relacionan e interaccionan dinámicamente dentro del sistema vascular. Muchos de los procesos involucrados en el metabolismo de las lipoproteínas se regulan por actividad enzimática y pueden influenciar los niveles de las lipoproteínas plasmáticas. El entendimiento de estas interacciones y sus interrelaciones se ha hecho posible gracias a numerosos estudios llevados a cabo desde hace dos décadas. (1)

Hasta hace aproximadamente 20 años las lipoproteínas se veían clásicamente como familias aisladas o especies definidas ya fuera por ultracentrifugación o por electroforesis. Las separaciones por densidad o por movilidad electroforética permitieron clasificar y cuantificar varias anomalías, pero dieron poca visión de las causas de estas anomalías o de el papel de las lipoproteínas en el transporte de los lípidos. Un punto de vista más funcional respecto al aislamiento, la caracterización y el estudio metabólico de sus apoproteínas, cuyas funciones, además de servir como elementos estructurales de las lipoproteínas, son las de transportar y redistribuir los lípidos a través de los tejidos y servir como reguladores de su metabolismo.

Hasta la fecha se conocen por lo menos 15 clases diferentes de apolipoproteínas distribuidas en 8 grupos denominados A, B, C, D, E, F, G y H. (26).

Algunas apolipoproteínas han podido ser secuenciadas y se conocen sus estructuras secundarias y terciarias, así se ha podido saber el porqué transportan lípidos y también el porqué son diferentes a otras proteínas.

Se sabe que sirven como moduladores del metabolismo de las lipoproteínas, porque se ha observado que algunas sirven como cofactores específicos de enzimas claves para el metabolismo de las lipoproteínas.

Se están haciendo muchos esfuerzos para saber cuáles son los sitios de origen, los sitios de degradación y cuáles son las interacciones de las apolipoproteínas. El principal interés que se cifra sobre éstas en la actualidad, es ver su relación con la incidencia cada vez mayor de riesgo aterogénico.

No se ha alcanzado un entendimiento total de su papel en el metabolismo de las lipoproteínas debido a la carencia de resultados confiables obtenidos por métodos analíticos comunes, ya que por encontrarse en mezclas complejas con lípidos son relativamente insolubles y no pueden determinarse en base a su función, p. ej., la apo B es la apolipoproteína fundamental de las lipoproteínas en el espectro de los quilomicrones y las LDL, estas partículas pueden variar en diámetro de 20 a 600 nm y también varían marcadamente en su composición de lípidos y apoproteínas. De aquí que es importante estandarizar técnicas accesibles en el laboratorio para establecer su concentración en el plasma y así tener una idea más clara de la regula-

ción del metabolismo de las lipoproteínas tanto en personas sanas como en personas con padecimientos relacionados con estas apolipoproteínas.

Los métodos más específicos para la cuantificación de las apolipoproteínas son los métodos inmunoquímicos. La cuantificación de las apolipoproteínas es complicada por el hecho de que en suero se presentan como parte de una partícula grande, bioquímicamente heterogénea, dentro de la que algunos sitios antigénicos están internos. Aún cuando los péptidos puros pueden ensayarse por otros métodos (cuantificar proteínas por métodos usuales del laboratorio clínico), los inmunoensayos son los procesos analíticos más accesibles para utilizarse en investigación y en el laboratorio clínico, debido a su alta especificidad para identificar las múltiples apolipoproteínas.

Existen diversos métodos, de sensibilidad variable, utilizados para estudiar reacciones antígeno-anticuerpo de las apolipoproteínas. Los resultados de estudios hechos con estos métodos se pueden dividir en 3 categorías: 1) reacción de las lipoproteínas aisladas, 2) reacción de las lipoproteínas aisladas y modificadas (p.ej. con calor) y 3) reacción de las apolipoproteínas obtenidas por deslipidación. Los inmunoensayos más utilizados son: el radioinmunoensayo (RIA), el electroinmunoensayo (EIA), la inmunodifusión radial (RID), la inmunofluorimetría (INA) y los inmunoensayos enzimáticos.

Los inmunoensayos tienen coeficientes de variación más elevados que muchos otros procedimientos analíticos, por lo que es necesario que cada laboratorio estandarice su propia metodología con el fin de que estos coeficientes de variación se vean disminuidos. Idealmente, la exactitud de un método se evalúa por el uso de

un método de referencia satisfactorio con el que se pueda evaluar los inmunoensayos de las apolipoproteínas; por esta razón la Organización Mundial de la Salud ha creado Centros Especializados en diversos países del mundo, a los que provee de todo el material necesario para unificar criterios en base a los resultados obtenidos siguiendo una misma metodología. Estos centros están asesorados por un panel de expertos en apolipoproteínas de la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica). Este panel de expertos ha llegado a ciertos acuerdos en cuanto al estudio de las apolipoproteínas, dichos acuerdos son: (1) concentrar los esfuerzos en actividades que ayudarán a los laboratorios de química clínica; (2) primero limitar los estudios a las apolipoproteínas A-I y B que probablemente serán las primeras en ser introducidas ampliamente en los laboratorios de química clínica; (3) planear y conducir proyectos en áreas donde las apolipoproteínas resuelvan problemas de alta prioridad dentro del laboratorio clínico; (4) designar a un miembro del panel como responsable de dirigir un área del problemas seleccionado.

El panel de expertos seleccionó 5 áreas que permitirán resolver los problemas en las mediciones de las apolipoproteínas, éstas son:

1. Colección, preparación y tratamiento de las muestras.
2. Técnicas, instrumentación y cómputo de datos.
3. Especificaciones en cuanto al anticuerpo utilizado.
4. Control de calidad, estandarización y valores de referencia.
5. Aplicaciones clínicas.

Así con asesoría del grupo de expertos y bajo el patrocinio de la Organización Mundial de la Salud, se eligió estandarizar el electroinmunoensayo de Laurell para cuantificar las apolipoproteínas sé-

ricas A-I y B.

El electroinmunoensayo ha tenido un amplio uso y tiene muchas de las ventajas de los otros métodos, por ejemplo, es comparable con el radioinmunoanálisis sin requerir del uso de un componente radiactivo dentro del ensayo.

El electroinmunoensayo se basa en la estimación de proteínas séricas por precipitación cuantitativa de acuerdo al principio fundamental de Heidelberg y Kendall donde se requiere de anticuerpos específicos para proteínas individuales. La multivalencia de antígenos fue la que sugirió a Heidelberg y a Kendall que la reacción de precipitación podría ser una consecuencia del crecimiento de los agregados antígeno-anticuerpo, de tal manera que cada molécula de antígeno se halla unida a una molécula de anticuerpo. Cuando los agregados crecen por encima de cierto volumen crítico, sedimentan espontáneamente. (27)

La importancia de estandarizar esta metodología para cuantificar a las dos apolipoproteínas séricas A-I y B, es debido a que se encuentran muy ligadas a ciertos padecimientos como la aterosclerosis, que debido a su incidencia cada vez mayor en nuestro país va tomando más importancia a nivel clínico; además por hallarse en mayor concentración en el suero, que el resto de las apolipoproteínas, son más fáciles de detectar y de aislar, para así poder obtener anticuerpos específicos contra ellas y estándares puros, necesarios para la realización de los inmunoensayos que sirven para su cuantificación.

OBJETIVOS

La realización del presente trabajo tiene como objetivos los siguientes:

1. Establecer y estandarizar un método inmunológico que sea simple y preciso, basado en los principios del electroinmunoensayo de Laurell, para cuantificar dos de las principales apolipoproteínas séricas, A-I y B.
2. Establecer un control de calidad interno del método, en base a los materiales utilizados para evaluarlo (estándares y suero control), para que permita asegurar que los valores obtenidos de estas apolipoproteínas, tanto en personas sanas como en aquellas con riesgo coronario, sean precisos y exactos dentro de un mismo laboratorio.
3. Iniciar un programa de evaluación externa del control de calidad con centros especializados en el estudio de estas apolipoproteínas, (grupos asesores de la Organización Mundial de la Salud).
4. Correlacionar los valores de los lípidos de cada suero estudiado, con sus respectivos valores de apolipoproteínas.
5. Hacer accesible la metodología para futuros programas de investigación donde se establezcan los niveles séricos de estas apolipoproteínas tanto en sujetos normolipidémicos como en sujetos hiperlipidémicos e hipolipidémicos.

CAPITULO 1 GENERALIDADES

Muchas enfermedades metabólicas se relacionan con concentraciones anormales de los lípidos y de las apolipoproteínas séricas. Muchas de ellas son alteraciones primarias y secundarias. Generalmente, se detectan clínicamente por concentraciones anormales de una o de ambas clases de los lípidos que se miden más frecuentemente, el colesterol y los triacilgliceroles. Muchos de estos padecimientos del metabolismo de los lípidos, se asocian con cambios en las concentraciones del colesterol y los triacilgliceroles (1). Los estudios realizados sobre las lipoproteínas séricas han ayudado a entender mejor el metabolismo de los lípidos y las anomalías que se presentan en él (2). A continuación se mencionarán algunas características importantes de las lipoproteínas.

1.1. Lipoproteínas

Los lípidos se transportan en el plasma en forma de lipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas son moléculas solubles en agua (Partículas pseudomicelares) que representan complejos de lípidos (triacilgliceroles, colesterol y fosfolípidos) con una o más proteínas específicas llamadas apolipoproteínas (3). Así, la función más obvia e importante de las lipoproteínas plasmáticas es la solubilización y el transporte de los lípidos séricos (1).

Una lipoproteína puede visualizarse simplemente como una esfera con cubierta exterior soluble formada de proteínas, fosfolípi-

dos y colesterol libre, y una capa interna hidrofóbica neutra, formada de triacilglicérols y ésteres de colesterol (Fig. 1).

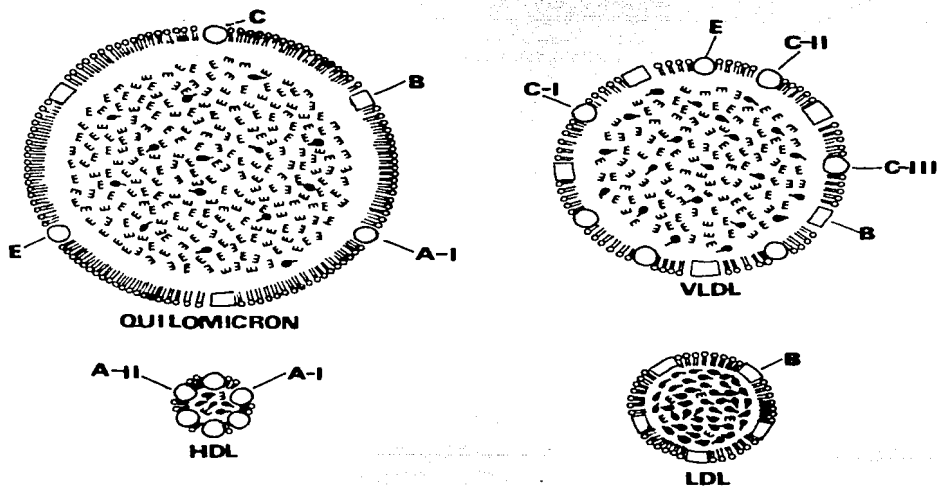


Fig. 1. Esquema de la estructura y composición de las 4 clases principales de lipoproteínas: (—) monocapa de colesterol libre y fosfolípidos; (○) apolipoproteínas intercambiables A, C, E; (□) apolipoproteína B; (Δ) ésteres de colesterol; y triacilglicérols. El diámetro relativo de las partículas lipoproteínicas está aproximadamente a escala, con excepción de los quilomicrones que deberían ser 2 veces el tamaño que se presenta (5).

La unión de los lípidos internos con la cubierta de fosfolípidos, el colesterol libre y las proteínas es no covalente, siendo principalmente a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (1,4). El concepto general de la estructura de las lipoproteínas

ha sido establecido por estudios realizados por difracción de rayos X y por otros métodos físicos en los que se han utilizado una variedad de pruebas para poder explicarla (1).

Algo que llama la atención acerca de esta unión de material hidrófobo con materia hidrófila, es que es lo suficientemente débil como para permitir el fácil intercambio de los lípidos de las lipoproteínas séricas con las lipoproteínas tisulares o entre las mismas lipoproteínas séricas; y es lo suficientemente firme para permitir su separación como partículas íntegras al ser aisladas y purificadas en los sistemas que se utilizan para ello (4).

Con el paso de los años, se han desarrollado muchos sistemas para aislar, separar y caracterizar las lipoproteínas. Todos están basados en sus diversas propiedades fisicoquímicas: carga eléctrica, densidad, tamaño molecular, etc. Los dos sistemas más frecuentemente utilizados se basan en su movilidad electroforética y en sus diferencias de densidad, utilizando la ultracentrifugación, Fig. 2, (3,4,6-15).

Las lipoproteínas se separan en varias clases basándose en la densidad a la que flotan por ultracentrifugación. La velocidad a la cual flota cada lipoproteína a través de una solución de cloruro de sodio (densidad 1.063 g/ml), puede expresarse en unidades Svedberg de flotación (S_f), TABLA I. De acuerdo a los límites de densidad a los que flota cada lipoproteína se les divide principalmente en: quilomicrones, $d < 0.94$ g/ml; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); $d = 0.94 - 1.006$ g/ml, lipoproteínas de baja densidad (LDL), $d = 1.006 - 1.063$ y lipoproteínas de alta densidad (HDL), $d = 1.063 - 1.21$ (7).

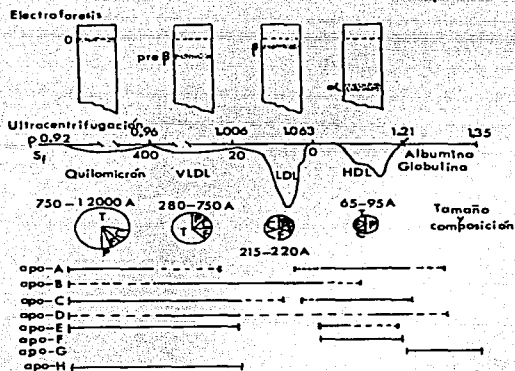


Fig. 2. Se muestra la terminología empleada para las lipoproteínas plasmáticas de acuerdo a los intervalos de densidad, los valores S_f , y la electroforesis; tamaño; composición de lípidos, distribución de las apolipoproteínas. C=colesterol, F=fosfolípidos, T=triacilglicerol y P=proteínas (4,15).

TABLA I. COMPOSICION DE LAS LIPOPROTEINAS DEL PLASMA HUMANO (7)

Fracción	Origen	Diámetro Å	Densidad	Sf	Composición							
					P (%)	L (%)	Porcentaje de lípidos totales					
					Tg	F	CE	Ct	AGL			
Quilomicrones	Intestino	750-12000	0.94	400	1-2	98-99	88	8	3	1	-	
Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)	Hígado e Intestino	280-750	0.96-1.006	20-400	6-10	90-94	56	20	15	8	1	
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Quilomi- cronos, VLDL	215-220										
LDL 1 o IDL			1.006-1.019	12-20	11	89	29	26	34	9	1	
LDL 2			1.019-1.063	0-12	21	79	13	28	48	10	1	13
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Hígado, Intestino	65-95										
HDL 1*			1.063	0-2								
HDL 2			1.063-1.125	Sedi- mento	33	67	16	43	31	10	-	
HDL 3			1.125-1.21		57	43	13	46	29	6	6	
Albúmina-AGL	Tejido adiposo		1.281		99	1	0	0	0	0	100	

*Cuantitativamente insignificante

Casi todos los investigadores en el campo de las lipoproteínas plasmáticas humanas, han considerado a estas 4 fracciones como las principales y cuyas funciones biológicas son las siguientes:

a) Quilomicrones: Son las lipoproteínas más grandes, se sintetizan en el intestino para transportar los triacilglicerolos de la dieta y el colesterol desde los sitios de absorción en el epitelio intestinal a varias células del organismo. Los triacilglicerolos de estas partículas se hidrolizan en el plasma por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), los ácidos grasos libres (AGL) liberados durante la hidrólisis, se utilizan como fuente de energía en varias células son tomados por los adipocitos y se almacenan en forma de triacilglicerolos. Las partículas lipoproteínicas generadas por acción de la LPL sobre los quilomicrones se llaman remanentes de los quilomicrones que son ricos en colesterol, Fig. 3 (3,5,7,15,16).

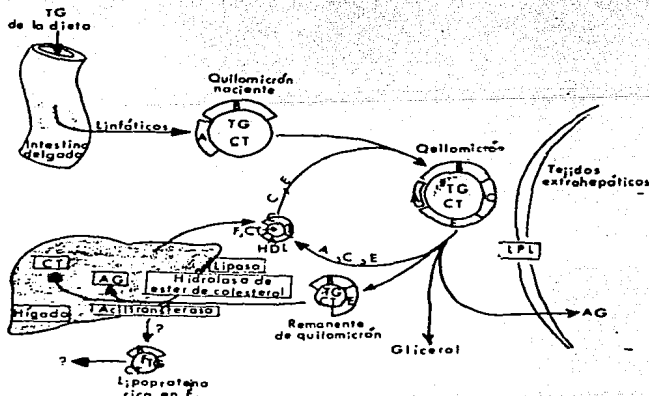


Fig. 3. Destino metabólico de los quilomicrones (7)

b) VLDL: Son partículas que transportan triacilglicerolos y colesterol del hígado para redistribuirlos a otros tejidos. Dentro del plasma los triacilglicerolos de las VLDL se hidrolizan a AGL por acción de la LPL hepática, generando lipoproteínas ricas en colesterol, que incluyen las IDL y las LDL, Fig. 4. (3.5.7.15.16)

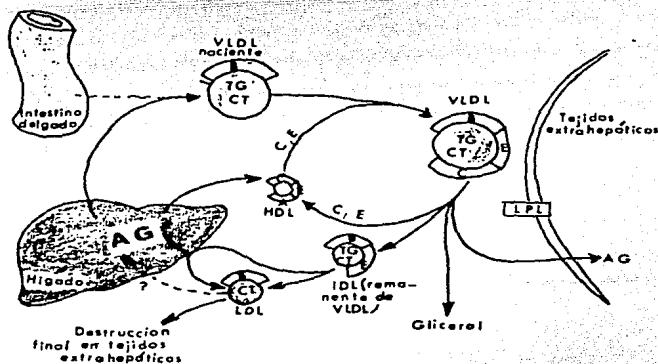


Fig. 4. Destino metabólico de las VLDL. (7)

c) LDL: Representan el producto final del catabolismo de VLDL y son las principales lipoproteínas transportadoras en el plasma, sus niveles son directamente proporcionales al riesgo aterogénico, Fig. 5 (3,5, 7, 15, 17-21)

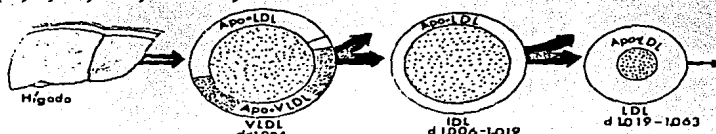


Fig. 5. Formación de IDL y de LDL (4)

d) HDL: Parecen provenir de diversas fuentes, incluyendo el hígado y el intestino. Parece ser que las HDL junto con sus precursores, se forman a partir de los procesos lipolíticos de los quilomicro - nes durante los cuales se producen formas discoides de proteínas - fosfolípidos provienen de la superficie de los quilomicrones. Se ha propuesto que esta lipoproteína está involucrada en el transpor - te de colesterol de los tejidos periféricos al hígado (Fig. 6). Observa - ciones recientes sugieren que existe una correlación negativa entre esta lipoproteína y la enfermedad vascular en el hombre o ateros - clerosis. En el humano los ésteres de colesterol presentes en las lipoproteínas se forman por la enzima LCAT en la fracción HDL, es - ta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso (generalmen - te ácido linoléico) de la posición β de la lecitina (fosfatidilco - lina) a la posición 3 β hidroxil del colesterol. Los ésteres de co - lesterol formados por esta reacción se unen a otras lipoproteínas, ya sea por transferencia de lípidos o por intercambio de apolipo - proteínas en el plasma. (3,5,7,15,16,20,22-25)

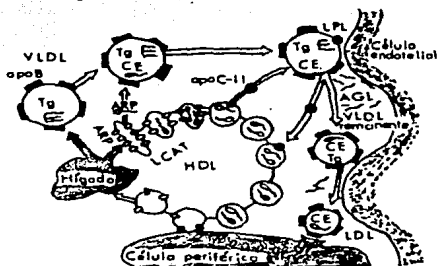


Fig. 6. Posible función de HDL en el transporte de colesterol del hígado al tejido periférico. a) HDL sirve como recolector durante el catabolismo de VLDL; b) HDL puede ayudar al transporte de coles - terol fuera de las células periféricas al sitio de catabolismo. (4)

Existen estados patológicos donde la concentración plasmática de VLDL, LDL o ambas se encuentran elevadas, esto constituye lo que se conoce como hiperlipoproteinemias, las cuales han sido ampliamente estudiadas y así se ha permitido clasificarlas en base a hallazgos del laboratorio, la TABLA II muestra esta clasificación.

TABLA II. HIPERLIPOPROTEINEMIAS FAMILIARES. (6,12)

TIPO	Ct	Tg
I (rara)	↑ ←————→	↑ ↑ ↑
II-A (comun)	↑ ↑ ↑	←————→
II-B (comun)	↑ ↑ ↑	↑
III (muy raro)	↑ ↑	↑ ↑
IV (muy comun)	↑ ←————→	↑ ↑ ↑
V (raro)	↑ ↑ ↑	↑ ↑

↑ valor elevado
 ← valor normal

También existen algunos estados de deficiencia en lipoproteínas, en los cuales algunas de estas fracciones están ausentes o están ausentes o están muy disminuídas, ver TABLA III.

En los últimos años se ha tenido una gran cantidad de información acerca de las lipoproteínas plasmáticas, particularmente en relación a sus constituyentes proteínicos. Esta información amplia

Enfermedades	Ct mg/dl plasma 20-80 (muy bajo)	Tg mg/dl plasma 0-20 (muy bajo)	Fl mg/dl plasma 35-95 (muy bajo)	Determinaciones y exámenes adicionales
Abetalipoproteinemia Características clínicas: retraso del crecimiento y malabsorción de las grasas en la infancia; deficiencias neurológicas progresivas (especialmente ataxia) en la infancia tardía y retinitis pigmentosa.				Acantocitosis en la sangre periférica; la biopsia hepática e intestinal revelan células espumosas y vacuoladas; la electroforesis lipoproteica muestra ausencia de las lipoproteínas β (LDL), pre- β (VLDL) y quilomicrones; sólo persisten las lipoproteínas α (HDL).
Hipoproteinemia (deficiencia familiar de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Características clínicas: dificultades neuromusculares en la edad adulta.	55-150 (bajo a muy bajo)	15-75 (bajo a normal)	110-170 (bajo, normal o en límite)	Prueba de fragilidad eritrocítica, estudios de absorción intestinal; la electroforesis lipoproteica revela deficiencia de LDL reflejada por una débil banda de lipoproteína β ; la VLDL y HDL son normales.
Deficiencia familiar de lipoproteínas de densidad elevada(HDL) o deficiencia en lipoproteínas (enf. de Tangier). Características clínicas: tonos aumentados y de color anaranjado; neuropatía periférica; esplenomegalia; a veces hepatosplenomegalia y linfadenopatía.	90-125 (bajo)	150-330 (normal o elevado)	70-140 (anormalmente bajo)	Biopsia tisular (acumulaciones de colesterol); electroforesis lipoproteica muestra ausencia casi total de las lipoproteínas de densidad elevada (HDL), pero una amplia banda β debida a una anómala lipoproteína β de migración (LDL) en la fracción VLDL del plasma o anómala de hiperlipoproteinemia tipo III.

TABLA III. ESTADOS DE DEFICIENCIA DE LIPOPROTEINAS (27)

el conocimiento de los defectos moleculares en pacientes con dislipoproteinemias y aterosclerosis, y ayuda a comprender mejor el metabolismo de las lipoproteínas séricas así como también de las funciones de las apolipoproteínas(26)

1.2. Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas son las proteínas libres que se encuentran unidas a los lípidos en las lipoproteínas, se han aislado por el tratamiento de las lipoproteínas intactas con solventes orgánicos, detergentes o agentes desnaturalizantes (1)

El sistema de nomenclatura A,B,C que introdujo Alaupovic para designar cada clase de apolipoproteína, no tiene ninguna relación con la forma como se origina cada apolipoproteína, ni con las relaciones metabólicas que existen entre cada una de éstas: simplemente es la nomenclatura utilizada para diferenciar cada clase de apolipoproteína. (1,9,27,28) Hasta ahora se han identificado 8 grupos de apolipoproteínas conocidos como A,B,C,D,E,F,G,H, existiendo dentro de cada grupo varias subclases. (4)

Hoy en día se sabe que las apolipoproteínas regulan el metabolismo de las lipoproteínas y son determinantes en las funciones de éstas en el metabolismo de los lípidos. (3,7) De un modo general, una de sus funciones es el transporte y la redistribución de los lípidos en varios tejidos. Para que las células capten los lípidos, se necesita de endocitosis mediada por un receptor específico para lipoproteínas, que reconozca a las apolipoproteínas específicas (3) No todas las proteínas que se encuentran en las li-

poproteínas tienen necesariamente un papel en el transporte de los lípidos (1).

Una segunda función específica de las apolipoproteínas es la de servir como cofactores para enzimas del metabolismo de los lípidos, ya sea en lipólisis o en interconversiones de los lípidos. (1, 3,17)

Se han podido secuenciar muchas de las apolipoproteínas para esclarecer el porqué son diferentes a las otras proteínas séricas y porqué son capaces de transportar lípidos (Fig. 7). Estudios reportados en Enero de 1987 dieron a luz la secuencia de la apolipoproteína B-100, que hasta esa fecha era la apolipoproteína que más problemas había presentado para su secuenciación.

Cuando se supo bien la secuencia de estas apoproteínas, los investigadores se sintieron frustrados ya que no encontraron un aminoácido poco común, alguna cosa nueva o alguna omisión en la secuencia de los aminoácidos, sin embargo, cuando se les vió en solución estudiando su estructura secundaria y terciaria, en base a su secuencia de aminoácidos, se vió que existía una relación de la proteína en solución con su capacidad de unir lípidos, encontrándose áreas hidrofóbicas e hidrofílicas cercanas unas de otras en las zonas donde la estructura de la apolipoproteína se pliega, esto explica claramente el porqué son capaces de unir lípidos. De la hipótesis de que hay regiones específicas y especializadas de sitios de unión con los lípidos dentro de estas moléculas, nacen las regiones llamadas hélices anfipáticas, en las que en una de sus caras se hallan contenidos residuos de aminoácidos hidrofóbicos, mientras que la otra tiene naturaleza hidrofílica. (1,26,29)

Apolipoprotefna E

1	10	20	30	40	50
KVEQAVETEP	EPELRQQTEW	QSGQRWELAL	GRFWDYLRWV	QTLSEQVQEE	
	60	70	80	90	100
LLSSQVTQEL	RALMDETMKE	LKAYKSELEE	QLTPVAEETR	ARLSKELQAA	
	110	120	130	140	150
EARLGADMED	VCGRLVQYRG	EVQAMLGQST	EELRVRLASH	LRKLRKRLLR	
	160	170	180	190	200
DADDLQKRLA	VYQAGAREGA	ERGLSAIRER	LGPLVEQGRV	RAATVGS LAG	
	210	220	230	240	250
QPLQERAQAW	GERLRARMEE	MGRSTRDRLD	EVKEQVAEVR	AKLEEQAQKI	
	260	270	280	290	299
RLQAEAFQAR	LKSWFEPLVE	DMQRQWAGLV	EQVQAAVGSTS	AAPVPSDNH	

Apolipoprotefna A-I

1	10	20	30	40	50
DEPPQSPWDR	VKDLATVYVD	VLKDSGRDYV	SFEGSALGK	QLNLKLLDNW	
	60	70	80	90	100
DSVTSTFSKL	REQLGPTVQE	FWDNLEKETE	GLRQEMSKDL	EEVKAKVQPY	
	110	120	130	140	15C
LDDFQKKWQE	EMELYRQKVE	PLRAELQEGA	RQKLHELQEK	LSPLGEEMRD	
	160	170	180	190	200
RARAHVDALR	THLAPYSDEL	RQRLAARLEA	LKENG GARLA	EYHAKATEHL	
	210	220	230	243	
STLSEKAKPA	LEDLRQGLLP	VLESFKVSFL	SALEEYTKKLNQ		

Apolipoprotefna A-II

1	10	20	30	40	50
QAKEPCVESL	VSQYFQTVTD	YGKDLMEKVK	SPELQAEAKS	YFEKSKEQLT	
	60	70	77		
PLIKKAGTEL	VNFLSYFVEL	GTPQATQ			

Apolipoprotefna C-I

1	10	20	30	40	50
TPDVSSALDK	LKEFGNTLED	KARELISRIK	QSELSAKMRE	WFSETFQKVK	
	57				
EKLKIDS					

Apolipoprotefna C-II

1	10	20	30	40	50
TQRPQQDEMP	SPTFLTQVKE	SLSSYWESAK	TAAQNLYEKT	YLPVAVDEKLR	
	60	70	79		
DLYSKSTAAM	STYTGIFTDQ	VLSVLK GEE			

Apolipoprotefna C-III

1	10	20	30	40	50
SEAEDASLLS	FMQGYMKHAT	KTAKDALSSV	QESKVAQAR	GWVTDGFSS L	
	60	70	79		
KDYWSTVKDK	FSEFDWLOPE	VRPTS AVAA			

Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de las apolipoproteínas plasmáticas humanas. Cada letra es un aminoácido: A=Ala, C=Cis, D=Asp, E=Glu, F=Fen, G=Gli, H=His, I=Ile, K=Lis, L=Leu, M=Met, N=Asn, P=Pro, Q=Gln, R=Arg, S=Scr, T=Treo, V=Val, W=Trp y Y=Tir. (3)

Las clases diferentes de apolipoproteínas se distribuyen a lo largo del espectro de las lipoproteínas, (TABLA IV).

TABLA IV. DISTRIBUCION DE LAS APOLIPOPROTEINAS EN LAS LIPOPROTEINAS. (26)

APOLIPOPROTEINA	PRINCIPAL CLASE DE LIPOPROTEINA
A-I	HDL
A-II	HDL
A-IV	QUILOMICRONES
B-100	VLDL, IDL, LDL
B-48	QUILOMICRONES, VLDL, IDL
C-I	QUILOMICRONES, VLDL, IDL, HDL
C-II	QUILOMICRONES, VLDL, IDL, HDL
C-III ₀₋₂	QUILOMICRONES, VLDL, IDL, HDL
D	HDL
E ₂₄	QUILOMICRONES, VLDL, LDL, HDL
F	HDL
G	LIPOPROTEINA DE MUY ALTA DENSIDAD
H	QUILOMICRONES, VLDL

Hasta la fecha no se conocen las características generales de cada clase de apolipoproteínas (TABLA V), a continuación se mencionarán las de las más conocidas.

a) Apolipoproteína A-I

Se sintetiza principalmente en el hígado y en el intestino. Es el principal constituyente proteínico de la fracción HDL. Se encuentra también en los quilomicrones y en raras ocasiones se les ve en cantidades considerables en los remanentes de los quilomicrones, VLDL o sus remanentes o en LDL.

TABLA V. APOLIPOPROTEINAS PLASMATICAS HUMANAS (1,3,16,26)

Apolipoproteína	Peso molecular	Concentración en plasma mg/dl	Origen	Función
A-I	28,000	100 - 160	Hígado e intestino	-Activa LCAT -Mediador de endocitosis para HDL -Proteína estructural en la biosíntesis de HDL. -Desconocida
A-II	17,400	30 - 40	"	"
A-III C D	32,000	Desconocida	Desconocido	"
A-IV	46,000	≈15	Hígado e intestino	"
B-100	400,000	70 - 100	Hígado	-Activa LCAT -Mediador de endocitosis para LDL, transporte de lípidos neutros, interviene en procesos aterogénicos. -Proteína estructural en la biosíntesis de VLDL, IDL y LDL.
B-48	264,000	<5	Intestino	-Proteína estructural en la biosíntesis de VLDL, IDL y LDL.
C-I	6,605	4 - 7	Hígado e intestino	-Activa LCAT.
C-II	8,824	3 - 8	"	-Activa LPL y LCAT.
C-III	8,750	8 - 15	"	-Inhibe a la apo C-II para activar a la LPL.
E	34,200	3 - 7	Hígado	-Interviene en el proceso de metabolismo de colesterol; mediador de endocitosis de lipoproteínas; se une a heparina; ayuda a la formación de partículas ricas en ésteres de colesterol; interviene en lipólisis de β -VLDL; inhibe la estimulación mitogénica de los linfocitos; tiene múltiples funciones.

La apo A-I derivada del intestino entra a la circulación asociada con los quilomicrones, pero se transfiere rápidamente a partículas de HDL durante la hidrólisis de los quilomicrones causada por la enzima LPL. La apo A-I hepática entra a la circulación probablemente asociada con partículas de HDL naciente teniendo poco o nada de ésteres de colesterol. Esta apolipoproteína tiene una estructura ampliamente helicoidal, es un potente activador de la enzima LCAT, enzima que cataliza la conversión de colesterol y fosfatidilcolina a ésteres de colesterol y lisofosfatidilcolina. Tiene un peso molecular de 28,000.

Sus niveles plasmáticos reportados por varios grupos que han utilizado diversos métodos inmunológicos, van de 100 a 160 mg/dl. La diferencia en los valores reportados puede relacionarse al tipo de ensayo, a un paso en la deslipidación o a una posible variación en el anticuerpo empleado.

Los niveles plasmáticos de apo A-I son menores del 30% de lo normal en pacientes con deficiencia de LCAT, y menores del 25% de lo normal en pacientes hiperquilomicronémicos sin tratamiento. Los pacientes con deficiencia familiar de HDL (enfermedad de Tangier), tienen niveles plasmáticos de apo A-I que son del 1% o menos de los valores normales, la apo A-I aislada de estos pacientes es estructuralmente diferente a la que se encuentra en los individuos normales; algunos investigadores han reportado que las isoproteínas plasmáticas de apo A-I en pacientes con esta enfermedad se presentan en proporciones diferentes a aquellos considerados como normales.

Los datos poblacionales de apo A-I y su variación entre personas son limitados, pero hallazgos preliminares indican que muchos

de los factores asociados con variaciones en los niveles de colesterol de HDL son también fuente de variación de apo A-I. Junto con el colesterol de HDL, la concentración de apo A-I son mayores en mujeres bajo tratamiento con esteroides exógenos, siendo más marcado en mujeres recibiendo estrógenos sin progestinas que en aquellas que los utilizan; son más elevados en personas negras (hombres en particular) que en personas blancas con el mismo peso; se incrementa con el consumo de etanol y decrece al fumar cigarrillos y con el incremento de adiposidad. También se ha observado una relación inversa entre los niveles de apo A-I y los triacilglicérolos.

Ya que la principal apolipoproteína de HDL, la apo A-I tiene un papel importante en el transporte de colesterol como activadora de la enzima LCAT, en lo que se refiere a enfermedad aterogénica, está íntimamente relacionada con esta apolipoproteína; recientemente se ha visto que la apo A-I elimina el colesterol de las células del músculo liso de la aorta (1-4,7,18,24,25,29-31).

b) Apolipoproteína A-II

El principal sitio donde se sintetiza es el hígado. Es el segundo constituyente principal de HDL y se le encuentra asociada a otras lipoproteínas en menor proporción. Tiene un peso molecular de 17,400.

Su concentración aproximada en el plasma es de 30 a 40 mg/dl.

Se sabe que puede desplazar completamente a la apo A-I de HDL, pero no se sabe si esto tiene algún significado fisiológico. Excepto por su presencia como componente estructural de HDL, no se

sabe si apo A-II tiene una función específica dentro de la estructura de HDL o en su metabolismo (1-3,17,28).

c) Apolipoproteína A-III o Apolipoproteína D

Esta designación se ha dado a proteínas de un peso molecular aproximado de 32,000, y que comprenden menos del 5% de la apolipoproteína de HDL. En un principio se pensó que apo D estimulaba a la LCAT, pero esta actividad no fue evidente en estudios posteriores (1,3,17).

d) Apolipoproteína A-IV

Se sintetiza tanto por el hígado y el intestino. Es uno de los principales componentes de los quilomicrones recién secretados pero no se encuentra asociada con los remanentes de los quilomicrones, la VLDL o con la LDL, en cantidades significativas. Es solamente un componente menor de la HDL humana. Tiene un peso molecular de 46,000. Su concentración plasmática aproximada es de 15.0 mg/dl.

De ésta su estructura no se conoce. Se ha demostrado que esta apolipoproteína es un potente activador de la enzima LCAT in vitro (1,3,17).

e) Apolipoproteína B

Existe una heterogenicidad de la apo B humana, se presenta en especies de diferente peso molecular conocidas como B-100 y B-48, teniendo pesos moleculares de 400,000 y 264,000 respectivamente.

Apo B se sintetiza principalmente en el hígado y es un

constituyente obligatorio de VLDL, IDL y LDL. En el hombre, la apolipoproteína B-48 es sintetizada por el intestino y se encuentra en los quilomicrones y en los remanentes de los quilomicrones.

La concentración de apo B en el plasma normal humano va de 70-100 mg/dl encontrándose sobre todo en LDL, donde comprende de un 70 a un 90% de la proteína total.

Se han encontrado otras dos subespecies de esta apolipoproteína de pesos moleculares de aproximadamente 300,000 y 100,000 y se les conoce como B-74 y B-26 respectivamente, los datos obtenidos de su composición de aminoácidos sugieren que estas dos clases de apolipoproteínas derivan de la forma B-100.

Se ha observado que el contenido de apo B en las diferentes partículas de VLDL y LDL parece ser constante e independiente del peso de la partícula y de los constituyentes lipídicos y proteínicos.

Esta apolipoproteína parece estar íntimamente relacionada con la cascada de deslipidación VLDL-LDL, también su función en la síntesis de los quilomicrones y la VLDL ha sido muy discutida. La apo B es crítica en el proceso de endocitosis mediada por receptores específicos para LDL, ya que la modificación química en sus residuos de arginina o lisina puede impedir la unión y captación por los fibroblastos y por los hepatocitos de LDL in vitro. Más aún, las alteraciones de los residuos de arginina de la apo B con ciclohexanodiona prolongan la vida de LDL en el torrente sanguíneo humano, dando evidencia de una función de apo B en la liberación de LDL así como también en su formación.

La apo B parece ser esencial para el transporte de triacil -

gliceroles fuera del hígado y del intestino, cuando está ausente del plasma, como en los pacientes con abetalipoproteinemia, ningún triacilglicerol entra al torrente sanguíneo, a pesar de que existen cantidades elevadas de triacilgliceroles intracelularmente.

Más del 90% de apo B en el plasma de algunos sujetos normales y en el de muchos pacientes hipercolesterolémicos está en la LDL, 20 a 50% de la apo B total está en VLDL y en los quilomicrones en estados de hipertrigliceridemia que va de moderada a severa.

En estados dislipoproteínemicos parece ser que cantidades variables de apo B entran a la circulación tanto como IDL o LDL y cantidades variables de apo B pueden permanecer en el espacio libre en el plasma dentro del límite de densidad de VLDL e IDL.

Como ya se sabe una concentración elevada de colesterol plasmático es un factor de riesgo de aterosclerosis. Recientemente se ha demostrado que el riesgo de desarrollar una enfermedad de este tipo está relacionado directamente con la concentración de LDL en el plasma. De acuerdo a Brown y Goldstein (55), la apo B de LDL regula el metabolismo de la lipoproteína y tiene una función importante en el proceso aterogénico. Las evidencias sugieren que apo B en LDL, a través de una interacción de endocitosis mediada por receptores específicos de membrana, modula a la enzima clave para la síntesis del colesterol, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A-reductasa. A esta apolipoproteína se le ha localizado en la íntima aórtica y la captan las células del músculo liso de las arterias humanas, estando involucrada en la génesis de la ateroclerosis. Así esta apolipoproteína es buen marcador de la enfermedad car-

diovascular (2-4,17-19,26,28,33,34).

f) Apolipoproteína C-I

Se sintetiza principalmente en el hígado, el intestino contribuye en menor proporción. Tiene un peso molecular de 6,605.

Su concentración plasmática es de 4 a 7 mg/dl.

In vitro, esta apolipoproteína activa la enzima LCAT siendo de este modo como participa en la esterificación de colesterol que se transfiere a HDL como parte del exceso de componentes de superficie generados durante la lipólisis de VLDL, de los quilomicrones y del colesterol que se transfiere desde las células periféricas a HDL. La capacidad de apo C-I para activar la LCAT puede servir para mantener concentraciones séricas normales de colesterol esterificado en sujetos con deficiencia de apo A-I (1-3,17,27).

g) Apolipoproteína C-II.

Al igual que la apo C-I su principal sitio de síntesis es el hígado, contribuyendo en menor proporción el intestino. Tiene un peso molecular de 8,824.

Su concentración plasmática es de 3-8 mg/dl, su principal función metabólica es la de servir como cofactor en la activación de la LPL; también se ha observado que la apo C-II activa la enzima LCAT (1,3,17,26).

h) Apolipoproteína C-III

Es la más abundante del grupo de las apolipoproteínas C, su concentración sérica varía de 8 a 15 mg/dl. Representa aproximada-

mente el 50% de la proteína de VLDL y el 2% de HDL. Tiene un peso molecular de 8,750.

Se le encuentra en el plasma en 3 formas dependiendo de la cantidad de ácido siálico que tengan: C-III₀, C-III₁, C-III₂. El subíndice indica el número de moléculas de ácido siálico que están presentes.

La función metabólica de apo C-III y el significado de la heterogenicidad en ácido siálico aún no son claros. Se ha sugerido que la presencia de apo C-III puede modular la toma de remanentes ricos en triacilgliceroles por receptores hepáticos, y se ha demostrado que activa a la LCAT, también se ha visto que inhibe la activación de la LPL por apo C-II, aunque para esto se requiere de una gran cantidad y la especificidad de esta inhibición no ha sido demostrada. (1,3,17,26)

i) Apolipoproteína E

Se sintetiza en el hígado, su producción intestinal aún no ha sido demostrada.

Es un constituyente de los quilomicrones, de los remanentes de los quilomicrones, de VLDL y de una porción de HDL. Comprende de un 10 a un 20% de la proteína de VLDL. Tiene un peso molecular de 34,200. Su concentración plasmática va de 3 a 7 mg/dl en sujetos normolipidémicos y puede ser hasta de 20-60 mg/dl en sujetos con cierto tipo de hiperlipidemia, especialmente la tipo III.

Presenta 3 isoformas E-2, E-3 y E-4 definidas por isoelectroenfoque.

Es una de las apolipoproteínas que más se han estudiado y pa-

rece tener numerosas funciones, entre las que se encuentran:

- Ser determinante responsable de la captación de HDL rica en colesterol y de β -VLDL por las células, teniendo así un papel en el metabolismo y el transporte de colesterol.
- Interviene en el reconocimiento de lipoproteínas a través de receptores específicos.
- Se une a la heparina y esto puede representar un mecanismo fisiológico importante para la unión de las lipoproteínas a superficies endoteliales (en asociación con procesos lipolíticos) o con el depósito de sustancias en la pared arterial (en asociación con aterogénesis).
- Se ha visto que es necesaria en la formación de partículas ricas en ésteres de colesterol.
- Interviene en el proceso lipolítico de la conversión de β -VLDL del tipo II en IDL.
- Inhibe la estimulación mitogénica de los linfocitos.
- Tiene amplias funciones debido a su distribución única en los tejidos, recientemente se ha observado que otros tejidos tienen cantidades significativas de apo E, estos tejidos incluyen el cerebro, adrenales, bazo, ovarios, riñón y músculo. La síntesis de apo E por los tejidos periféricos puede proveer un mecanismo por el cual el colesterol puede redistribuirse en los diferentes tejidos. La presencia de apo E posee una alta afinidad para mediar la captación de lipoproteínas por receptores específicos. Es razonable especular que la apo E puede funcionar en el transporte de lípidos dentro del cerebro, puede tener una amplia función dentro de los tejidos del sistema nervioso, pe-

ro esto aún no se comprueba. (1,3,7,26)

1.3. Métodos de separación y cuantificación de las apolipoproteínas séricas

La determinación cuantitativa de las apolipoproteínas en el suero y en sus fracciones lipoproteínicas aisladas ha llegado a tener gran importancia en estudios de investigación referentes a los lípidos y su metabolismo.

El aislamiento de las diferentes apolipoproteínas requiere una separación previa y una deslipidación de las lipoproteínas. Las técnicas accesibles para la separación preparativa de las apolipoproteínas son:

- a) cromatografía en columna (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de microfiltración)
- b) isoelectroenfoque preparativo en geles polimerizados y en geles granulares
- c) electroforesis preparativa en SDL poliacrilamida e
- d) isotacoforesis preparativa.

Los métodos siguientes son los que se emplean en la cuantificación de las apolipoproteínas:

- RID (Inmunodifusión radial)
- EIA (Electroinmunoensayo)
- Nefelometría de rayo laser
- Inmunoensayos enzimáticos (35)
- RIA (Radioinmunoanálisis)
- Isoelectroenfoque y densitometría
- Electroforesis en poliacrilamida y densitometría

Los ensayos de apolipoproteínas se utilizan en la investigación clínica para los siguientes fines:

1. Identificación de alteraciones en las apolipoproteínas (p.ej. deficiencia de apo C-II, homocigotos de apo E-2, aparición de variantes estructurales de la apo A-I).
2. Identificación de pacientes con riesgo cardiovascular. De acuerdo a estudios realizados por diversos investigadores, la relación apo A-I/apo B en pacientes con aterosclerosis coronaria es frecuentemente más baja que la de individuos sanos. Estudios posteriores indicarán si esta relación es más adecuada para la predicción y la detección temprana del riesgo cardiovascular que la correspondiente relación lipídica (colesterol de HDL/colesterol de LDL).
3. Determinar el significado del polimorfismo de apo E en la patogénesis de la aterosclerosis coronaria. En los casos de homocigotos de apo E-2 ($\approx 1\%$ de la población), la disbetalipoproteinemia se manifiesta como un resultado del catabolismo dañado de los remanentes de los quilomicrones y de las IDL. Hasta ahora no ha sido posible establecer definitivamente si esta disbetalipoproteinemia está asociada con un incremento de la aterogénesis (7).

Hasta ahora se ha visto que los inmunoensayos son los métodos de elección para cuantificar las apolipoproteínas séricas. Cada tipo de inmunoensayo tiene características únicas y restringidas en cuanto a su aplicación, de todos los inmunoensayos mencionados anteriormente, los más utilizados son: RIA, RID, INE, EIA y más recientemente los inmunoensayos enzimáticos.

A continuación se hablará de cada uno de estos ensayos y del principio en el que se basan.

a) RIA. Fue el primer inmunoensayo que se utilizó para la cuantificación de las apolipoproteínas séricas. A diferencia de los otros métodos inmunológicos, el RIA es un ensayo que consiste en la unión competitiva de proteínas, en el que el analito no marcado va a competir con un componente marcado para unirse al anticuerpo. El analito presente en el suero debe tener propiedades de unión que le permitan competir de igual modo como lo hace el estándar por el anticuerpo, aunque difiera del estándar en otras propiedades como pueden ser la forma molecular o la carga. Este punto es especialmente importante en el RIA de apolipoproteínas, ya que los estándares y los sueros a menudo difieren de sus estados físicos.

En la determinación de las apolipoproteínas por RIA, se utiliza un segundo anticuerpo para separar el analito total que se encuentra unido al anticuerpo, del analito total que queda en forma libre. La radiactividad se mide en donde queda el anticuerpo con el analito unido y se compara con sistemas de estándares cuyas concentraciones de material no marcado son conocidas. Los estándares deben competir por el anticuerpo de un modo equivalente a como lo hace el analito presente en el plasma.

La sensibilidad del método está en los límites de los nanogramos, esto puede representar problemas serios debido a errores en los pasos de dilución. En el RIA se han reportado variaciones inter e intraensayo del 5%. Los métodos más comunes que se utilizan para medir son el de la cloramina T, la lactoperoxidasa y el del monoclóruo de yodo. (21,24,31-33, 36,37)

b) RID. Es un método simple y confiable para la cuantificación de las apolipoproteínas. (38) Se basa en la formación de anillos de

precipitación por difusión del antígeno en un medio de agarosa que contiene el anticuerpo, la concentración del antígeno es proporcional al área del anillo de precipitación.

Las diluciones utilizadas para RID van desde 10 hasta 40 veces, lo que hace a este ensayo menos susceptible a error por dilución, como sería el caso del RIA, que requiere diluciones de 10^3 a 10^4 veces. Como sucede en el EIA, la heterogeneidad del anticuerpo es un problema potencial. (21,24,28,33,38).

Ultimamente se ha desarrollado un método de RID con anticuerpos monoclonales, éste ha permitido tener mediciones más claras de los anillos y curvas de precipitación paralelas y lineales. Este método no necesita ningún pretratamiento de las muestras y éstas no necesitan una dilución previa. (39)

c) INA. Mide la intensidad de dispersión de un rayo de luz que incide en una solución donde se han formado complejos de antígeno-anticuerpo, la dispersión es directamente proporcional a la concentración de los complejos. Este método ha sido muy utilizado para cuantificar proteínas séricas y ahora se utiliza en inmunoensayos para apo A-I y apo B. (20,21,32,36)

Los ensayos de INA son apropiados para proyectos de gran escala para medir apolipoproteínas, y además, no es una técnica que implique muchas complicaciones.

Las técnicas que se utilizan comunmente requieren de 20 a 50 μ l de suero y cantidades de anticuerpo similares a aquellas utilizadas en el EIA. El límite más bajo de detección del ensayo es aproximadamente de 50 a 100 ng. Coeficientes de variación inter-ensayo de 2.5% e intraensayo de 6.3% han sido reportados.

Algunos investigadores han observado que una gran abundancia de partículas ricas en triacilglicérolas son un factor que complica la medición inmunofluorométrica de apo A-I. Otro factor limitante de este método es la falta de uniformidad en el tamaño de las partículas de HDL, lo que da variaciones en la concentración del complejo inmune. (20,21,24,36)

d) Inmunoensayos enzimáticos. Su aplicación a la medición de las apolipoproteínas séricas es más reciente que la de los otros métodos utilizados. Se ha descrito un inmunoensayo enzimático tipo "sandwich", donde las muestras diluidas se pipeteen en los pozos de una placa de microtitulación de poliestireno, cubierta con anticuerpo de conejo antiapolipoproteína humana. Después de un tiempo de incubación y de haber lavado, se añaden anticuerpos conjugados a peroxidasa y se incuban, después de otro lavado, la enzima unida se mide por oxidación de o-fenilendiamina. La sensibilidad de estos ensayos llega a ser hasta de 0.5 ng de apo A-I con límites de 1 a 14 ng, similares a los que se encuentran en RIA. Se han reportado coeficientes de variación inter e intraensayo de 4 y 8% respectivamente. (35)

e) EIA. Ha tenido un amplio uso en la cuantificación de las apolipoproteínas séricas; tiene muchas de las ventajas del RIA sin requerir de un componente radiactivo en el ensayo.

Libich mostró en 1959 que la diferencia en la movilidad electroforética entre el anticuerpo y el antígeno, podía utilizarse para efectuar una rápida reacción de precipitación entre el antígeno y el anticuerpo en el gel de agar por aplicación de un campo eléc-

trico. El descubrió una técnica electroforética para la medición cuantitativa de proteínas individuales donde el antígeno y el anticuerpo se aplicaban en surcos en forma de cuña moviéndose uno hacia el otro por el efecto combinado de la diferencia de la movilidad electroforética y del flujo endosmótico. Se formaba un precipitado en el gel en la zona entre los sitios de aplicación del antígeno y del anticuerpo. Teóricamente la concentración del antígeno podía estimarse de la apariencia y la posición de los precipitados formados.

En 1966 Laurell, en base a lo anteriormente descrito, diseñó un método de electroinmunodifusión, conocido como electroinmunoensayo o método de Laurell; este ha sido un procedimiento conveniente para la cuantificación de proteínas en fluidos biológicos. Volúmenes exactos del fluido se aplican en pozos hechos en un gel de agarosa de grosor uniforme que contiene una mezcla homogénea de un anticuerpo policlonal que reacciona específicamente con la proteína en estudio, el sistema contiene una solución amortiguadora con un pH tal que permite que el anticuerpo permanezca estable durante la electroforésis. Un campo eléctrico induce la migración de la proteína dentro del gel con el anticuerpo incorporado, reaccionan unos con otros y forman complejos antígeno-anticuerpo que se agregan para formar zonas de precipitación visibles, angostas y estacionarias que semejan cohetes en ascenso, el antígeno no unido dentro de la cabeza cónica migra dentro de la zona de precipitación y redisuelve los complejos en el frente, la zona de precipitación se va desplazando hacia uno de los electrodos, la reacción de equivalencia entre el antígeno y el anticuerpo

po. se alcanza apareciendo primero como líneas laterales que luego cierran el camino seguido por el antígeno en movimiento. La posición final de la frontera de precipitación de cada antígeno a una concentración dada de anticuerpo en la agarosa varía con la cantidad de antígeno aplicada. La altura del pico es directamente proporcional a la cantidad de antígeno aplicada. (40-43)

Los ensayos de apolipoproteínas que se han utilizado de acuerdo a los principios de Laurell (40,41), utilizan una concentración de agarosa de 8-20 g/l en solución amortiguadora de barbital (50 mmol/l, pH 8.6). El anticuerpo obtenido de la apolipoproteína purificada, se añade a la agarosa en la dilución apropiada, determinada empíricamente. Generalmente la sensibilidad es mayor cuando se utilizan concentraciones más bajas del anticuerpo. Para incrementar la sensibilidad se puede incorporar al gel dextran ó polietilenglicol. Se han reportado voltajes de 4 a 25 voltios/cm a 1-20°C y por intervalos de tiempo de 4 a 20 horas (20,24,44-46)

Las placas se lavan para remover proteínas que no precipitaron o lipoproteínas, y se tiñen con colorantes para proteínas, p.ej. azul de coomassie brillante, negro de amido o con colorantes para lípidos como negro Sudan o rojo oleoso. Los picos se miden ya sea por su altura o por su área y se comparan con picos formados por estándares primarios de apolipoproteínas purificadas o diluciones de sueros utilizados como estándares secundarios.

La medición del área del precipitado no ha sido evaluada para la calibración del EIA, a pesar de que es la medida más direc

ta de la cantidad de anticuerpo que reacciona con una muestra, y así también implica la cantidad de antígeno consumida. El uso de la altura de los picos para la calibración se basa en la suposición, de que la altura de los picos y su área se relacionan igualmente en todas las muestras. Esto es a menudo invalidado para las apolipoproteínas del suero humano, donde la forma del pico depende de las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas y del diluyente empleado. La medida del área de los precipitados se ha visto limitada por la carencia de un equipo adecuado. (46)

Aunque se han reportado coeficientes de variación inter e intraensayo del 1 al 12%, muchos investigadores reportan variaciones del 5 al 7% y variaciones intraensayo del 5% o menos (20, 24, 44) Se puede ver una sensibilidad de aproximadamente 20 ng en ensayos de tipo A-I.

Se han realizado estudios con un tratamiento previo de las muestras para exponer sitios antigénicos, pero no ha resultado favorable en todos los casos. En algunos ensayos el uso de agentes desnaturalizantes ha dado como resultado la formación de picos cortos, pero en algunos otros la altura se ha visto aumentada después de haber tratado las muestras con solución amortiguadora que contiene TMU o urea. (36, 47)

En el EIA es importante que tanto las muestras como los estándares presenten el mismo tamaño molecular y la misma carga. Los estándares secundarios tales como mezclas de diferentes sueros son útiles en estos casos. (24)

La heterogeneidad del anticuerpo puede presentar serios problemas en el EIA, especialmente en vista de la posible variación

de los sitios antigénicos expuestos.

En resumen, RID, EIA e INA son más fáciles de realizar que el RIA, no requieren de un componente radiactivo y son sensibles en límites apropiados para la medición de apo A-I y B en suero. La variación en el tamaño de la partícula cuando no hay pretratamiento para exponer los sitios antigénicos, especialmente en sueros deslipoproteinémicos y en sueros lipémicos, es un problema potencial para RID, EIA e INA. Los parámetros de unión del RIA se definen claramente, se utiliza una apolipoproteína purificada como estándar, y los efectos de cada componente del ensayo pueden ser claramente monitoreados. RIA puede utilizarse para sueros, tomando en cuenta que puede haber errores de dilución. El EIA presenta las mismas ventajas del RIA, además de permitir el trabajar sin material radiactivo, lo que hace al RIA un método caro y delicado en su realización.

CAPITULO 2

METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTOS

Para la estandarización de la metodología se seleccionaron 18 muestras de mujeres voluntarias, sanas, que participaban como grupo control de un estudio de valores de referencia para lípidos y lipoproteínas, llevado a cabo en el Departamento de Diabetes y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán. La edad media de dicho grupo fue de 30 años (límites 23 a 43 años).

Para su admisión en dicho estudio, se siguieron los lineamientos de selección, establecidos por la Organización Mundial de la Salud:

- No tener antecedentes de diabetes.
- No tener antecedentes de obesidad o cualquier otra endocrinopatía.
- No tener antecedentes de enfermedades tromboembólicas (incluyendo enfermedades cerebrovasculares).
- No tener antecedentes de hipertensión arterial (presión sistólica mayor de 140 y presión diastólica menor de 90 mm de Hg).
- No haber padecido enfermedades hepáticas recientes, incluyendo la ictericia recurrente del embarazo.
- No estar ingiriendo barbitúricos, hipolipemiantes, anticonvulsivos, antibióticos o drogas de tipo profiláctico.
- No haber sido usuaria de anticonceptivos hormonales.
- No haber sufrido ningún tipo de intervención quirúrgica por lo menos en los 3 últimos años.

El día de la toma de muestra se realizó una encuesta a cada persona (ANEXO A), para registrar sus características básicas como son: edad, peso, presión sanguínea e historia dietética.

2.1. Recolección, procesamiento y conservación de las muestras.

Previo a la toma de muestra, se recomendó a cada sujeto que consumiera su dieta habitual, que no realizara ejercicios pesados, que no consumiera alcohol las 24 horas previas y que guardara un ayuno de 12 a 16 horas (tomar agua les fue permitido).

De cada persona se obtuvo un volumen de 20 ml de sangre de la vena antecubital, se mantuvo a la persona en posición sentada y se empleó un torniquete que se retiró antes de extraer la muestra para evitar la estasis sanguínea y por ende la hemoconcentración.

Las muestras permanecieron a temperatura ambiente entre 30 minutos y 1 hora, después se centrifugaron a 2,000 X g por espacio de 10 minutos a una temperatura de 4°C en una centrifuga refrigerada (Modelo PR-6IEC). Los sueros se separaron del paquete celular inmediatamente después de la centrifugación utilizando pipetas Pasteur, se transfirieron a tubos de vidrio limpios, dejando un espacio para permitir la expansión y la mezcla. Se separaron alícuotas de 4 ml para la obtención de fracciones lipoproteínicas por ultracentrifugación, de 2 ml para el análisis de lípidos y una alícuota final de 1 ml para la cuantificación de las apolipoproteínas séricas A-I y B; las alícuotas se conservaron a 4°C hasta el momento de ser analizadas el mismo día de su obtención, el resto de la muestra se conservó a -20° C.

Se prefirió utilizar suero, ya que en el plasma la presencia

de fibrina interfiere en las cuantificaciones, además en suero los resultados son más reproducibles.

2.2. Obtención de fracciones de lipoproteínas séricas por ultracentrifugación preparativa.

En los tubos de nitrato de celulosa, especiales para ultracentrifugación, de 13.5 ml de capacidad (BECKMAN), se estratificaron 5 ml de la solución de NaCl $\rho=1.063\text{g/ml}$, 4 ml de suero de cada persona y finalmente 3 ml de la solución de NaCl $\rho=1.006\text{ g/ml}$. La densidad de las soluciones empleadas se verificó, previamente a su uso, a temperatura ambiente con un hidrómetro.

Los tubos se sellaron con su respectivo tapón de aluminio, se equilibraron perfectamente, se introdujeron el rotor Ti 50 (BECKMAN) y se ultracentrifugaron en la ultracentrífuga BECKMAN L8-70, a 4°C durante 22 horas a $105,000 \times g$.

Terminado el tiempo de ultracentrifugación se separó cada fracción lipoproteínica utilizando el cortador especial para tubos (BECKMAN), cuidando el evitar la difusión a través de las paredes del tubo y la mezcla entre las fracciones. Las fracciones obtenidas VLDL, LDL y HDL se aforaron a 5 ml con solución de NaCl $\rho=1.006\text{g/ml}$.

2.3. Análisis de lípidos y lipoproteínas séricas.

A los sueros y a sus respectivas fracciones lipoproteínicas se les cuantificaron el colesterol total y los triacilglicérolos.

El colesterol total se cuantificó por el método de Roschlau, P. (48) y los triacilglicérolos por el método modificado de Wahlefeld, A. (49), (APENDICE B).

Esta metodología fue estandarizada previamente en el mismo Departamento donde se desarrolló el presente trabajo. (50)

2.4. Estandarización del electroinmunoensayo para cuantificar las apolipoproteínas séricas A-I y B.

Principio: El electroinmunoensayo es un procedimiento conveniente para determinar las concentraciones de las proteínas en fluidos biológicos. Se aplica una cantidad medida del fluido en un pozo hecho en una matriz de agarosa que contiene un anticuerpo policlonal que reacciona específicamente con la proteína que se está investigando. Un potencial eléctrico mueve la proteína dentro del gel hasta un punto de equivalencia donde es precipitada por el anticuerpo para formar un pico de complejo antígeno-anticuerpo insoluble. La altura del pico es proporcional a la concentración de la proteína en el fluido.

Para llegar a estandarizar en nuestro laboratorio los electroinmunoensayos de las apolipoproteínas séricas A-I y B se tomaron en cuenta las recomendaciones dadas por el grupo asesor de la Organización Mundial de la Salud y las condiciones analíticas seguidas por diversos investigadores que fueron consultadas en la literatura, estas condiciones se encuentran resumidas en las TABLAS VI y VII.

Así en base a los datos con que se contó se probaron en nuestro laboratorio las condiciones que se hallan resumidas en las TABLAS VIII y IX.

TABLA VI. CONDICIONES ANALITICAS DEL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO A-I.

Ref.	Estándar	Anticuerpo	Tratamiento de la muestra	Medio	Condiciones	%C.V. Inter Intra ensayo ensayo	
28	Apo A-I purificada d>1.083 HDL; deslipidación EtOH/dietil éter; cromatografía: Sephadex G-75 con ácido acético 1 M y DEAE celulosa con urea 8 M	Suero de conejo anti apo A-I	Suero diluido 100 a 200 veces	Agarosa 20 g/l en barbital pH 8.4 50 M; dextrano 50 g/l	10 V/cm 4.5 hrs	5	7
20	Plasma humano	Suero de conejo anti apo A-I 20 g/l en agarosa	Plasma diluido en barbital pH 8.6 urea 6 M.	Agarosa 10 g/l	25 V/cm 16 hrs 4°C	4.7	7
37	Apo A-I purificada d>1.063 deslipidación: acetona, heptano, éter/EtOH; cromatografía Sephadex G-150, urea 6 M	Suero de conejo anti apo A-I, aislado utilizando inmunoadsorvente con apo A-I	Suero tratado con TMU, diluido con Tris 10 M, urea 8 M, pH 8.0	Agarosa 15 g/l en barbital pH 8.2, $\mu=0.1$	40 mA/placa, 2 hrs		
23	Suero de referencia diluido	Suero de conejo anti apo A-I, 30 g/l en agarosa	Suero diluido en barbital 50 M, pH 8.5	Agarosa 15 g/l, dextrano 50 g/l, barbital pH 8.5 50 M	7 V/cm 5.5 hrs	2.4-3.8	5.7
44	Apo A-I purificada d>1.063 -1.21 HDL; deslipidación: éter/EtOH; cromatografía: Sephadex G-150, urea 6 M	Suero de cabra anti apo A-I al 1% en agarosa	Plasma diluido 20-100 veces en barbital urea 9M	Agarosa 15 g/l dextrano 50 g/l, barbital pH 8.6	4-6V/cm 16-18 hrs	3.3	7.7
50	Mezcla de sueros humanos	Suero de cabra anti apo A-I en dietil barbiturato 50 M		Agarosa 8 g/l dextrano 50 g/l	3.5 V/cm 10 hrs		9

TABLA VII. CONDICIONES ANALITICAS DEL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO B.

Ref.	Estándar	Anticuerpo	Tratamiento de la muestra	Medio	Condiciones	% C.V.	
						Intra ensayo	Inter ensayo
38	LDL 1.02-1.06 g/dl de plasma, con apo B caracterizada	Suero de conejo monoespecífico anti apo B (10 ml/l)	5 µl de LDL, VLDL o plasma diluidos 5-10 veces en PBS	Agarosa 10-15 g/l, en barbital pH 8.6 30 mmol/l.	15 V/cm 12°C 4.5 hrs.	5	7
36	LDL humana d=1.03-1.05 dializado contra NaCl 0.15 M - conteniendo EDTA - disódico 0.1 g/l.	Suero de cabra anti apo B - (6.67 ml/l) en agarosa . 50°C	5 µl de plasma diluido	Agarosa 10 g/l en barbital pH 8.6 0.024 M	20-24 hr 15°C 2-3 V/cm		
19	LDL humana (d=1.03-1.04g/ml)	Suero anti apo B humana	50 µl de muestra incubados 60' a - 37°C con 50 µl de Lipasa -TG'	Agarosa 10 g/l en tricina ph 8.6	16 hrs 8 V/cm 22°C	2	6
32	Suero humano liofilizado	0.1 ml de suero de cabra anti lipoproteína B en 25 ml de gel	5 o 10 µl de suero diluido 15-15 veces	Agarosa "indubiosa" 25 g/l	3 hrs 10 V/cm 15°C	5	7
43	Apo B purificada	Suero de cabra o de conejo anti apo B	2 µl de suero preteñido	Agarosa 8 g/l, 12 g/l de hidroxietilcelulosa en solución amortiguadora de fosfatos pH 9.2	3 hrs 4°C 12.5 V/cm	4.3	2.9

TABLA VIII. CONDICIONES QUE SE PROBARON PARA EL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO A-1.

Estándar	Muestras	Suero Control	Anticuerpo	Medio	Condiciones	Lavado y Tinción
Suero de referencia para apolipoproteínas AA8875 diluido 1:50 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, y 1:1600	Sueros y sus fracciones HDL diluidos en agua 1:200 8 µl	Suero control	Al 3% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1.5% Dextran T10 al 5% en Barbital pH 8.6	V=200 v t=18 hrs. T=17-19°C	Lavado: 2 hrs en agua desionizada Tinción: 0.25 g de azul de + Coomassie brillante 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml de agua.
Suero control OMEGA, diluido 1:12, 1:15, 1:20, 1:30, y 1:60	Sueros y sus fracciones HDL diluidos en agua 1:20 5 µl	Suero de referencia para apolipoproteínas AA8875 dil. 1:20 en agua 5 µl	Al 25% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1% en Barbital pH=8.6	V=30 v t=6 hrs. T=16-20°C	Lavado: 30 min. en NaCl 0.15 M Tinción: 0.5 g de azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua. Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua.
Suero control OMEGA, diluido 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400	Sueros y sus fracciones HDL diluidos en NaCl 0.15 M (adicional de Tween 20)	Suero de referencia para apolipoproteínas AA8875 dil 1:200 en NaCl 0.15 M adicional de Tween 20 8 µl	Al 3% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (Pharmacia) al 1.5% en Barbitol pH=8.6	V=200 v t=18 hrs. T=16°C	Lavado: 15 min en agua desionizada Tinción: Azul de Coomassie brillante 0.5 g + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml etanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua.

TABLA IX. CONDICIONES QUE SE PROBARON PARA EL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO B.

Estándar	Muestras	Suero Control	Anticuerpo	Medio	Condiciones	Lavado y Tincion
Suero de referencia para apolipoproteínas AA8875 diluido 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, y 1:50	Sueros y su fracción LDL diluidos en agua 1:30, 8 µl en cada pozo		Al 3% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1.5% en agua. Dextran T10 al 5% en Barbital pH=8.6	V=200 v t=18 hrs. T=17-19°C	Lavado: 2 hrs en agua desionizada. Tinción: 0.25 g de azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua
Suero control OMEGA diluido 1:1.25, 1:1.66, 1:25, 1:5, y 1:7	Sueros y su fracción LDL en agua 1:2 5 µl en cada pozo	Suero de referencia para apolipoproteínas diluido 1:2 en agua, 5 µl	Al 2% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1% en Barbital pH=8.6	V=30 v t=6 hrs. T=16-20°C	Lavado: 30 min en NaCl 0.15 M Tinción: azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua. Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua
Suero control OMEGA diluido 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40	Suero y su fracción LDL diluidos en NaCl 0.15 M (adicionado de Tween 20) 1:30, 8 µl en cada pozo	Suero de referencia para apolipoproteínas diluido 1:30 en NaCl 0.15 M adicionado de Tween 20 8 µl	Al 3% en el gel de agarosa	Gel de agarosa (Pharmacia) al 1.5% en Barbital pH=8.6	V=200 v t=18 hrs. T=16°C	Lavado: 30 min en NaCl 0.15 M Tinción: 0.5 g azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua. Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua

De los datos resumidos en las tablas VIII y IX, se escogieron para la estandarización del EIA en nuestro laboratorio las condiciones que a continuación se mencionan:

1. Estándar. A pesar de que las apolipoproteínas forman parte estructural de moléculas bioquímicamente heterogéneas como son las lipoproteínas, se han podido aislar y purificar para obtener estándares primarios que sirvan como calibrantes de los diferentes métodos inmunológicos que existen para su estudio. El problema que han presentado estos estándares es que son inestables, y presentan disociación de la molécula alterando su inmunorreactividad, por lo que es necesario purificarlos cada dos semanas, situación que para fines prácticos no es muy conveniente. De aquí el hecho de que se prefiera utilizar estándares secundarios, los cuales presentan más estabilidad que los primarios, calibrándose contra estos últimos.

Durante la estandarización del EIA aquí descrito se utilizó el suero control OMEGA para lípidos (Cooper Biomedical Laboratories), este suero ha sido utilizado ampliamente, por diversos laboratorios, como calibrador. En el presente trabajo se utilizó para cada electroinmunoensayo en serie de 4 diluciones en cada placa. En el electroinmunoensayo de apo A-I (conc. 135 mg/dl) se utilizó diluido en NaCl 0.15 M (adicionado de Tween 20): 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400, obteniéndose así concentraciones de 2.70, 1.35, 0.68 y 0.34 mg/dl; en el electroinmunoensayo de apo B (conc. 75.0 mg/dl) se diluyó en NaCl 0.15 M (adicionado de Tween 20): 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40, teniéndose así concentraciones de 15.0, 7.50, 3.75 y 1.88 mg/dl.

2. Material de referencia. Como material de referencia se utilizó el

sucro de referencia para apolipoproteínas clave AA 8875 (Northwest Lipid Research Clinic in Seattle Washington USA). En el caso de apo A-I tiene una concentración asignada de 128.00 mg/dl, se utilizó diluido en solución diluyente: 1:200. que equivale a una concentración de 0.64 mg/dl; en el caso de apo B este suero tiene una concentración asignada de 100.00 mg/dl, se utilizó diluido en solución diluyente: 1:30, que equivale a una concentración de 3.33 mg/dl.

3. Muestras. Para apo A-I se utilizaron los sueros y sus respectivas fracciones HDL diluidos 1:200. En el caso de apo B se utilizaron los sueros y sus respectivas fracciones LDL diluidos 1:30, las diluciones se hicieron con la solución diluyente.

El objeto de medir estas apolipoproteínas en las fracciones lipoproteínicas donde se hallan en mayor abundancia, fue qué tan conveniente es hacerlo en las fracciones o en el suero total. Para obtener la concentración en cada fracción lipoproteínica se hicieron los cálculos tomando en cuenta el factor de dilución que se tiene después de la ultracentrifugación.

4. Reactivos y equipo.

a) Solución amortiguadora para la electroforesis: Se prepararon 2 litros de solución amortiguadora B-2 (BECKMAN) de pH 8.6 y fuerza iónica de 0.75 (2.76 g de ácido 5,5' dietilbarbitúrico y 15.4 g de barbiturato de sodio), disuelto en agua desionizada. Esta solución se utilizó hasta 3 veces consecutivas filtrándose en cada ocasión.

b) Solución amortiguadora para el gel: Se utilizó la misma solución amortiguadora para la electroforesis adicionada de Tween 20 al 2%.

c) Solución diluyente de muestras y estándares: Como diluyente se utilizó una solución de NaCl 0.15 M adicionada de Tween 20 al 2%.

d) Preparación del gel: Previamente a la preparación del gel, las placas de vidrio (100X100X1 mm) (BIO-RAD), se lavaron con agua desionizada, se secaron y se limpiaron con solventes orgánicos para evitar la grasa en la superficie de éstas.

Para la preparación del gel se empleó agarosa A de bajo efecto electroendosmótico (Pharmacia) al 1.5% en solución amortiguadora para el gel, se calentó sobre una plancha de calentamiento asegurándose de la disolución total de la agarosa. Se dejó enfriar a 50°C para evitar la desnaturalización del anticuerpo, que se añadió cuando la mezcla alcanzó esta temperatura. Para los ensayos de ambas apolipoproteínas se añadió su respectivo anticuerpo (DAKO Immunoglobulins a/s, Denmark) a una concentración al 3% en el gel. Por cada placa se utilizaron 15 ml del gel.

Una vez solidificado el gel, se hicieron 11 horadaciones de 3.5 mm de diámetro en cada placa con una separación de 6 mm entre los centros de los pozos y una separación de 2 cm con las orillas de la placa. El volumen de antígeno aplicado en cada pozo fue de 8 ul.

e) Solución colorante. Se preparó pesando 0.50 g de azul de Coomassie brillante (SIGMA) se disolvió en una mezcla de 45 ml de metanol, 10 ml de ácido acético y 45 ml de agua desionizada.

f) Solución decolorante. Como solución decolorante se utilizó una mezcla de 45 ml de etanol, 10 ml de ácido acético y 45 ml de agua desionizada.

5. Procedimiento. Se colocó la placa con los pozos hacia el cátodo sobre el puente refrigerante de la cámara de electroforesis (Dansk Laboratorizudstyra/s, Denmark), manteniéndose la temperatura a 16°C por medio de un baño de recirculación (HAAKE, Germany).

La posición de los estándares, del material control y de los sueros en cada placa se encuentran en las TABLAS X y XI.

TABLA X. POSICION DE ESTANDARES, MATERIAL DE REFERENCIA Y SUEROS EN EL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO A-I

Pozo	Identificación
1	Suero 1
2	Fracción HDL del suero 1
3	Suero 2
4	Fracción HDL del suero 2
5	Estándar 1 (OMEGA) dil 1:50 (2.70 mg/dl)
6	" 2 (OMEGA) dil 1:100 (1.35 mg/dl)
7	" 3 (OMEGA) dil 1:200 (0.68 mg/dl)
8	" 4 (OMEGA) dil 1:400 (0.34 mg/dl)
9	Suero 3
10	Fracción HDL del suero 3
11	Material de referencia

TABLA XI. POSICION DE ESTANDARES, MATERIAL DE REFERENCIA Y SUEROS EN EL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO B

Pozo	Identificación
1	Suero 1
2	Fracción LDL del suero 1
3	Suero 2
4	Fracción LDL del suero 2
5	Estándar 1 (OMEGA) dil 1:5 (15.00 mg/dl)
6	" 2 (OMEGA) dil 1:10 (7.50 mg/dl)
7	" 3 (OMEGA) dil 1:20 (3.75 mg/dl)
8	" 4 (OMEGA) dil 1:40 (1.88 mg/dl)
9	Suero 3
10	Fracción LDL del suero 3
11	Material de referencia

Como puentes se utilizaron tiras de papel filtro Whatman no.1, colocadas a cada lado de la placa para completar la conexión eléctrica entre ésta y la solución amortiguadora.

La electroforesis se llevó a cabo a 200 voltios medidos directamente sobre la placa, el tiempo de corrimiento fue de 18 horas.

Terminado el tiempo de corrimiento, las placas de apo A-I se lavaron con agua desionizada por 15 minutos y las de apo B en solución salina isotónica por 30 minutos. Se dejaron secar y se tñeron durante 20 minutos en la solución colorante. Se decoloraron hasta que los picos aparecieron bien definidos, una vez teñidas se dejaron secar.

6. Procedimiento para determinar la varianza en condiciones óptimas.

Para llevar a cabo este procedimiento se siguieron estrictamente las instrucciones señaladas para cada ensayo, se estuvo seguro de que las pipetas y los pipetores utilizados estuvieran bien calibrados. Todos los reactivos que se utilizaron fueron reactivos frescos. El material de referencia se reconstituyó 1 hora antes de la realización del ensayo. En el estudio de varianza en condiciones óptimas no deben utilizarse alícuotas congeladas del material de referencia.

En el caso de apo A-I se incluyó 10 veces en una misma placa el suero de referencia para apolipoproteínas clave AA8875 diluido 1:200; en el caso de apo B el suero de referencia se utilizó diluido 1:30 incluyéndose 10 veces en una misma placa. De los datos obtenidos de este suero se obtuvo el coeficiente de variación intraensayo.

7. Procedimiento para determinar la varianza en condiciones de rutina

na.

Una vez hecho el estudio de varianza en condiciones óptimas se comenzó a trabajar en condiciones de rutina. Para tal fin se realizaron 16 ensayos sucesivos que incluyeron muestras y el suero de referencia para apolipoproteínas clave AA8875 que en el caso de apo A-I se utilizó diluido 1:200 y en el caso de apo B se utilizó diluido 1:50.

De estos ensayos se calculó el coeficiente de variación inter ensayo.

8. Obtención de la altura de los picos y de la curva de calibración.

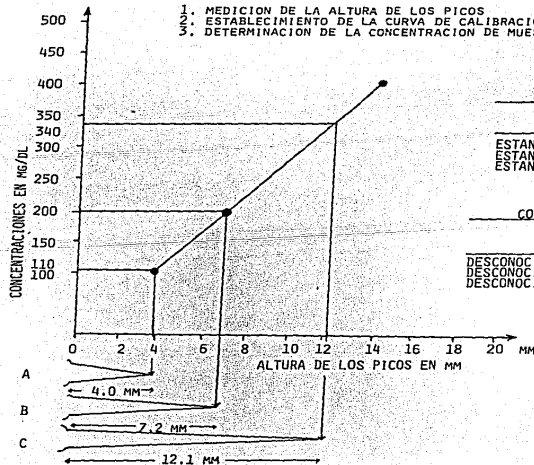
Se proyectó la imagen de los picos en una pantalla blanca utilizando un magnificador y midiendo la altura del pico desde el centro del pozo hasta el vértice. Se construyó una curva estándar de concentración contra altura del pico obtenido (Fig. 8); en dicha curva se interpolaron las alturas de las muestras y del material de referencia, la concentración obtenida se multiplicó por su respectivo factor de dilución y así se obtuvo la concentración real de cada muestra.

9. Métodos estadísticos.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizaron métodos estadísticos convencionales para calcular la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación inter e intraensayo y la regresión lineal. Para el análisis de correlación se utilizaron el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de correlación de Spearman (r_s), este es un coeficiente de correlación por límites que se obtiene: $r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$ en donde d es la diferencia entre los límites de 2 variables X y Y, y n es el número total de cada variable.

CONSTRUCCION DE LA CURVA DE CALIBRACION
DEL ELECTROINMUNOENSAYO

1. MEDICION DE LA ALTURA DE LOS PICOS
2. ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA DE CALIBRACION
3. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE MUESTRAS DESCONOCIDAS



CURVA DE CALIBRACION		
	ALTURA DEL PICO	VALOR ASIGNADO
ESTANDAR 1	14.4 MM	400 MG/DL
ESTANDAR 2	7.2 MM	200 MG/DL
ESTANDAR 3	3.6 MM	100 MG/DL

CONCENTRACION DE MUESTRAS DESCONOCIDAS		
	ALTURA DEL PICO	VALOR DETERMINADO
DESCONOCIDA A	4.0 MM	110 MG/DL
DESCONOCIDA B	7.2 MM	200 MG/DL
DESCONOCIDA C	12.1 MM	340 MG/DL

Fig. 8. Ejemplo de la construcción de una curva de calibración para un electroinmunoensayo.

CAPITULO 3
RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de prueba que se mencionan en la sección de metodología se resumen en las TABLAS XII y XIII.

TABLA XII. RESULTADOS QUE SE OBTUVIERON EL PROBAR DIVERSAS CONDICIONES DEL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO A-I.

Estandar	Muestras	Material Control	Anticuerpo	Medio	Condi- ciones	Lavado y Tinción	Resultados
Suero de referencia para α poliproproteínas AA8875 diluído 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 y 1:1600	Sueros y sus fracciones HDL diluïdos en agua 1:200 8 μ l	Suero de referencia para α poliproproteínas AA8875 diluïdo 1:20 en agua 5 μ l	Al 3X en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1.5% Dextran T10 al 5% en Barbital pH 8.6	V=200 v t=18 hrs T=17-19°C	Lavado: 2 hrs en agua desionizada Tinción: 0.25 g de azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Curva de calibración pierde linealidad a diluciones muy elevadas (Fig.9). Tinción: no muy clara, el fondo de la placa permanece muy azul
Suero control OMEGA, diluido 1:12, 1:15, 1:20, 1:30, y 1:60	Sueros y sus fracciones HDL diluïdos en agua 1:20 5 μ l	Suero de referencia para α poliproproteínas AA8875 diluïdo 1:20 en agua 5 μ l	Al 2X en el gel de agarosa	Gel de agarosa (SIG-MA) al 1% en Barbital pH=8.6	V=30 v t=6 hrs T=16-20°C	Lavado: 30 min en NaCl 0.15 M Tinción: 0.5 g de azul de Coomassie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Precipitados aparecen curvos, la tinción no es clara (Fig.11).
Suero control OMEGA, diluido 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400	Sueros y sus fracciones HDL diluïdos en NaCl 0.15 M (adicionado en Tween 20) 8 μ l	Suero de referencia para α poliproproteínas AA8875 diluïdo 1:200 en NaCl 0.15 M adicionado de Tween 20 8 μ l	Al 3X en el gel de agarosa	Gel de agarosa (Pharmacia) al 1.5% en Barbital pH=8.6	V=200 v t=18 hrs T=16°C	Lavado: 15 min en agua desionizada Tinción: Azul de Coomassie brillante 0.5 g + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Picos de precipitación bien definidos, la curva de calibración es lineal (Fig.12).

TABLA XIII. RESULTADOS QUE SE OBTUVIERON AL PROBAR DIVERSAS CONDICIONES DEL ELECTROINMUNOENSAYO DE APO B.

Estándar	Muestras	Material Control	Anticuerpo	Medio	Condi- ciones	Lavado y Tinción	Resultados
Suero de refe- rencia para a polipoproteí- nas AAB875 diluído 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, y 1:50	Sueros y sus fracciones LDL diluidos en agua 1:30 8 μ l en cada pozo		Al 3% en el gel de agarosa	Gel de aga- rosa (SIG- MA) al 1.5% en agua. Dextran T10 0.5% en Barbital pH=8.6	V=200 v t=18 hrs T=17-19°C	Lavado: 2 hrs en agua desionizada Tinción: 0.25 g de azul de Cooma- sie brillante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Curva de calibración no es lineal (Fig.10) la tinción no es muy clara, el fondo de la placa permanece muy azul
Suero control OMEGA diluido 1:1.25, 1:1.66, 1:25, 1:5 y 1:7	Suero y su fracción LDL diluido en agua 1:2 5 μ l en ca- da pozo	Suero de refe- rencia para a polipoproteí- nas diluído 1:2 en agua 5 μ l	Al 2% en el gel de agarosa	Gel de aga- rosa (SIG- MA) al 1% en Barbital pH=8.6	V=30 v t= 6 hrs T=16-20°C	Lavado: 30 min en NaCl 0.15 M Tinción: azul de Coomassie bri- llante + 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Precipitados aparecen curvos, la tinción no es clara
Suero control OMEGA diluido 1:15, 1:10, 1:20, y 1:40	Sueros y su fracción LDL diluido en NaCl 0.15 M (Adiciona- do de Tween 20) 1:30 8 μ l en ca- da pozo	Suero de refe- rencia para a polipoproteí- nas diluído 1:30 en NaCl 0.15 M adicionado de Tween 20 8 μ l	Al 3% en el gel de agarosa	Gel de aga- rosa (Phar- macía) al 1.5 % en Barbital pH=8.6	V=200 v t=18 hrs T=16°C	Lavado: 30 min en NaCl 0.15 M Tinción: 0.5 g azul de Cooma- sie brillante + 45 ml metanol T10 ml ácido acético + 45 ml agua Decoloración: 45 ml metanol + 10 ml ácido acético + 45 ml agua	Picos de precipitación bien definidos, la cur- va de calibración es lineal (Fig.13)

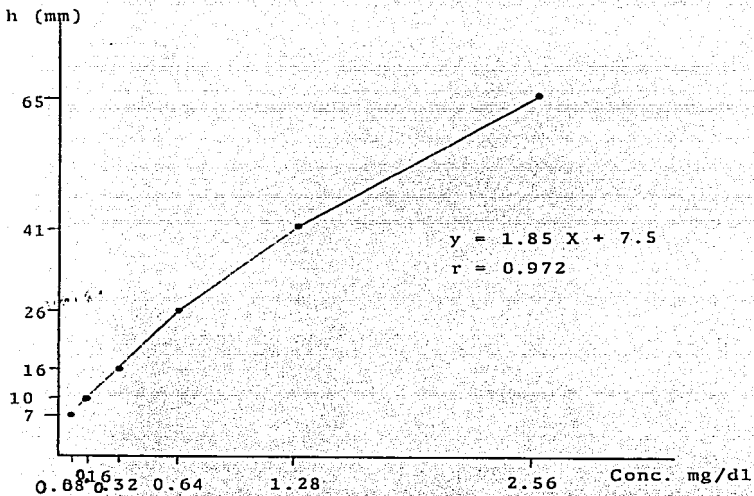


Fig. 9. Curva de calibración del EIA de apo A-I.
Estándar: Suero de referencia para apolipoproteínas
clave AA8875, dil 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800
y 1:1600 (2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16 y 0.08 mg/dl)
(h=altura en mm)

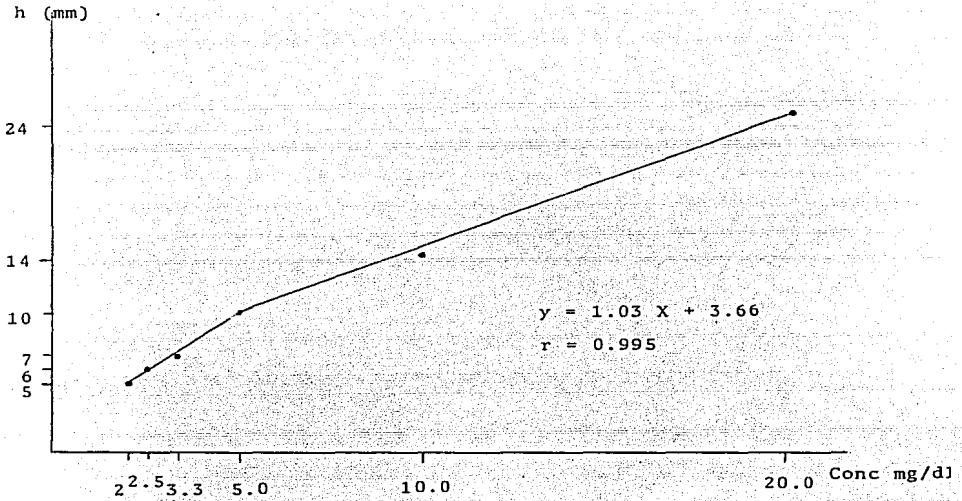


Fig. 10. Curva de calibración del electroinmunoensayo de apo B, obtenida con el suero de referencia para apolipoproteínas clave AA 8875 dil 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 y 1:50 (20.0,10.0,5.0,3.3,2.5 y 2.0 mg/dl)
(h= altura en mm)

- Material control: Suero de referencia para apolipoproteínas diluído 1:200 (0.64 mg/dl)
- Muestras: Sueros y sus respectivas fracciones HDL diluídos 1:200
- Medio: Agarosa A, 15 g/l en amortiguador de barbital pH=8.6
- Condiciones: 200 voltios
18 horas
16°C

3.1.2. Electroinmunoensayo de apo B

Para la realización del electroinmunoensayo las condiciones que se hallaron como óptimas fueron las siguientes:

- Estándar: Suero control OMEGA incluido en cada ensayo en series de 4 diluciones por cada ensayo 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 (15.0, 7.50, 3.75 y 1.88 mg/dl)
- Anticuerpo: Suero de conejo anti-apoB al 3% en el gel de agarosa
- Material control: Suero de referencia para apolipoproteínas diluído 1:30 (3.33 mg/dl)
- Muestras: Sueros y sus respectivas fracciones LDL diluídos 1:30
- Medio: Agarosa A, 15 g/l en amortiguador de barbital pH=8.6
- Condiciones: 200 voltios
18 horas
16°C

Como ya se indicó estas fueron las condiciones que se utilizaron durante el proceso de la estandarización de la metodología.

3.2. Calibración del electroinmunoensayo.

El suero control OMEGA sirvió como calibrante durante 16 ensa-

3.3. Control de calidad interno.

3.3.1. Varianza en condiciones óptimas.

Después de realizar el estudio de linealidad para cada uno de los ensayo, se determinó la varianza en condiciones óptimas para el material de referencia, éste se corrió 10 veces en una misma placa. En el caso de apo A-I se utilizó diluido 1:200 que equivale a una concentración teórica de 0.64 mg/dl y en el caso de apo B se utilizó diluido 1:30 que equivale a una concentración teórica de 3.3 mg/dl.

Los datos obtenidos se presentan en las TABLAS XIV y XV.

TABLA XIV. VARIANZA EN CONDICIONES OPTIMAS DEL EIA DE APO A-I

	Altura (mm)	Conc apo A-I mg/dl	
1	11.9	132.0	
2	12.0	136.0	
3	11.9	132.0	
4	11.6	128.0	
5	11.6	128.0	
6	12.0	136.0	
7	12.1	134.0	$\bar{X} = 132.0 \text{ mg/dl}$
8	11.9	132.0	D.S. = 2.74
9	11.9	132.0	C.V. = 2.1%
10	11.9	132.0	

TABLA XV. VARIANZA EN CONDICIONES OPTIMAS DEL EIA DE APO B

	Altura (mm)	Conc apo B mg/dl	
1	8.0	110.0	
2	7.4	95.0	
3	8.1	113.0	
4	8.0	110.0	
5	7.6	101.0	
6	7.5	107.0	
7	7.6	101.0	$\bar{X} = 105.5 \text{ mg/dl}$
8	8.0	110.0	D.S. = 5.7
9	7.8	107.0	C.V. = 5.4%
10	7.6	101.0	

3.3.2. Varianza en condiciones de rutina

El coeficiente de variación interensayo se obtuvo en base a los datos obtenidos al ensayar 16 veces el material de referencia para apolipoproteínas clave AA 8875, a la misma dilución que se utilizó para la varianza en condiciones óptimas.

Los datos de 16 ensayos se presentan en las TABLAS XVI y XVII.

TABLA XVI. VARIANZA EN CONDICIONES DE RUTINA DEL EIA DE APO A-I

	<u>Altura (mm)</u>	<u>Conc apo A-I mg/dl</u>	
1	12.0	134.0	
2	11.0	116.0	
3	11.0	116.0	
4	11.5	124.0	
5	12.0	134.0	
6	13.0	154.0	
7	13.0	154.0	
8	13.0	154.0	
9	13.0	154.0	
10	11.0	116.0	
11	11.0	116.0	
12	11.0	116.0	
13	13.0	154.0	X = 136.5 mg/dl
14	13.0	154.0	D.S. = 17.2
15	13.0	154.0	C.V. = 12.6%
16	12.0	134.0	

TABLA XVII. VARIANZA EN CONDICIONES DE RUTINA DEL EIA DE APO B

	<u>Altura (mm)</u>	<u>Conc apo B mg/dl</u>	
1	7.5	99.0	
2	8.0	111.0	
3	7.5	99.0	
4	8.0	111.0	
5	7.5	99.0	
6	8.5	123.0	
7	8.5	123.0	
8	7.5	99.0	
9	8.0	111.0	
10	7.5	99.0	
11	8.0	111.0	
12	8.0	111.0	
13	8.0	111.0	$\bar{X}=108.0$ mg/dl
14	8.0	111.0	D.S. = 8.2
15	7.5	99.0	C.V. = 7.6%
16	8.0	111.0	

El suero de referencia para apolipoproteínas clave AA 8875 tiene un valor asignado de 128.0 mg/dl en el caso de apo A-I, con el método aquí descrito el promedio de todos los resultados obtenidos fue de 134.8 mg/dl, por lo que la diferencia entre ambos valores fue de 6.8 mg/dl, que equivale a un 5.3% del valor asignado.

En el caso de apo B este suero tiene un valor asignado de 100.0 mg/dl, con el método aquí descrito el promedio de todos los resultados obtenidos fue de 107.0 mg/dl, por lo que la diferencia entre ambos valores fue de 7.0 mg/dl, que equivale a una diferencia del 7% con respecto al valor asignado.

3.4. Valores de los lípidos y de las apolipoproteínas en las muestras de las 18 mujeres analizadas para el estudio.

Como ya se indicó en la sección de metodología se utilizaron los sueros junto con sus fracciones LDL y HDL de 18 mujeres normolipidémicas; la edad media de dichas mujeres fue de 30 años (límites de 23 a 43 años). En la TABLA XVIII se resumen las características básicas de este grupo estudiado.

TABLA XVIII. CARACTERISTICAS BASICAS DEL GRUPO DE REFERENCIA (n=18)

Edad (años)	30.77 ± 6.75
Peso corporal (kg)	55.33 ± 10.71
Talla (cm)	155.22 ± 8.20
I.Q.	22.85 ± 3.24
Presión sanguínea sistólica (mm Hg)	115.80 ± 13.6
Presión sanguínea diastólica (mm Hg)	71.88 ± 11.59

En la TABLA XIXI se encuentran los valores de los lípidos y las concentraciones de cada una de las apolipoproteínas estudiadas en el grupo de 18 mujeres que se evaluaron en los ensayos.

Sujeto	Apo A-I	Apo A-I	Apo B	Apo B	Colesterol			Triglicéridos séricos
	suero mg/dl	HDL mg/dl	suero mg/dl	.LDL mg/dl	Suero mmol/l	LDL mmol/l	HDL mmol/l	
1	153.0	153.0	120.0	65.0	6.7	4.6	1.5	1.3
2	150.0	134.0	120.0	80.0	5.1	3.2	1.0	2.3
3	135.0	132.0	105.0	60.0	3.9	1.9	1.6	1.0
4	140.0	125.0	70.0	36.0	5.4	2.9	1.9	1.3
5	135.0	132.0	90.0	66.0	4.7	2.4	1.2	1.4
6	182.0	160.0	150.0	94.0	6.2	4.2	1.7	1.0
7	172.0	93.0	132.0	23.0	7.1	4.9	1.9	0.9
8	184.0	180.0	92.0	79.0	7.4	4.6	2.7	0.7
9	96.0	80.0	108.0	94.0	3.8	2.3	1.2	0.6
10	118.0	80.0	57.0	7.5	3.6	1.9	1.0	0.9
11	170.0	132.5	108.0	3.0	5.7	4.0	1.4	1.0
12	118.0	80.0	150.0	45.0	5.9	5.9	1.1	0.9
13	102.0	102.0	150.0	45.0	5.0	3.3	1.4	1.0
14	146.0	102.5	114.0	94.0	5.8	3.0	1.4	1.7
15	138.0	116.0	90.0	40.0	4.9	3.7	1.0	0.9
16	148.0	107.0	120.0	40.0	4.6	2.7	1.6	1.2
17	148.0	107.0	90.0	40.0	4.8	2.6	2.0	1.3
18	128.0	107.0	90.0	50.0	4.7	2.7	1.7	0.9
n=18								
Media	141.0	118.0	109.0	53.0	5.3	3.3	1.5	1.1
+ D.S.	+25.0	+28.0	+26.0	+28.0	+1.1	+0.9	+0.4	+0.4

TABLA XIX. RESULTADOS DE APOLIPROTEINAS, LÍPIDOS Y LIPOPROTEINAS.

La distribución de los valores de ambas apolipoproteínas en las 18 mujeres estudiadas, independientemente de sus valores de lípidos, fueron considerados dentro de los intervalos de referencia de acuerdo a diferentes autores consultados (TABLAS XX y XXI).

TABLA XX. CONCENTRACIONES DE APO A-I EN SUJETOS NORMOLIPIDEMICOS

Autor	Ref.	Método	Apo A-I mg/dl \pm D.S.
Curry et al	28	EIA	146 \pm 78
Caslake et al	25	EIA	111 \pm 14
Avogaro et al	46	EIA	154 \pm 20
Stanbury et al	1	-	110 \pm 20
Fager et al	23	EIA	175 \pm 20
Shapiro et al	20	INE	132 \pm 25
Shapiro et al	20	EIA	156 \pm 33
Albers et al	22	RID	129 \pm 25
Steinberg et al	24	RIA	104 \pm 34

TABLA XXI. CONCENTRACIONES DE APO B EN SUJETOS NORMOLIPIDEMICOS

Autor	Ref.	Método	Apo B mg/dl \pm D.S.
Stanbury et al	1	-	80 \pm 10
Foreman et al	34	RIA	92 \pm 3
Havekes et al	38	EIA	105 \pm 28
Albers et al	33	RIA	82 \pm 21
Curry et al	32	EIA	89 \pm 19
Fruchart et al	44	EIA	98 \pm 19

Los valores de apo A-I tuvieron una media de 141.0 \pm 24.9 mg/dl en suero, y en la fracción HDL donde es la principal apolipoproteína fue de 118.0 \pm 28.4 mg/dl, significando esto que de las muestras analizadas el 84% de apo A-I total estuvo contenido en la fracción HDL.

Los valores de apo B tuvieron una media de 109.0 ± 26.0 mg/dl en suero, y en la fracción LDL fue de 52.6 ± 27.9 mg/dl, esto significa que solamente el 50% de apo B estuvo presente en LDL.

3.4.1. Relación de apo A-I con las concentraciones de los lípidos y con las características físicas de las mujeres estudiadas.

En esta sección se tratarán las relaciones que mantuvieron las concentraciones de apo A-I con los lípidos analizados y con algunas características físicas del grupo de referencia como son edad, peso y presión sanguínea.

Los niveles de apo A-I tuvieron una correlación con el colesterol sérico de $r_s = 0.733$, $p < 0.05$ (Fig. 14 a), con el colesterol de HDL la correlación fue de $r_s = 0.7$, $p < 0.05$ (Fig. 14 b), con el colesterol de LDL la correlación fue de $r_s = 0.55$, $p < 0.05$ (Fig. 14 c).

El coeficiente de correlación hallado entre el colesterol de HDL y la apo A-I fue de $r = 0.6$, con el colesterol total tuvo una correlación de $r = 0.72$. No se encontró una correlación que estadísticamente fuera significativa entre los triacilglicérols y la apolipoproteína A-I.

El coeficiente de correlación de Spearman entre apo A-I y el peso corporal fue $r_s = 0.211$, $p < 0.05$, con la presión sanguínea y la edad las correlaciones fueron muy similares ($r_s = 0.617$ y 0.603 respectivamente, $p < 0.05$). Con la presión sanguínea diastólica tuvo una correlación de $r_s = 0.93$, $p < 0.05$.

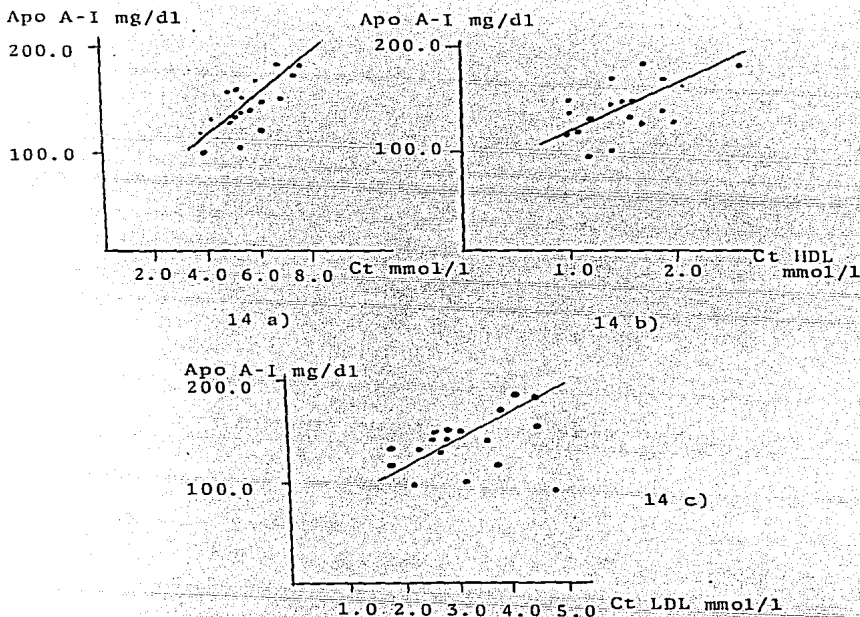


Fig. 14. Niveles de apo A-I graficados contra a) niveles de colesterol sérico ($y=0.00105 X + 1.41$, $r_s=0.73$), niveles de colesterol de HDL ($y=0.5306 X + 0.917$, $r_s=0.7$), c) niveles de colesterol de LDL ($y=0.17 X + 0.86$, $r_s=0.55$); en las muestras de la población analizada.

Se encontró una correlación entre apo A-I y la edad de $r_s=0.60$, $p < 0.05$, (Fig. 15).

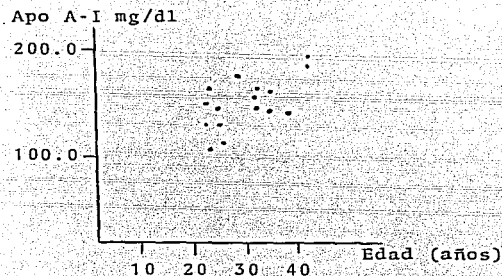


Fig. 15. Niveles de apo A-I en sujetos de diferentes edades del grupo de referencia. ($r_s=0.603$, $p<0.05$) (n=18)

3.4.2. Relación de apo B con los niveles de los lípidos y con las características físicas de las mujeres estudiadas.

Los niveles de apo B tuvieron una correlación de $r_s=0.529$, $p<0.05$ (Fig. 16 a), con el colesterol de HDL fue de $r_s=0.666$, $p<0.05$ (Fig. 16 b) y con el colesterol de LDL fue de $r_s=0.597$, $p<0.05$ (Fig. 16 c).

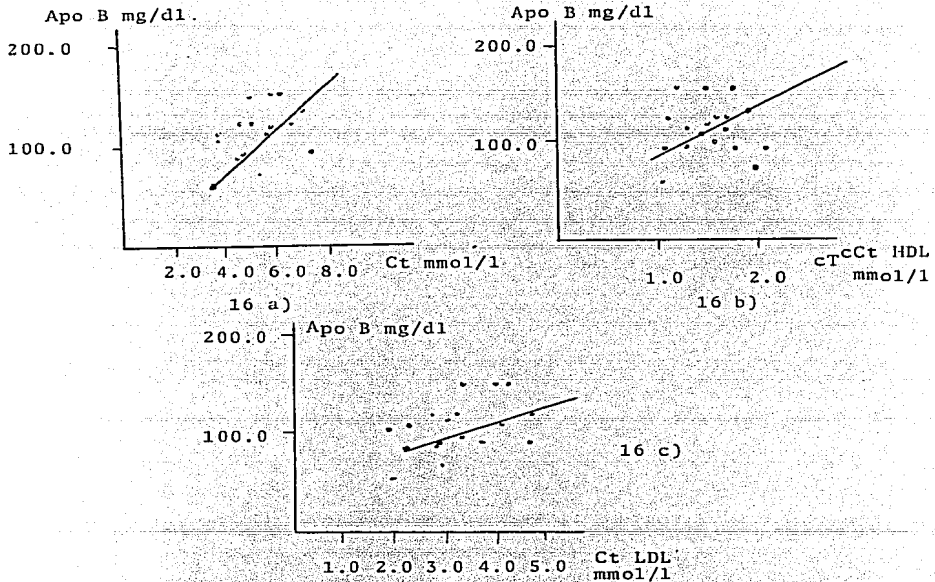


Fig. 16. Niveles de apo B graficados contra a) colesterol sérico ($y=0.0967 X + 5.574$, $r_s=0.529$), b) colesterol de HDL ($y=-0.0496 X + 1.16$, $r_s=0.666$) y c) colesterol de LDL ($y=0.140 X + 0.628$) en las muestras de la población analizada (n=18).

El colesterol de LDL tuvo una correlación de $r=0.493$ con apo B. Con el colesterol total la correlación fue de $r=0.42$. No se encontró una correlación que estadísticamente fuera importante entre los triacilglicérols y la apo B.

Apo B con el peso corporal tuvo una correlación de Spearman de 0.355 ; $p < 0.05$; con la presión sanguínea sistólica y la diastólica la correlación fue de $r_s=0.778$ y $r_s=0.772$ respectivamente; con la edad la correlación fue de $r_s=0.734$, $p < 0.05$ (Fig. 17).

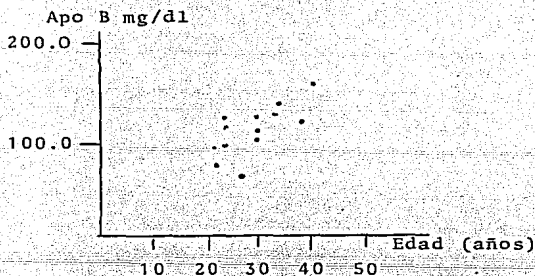


Fig. 17. Niveles de apo B en sujetos de diferentes edades del grupo de referencia ($r_s=0.734$, $p < 0.05$) ($n=18$).

CAPITULO 4 DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los inmunoensayos que se han publicado en la literatura para la cuantificación de las apolipoproteínas séricas, tienen características especiales y limitaciones en su aplicación debido a los problemas específicos inherentes a las propiedades fisicoquímicas de las apoproteínas, ya que por ser moléculas bioquímicamente heterogéneas se dificulta su purificación y la obtención de anticuerpos. Así mismo, la obtención de estándares primarios adecuados constituye otro problema metodológico.

Por esta razón resulta complejo estandarizar la metodología existente y comparar los resultados obtenidos por diferentes laboratorios. A nivel internacional existen organismos dedicados a estandarizar la metodología disponible para la determinación de apolipoproteínas, entre ellos se puede mencionar el Estudio Colaborativo Internacional para la Estandarización de los Inmunoensayos de Apolipoproteínas apoyado por el Subcomité de Lípidos y Apolipoproteínas de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS). El objetivo principal de este estudio llevado a cabo en 1983-1984, es el de estandarizar la metodología para cuantificar apo A-I y apo B, para tal fin los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Ga., planearon el estudio y desarrollaron un suero liofilizado, preparado a partir de la mezcla de sueros humanos recientemente colectados, a modo de que éste sirviera como candidato para material de referencia. En él participaron 75 laboratorios de 18

países quienes evaluaron la concentración en gramos por litro de apo A-I y apo B del material de referencia propuesto. Para examinar los datos se evaluó la concentración media obtenida por cada laboratorio contra la concentración media de todos los resultados enviados, se hizo un análisis de varianza para cada fuente de variación analizada, (área, método, laboratorio, sublaboratorio y diferencias entre los frascos), la suma de estos análisis constituyó la variación total. Se realizó un análisis por área geográfica ya que los reactivos distribuidos a Europa, Asia y Norte América podrían ser diferentes. A los datos de los laboratorios que utilizaron 2 o más métodos o diferentes anticuerpos se les trató por separado y esto es lo que se llamó sublaboratorio en el análisis de varianza. La variación entre laboratorios fue la mayor que se obtuvo en el estudio (68% de la variación para apo A-I y 73% para apo B). La variación entre las tres áreas consideradas fue del 13.5% de la variación total para apo A-I y para apo B fue aproximadamente cero. La variación entre métodos significó un 20% de la variación total para apo B y para apo A-I fue casi nula. Las diferencias encontradas en el análisis de la misma muestra en repetidas ocasiones fueron del 6% o menos de la variación total. La variación encontrada entre los diferentes frascos suministrados a un mismo laboratorio fue menor del 5% de la variación total.

Estas variaciones sirvieron para conocer qué tanto comparaban los resultados entre los laboratorios participantes y saber hasta qué grado es necesario contar con estándares comunes para apolipo - proteínas cuando se llevan a cabo estudios multicéntricos.

Más recientemente los Centros para el Control de Enfermedades

de Atlanta, Ga., han iniciado un Programa Colaborativo para la Estandarización de la Metodología de las Apolipoproteínas. A través de este Programa se evalúan los resultados obtenidos por diferentes laboratorios al analizar los diversos sueros liofilizados que sirven como material de referencia, distribuidos por el CDC.

El Panel de Expertos en Apolipoproteínas de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) ha definido las áreas prioritarias para el estudio y la estandarización de la metodología de las apolipoproteínas, éstas son: 1. Colección, preparación y tratamiento de las muestras, 2. especificaciones en cuanto al anticuerpo empleado y 3. control de calidad, estandarización y valores de referencia; ellos darán la pauta de lo que debe hacer cada laboratorio para que los resultados sean confiables y reproducibles por diferentes métodos, dentro de un mismo laboratorio y entre diferentes laboratorios.

Nuestro laboratorio forma parte de estos estudios multicéntricos internacionales y en base a estos lineamientos se trató de estandarizar el electroinmunoensayo, basado en los principios de la técnica de Laurell (40,41), para la determinación de apo A-I y apo B. Enseguida se discutirán los aspectos críticos de esta metodología.

- Preparación del gel.

En este ensayo el estado de la matriz soporte es crítico para la inmunoprecipitación óptima y la migración electroforética uniforme.

El anticuerpo debe permanecer estacionario en el gel, por lo que se prefiere utilizar agarosa con bajo efecto electroosmótico y que tenga bajo contenido de polisacáridos disueltos. Esto minimi-

za los problemas causados por el flujo de agua, ya que cuando el gel tiene alto efecto electroosmótico presenta carga negativa, así el agua contenida en el gel se polariza y adquiere una carga positiva muy fuerte, capaz de arrastrar al anticuerpo hacia el cátodo, ya que la carga negativa que presenta el anticuerpo es muy débil como para contrarrestar la del agua, así la precipitación que se obtiene no es óptima. Al preparar el gel de agarosa debe mantenerse una ebullición regulada para evitar la formación de grumos o una evaporación exagerada, ya que esto causa interferencia en la formación de los inmunoprecipitados; otro aspecto muy importante que hay que vigilar es durante el vaciado del gel, esto debe hacerse en una plataforma especial de nivelación, con el objeto de obtener un gel de grosor uniforme que permita tener una distribución homogénea del anticuerpo en la placa.

La perforación del gel debe ser muy cuidadosa procurando que el diámetro sea uniforme y la separación entre los pozos sea adecuada (6 mm), no deben ocasionarse rupturas o irregularidades en el borde de éstos, ya que por mínimas que sean provocan una mala difusión del antígeno.

En algunos de los experimentos para cuantificar apo B, donde se utilizó agarosa A de SIGMA, los inmunoprecipitados tanto del estándar como de las muestras analizadas, mostraron un pico de precipitación interno además de la principal línea distintiva del precipitado. Este fenómeno ha sido observado por otros investigadores en el electroinmunoensayo de la albúmina sérica humana. Esto parece indicar que este artefacto en la técnica no es debido necesariamente a la diferencia en el tamaño de la partícula o a la movilidad elec-

troforética de la apolipoproteína, sino a las características de la agarosa (tamaño del poro, contenido de agua). En el presente trabajo se logró eliminar este fenómeno utilizando agarosa A de Pharmacia.

- Anticuerpo.

La adición del anticuerpo al gel debe hacerse a una temperatura no superior a los 50°C para evitar la desnaturalización del mismo, y procurando que esta incorporación sea homogénea, ya que de esto depende el éxito de los resultados finales. La concentración a la que se añade el anticuerpo depende de su potencia y especificidad, es recomendable estandarizar la metodología con un mismo lote de anticuerpos. De las concentraciones de anticuerpo probadas en el presente trabajo, la que mostró mejor resolución de los picos obtenidos fue la de 3% en relación al volumen del gel.

La concentración óptima variará si se trata de anticuerpos monoclonales o policlonales. Con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales se obtienen mejores resultados en la inmunoprecipitación ya que estos presentan mayor especificidad que los policlonales y la resolución de los picos es mejor; esta especificidad se debe a que se obtienen a que se obtienen de clonas o líneas celulares puras. Además se han reportado experimentos donde se utilizan mezclas de anticuerpos monoclonales que tengan una especificidad muy elevada y así los resultados son más confiables.

Estándares.

Como se mencionó anteriormente es difícil obtener un estándar

primario, aunque sería lo ideal para utilizarse en los ensayos). Esta dificultad se debe a que una vez aislada la fracción HDL₃ rica en apo A-I, presenta inestabilidad debido a la disociación de la molécula de lipoproteína. La mayoría de los ensayos se llevan a cabo con estándares secundarios ya que son más estables y se pueden calibrar frente a los primarios, por esta razón se utilizó en la metodología aquí descrita un suero control para lípidos (OMEGA 4610G001AA) como estándar secundario.

Al utilizar este estándar en diluciones seriadas se observó que en el caso de apo A-I la linealidad se mantiene entre los límites de 0.34 y 2.70 mg/dl (Fig. 12) y en el caso de apo B los límites son de 1.88 a 15.0 mg/dl.

El diluyente que se utilizó en algunos ensayos de prueba fue agua y en otros fue NaCl 0.15 M adicionado de Tween 20 al 2%, este último dió mejor resolución de los picos debido a que el Tween 20 actúa como agente tensoactivo y disocia los agregados moleculares que interfieren en la formación de los precipitados, en otros ensayos se probó Dextrán T 10 con el mismo propósito, pero éste interfirió en el proceso de tinción con azul de Coomassie brillante, dejando una coloración muy intensa después del lavado final.

- Muestras.

Existen diferentes enfoques para el tipo de muestra que se debe utilizar en el electroinmunoensayo, algunos autores utilizan fracciones lipoproteínicas aisladas por ultracentrifugación como son HDL₃ o HDL total para apo A-I y LDL en el caso de apo B, otros sugieren el uso de sueros completos. En nuestro laboratorio se pro-

baron ambas situaciones con el objeto de elegir qué muestra resulta más útil para los fines de este trabajo.

El problema de utilizar fracciones lipoproteínicas aisladas por ultracentrifugación es que suelen contaminarse unas con otras al momento de la separación y esto ocasiona que existan pérdidas de las apolipoproteínas y la medición de estas últimas en las fracciones no es confiable, se puede saber si hay contaminación de una fracción con otra, haciendo electroforesis de cada una y viendo que no existan otras lipoproteínas que causen impurezas. Para tener un rendimiento total de las apolipoproteínas en las fracciones, se cuantifica cada apoproteína en todas las fracciones lipoproteínicas y así se conoce el rendimiento que existe al ser aisladas por métodos de ultracentrifugación de un solo paso; en métodos de ultracentrifugación secuencial se ha observado que las fracciones que se aíslan son más puras.

En este trabajo no se dializaron las fracciones lipoproteínicas antes de su análisis, lo cual es recomendable para evitar una posible interferencia de las sales durante el corrimiento, por lo que se recomienda tomar en cuenta esta observación en experimentos que deseen realizarse con las fracciones.

- Voltaje y tiempo de corrimiento.

Se probaron diversas condiciones en las que se variaron el tiempo y el voltaje utilizados durante el corrimiento. Se sabe que a menor voltaje el tiempo se incrementa o que a menor tiempo el voltaje disminuye, en el presente trabajo se quería realizar los ensayos a un tiempo corto, el que se probó fue de 6 horas combinándolo con un voltaje de 3 V/cm y con un voltaje de 20 V/cm, pero los picos que

se obtuvieron fueron pequeños y curvos; cuando se probó un voltaje de 3 V/cm con un tiempo de 6 y de 18 horas los resultados fueron muy similares a los ya descritos con un tiempo corto, por lo que se optó mantener estas condiciones elevadas utilizando un tiempo de 18 horas con un voltaje de 20 V/cm, que para el diseño de la presente metodología resultaron ser una relación óptima, esto puede deberse a la complejidad de las apolipoproteínas que hace que retarden su migración.

- Temperatura.

Debido a que el agua corriente presenta fluctuaciones de temperatura se prefirió mantener la temperatura constante mediante un baño de temperatura controlable, a 16°C, esto para evitar evaporación del gel que pudiera presentarse durante la corrida.

-Lavado de las placas.

Una vez que termina cada corrida el paso crítico lo constituye el lavado de la placa. En el presente trabajo se probó lavar las placas de apo A-I y de apo B con agua desionizada, pero este lavado no fue suficiente para el caso de apo B, ya que al momento de teñir la placa se obtenía una coloración del fondo muy intensa, esto es debido posiblemente a la presencia de un mayor contenido de proteína en el anticuerpo antiapoB, al lavar estas placas de apo B con solución salina isotónica se observó que el fondo oscuro después de la tinción desaparecía. Es necesario observar cuidadosamente el tiempo de lavado, que fue de 15 minutos el que se utilizó en el presente trabajo, si se lavan por más tiempo se pierde parte del precipitado y

al momento de teñir los picos aparecen muy tenues.

- Tinción.

Se han recomendado diferentes colorantes para la tinción después de la electroforesis, entre ellos se encuentran el negro de amido (Amido black), el azul de Coomassie brillante, el rojo Ponceau y el negro Sudán; estos dos últimos se han recomendado en la tinción de placas comerciales, pero aún sobre éstos se prefiere el azul de Coomassie brillante, ya que da una sensibilidad 2 a 3 veces más que los anteriormente mencionados. Hay autores que recomiendan mezclar el antígeno con el colorante antes de la electroforesis, de esta manera es posible visualizar la formación de los picos.

En el presente trabajo se probaron dos diferentes soluciones de colorante azul de Coomassie brillante, una de 0.25 g de colorante en 100 ml de solución decolorante y otra de 0.5 g de colorante en 100 ml de solución decolorante, la que dió mejor resolución de los picos fue esta última.

Una vez estandarizadas las condiciones experimentales para los electroinmunoensayos de apo-A-I y de apo B, se procedió a establecer la varianza en condiciones óptimas y en condiciones de rutina para ambos casos.

- Control de calidad interno.

El control de calidad interno es un aspecto muy importante en la estandarización de un método y en el trabajo diario, como ya se mencinó en el capítulo de Metodología y Procedimientos se contó con

un suero de referencia que sirvió para llevar el control de calidad diariamente. Con este mismo suero se llevaron a cabo previamente los estudios de varianza en condiciones óptimas y de varianza en condiciones de rutina.

El estudio de varianza en condiciones óptimas tiene por objeto establecer la variación cuando las condiciones a las que se lleva a cabo un experimento son las óptimas, en cuanto a los reactivos empleados (recientemente preparados), y al procedimiento de experimentación seguido, de tal manera que se pueda determinar la variación mínima analítica al ensayar el material de referencia. Del ensayo diseñado para este estudio se obtuvo un coeficiente de variación intraensayo en condiciones óptimas de 2.8% para apo A-I y de 5.4% para apo B; diversos investigadores han determinado que el coeficiente de variación intraensayo en los métodos inmunoquímicos oscila alrededor del 5% (24).

El estudio de varianza en condiciones de rutina nos indica la variación obtenida cuando se trabaja diariamente en condiciones rutinarias, esto implica el uso de muestras congeladas, el uso de estándares preparados con anterioridad, el uso de reactivos preparados con días de anterioridad y en las que se incluyen las muestras de sujetos experimentales además de los controles y estándares adecuados. En términos generales los estudios de varianza en condiciones de rutina dan coeficientes de variación mayores a los que se obtienen en la varianza en condiciones óptimas, pero se considera que la diferencia no debe ser mayor del 3% entre estos estudios para lograr la excelencia analítica. Sin embargo, la variación

de día a día y semana a semana en los reactivos, el equipo o las muestras, así como los pasos críticos que implica la metodología: preparación del gel, mantener estables las condiciones del corrimiento e incluso la medición de los picos, dan por resultado una variación analítica mayor que se determina en base a la variación en condiciones de rutina. Esta servirá para la evaluación diaria de las corridas analíticas y servirá para juzgar si un ensayo es confiable o no lo es. De los ensayos de rutina que se realizaron para este estudio se obtuvo un coeficiente de variación interensayo, para el caso de apo A-I de 12.6% y en el caso de apo B fue de 7.4%, en la literatura se han informado límites para el coeficiente de variación interensayo de los métodos inmunoquímicos que van de un 10 a un 15% (24), los obtenidos en los ensayos aquí descritos caen dentro de estos límites, pero son más elevados si los comparamos con el coeficiente de variación intraensayo obtenidos en el presente trabajo, esto se debe a lo mencionado anteriormente, como el gran número de pasos críticos que comprende esta metodología.

En la actualidad, la existencia de equipos comerciales que incluyen geles ya preparados, permitirán eliminar algunas fuentes de error como son la homogeneidad en el grosor de las placas, la distribución del anticuerpo, la perforación del gel, por lo que los coeficientes de variación interensayo disminuyen considerablemente.

Dado que el material de referencia empleado tiene un valor asignado en base al promedio de datos reportados por diferentes laboratorios no es fácil hablar de exactitud o inexactitud, ya que no se trata de un estándar primario, por lo que se habla de porcentaje de

diferencia hallada entre el valor asignado y el valor medio obtenido de los ensayos realizados con la metodología aquí descrita. Sin embargo, el hecho de que esta diferencia sea baja (5.3% para apo A-I y 7% para apo B), permite deducir que la ejecución analítica está dentro de límites aceptables.

Una vez estandarizada la metodología se inició la participación de nuestro laboratorio en un programa de evaluación externa de la calidad en los estudios multicéntricos mencionados al inicio de esta discusión, no se reportan los resultados ya que al momento de la publicación de este trabajo aún no se cuenta con la información completa de esta evaluación.

- Valores de apo A-I y apo B obtenidos en el grupo de mujeres estudiadas.

Como se indicó anteriormente se estudiaron como parte de un grupo control 18 mujeres, cuyas concentraciones de apo A-I tuvieron un valor medio de 141.0 ± 24.9 mg/dl, los cuales son muy semejantes a los obtenidos por Curry et al (28) (146.0 ± 78.0 mg/dl) y a los de Shapiro et al (20) (156.0 ± 33.0 mg/dl), que utilizan el electroinmunoensayo (TABLA XX). En el caso de apo B la concentración media que se obtuvo fue de 109.0 ± 26.0 mg/dl, lo cual se asemeja a lo obtenido por Havekes et al (38) (105.0 ± 28.0 mg/dl) y a los del grupo francés de Fruchart et al (44) (98.0 ± 19.0 mg/dl) (TABLA XXI).

Las pequeñas diferencias existentes entre los valores aquí reportados con respecto a los obtenidos por otros investigadores pueden deberse a la variación biológica de la población estudiada, al

hechos de utilizar un estándar diferente al utilizado por ellos, así como también a modificaciones del método empleado. Es importante hacer notar que el número de muestras analizadas en este estudio fué reducido, del cual difícilmente se pueden sacar conclusiones aplicables a una población general, esta observación debe interpretarse con cautela ya que no fué el objetivo principal de este trabajo obtener valores de referencia.

- Cuantificación de apo A-I y de apo B en las fracciones lipoproteínicas.

Se sabe que más del 90% del total de apo A-I sérica está contenido en la fracción HDL, incluyendo HDL₂ y HDL₃, en nuestro laboratorio cuando se probó como muestra HDL, se obtuvo el 84% de apo A-I en esta fracción. Se ha reportado que de un 70 a un 90% del total de la apo B sérica se halla en la fracción LDL, cuando se utilizó en nuestro laboratorio esta fracción como muestra, se encontró que el 50% se hallaba en LDL. Estas discrepancias se deben al aislamiento de las lipoproteínas, ya que en algunos casos al comprobar con electroforesis se vió que existía contaminación de la fracción HDL con LDL.

Debido a este mismo problema de aislamiento de fracciones es necesario interpretar con cuidado la correlación entre lípidos de las fracciones lipoproteínicas y las apolipoproteínas (ver secciones 3.4.1 y 3.4.2.).

Como conclusiones finales se puede indicar que los esfuerzos en la estandarización de la metodología para cuantificar apolipoproteínas deben concentrarse en los siguientes puntos: a) preparación de estándares puros, b) mayor uniformidad de los materiales de referencia utilizados en los ensayos, c) preparación de anticuerpos específicos policlonales o monoclonales, d) establecimiento de valores de referencia para distintas poblaciones y e) consenso en el empleo de métodos estadísticos apropiados para evaluar los resultados obtenidos en diferentes estudios.

La estandarización de la metodología para la cuantificación de apolipoproteínas permitirá obtener resultados precisos y exactos que permitan llevar a cabo diversos estudios clínicos y epidemiológicos.

Por otra parte algunos investigadores han demostrado que el estudio de las apolipoproteínas A-I y B constituyen posiblemente mejores marcadores de riesgo coronario que las determinaciones de colesterol total, colesterol de HDL y colesterol de LDL; ya que en pacientes en los que se ha demostrado, por estudios angiográficos, alteraciones importantes, las apolipoproteínas se encuentran alteradas, mientras que las concentraciones de colesterol aún se encuentran dentro de los valores de referencia recomendados. Marcovina et al (52) mediante el estudio de las apolipoproteínas A-I y B detectaron enfermedad coronaria en un 81% de los casos estudiados, lo cual refuerza el valor de las apolipoproteínas en el laboratorio clínico asociado con el de los lípidos estudiados clínicamente (53).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Stanbury, J.B., Herbert, P., Assman, G., Gotto, A., Fredrickson, D. THE METABOLIC BASIS OF INHERITED DISEASE. Mc Graw-Hill N.Y. (1983) p. 589-614.
- (2) Schaefer, E.J., Eisenberg, S., Levy, R.I. "Lipoprotein apoprotein metabolism". J. Lipid Res., 19/667-687 (1978)
- (3) Mahley, R.W., Inncarity, T.L., Rall, S.C., Weisgraber, K.H. "Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function". J.Lipid Res., 25/1277-1294 (1984)
- (4) Levy, R.I. "Cholesterol, Lipoproteins, Apoproteins, and Heart Disease: Present Status and Future Prospects". Clin. Chem., 27/5/653-662 (1981)
- (5) Segrest, J.P., Chung, B.H., Cone, J.T., Hughes, T.A. "Coronary Heart Disease Risk. Assessment by Plasma Lipoprotein Profiles". Alabama J. Med. Sci., 20/1/76-83 (1983)
- (6) Frederickson, D.S. "Symposium of Plasma Lipoproteins". Proc. N. A.S., 64/1107-1146 (1969)
- (7) Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. BIOQUIMICA DE HARPER. El Manual Moderno. México (1982) p 227-231.
- (8) Schettler, G., Burton, R.M., Cornwell, D.G., Fuhrmann, W., Kahlke, W., Kinsell, L.W., Kritchevsky, D., Rossiter, R.J., Schlierf, G., Shapiro, B., Stoffel, W., Wagener, H. LIPIDS AND LIPIDOSES. Springer-Verlag, N.Y. Inc. (1967) p 168-182.

- (9) Alaupovic, P., Lee, D.M., Mc Conathy, W.J. "Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins". Biochim. Biophys. Acta, 260/689-707(1972)
- (10) Redgrave, T.G., Roberts, D.C.K., West, C.E. "Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation". Anal. Biochem., 65/42-49 (1975)
- (11) Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdon, J.H. "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum". J. Clin. Invest., 34/1345-1353 (1955)
- (12) Kaplan, L.A., Pesce, A.J. CLINICAL CHEMISTRY. The C.V. Mosby Company. St. Louis, Mo. (1984) p 1182-1228.
- (13) Lehninger, A.L. BIOCHEMISTRY. Worth Publishers, Inc. N.Y.(1978) p 659-689.
- (14) Bohinsky, R.C. BIOQUIMICA. Fondo Educativo Interamericano,S.A. México (1978)p 265-289.
- (15) Gustafson, A. PLASMA PROTEINS. John Wiley & Sons Inc. N.Y.(1979) p 72-94.
- (16) Wilson, D.E., Lees, R.S. "Metabolic Relationships among the Plasma Lipoproteins". J. Clin. Invest., 51/1051-1057 (1972)
- (17) Assman,G. LIPID METABOLISM AND ATHEROSCLEROSIS. F. K. Scattauer Verlag GmbH, Stuttgart, Germany (1982)p 149-162.
- (18) Havekes, L., Van Gent. C.M., Stegerhoek, C.I., Arntzenius, A.C., Hessel, L.W. "High density lipoprotein cholesterol and apolipo-

- protein A-I levels in 32-33-year-old women on steroid contraceptives-differences between two frequently used low-estrogen-pills". Clin. Chim. Acta, 116/223-229 (1981)
- (19) Reardon, M.F., Poapst, M.E., Uffelman, K.D., Steiner, G. "Improved Method for Quantitation of B Apoprotein in Plasma Lipoprotein by Electroimmunoassay". Clin. Chem., 27/6/892-895 (1981)
- (20) Shapiro, D., Ballantyne, F.C., Shepherd, J. "Comparison of Immunonephelometry and Electroimmunoassay for Estimation of Plasma Apolipoprotein A-I". Clin. Chim. Acta, 103/7-13 (1980)
- (21) Cooper, G.R., Smith, S.J., Wiebe, D.A., Kuchmak, M., Hannon, W.H. "International Survey of Apolipoproteins A1 and B Measurements (1983-1984)". Clin. Chem., 31/2/223-228 (1985)
- (22) Albers, J.J., Wahl, P.W., Cabana, V.G. "Quantitation of Apolipoprotein A-I of Human Plasma High Density Lipoprotein". Metabolism, 25/6/ 633-644 (1976)
- (23) Fager, G., Wiklund, O., Olofson, P.I., Vedin, A., Bondjers, G. "Quantitation of human serum apolipoprotein A-I by electroimmunoassay. Studies on some techniques for standardization of the assay and determination of serum apolipoprotein A-I levels in a random population sample of middle-aged men". Scand. J. Clin. Invest., 40/451-460 (1980)
- (24) Steinberg, K.K., Cooper, G.R., Griser, S.R., Rosseneu, M. "Some Considerations of Methodology and Standardization of Apolipoprotein A-I Immunoassays". Clin. Chem., 29/3/415-426 (1983)

- (25) Caslake, M.J., Farish, E., Shepherd, J. "Metabolism of Apolipoprotein A-I in Healthy Young Adults". Metabolism, 27/4/437-447 (1978)
- (26) Shepherd, J., Packard, C.J., Lorimer, A.R., Lawrie, T.D.V., Morgan, H.G., Brownlie, S.M. LIPOPROTEINS AND CORONARY HEART DISEASE Proceedings of the Glasgow Heart Disease Symposium. September 1984 p. 13-21.
- (27) Davidsohn, I., Henry, J.B. DIAGNOSTICO CLINICO PARA EL LABORATORIO. Salvat Editores. Barcelona (1978)p 625-653.
- (28) Curry, M.D., Alaupovic, P., Suenram, C.A. "Determination of Apolipoprotein A and its Constitutive A-I and A-II Polypeptides by Separate Electroimmunoassays". Clin. Chem., 22/3/315-322 (1976)
- (29) Morrisett, J.D., Jackson, R.L., Gotto, A.M. "Lipoproteins: Structure and Function". Ann. Rev. Biochem., 44/183-207 (1975)
- (30) Crona, N., Silfvertofte, G., Samsioe, G. "Changes in serum apolipoprotein AI and sex-hormone-binding globulin levels after treatment with two different progestins administered alone and in combination with ethinyl estradiol". Contraception, 29/3/261-270 (1984)
- (31) Philips, N.R., Havel, R.J., Kane, J.P. "Serum apolipoprotein AI levels". Am. J. Epidem., 116/2/302-313 (1982)
- (32) Curry, M.D., Gustafson, A., Alaupovic, P., Mc Conathy, W.J. "Electroimmunoassay, Radioimmunoassay and Radial Immunodiffusion

Assay Evaluated for Quantification of Human Apolipoprotein B".
Clin. Chem., 24/2/280-286 (1978)

- (33) Albers, J.J., Cabana, V.G., Hazzard, W.R. "Immunoassay of Human Plasma Apolipoprotein B". Metabolism, 24/12/1339-1351 (1975)
- (34) Foreman, J.R., Karlin, J.B., Edelstein, C., Juhn, D.J., Rubenstein, A.H., Scanu, A.M. "Fractionation of human serum lipoproteins by single-spin gradient ultracentrifugation: quantification of apolipoproteins B and A-I and lipid components". J. Lipid Res., 18/759-767 (1977)
- (35) Bury, J., Rosseneu, M. "Quantification of Human Serum Apolipoprotein AI by Enzyme Immunoassay". Clin. Chem., 31/2/247-251 (1985)
- (36) Calvert, G.D., Yeates, R.A., Roeger, D.C. "Electroimmunoassay of a subunit protein in a macromolecular complex (Apolipoprotein B in human plasma very low density lipoprotein); implications for other electroimmunoassays systems". Clin. Chim. Acta, 97/135-142 (1979)
- (37) Mordasini, R.S., Riesen, W.F. "Electroimmunoassay and radioimmunoassay for the quantitation of high density apolipoproteins A-I and A-II". J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18/917-920(1980)
- (38) Havekes, L., Hemmink, J., de Wit, E. "Low-Density-Lipoprotein Apoprotein B in Plasma as Measured by Radial Immunodiffusion and Rocket Immunoelectrophoresis". Clin. Chem., 27/11/1829-1833(1981)

- (39) Marcovina, S.D., Cola, G., Catapano, A.L. "Radial-Immunodiffusion Assay of Human Apolipoprotein A-I with Use of Two Monoclonal Antibodies Combined". Clin. Chem., 32/12/2155-2159 (1986)
- (40) Laurell, C.B. "Electroimmuno Assay". Scand. J. Clin. Lab. Invest., 29/124/21-37 (1972)
- (41) Laurell, C.B. "Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies". Anal. Biochem., 15/45-52 (1966)
- (42) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, W., Mc Carthy, M. TRATADO DE MICROBIOLOGIA. Salvat Editores. Barcelona (1981) p 387-408.
- (43) Fudenberg, H.H., Stites, D.P. INMUNOLOGIA CLINICA. El Manual Moderno. México (1978) p 363-370.
- (44) Fruchart, J.C., Kora, I., Cachera, C., Clavey, V., Dutchilleul, P., Moschetto, Y. "Simultaneous Measurement of Plasma Apolipoproteins A-I and B by Electroimmunoassay". Clin. Chem., 28/1/59-62 (1982)
- (45) Miller, J.P., Mao, S.J.T., Patsch, J.R., Gotto, A.M. "The measurement of apolipoprotein A-I in human plasma by electroimmunoassay". J. Lipid Res., 21/775-780 (1980)
- (46) Avogaros, P., Cazzolato, G., Bittolopon, G. "HDL-cholesterol apolipoprotein A-I and apo B. Age and index body weight". Atherosclerosis, 31/85-91 (1978)

- (47) Weech, P.K. "Electroimmunoassay Rocket Areas Estimated with a Desktop Computer System: An Expedient in the Assay of Serum Apolipoproteins". Clin. Chem., 27/2/357-358 (1981)
- (48) Roschlau, P.E., Bernert and W. Gruber: 9th. Inter. Congres. on Clin. Chem., Toronto, 1975. Abstr. No 1 Trinder, P. Ann. Clin. Biochem., 6/24 (1969)
- (49) Wahlefeld, A.W. Methoden der enzymatischen analyse, 3a. ed. Tomo II, Verlag Chemic, Weheim, p 1878, 1974
- (50) Juárez, A.J. Valores de referencia para lípidos y lipoproteínas en mujeres mexicanas en edad reproductiva. Tesis Facultad de Química UNAM, México, 1978.
- (51) Brussard, J.H., Dallinga-Thie, G., Groot, P.H.E., Katan, M.B. "Effects of amount and type of dietary fat on serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in man. A controlled-8-week trial". Atherosclerosis, 36/515-527 (1980)
- (52) Marcovina, S., Radaelli, G., Gallus, G., Graziani, M., Vassanelli, c., Catapano, A.L. "Apolipoprotein A-I and B in Patients with Angiographically Assessed Coronary Artery Disease". International Symposium on Cholesterol Control and Cardiovascular Diseases, Prevention and Therapy, Milan Italy. Julio 1987 p 75.
- (53) Love, J.E., Jones, J.T., Mc Grath, P., Moore, E. "Reference intervals for apolipoproteins A-I and B by rate nephelometry and associated CHD risk assessment". American Association for Clinical Chemistry 39 th National Meeting, San Francisco, California USA. Julio 19-24 1987 p898.

- (54) Cooper, G.R., De Keersgieter, W., Ezcurra, E.J., Rosseneu, M., Shepherd, J., d'Arcangues, C. Method Manual for Lipid and Lipoprotein Determinations. WHO Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. 3rd. Edition. December 1986.
- (55) Goldstein, J.L., Brown, M.S. "The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy". Med. Clin. North Am, 66/335-362 (1982)

RESUMEN

En los últimos años se ha considerado que los niveles de apo A-I y de apo B son mejores indicadores de riesgo coronario que los niveles correspondientes de colesterol de HDL, colesterol de LDL y que el colesterol total, ya que algunos estudios realizados en personas con riesgo coronario indican que apo B se encuentra elevada en dichos pacientes, mientras que el colesterol de LDL y el colesterol total permanecen en niveles normales. De aquí la importancia de tener métodos adecuados para cuantificar estas apolipoproteínas en el laboratorio clínico.

En el presente trabajo, para la cuantificación de estas dos apolipoproteínas, se estandarizó una modificación al electroinmunoensayo de Laurell (23); para tal fin se probaron dos diferentes materiales de referencia, se variaron algunos parámetros que constituyen los puntos críticos de la metodología como son: la concentración del anticuerpo en el gel, el tiempo de corrimiento, el voltaje, la temperatura, el lavado y la tinción de las placas. Una vez que se probó todo esto se llegó a las siguientes condiciones consideradas como óptimas para realizar el método:

- Estándar: Suero control (OMEGA) a concentraciones de 2.7, 1.35, 0.68 y 0.34 mg/dl para apo A-I y a concentraciones de 15.0, 7.5, 3.75 y 1.88 mg/dl para apo B.
- Anticuerpo: Suero de conejo anti apo A-I y suero de conejo anti apo B al 3% en el gel de agarosa.
- Material control: Suero de referencia para apolipoproteínas clave AA8875 dil 1:200 (0.64 mg/dl) en el caso de apo A-I y dil 1:30 (3.33

mg/dl) en el caso de apo B.

- Muestras: Para apo A-I se utilizaron sueros y sus respectivas fracciones HDL diluidos 1:200, para apo B se utilizaron sueros y sus respectivas fracciones LDL diluidos 1:30.

- Medio: Agarosa A 15 g/l en amortiguador de Barbitol pH=8.6.

- Condiciones: 200 v/cm,

18 horas,

16°C.

En base a estas condiciones se hizo un estudio de varianza en condiciones óptimas, del que se obtuvo el coeficiente de variación intraensayo, que fue de 2.1% para apo A-I y de 5.4% para apo B.

También se realizó un estudio de varianza en condiciones de rutina, del que se obtuvo el coeficiente de variación interensayo, en el caso de apo A-I fue de 12.6% y en el caso de apo B fue de 7.6%.

Con el objeto de aplicar la metodología se analizaron 18 muestras de mujeres, los valores obtenidos para ambas apolipoproteínas caen dentro de límites de referencia dados por autores consultados. En el caso de apo A-I los valores tuvieron una media de 141.0 ± 24.9 mg/dl en el suero total, en la fracción HDL fue de 118.0 ± 28.4 mg/dl, significando que el 84% de la apo A-I total estuvo contenida en la fracción HDL. En el caso de apo B los valores tuvieron una media de 109.0 ± 26.0 mg/dl y en la fracción LDL fue de 52.6 ± 27.9 mg/dl, esto significa que el 50% de apo B estuvo contenido en LDL. De aquí se llegó a la conclusión de que es mejor cuantificar estas dos apolipoproteínas en suero total que en fracciones lipoproteínicas, debido a los problemas que presentan éstas al ser aisladas.

Finalmente, a pesar de las dificultades que presentan las apolipoproteínas al ser analizadas por métodos inmunoquímicos, se lograron establecer condiciones estándares para la aplicación del EIA en la práctica clínica, ya que está dentro de límites aceptables por otros investigadores.

El objetivo de este estudio fue también el de participar en estudios multicéntricos internacionales que ayudan en la estandarización de la metodología, de dicha participación no se tienen aún los resultados finales.

ABREVIATURAS

AGL = Acidos grasos libres
Apo = Apolipoproteína
CE = Colesterol esterificado
CL = Colesterol libre
Ct = Colesterol total
EIA = Electroinmunoensayo
F = Fosfolípidos
HDL = Lipoproteína de alta densidad
IDL = Lipoproteína de densidad intermedia
INA = Inmunonefelometría
L = Lípidos
LCAT = Lecitin colesterol acil transferasa
LDL = Lipoproteína de baja densidad
LPL = Lipoprotein lipasa
P = Proteínas
RIA = Radioinmunoanálisis
RID = Inmunodifusión radial
Tg = Triacilgliceroles
TMU = Trimetilurea
VLDL = Lipoproteína de muy baja densidad

APENDICE A

Formato de los cuestionarios utilizados para evaluar a cada participante de los estudios:

1. Nombre del paciente
2. Edad
3. Fecha del examen físico
4. Fecha de la toma de sangre
5. Primer día de su pasado período menstrual
6. ¿Ha utilizado anticonceptivos?
7. Si la respuesta anterior es afirmativa, ¿qué método utilizó?
8. ¿Ha utilizado anticonceptivos orales hormonales?
9. Presión sanguínea (mm Hg): a) diastólica, b) sistólica
10. Peso al siguiente kilogramo
11. Altura (cm)
12. Veces al mes que toma alcohol
13. ¿Cuánto consume de alcohol las veces que lo hace?
14. ¿Fuma tabaco?
15. Si la respuesta es afirmativa ¿qué fuma usualmente?
16. De lo que fuma, ¿cuánto consume al día?
17. De los siguientes alimentos marque con un asterisco lo que consumió la semana pasada:

a) Leche	h) Margarina
b) Mantequilla	i) Vegetales verdes
c) Queso	j) Tubérculos
d) Huevo	k) Fruta
e) Manteca	l) Nueces
f) Aceite o grasa animal	m) Carne
g) Aceite o grasa vegetal	n) Pescado
18. Diga cuáles fueron los 3 alimentos principales que consumió

APENDICE B

CUANTIFICACION DE COLESTEROL TOTAL

Método enzimático CHOD-PAP

Boehringer Mannheim GmbH

A.- Fundamento:

Esteres de colesterol + H₂O $\xrightarrow{\text{colesterol esterasa}}$ colesterol + ácidos grasos

Colesterol + O₂ $\xrightarrow{\text{colesterol oxidasa}}$ 4-colestanona + H₂O₂

2 H₂O₂ + 4-aminofenazona + fenol $\xrightarrow{\text{peroxidasa}}$

4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona + 4 H₂O

B.- Material de prueba: Suero y sus fracciones lipoproteínicas

C.-, Reactivos:

<u>Contenido</u>	<u>Concentración de las soluciones</u>
1 Amortiguador (fosfato de potasio)	0.4 mol/l; pH 7.7
Fenol	20 mmol/l
Metanol	1.85 mol/l
2 Amortiguador (fosfato de potasio)	0.4 mol/l; pH 7.7
4-Aminofenazona	2 mmol/l
Metanol	1.85 mol/l
Hidroxipolietoxidodecano	0.4%
3 Colesterolesterasa	40 U/ml
Colesterol oxidasa	12 U/ml
Peroxidasa	8 U/ml

D.- Control de calidad interno

Calibración: Precilip

Control de exactitud: Precilip E.L.

E.- Método de determinación

Material de prueba: Suero claro libre de hemólisis y fracciones lipoproteínicas

Longitud de onda: 500 nm

Celdilla: 1 cm de paso de luz

Temperatura de incubación: 20-25°C

Pipetear en un tubo de ensaye:		
	Blanco reactivo	Prueba
Material de prueba	-	0.02 ml
Solución 4	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar, incubar el blanco de reactivo y la prueba 20 min. 20-25°C

Leer la extinción de la prueba frente al blanco de reactivo en el término de los 20 minutos siguientes = E

F.- La concentración (c) del colesterol en las muestras se calcula según:

Longitud de onda	mg/100 ml	mmol/l
500 nm	$c = 575 \times E$	$C = 14.9 \times E$

NOTA: Para las fracciones lipoproteínicas el valor de c se multiplica por 1.25, ya que éste es su factor de dilución al aforarlas a 5 ml después de obtenidas, las fracciones que tengan un volumen mayor del mencionado se multiplican por su factor de dilución que se obtiene: volumen de afor/4 (El 4 se refiere a la cantidad de suero que se ultracentrifuga).

CUANTIFICACION DE TRIACILGLICEROLES

Método: Cuantificación enzimática después de la hidrólisis enzimática
Boehringer Mannheim GmbH

A.- Fundamento:

Triacilglicerolos lipasa/esterasa, glicerol + ácidos grasos

Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ glicerol-3-fosfato + ADP

ADP + PEP $\xrightarrow{\text{PK}}$ piruvato + ATP

Piruvato + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ L-lactato + NAD⁺

B.- Material de prueba: Suero y sus fracciones lipoproteínicas

C.- Reactivos:

<u>Contenido</u>	<u>Concentración de las soluciones</u>
1 Amortiguador de fosfato	20 mmol/l; pH 7
Sulfato de magnesio	4 mmol/l
Dodecilsulfato sódico	0.35 mmol/l
2 NADH/	10 mmol/l
ATP/	22 mmol/l
PEP	18 mmol/l
3 LDH/	300 U/ml
PK	50 U/ml
Lipasa/	4000 U/ml
Esterasa	30 U/ml
4 GK	150 U/ml

D.- Control de calidad interno

Calibración: Trioleína, Precilip

Exactitud: Precilip E.L.

E.- Método de determinación:

Longitud de onda: 340 nm