

44
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA

Obtención de anticuerpos contra la Lipo-
proteína de baja densidad aislada de plas-
ma humano y su aplicación en la Técnica
de Radioinmunoanálisis.

TESIS:

Que para Obtener el Título de:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

LAURA CATALINA DIAZ BONILLA

Laboratorio del Departamento de Endocrinología.
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

México, D.F., Noviembre 1992.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

La medición de la concentración de apolipoproteínas, en especial apo AI y B, aportar información adicional acerca del estado clínico de un paciente, ya que sujetos con enfermedad cardiovascular prematura frecuentemente tienen un valor mayor al normal de Apo B aún cuando su colesterol plasmático no esté significativamente elevado. Por lo anterior la medición de Apo B ha despertado gran interés y no solo debido a su uso como predictor del riesgo a desarrollar una enfermedad cardiovascular coronaria, sino porque también ayuda en el diagnóstico de dislipoproteinemias y en el monitoreo de la evolución de un tratamiento dietético o farmacológico. Sin embargo, la medición de apolipoproteínas no ha desarrollado todo su potencial en los laboratorios de investigación debido a problemas en la estandarización tanto de materiales como de la metodología de referencia. Por lo anterior se diseñó un proyecto cuya hipótesis de trabajo fue:

Si el método que presenta la mayor sensibilidad para medir Apo B-100 es el radioinmunoanálisis (RIA), y para realizarlo es necesario contar con un estándar confiable y anticuerpos (Ac) específicos, entonces podemos aislar LDL de sangre periférica humana como fuente de Apo B-100 e inocularla en conejos de la raza Nueva Zelanda para inducir síntesis de Ac policlonales y usar estos dos elementos para medir la concentración de Apo B en circulación por esta técnica.

Para demostrarla se propusieron los objetivos siguientes: 1) Obtener LDL pura a partir de plasma humano como fuente de Apo B-100 para utilizarlo como estándar y antígeno (Ag). 2) Inducir la formación de Ac policlonales en conejo para esta apolipoproteína. 3) Probar que los Ac son útiles en la técnica del RIA Apo B-100 en la técnica de .

Para aislar a la LDL (1.03-1.05 g/ml) se utilizó la técnica de ultracentrifugación secuencial preparativa utilizando tres cortes de densidad. Para demostrar la pureza de la LDL obtenida se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 7% y con la densitometría de este gel se obtuvo el porcentaje de pureza. Para comprobar que las propiedades inmunológicas de la Apo B100 expresada

en la LDL no fueron alteradas durante los procedimientos de su obtención se hizo una inmunodifusión radial. Una vez demostrada la pureza de la LDL se inoculó en cuatro conejos de la raza Nueva Zelanda. Se eligieron dos formas de presentación del Ag la forma 1 consistió en 1mg de LDL + 1ml de Adyuvante de Freund Completo, y la forma 2 en la electroforesis de 1mg de LDL en PAGE-GDS al 5% utilizando el acrilamida como adyuvante. Para el Ag forma 1 el esquema de inmunización fue de 4 períodos con refuerzos cada 28 días y los sangrados 14 días después del refuerzo. Diez meses después se repitieron los cuatro períodos antes del título final. Para los conejos inoculados con el Ag forma 2 se aplicaron los refuerzos los días 28 y 84 después de la inoculación y se tituló el suero. La titulación se realizó por RIA, para ello se marcó parte del estándar con 125I por el método de Cloramina T para utilizarla como marcador. Una vez titulados los sueros se realizaron una serie de curvas estándar para demostrar su utilidad en el RIA.

El rendimiento de la obtención de la LDL fue de 0.12B +/- 0.042 mg de LDL/ml de plasma. La densitometría de la electroforesis del estándar demostró que contaba con una pureza superior al 90%. La actividad específica de la marcación de LDL con 125I fue de 0.0055 uCi/ug de LDL. Los títulos de los conejos inoculados con el Ag forma 1 fueron de 1:15,000 y 1:10,000 y del Ag forma 2 de 1:2000 en ambos casos. Las curvas estándar de los cuatro Ac fueron linearizadas por el método Logit. Con la linearización se obtuvo el valor del 50% de unión para estimar la sensibilidad de los Ac encontrándose que el más sensible fue uno de los conejos inoculados con el Ag 2 con 6.134 ng de LDL y el menos sensible, también inoculado con el Ag 2 con 15.8 ng de LDL. El análisis de especificidad por IDR y RIA mostró que los Ac no reconocen Apo AI ni HDL en concentraciones superiores a la fisiológicas. Por lo tanto, con la metodología antes descrita se obtiene un estándar de LDL como fuente de Apo B-100 y Ac policlonales contra esta apoproteína que son específicos y útiles en el RIA.

I. INTRODUCCION

PAGINA

I.1- Obtención de energía celular por nutrimentos.....	1
I.1.1. Proteínas.....	2
I.1.2. Carbohidratos.....	2
I.1.3. Lípidos.....	4
I.2. Lípidos de importancia clínica.....	5
I.2.1. Ácidos grasos.....	6
I.2.2. Triglicéridos.....	6
I.2.3. Fosfolípidos.....	8
I.2.4. Colesterol.....	8
I.3. Lipoproteínas.....	9
I.3.1. Estructura.....	9
I.3.2. Clasificación.....	11
I.4. Quilomicrones y remanentes de Quilomicron.....	13
I.5. Lipoproteínas de muy baja densidad. (VLDL, Very Low Density Lipoprotein).....	15
I.6. Lipoproteínas de densidad intermedia. (IDL, Intermediate Density Lipoprotein).....	15
I.7. Lipoproteínas de baja densidad. (LDL, Low Density Lipoprotein).....	15
I.8. Lipoproteínas de alta densidad. (HDL, High Density Lipoprotein).....	16
I.9. Obtención de los lípidos por el organismo.....	17
I.9.1 Vía exógena.	
I.9.1.1. Digestión.....	17
I.9.1.2. Absorción.....	19
I.9.1.3. Metabolismo de los Quilomicrones.....	19
I.9.2. Vía endógena.	
I.9.2.1. Metabolismo de las VLDL.....	20
I.9.2.2. Metabolismo de las IDL.....	21

1.9.2.3. Metabolismo de las LDL.....	22
1.9.2.4. Metabolismo de las HDL.....	25
I.10. Importancia clínica de los lípidos y las lipoproteínas	
I.10.1. Asociación entre colesterol y aterosclerosis.....	27
I.11. Métodos para la medición de apoproteínas.	
I.11.1. Análisis de unión enzimática en inmunoadsorbente. (ELISA).....	28
I.11.2. Electroinmunoanálisis (EIA).....	28
I.11.3. Inmunodifusión radial (IDR).....	28
I.11.4. Inmunonefelometría.....	29
I.11.5. Radioinmunoanálisis.....	29
I.12. Anticuerpos.....	30
I.12.1. Estructura.....	31
I.12.2. Clasificación.....	32
I.12.3. Respuesta primaria y secundaria en la producción de anticuerpos.....	33
II.- HIPOTESIS.....	37
III. OBJETIVOS.....	38
IV. METODOLOGIA.	
IV.1- Obtención del estándar de LDL.	
IV.1.1. Colección de la muestra de sangre.....	39
IV.1.2. Separación de la LDL de plasma humano.....	39
• IV.1.2.1. Ultracentrifugación 1 ($d = 1.03$ g/ml).....	39
IV.1.2.2. Ultracentrifugación 2 ($d = 1.063$ g/ml).....	40
IV.1.2.3. Ultracentrifugación 3 ($d = 1.05$ g/ml).....	44
IV.1.2.4. Ultracentrifugación 4 ($d = 1.019$ g/ml).....	44
IV.2 Cuantificación de la apoproteína obtenida	45
IV.2.1. Curva patrón.....	45
IV.3 Caracterización de la LDL obtenida	
IV.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS...46	
IV.3.1.1. Preparación de los geles.....	46

IV.3.1.2. Preparación de las muestras.....	46
IV.3.1.3. Procedimiento.....	47
IV.3.2. Tinción del gel con Azul Brillante de Coomassie....	47
VI.3.2.1. Cálculo de los pesos moleculares de las proteínas.....	47
IV.3.3. Densitometría.....	48
IV.3.4. Inmunodifusión radial.....	48
IV.4. Obtención de anticuerpos contra LDL.	
IV.4.1. Inmunización.....	48
IV.4.1.1. Esquema de inmunización.....	50
IV.4.1.2. Patrón de inyecciones, dosis del antígeno y vía de inoculación.....	50
IV.4.1.3. Obtención del suero.	
IV.4.1.3.1. Sangría de prueba.....	50
IV.4.1.3.2. Sangría de cosecha.....	50
IV.5. Determinación del título de los sueros	
IV.5.1. Marcación de la LDL con ^{125}I , por el método de cloramina-T.....	51
IV.5.1.1. Autorradiografía.....	51
IV.5.1.2. Almacenamiento de la LDL- ^{125}I	52
IV.5.2. Purificación de la LDL- ^{125}I	52
IV.5.3. Titulación de los anticuerpos anti-Apo B100.....	52
IV.5.4. Radioinmunoanálisis de Apo B100.....	53
IV.5.4.1. Cálculo de resultados.....	55
IV.6. Prueba de especificidad.....	55
V. RESULTADOS.....	57
VI. DISCUSION.....	74
VII. CONCLUSIONES.....	82
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	83
IX. APENDICE A.....	88
X. APENDICE B.....	91

I. INTRODUCCION

I.1. Obtención de energía celular por nutrimentos.

Desde el punto de vista termodinámico, se considera a la célula como un sistema de energía abierto que se encuentra en un equilibrio dinámico con su medio. Los componentes de ambos se encuentran en un flujo constante, los materiales entran en forma continua a la célula y constantemente son excretados productos tanto de síntesis como de desecho. En este proceso de intercambio, los elementos se transforman, renuevan y reemplazan de manera continua (1). A toda esta actividad se le llama metabolismo. En sentido más amplio, el metabolismo incluye todas las reacciones químicas que se efectúan dentro del organismo o en sus células individuales para cubrir las funciones de crecimiento, reproducción, mantenimiento o producción de energía (1).

Los procesos metabólicos pueden tomar dos direcciones, una de ellas tiene el objeto de sintetizar compuestos complejos a partir de compuestos simples, consumiendo energía para ello y recibe el nombre de anabolismo. La segunda dirección es el conjunto de procesos que se encargan de liberar la energía que poseen los compuestos hasta reducirlos a otros elementos, proporcionando de esta manera una gran cantidad de energía química útil para realizar las funciones celulares, estos procesos reciben el nombre de catabolismo (1).

Las moléculas que intervienen en estos procesos metabólicos, provienen del alimento ingerido por el organismo en el caso de los heterótrofos, o pueden ser sintetizados a partir de alguna fuente de energía (solar, química, etc.) por los organismos autótrofos. Se sabe que existen bacterias capaces de vivir en un medio que contenga una fuente de carbono y oxígeno junto con algunos minerales esenciales (2). Sin embargo, el organismo humano necesita de una dieta mucho más variada que incluye, entre otros, proteínas, polisacáridos, lípidos, minerales y vitaminas, los cuales le sirven como elementos estructurales y nutricionales.

La importancia de los tres primeros tipos de nutrimentos radica principalmente en el hecho de que su catabolismo converge en la

formación de metabolitos comunes que dan lugar a la síntesis de ATP (3) (figura 1). Parte de los nutrientes, principalmente, carbohidratos y/o lípidos, son almacenados en plantas y animales como reserva de energía. De las características de estos tres tipos de moléculas se hace un resumen a continuación.

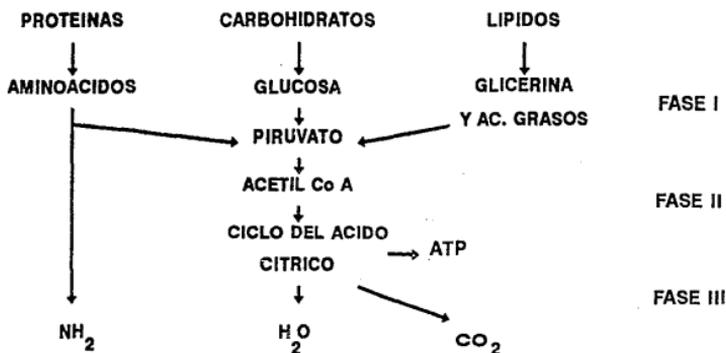
1.1.1. Proteínas

En lo que se refiere a proteínas, estas son moléculas formadas por residuos de aminoácidos L unidos por enlaces peptídicos. Pueden estar formados por combinaciones de 20 aminoácidos diferentes y con diversas proporciones de cada uno. Tienen en común la presencia de un grupo amino y un grupo carboxilo, que se encuentran unidos al carbono alfa de la molécula (excepto prolina e hidroxiprolina). Las proteínas se clasifican en dos categorías de acuerdo a los compuestos que las forman, es decir, las proteínas constituidas solo por aminoácidos se les llama proteínas simples, y las proteínas cuyos aminoácidos se encuentran unidos a otros compuestos como ácidos nucleicos, (nucleoproteínas), carbohidratos (glucoproteínas), o a diferentes sustancias de peso molecular bajo, como los metales, se les llama proteínas compuestas (4). Las funciones de las proteínas son muy variadas dentro de la célula. Pueden tener la función de regular reacciones metabólicas (enzimas), también pueden funcionar como soporte estructural dentro y fuera de las células o bien unir y transportar específicamente otras moléculas a través de la membrana plasmática (3).

1.1.2. Carbohidratos

Los carbohidratos son consideradas como moléculas simples, su fórmula general es $C_n(H_2O)_m$, donde n es el número de carbonos y m es el número de unidades de H_2O , que existen en la molécula (5). Cada uno de los carbohidratos posee un esqueleto de átomos de carbono, enlazados entre sí por un enlace sencillo, pueden presentar un arreglo lineal o cíclico. Estas moléculas se unen por medio de un enlace llamado glucosídico, el cual está formado por la condensación de dos azúcares con la eliminación de una molécula de agua (2).

FIG 1.- Esquema que muestra las fases del metabolismo convergente de las tres moléculas orgánicas empleadas como combustible: proteínas, carbohidratos y lípidos.



FASE I. Las moléculas combustibles orgánicas: proteínas, carbohidratos y lípidos, se oxidan hasta fragmentarse en los grupos acetilo del acetil Co A.

FASE II. Estos grupos se incorporan al ciclo del ácido cítrico y de su degradación enzimática se obtiene energía y se libera CO_2 .

FASE III. Con los átomos de hidrógeno se crea un gradiente a lo largo de la cadena respiratoria. La energía se conserva en forma de ATP.

Los carbohidratos más comunes están formados por unidades de 5 o 6 átomos de carbono (pentosas y hexosas, respectivamente). Estas unidades pueden estar libres y se les llama monosacáridos (en donde $m = n$), o bien, pueden unirse mediante el enlace glucosídico, y así formar polisacáridos, de los cuales los más sencillos son los disacáridos (en donde $m = n - 1$) que se componen de dos moléculas unidas al mismo o a diferentes monosacáridos. Ejemplos son la sacarosa (glucosa + fructosa), lactosa (glucosa + galactosa) y maltosa (glucosa + glucosa).

Los monosacáridos pueden también formar pequeños grupos, de tres a 10 monosacáridos (1), llamados oligosacáridos, o bien, formar estructuras muy grandes, que comprenden miles de unidades tales como las grandes moléculas de almidón, glucógeno (5), celulosa y dextrina (1). Todos ellos difieren en su peso molecular, estructura ramificada y solubilidad.

Por otro lado, los carbohidratos representan una parte principal del consumo calórico total de los humanos y de la mayor parte de las formas de vida animal, y ocupan un lugar central en el metabolismo de las plantas verdes (2). En forma de glucógeno o almidón pueden emplearse como reserva temporal de glucosa, actúan como lubricantes de las articulaciones del esqueleto, como adhesivos entre las células y para conferir especificidad biológica sobre la superficie de las células animales. Se pueden mezclar sus propiedades con las de las proteínas en moléculas híbridas, glucoproteínas o proteoglicanos, que son importantes componentes de la superficie celular y de los sistemas de soporte extracelular de los animales, entre otras funciones (2).

I.1.3. Lípidos

Los lípidos son compuestos que en forma característica comparten las propiedades de relativa solubilidad en solventes orgánicos (acetona, éter, alcohol, cloroformo), y de relativa insolubilidad en el agua. Entre los lípidos se encuentran sustancias de estructura molecular muy diversa, ácidos grasos, terpenoides (vitaminas A, E, K), carotenoides y esteroides (colesterol, cortisona, estrógenos, prostaglandinas, triglicéridos, fosfolípidos,

esfingolípidos, etc.) (6). Los lípidos pueden clasificarse como lípidos simples y lípidos compuestos. Los lípidos simples son aquellos que no se degradan mediante hidrólisis o bien porque al degradarse solo producen derivados lipídicos. Los lípidos compuestos, son ésteres de ácidos grasos que contienen grupos o radicales químicos en su molécula (7).

Dentro de las variadas funciones de los lípidos en el organismo, encontramos que son componentes estructurales de las membranas celulares y de estructuras subcelulares (8). Anatómicamente, los depósitos de grasa dentro del cuerpo actúan como aislantes y como material de protección alrededor de algunos órganos internos y también en las regiones subcutáneas (1). Los lípidos también sirven para el transporte, depósito y/o almacenamiento de energía metabólica, la cual se considera como su función principal. Desde este punto de vista, los lípidos más abundantes son las grasas o triglicéridos, los cuales representan la forma de almacenamiento de energía química más importante en la mayoría de los organismos. Los lípidos de la dieta son elementos importantes de la nutrición humana, no solo porque tienen un alto valor energético, sino porque también sirven como vehículo de las vitaminas liposolubles (7).

Por el tema del presente trabajo se desarrollarán en adelante otros aspectos de los lípidos.

1.2. Lípidos de importancia clínica

Los componentes lipídicos del suero se dividen en forma general en cuatro grandes categorías: ácidos grasos libres, triglicéridos, colesterol y fosfolípidos. Los tres primeros son lípidos simples y los fosfolípidos son lípidos compuestos (6).

Dentro de los lípidos considerados como importantes, por las variadas funciones que desempeñan en el organismo y que ingresan a él en cualquier dieta mixta, se encuentran los triglicéridos y el colesterol, los cuales, además de ser utilizados como nutrientes y componentes estructurales, pueden involucrarse en el desarrollo de procesos patológicos debido a un exceso en su ingestión o a un metabolismo deficiente. Existen modelos experimentales en animales como conejos(9), monos (10,11), cerdos (12), bovinos (13,14) y ratas

(15), entre otros, en los cuales está ampliamente demostrada la relación del exceso de lípidos con la aterosclerosis.

1.2.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos, son los componentes estructurales de la mayoría de los lípidos. Están constituidos por hidrógeno y carbono como sus elementos principales, unidos entre sí por enlaces sencillos y alineados en una cadena recta (alifáticos), que poseen desde 4 a 24 átomos de carbono (3). La cadena parte de un grupo carboxilo que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno, le sigue una cadena que contiene solo carbono e hidrógeno. La presencia de hidroxilo en un grupo funcional suele significar solubilidad en agua, por lo tanto es polar, mientras que la cadena hidrocarbonada es insoluble en agua, la cual le confiere a la mayoría de los lípidos esta característica, además del aspecto y consistencia grasosa, así como las propiedades físicas y químicas de cada graso, por ejemplo el punto de fusión (7).

Su clasificación se basa en el tipo y número de enlaces que presenten en la molécula. Si solo presentan enlaces sencillos se les llama ácidos grasos saturados, si presentan un enlace doble, ácidos grasos insaturados, y si presentan más de un enlace doble en su molécula, se llaman poliinsaturados. Por ejemplo, el ácido palmítico y el ácido esteárico son ácidos grasos saturados, y el ácido oleico y el linoleico son insaturados (3).

Aunque los ácidos grasos solo se presentan como trazas en la células y tejidos, son muy importantes como bloques constitutivos de varias clases de lípidos (8). La mayor parte de los ácidos grasos se encuentran formando ésteres con el glicerol y se llaman triglicéridos de los cuales se mencionarán a continuación algunas características.

1.2.2. Triglicéridos

Los triglicéridos están formados por 3 radicales de ácidos grasos acoplados a una molécula de glicerol por medio de enlaces éster de baja energía (1). Uno, dos o tres tipos diferentes de ácidos grasos, pueden combinarse de esta manera con los grupos hidroxilo del glicerol para formar una molécula de graso, y en base a ello, se clasifican en dos categorías: triglicéridos simples, los que

contienen una sola variedad de ácidos grasos, y los triglicéridos mixtos, que contienen más de una variedad (2).

La mayoría de los triglicéridos presentes en el cuerpo se obtienen de la dieta, o son sintetizados en el hígado, y pueden formarse a partir de carbohidratos, proteínas y otros lípidos en células y tejidos. Si en un momento llega a existir una cantidad mayor de lo requerido, son transportados al tejido adiposo para ser almacenados, o se envían al músculo y otros tejidos para su catabolismo (1a).

Los triglicéridos son la principal forma de almacenamiento de grasas, tanto en vegetales como en animales (3).

Una de las medidas importantes del nivel de energía libre de una molécula orgánica es su estado de reducción, y también es una medida de su capacidad para efectuar un trabajo químico dentro de la célula. Mientras mayor es el número de átomos de hidrógeno que se pueden eliminar de una molécula de "combustible", mayor es la cantidad de ATP que puede formarse. Debido a ello, las grasas son un gran almacén de energía por unidad de peso en comparación con los polisacáridos, ya que son moléculas mucho más reducidas que contienen largas hileras de grupos $-CH_2-$ que pertenecen a las largas cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos, cuyo estado de oxidación es muy bajo (2). Al ser oxidadas las grasas proporcionan más del doble de energía (en calorías/gramo), comparadas con las que aportan los carbohidratos o proteínas. Las grasas tienen un trayecto bastante más largo que recorrer antes de ser degradadas completamente a bióxido de carbono y agua (3).

Dado que las grasas carecen tanto de grupos cargados y por lo tanto polares, las moléculas de grasa son extremadamente insolubles en agua, y se almacenan en las células en forma de gotitas. En vista de que, a diferencia de los gránulos de glucógeno, estas gotitas de lípido no contienen agua, son considerados un almacén de energía muy concentrado.

En el tejido adiposo humano, los principales ácidos que forman parte de los triglicéridos en orden decreciente son: oleico, palmítico, linoléico y esteárico.

1.2.3. Fosfolípidos

Los fosfolípidos están formados por la unión entre un radical glicerol y el éster fosfórico de una base nitrogenada (generalmente colina o inositol). Los ácidos grasos están enlazados por uniones éster a dos de los grupos hidroxilo del glicerol, en tanto que el tercer grupo hidroxilo está esterificado con un ácido fosfórico en vez de un ácido graso (8).

Los fosfolípidos comparten una propiedad importante ya que poseen una "cola" hidrofóbica formada por las dos cadenas de ácidos grasos y una cabeza hidrofílica que consta del residuo de ácido fosfórico con carga negativa, y de una molécula de carga positiva unida a él. Los grupos adicionales aumentan la solubilidad, tanto en el agua como en los solventes orgánicos, por esta razón pueden unir materiales insolubles en el agua (1). Son los más polares de todos los lípidos, lo que los hace intermediarios importantes en el intercambio de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas a través de las membranas. Los fosfolípidos sirven de vínculos estructurales vitales entre las fases acuosa y no acuosa dentro y fuera de la célula, ayudan en el transporte de triglicéridos y colesterol a través del ambiente hidrico del cuerpo, y también cumplen un papel funcional en ciertas actividades enzimáticas (8).

Entre los fosfolípidos más abundantes en la composición de la mayor parte de las membranas de células animales, están los fosfoglicéridos de etanolamina (cefalinas), y de colina (lecitina) (8).

1.2.4. Colesterol

El colesterol está formado por cuatro anillos condensados y una molécula de alcohol (3). La molécula de colesterol posee una cabeza polar que es el grupo hidroxilo en posición 3. El resto de la molécula es de estructura no polar relativamente rígida (3). Esta molécula puede unirse a través del grupo hidroxilo por un enlace éster a un ácido graso, y así formar un éster de colesterol que, al igual que el colesterol libre, es hidrófobo (17).

Dentro de las funciones del colesterol en el organismo encontramos que actúa como elemento estructural de diversas membranas

y como precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas. El colesterol puede obtenerse por dos vías, una de ellas es la absorción intestinal del colesterol derivado de la dieta (vía exógena), o bien, puede ser sintetizado por las células del hígado y otras células extrahepáticas (vía endógena). El colesterol es excretado por la bilis y se elimina por las heces fecales (16).

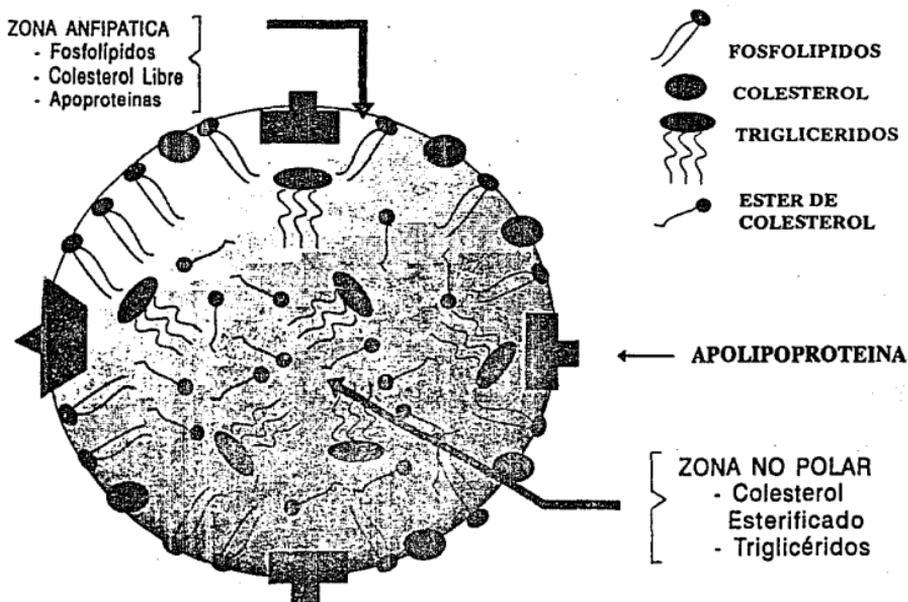
1.3. Lipoproteínas

La naturaleza hidrofóbica de los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, su demanda por las células del cuerpo, y la vía sanguínea por la que deben llegar a ellas, hacen necesario un sistema complejo para transportarlos. Aún cuando moléculas simples, como los ácidos grasos, pueden ser transportados en el plasma en unión a albúmina, un mecanismo eficiente para el acarreo de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol debe ser capaz, no solo de transportar esas moléculas hidrofóbicas a través de un medio acuoso como es el plasma sanguíneo, sino que también debe asegurar su distribución a tejidos específicos en los que se requieren. La unión de estos elementos en combinación con algunas proteínas (apoproteínas) forman unidades conocidas como lipoproteínas, que satisfacen ambos requerimientos (1,18,19).

1.3.1. Estructura.

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas constituidas por dos zonas principales. La primera se encuentra en la parte central de la molécula en donde encontramos lípidos no polares, es decir, triglicéridos y ésteres de colesterol, los cuales forman microemulsiones, siendo el elemento emulsificante un fosfolípido, generalmente lecitina (fosfatidilcolina) (6,18) (figura 2). La segunda región es anfipática, incluye moléculas como fosfolípidos y colesterol libre. Estas dos moléculas tienen una parte apolar y otra no cargada o que potencialmente puede adquirir carga. De esta manera alinean sus partes apolares junto a lípidos hacia el centro y las partes solubles hacia el ambiente acuoso de la sangre (18) (figura 2).

FIG.2. Esquema de las zonas principales de una lipoproteína.



Se muestran las dos zonas principales que componen a las lipoproteínas: la zona anfipática y la zona hidrófoba.

Las lipoproteínas poseen una o más clases de apoproteínas que tienen varias regiones helicoidales con propiedades anfipáticas. Las cuales arreglan sus partes insolubles en agua hacia el centro y sus regiones hidrofílicas hacia la parte externa, en contacto con el ambiente acuoso. Las apoproteínas tienen tres funciones principales: actúan como elementos estructurales de las lipoproteínas; algunas apoproteínas son el sitio de reconocimiento de receptores celulares específicos para lipoproteínas, la unión con ellos es el primer paso del catabolismo de las lipoproteínas por la célula y otras poseen determinantes específicos que les permiten funcionar como cofactores de las enzimas que intervienen en el metabolismo de las lipoproteínas, activan o inhiben enzimas que juegan un papel esencial en el metabolismo de los lípidos en el plasma (6,18,19) (tabla 1).

El resultado es una partícula que puede ser relativamente soluble en agua permitiendo el transporte de moléculas hidrófobas contenidas en su interior a través del plasma (19).

1.3.2. Clasificación.

La propiedad que permitió la separación de las lipoproteínas por medio de la ultracentrifugación, fue su densidad de hidratación, esto dio como resultado la identificación de cuatro grupos de lipoproteínas (6). De densidad menor a mayor: Quilomicrones (Qm, densidad menor a 0.95 g/ml); lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoprotein, con una densidad de 0.95-1.006 g/ml), lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein) cuya densidad es de 1.019-1.063 g/ml, y lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoprotein) con densidad de 1.063-1.210 g/ml. También se ha identificado un producto de densidad intermedia que proviene del catabolismo de los quilomicrones llamado remanente de quilomicrón, que se encuentra en la circulación después de ingerir grasa en los alimentos y un producto de la hidrólisis de las VLDL que permanece por muy corto tiempo en el plasma. Se les llama Lipoproteínas de Densidad Intermedia (IDL, Intermediate Density Lipoprotein), su densidad es de 1.006-1.019) (6).

TABLA 1.- PRINCIPALES APOPROTEINAS EN EL PLASMA HUMANO Y SUS FUNCIONES.

NOMBRE	EN LIPOPROTEINAS	PESO MOLECULAR	FUNCION
Apo A I	HDL, Qu.	28 000	- Estructural - Activación de la enzima LCAT
Apo A-II	HDL, Qu.	16 000	- Estructural
Apo A-IV	HDL, VLDL, Qu.	46 000	- Desconocida
Apo B-100	LDL, VLDL, IDL.	550 000	- Estructural - Síntesis y secreción de VLDL. - Unión al receptor de LDL
Apo B-48	QUILOMICRONES	250 000	- Estructural - Síntesis y secreción de quilomicrones
Apo C-I	HDL, Qu, VLDL	6 000	- Activador de LCAT.
Apo C-II	HDL, Qu, VLDL	7 000	- Activador de LL
Apo C-III	HDL, Qu, VLDL	7 000	- Estabilizador de superficie, provee carga negativa.
Apo-D	HDL, Qu	21 000	- Interviene en el intercambio de EC
Apo-E	HDL, VLDL, Qu, rem Qu	34 000	- Unión del receptor de macrófago y de hepatocito. estabiliza superficie de HDL.

rem Qu = Remanente de Quilomicron.
 Qu nas = Quilomicrones nacientes.
 EC = Esteras de colesterol.

Con base en su movilidad electroforética se distinguen seis lipoproteínas. De tamaño mayor a menor: Origen, (Quilomicrones), Pre Beta (VLDL), Pre Beta lenta (IDL), Beta (LDL), Alfa 1 (HDL₁) y Alfa 2 (HDL₂).

Durante el metabolismo de las lipoproteínas ocurren cambios en su tamaño y composición. Los cambios afectan a los lípidos transportados en el centro y a los componentes de superficie. Estos componentes pueden pasar de una partícula a otra por varios mecanismos. Estos intercambios ocurren entre la misma clase de lipoproteínas o entre clases diferentes. Por esta razón la diferenciación de las lipoproteínas por los medios usuales es arbitraria o incompleta ya que no se toma en cuenta ni el polimorfismo intrínseco ni la plasticidad de las partículas (6).

I.4. Quilomicrones y remanentes de quilomicrón

Los quilomicrones son las lipoproteínas de mayor tamaño, su diámetro es de más de 100 nm. Están constituidos en un 90 a 95% por triglicéridos y solamente contienen 1% de colesterol (tabla 2). Tienen una densidad de 0.95 g/ml (tabla 3). Su proporción de apolipoproteínas es de 1 - 2%; las más abundantes son la Apo A1 (33%) y Apo C (32%), además de la Apo B-48 (5-8%). Esta última se considera característica de los quilomicrones, ya que hasta donde se conoce, solo se sintetiza en el intestino. En este órgano estas lipoproteínas son ensambladas durante la absorción de la grasa de los alimentos para transportar los triglicéridos procedentes de la dieta a todas las células del cuerpo. El metabolismo de los quilomicrones se inicia en los capilares de los tejidos, donde por acción de la lipasa lipoproteica, el quilomicrón se transforma en una partícula más pequeña llamada remanente de quilomicrón, relativamente enriquecida en ésteres de colesterol, la cual es capturada en el hígado por receptores de alta afinidad que reconocen a la Apo E que recibió de las HDL₂ durante su metabolismo.

Dentro de las funciones de los quilomicrones se encuentra también el servir como vehículo para el transporte de los fosfolípidos, el colesterol de la dieta (en forma de ésteres principalmente), y de las vitaminas liposolubles al hígado (5).

TABLA 2.- CARACTERISTICAS DE LAS LIPOPROTEINAS HUMANAS

NOMBRE	ORIGEN	DENSIDAD (g/ml)	MAYOR CANT. LIP. TRANS.	MOVILIDAD ELECTROF.	TAMAÑO (nm)
QUILOMICRONES	Intestino delgado	0.95	TG exógenos	Origen	80-100
VLDL	Higado	0.95-1.006	TG endógenos	Preβ	30-80
IDL	Catabolismo VLDL	1.006-1.019	TG y EC	Preβ lenta	25-30
LDL	Catabolismo VLDL y de IDL	1.019-1.063	C y EC	B	19-25
HDL	Higado e Intestino	1.063-1.210	Fosfolípidos EC y C	α	8-9

TG = TRIGLICERIDOS
 EC = ESTERES DE COLESTEROL
 C = COLESTEROL

TABLA 3.- COMPOSICION DE LAS LIPOPROTEINAS PLASMATICAS HUMANAS.

†	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL1	DL-2
TG	90-95	50-65	25-40	6-12	3-8	3-5
EC	2-4	8-14	20-35	35-45	15-20	10-18
C	1	5-8	7-11	6-10	4-6	1-3
POSP.	2-6	12-18	16-24	22-26	30-40	25-35
APOS	1-2	5-10	12-16	22-26	36-40	45-55
A-I	33	-	-	-	65	62
A-II	-	-	-	-	10	23
A-IV	14	-	-	-	TRAZAS	-
B-4B	5-8	-	-	-	-	-
B-100	-	30-40	60-80	>95	-	-
GRUPO C	32	40-50	10-20	TRAZAS	10-15	5
E	10	15	10-15	TRAZAS	3	1

TG = TRIGLICERIDOS
 EC = ESTERES DE COLESTEROL
 C = COLESTEROL
 POSP = FOSFOLIPIDOS
 APOS = APOLIPOPROTEINAS

1.5. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Estas lipoproteínas tienen un diámetro de 30 a 80 nm. Están constituidas por triglicéridos en un 50 - 65% , 5 -8% de colesterol y 2 a 4% de ésteres de colesterol. Tienen un 5-10% de apolipoproteínas, de las cuales 30-40% son Apo B 100, 10-50% del grupo C y 15% de Apo E (tabla 2). Su densidad es de 0.95-1.006 gr/ml (tabla 1).

Las VLDL son ensambladas en los hepatocitos y en ellas se transportan principalmente los triglicéridos sintetizados en el hígado (llamados triglicéridos endógenos). El metabolismo de las VLDL se inicia en la circulación general, en donde son hidrolizados sus triglicéridos por la enzima lipasa lipoproteica (LL), por lo cual la VLDL aumenta relativamente su concentración de ésteres de colesterol. Las partículas resultantes de esta hidrólisis se llaman remanentes de VLDL o IDL.

1.6. Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)

Las lipoproteínas IDL, tienen un diámetro de 25 a 30 nm. Están constituidas por 25 a 40% de triglicéridos, 20 a 35% de ésteres de colesterol, 7 a 11% de colesterol libre y tienen un 12 a 26% de apolipoproteínas (tabla 2), de las cuales el 60 al 80% lo constituye la Apo B100, 10 a 20% las del grupo C y 10 a 15% la Apo E. Su densidad es de 1.006 a 1.019 gr/ml (tabla 3).

Estas lipoproteínas se forman al ser degradados los triglicéridos de las VLDL. El metabolismo de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) normalmente es rápido y por ello su concentración en el plasma es baja. Estas lipoproteínas son tomadas por el hígado por medio de los receptores Apo E o Apo B100. Del catabolismo de estas lipoproteínas se originan las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

1.7. Lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Las lipoproteínas de baja densidad tienen un diámetro de 19-25 nm. Están constituidas principalmente por ésteres de colesterol (35-45%), contienen un 22-26% de apolipoproteínas de las cuales más del 95% es Apo B 100. También contienen Apo C y Apo E en pequeñas

cantidades (tabla 2). Su densidad está entre 1.019-1.067 g/ml (tabla 3).

La LDL representa el producto final del catabolismo de las VLDL endógenas. Son las lipoproteínas que más colesterol transportan en el plasma humano y constituyen la principal fuente de colesterol para las células, el cual puede ser utilizado para la biosíntesis de membranas celulares, como precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas entre otros procesos biosintéticos.

La vía principal por la que el hígado y los tejidos periféricos depuran a las LDL del plasma, es a través de receptores específicos, los cuales reconocen y unen a la molécula de Apo B 100 presente en la superficie de las LDL.

1.8. Lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas en tamaño, tienen un diámetro de 8-12nm. Están constituidas por 3-8% de triglicéridos, 15-20% de ésteres de colesterol, 4-6% de colesterol libre y 30-40% de fosfolípidos. Tienen de un 36 a un 55% de apolipoproteínas y dentro de las más abundantes están la Apo AI que constituye el 62-65% y la Apo A II en un 10-23%. También tienen un 10-15% de Apo C y 1-3 % de Apo E (tabla 2). La densidad de estas lipoproteínas es de 1.063-1.210 g/ml (tabla 3) (6,20,21).

Las HDL son partículas heterogéneas. Por su densidad se han separado en HDL₂ (densidad= 1.063-1.125 g/ml) y HDL₃ (densidad=1.125-1.210 g/ml) (tabla 2). La formación de HDL₂ en HDL₃, es posterior a la adquisición de colesterol libre, triglicéridos, Apo C, y fosfolípidos que se derivan de la hidrólisis de los quilomicrones y VLDL (18).

El colesterol esterificado contenido en el interior de las HDL es transportado al hígado ya que es el principal órgano responsable de excretar colesterol y utilizarlo en la formación de sales biliares, etc. Aunque la HDL misma puede transportar el colesterol al hígado directamente, puede hacerlo de manera indirecta al actuar como una fuente de colesterol para quilomicrones, VLDL y LDL (6).

Al movimiento del colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado se llama transporte inverso del colesterol para

distinguirlo del transporte de colesterol del hígado a los tejidos periféricos por LDL. Este movimiento inverso está a cargo de las HDL, principalmente (21).

I.9. Obtención de los lípidos por el organismo.

El colesterol, al igual que los triglicéridos y fosfolípidos, se puede obtener por dos vías, una de ellas es la vía exógena, que son todos aquellos procesos a través de los cuales el organismo digiere, absorbe y transporta los lípidos contenidos en la dieta y la vía endógena, que se refiere a la síntesis, transporte y almacenamiento de los lípidos sintetizados por el organismo (6) (figura 3).

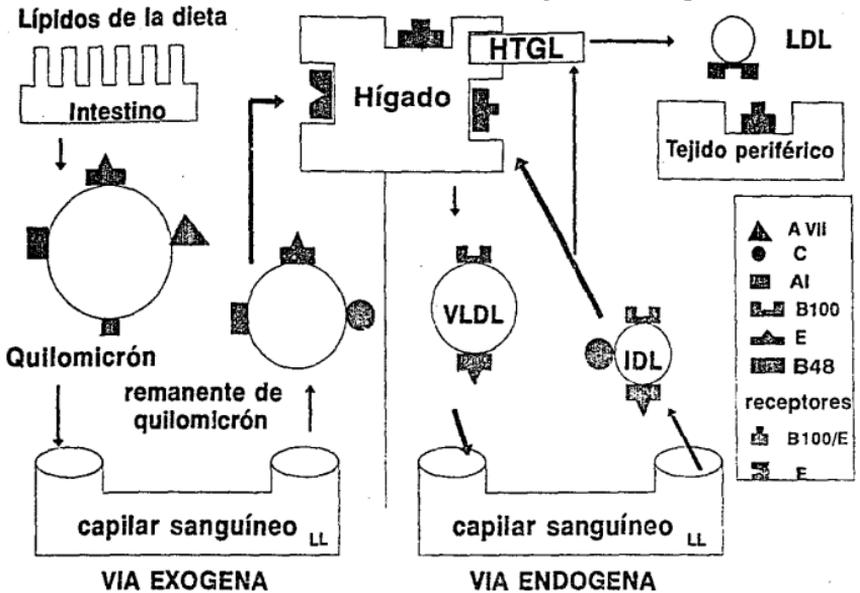
I.9.1. Vía exógena.

I.9.1.1. Digestión.

La degradación de las grasas en el estómago es mínima, por ello la mayor parte de la grasa es transportada hacia el duodeno en cuanto se ingiere. El primer paso para la digestión de la grasa es su emulsificación por medio de los ácidos y sales biliares que se encuentran mezclados con ácidos grasos, monoglicéridos, colesterol, lecitina e isolecitina. La acción detergente de estos compuestos permite la dispersión de la grasa en gotas diminutas de aproximadamente 0.5-1.0 micras de diámetro que son estables a pH intestinal (6-8,5), de esta manera se aumenta la eficiencia de la degradación enzimática. La enzima que está a cargo de este proceso es la lipasa pancreática, la cual es hidrosoluble por lo que actúa sólo en la superficie de las gotas de grasa, de ahí la importancia de la emulsificación previa hasta llegar a triglicéridos a los cuales degrada en ácidos grasos libres y 2-monoglicéridos.

Junto con la grasa se digiere y absorbe el colesterol de la dieta, el cual se mezcla libremente con grasa, sales biliares y con una esterasa de colesterol presente en el jugo pancreático. Como resultado de la acción de esta enzima prácticamente todos los ésteres de colesterol presentes en el intestino son hidrolizados y de esta manera se incorpora el colesterol libre a las micelas formadas para ser absorbido junto con las grasas.

FIG.3.- Esquema de las vías endógena y exógena.



La vía endógena incluye el metabolismo de los quilomicrones y remanentes de quilomicrón, en tanto que la vía exógena incluye el metabolismo de VLDL, IDL y LDL.

Estas micelas están formadas por ácidos grasos, monoglicéridos y colesterol, son partículas altamente estables combinándose con las sales biliares. Al ser anfipáticas pueden penetrar fácilmente la fase lípida de las membranas celulares (1).

La hidrólisis de los dos monoglicéridos se realiza intracelularmente por medio de la lipasa intestinal o entérica, la que se localiza en los microsomos de las células epiteliales.

1.9.1.2. Absorción.

Conforme avanza el proceso de absorción son resintetizados los triglicéridos en el retículo endoplásmico, después pasan a la región supranuclear donde son cubiertas por una capa de fosfolípidos y apoproteínas entre las que se encuentra la Apo B48, también se une una pequeña cantidad de colesterol obtenido de la dieta. Esta partícula recibe el nombre de quilomicrón.

1.9.1.3. Metabolismo de los quilomicrones.

Una vez sintetizados los quilomicrones son enviados al plasma a través del ducto torácico y su metabolismo se inicia en los capilares de los tejidos extrahepáticos (18). Al ingresar los quilomicrones a la circulación general intercambian algunos de sus componentes de superficie con las HDLs, las Apo CII y Apo E pasan de las HDLs al quilomicrón y la Apo AI pasa del quilomicrón a las HDLs (6).

La lipoproteína Apo C II que adquieren los quilomicrones es un cofactor para la activación de la enzima Lipasa de las Lipoproteínas (LLP), la cual hidroliza los triglicéridos contenidos en ellos (6,20). La LLP es producida por el endotelio vascular, cuando se encuentra inactiva se une con firmeza a la pared endotelial por medio de la unión con el glucocáliz celular, específicamente con los proteoglicanos. En presencia de moléculas como heparina, inulina y lipoproteínas ricas en triglicéridos que contengan Apo CII, esta enzima se activa y dispersa por la luz vascular (6).

Al ser hidrolizados los triglicéridos por acción de esta enzima, los ácidos grasos liberados atraviesan el endotelio vascular e ingresan en las células para ser reesterificados hasta convertirse de nuevo en triglicéridos o son catabolizados para la oxidación de su

cadena hidrocarbonada (6,22). El glicerol viaja al hígado en donde es transformado en glicerofosfato y así puede ser utilizado en la síntesis de VLDL o como precursor de la síntesis de la glucosa (gluconeogénesis) (6).

Después de la acción de la LLP sobre el quilomicrón, la Apo CII y la Apo AI regresan a las HDLs, de esta manera el quilomicrón queda convertido en una partícula más pequeña llamada remanente de quilomicrón, la cual contiene relativamente más ésteres de colesterol (6,18,19). Esta partícula es capturada en el hígado mediante receptores de alta afinidad que reconocen específicamente a las Apo E que obtuvo de las HDLs, y es en este órgano donde son retiradas de la circulación y catabolizadas (6,19).

1.9.2. Vía endógena.

Esta etapa del metabolismo de los lípidos involucra el transporte del colesterol y los triglicéridos sintetizados en el hígado (endógenos), y su distribución a los tejidos periféricos a través de las VLDL y su posterior hidrólisis para la liberación de estos compuestos (figura 3).

1.9.2.1. Metabolismo de las VLDL

En el hepatocito se sintetizan los componentes que al asociarse dan origen a las VLDL. En el sistema del retículo endoplásmico rugoso de estas células se sintetiza la Apo B 100, la cual permite distinguir a las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen endógeno (VLDL) de las de origen exógeno (quilomicrones), ya que como se mencionó anteriormente, éstas contienen Apo B 48, cuyas propiedades estructurales y genéticas son diferentes a las de Apo B 100 (6,18,23).

En el aparato de Golgi la Apo B 100 se une a los triglicéridos y colesterol esterificados sintetizados en el hígado, así como a pequeñas cantidades de fosfolípidos y Apo E (6,23).

En forma análoga a lo que ocurre con el quilomicrón, una vez que las VLDL son secretadas por el hígado, pasan a la circulación sistémica en donde intercambian Apo C II con las HDL. La Apo CII activa a la LLP que hidroliza a los triglicéridos del núcleo de las

VLDL. Algunos de los componentes de superficie de las VLDL son transferidos a las HDL después de que esta enzima actúa sobre ellas (6,18). El resultado es una partícula de menor tamaño con respecto al original que contiene relativamente mayor cantidad de ésteres de colesterol. Esta partícula retiene sus dos apolipoproteínas Apo B 100 y Apo E y recibe el nombre de remanente de VLDL o IDL (18,23).

Las VLDL también pueden ser capturadas por el receptor Apo B100/ Apo E en el hígado para ser metabolizadas.

I.9.2.2. Metabolismo de las IDL

La vida media de la IDL es corta, por lo que su concentración en el plasma es normalmente bajo. Una característica distintiva de la IDL es su contenido de múltiples copias de Apo E (que recibió VLDL de la HDL₂), además de una copia de Apo B100. Las múltiples copias de Apo E permiten que las IDL se unan al receptor Apo B100/ Apo E con alta afinidad (23,24). Las IDL, son capturadas casi en su totalidad por estos receptores en el hígado, en donde son irreversiblemente catabolizadas liberando sus lípidos (6,18).

La fracción de IDL que no es capturada en el hígado se transforma en LDL por un proceso no bien definido. Sin embargo, se sabe que esta transformación se lleva a cabo en el exterior del hepatocito por medio de la lipasa hepática de triglicéridos, la cual hidroliza los triglicéridos de IDL y las convierte de esta manera en LDL, cuya molécula contiene casi exclusivamente ésteres de colesterol y una molécula de Apo B 100 (6).

I.9.2.3. Metabolismo de las LDL.

Las lipoproteínas LDL representan el producto final del catabolismo de las VLDL y son las lipoproteínas que transportan mayor cantidad de colesterol en el plasma (19,23).

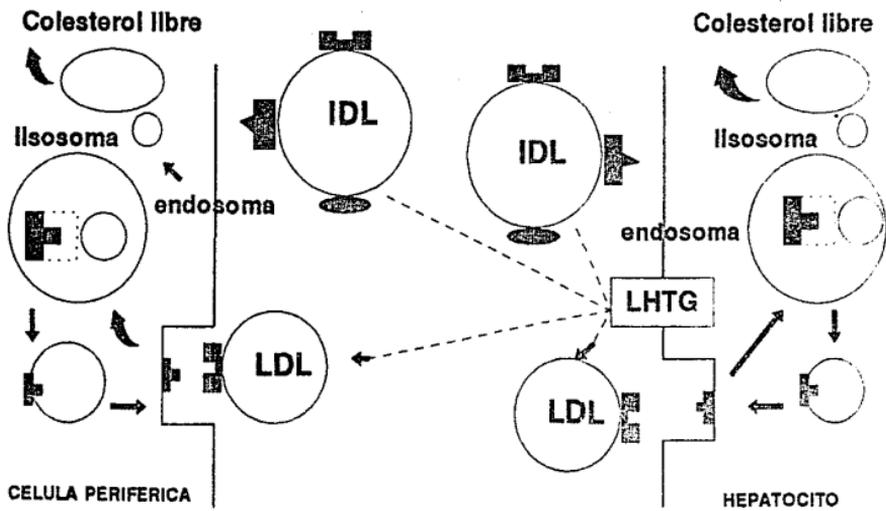
La vía principal por la cual el hígado y los tejidos periféricos capturan a la molécula es por medio de receptores específicos que reconocen y unen a la Apo B100 la que se encuentra localizada en la superficie de las LDL, y también son capaces de reconocer y unir a la Apo E. Por ello se les llama receptores Apo B100/ Apo E (19,20).

Este receptor es una glucoproteína que atraviesa la membrana plasmática de lado a lado, formada por 839 aminoácidos y que consta de cinco dominios, un dominio de 292 aminoácidos cargados negativamente, principalmente cisteínas (que es el sitio de unión para Apo B100 y Apo E); un dominio de 400 aminoácidos, un dominio de 58 aminoácidos glucosilados, un dominio de 22 aminoácidos hidrófobos que atraviesan la membrana plasmática y un dominio de 50 aminoácidos que se encuentra en la parte interna de la membrana, la cual contiene el extremo carboxilo (22,23,24).

Estos receptores se encuentran agrupados en regiones especializadas en donde la membrana forma una cavidad cuya superficie interna está recubierta por una proteína llamada clatrina (6,23,24). Cuando las LDL se unen al receptor, la cavidad que los contiene se invagina para formar vesículas endocíticas y la capa de clatrina rápidamente se disocia de ella. Estas vesículas pueden fusionarse entre sí para formar grandes sacos de contorno irregular llamados endosomas o receptosomas. El pH interno del endosoma es inferior a 6.5 debido a la activación de la bomba de protones manejada por ATP que se encuentra en su membrana. A este pH ácido la LDL se disocia del receptor, el cual regresa de nuevo a la superficie celular (6,23,24). Posteriormente, la membrana del endosoma se une al lisosoma, en el que existen un gran número de enzimas, como las proteasas que degradan a la Apo B 100 en aminoácidos libres, y una esterasa que transforma el colesterol esterificado en colesterol libre, el cual abandona el complejo receptosoma-lisosoma y se traslada al citoplasma (6,24) (figura 4).

La importancia del colesterol derivado de las LDL fue motivo de numerosas investigaciones que demostraron que muchos tipos de células animales sintetizan colesterol y que esta síntesis está regulada por un proceso de retroalimentación negativa. Por medio de observaciones hechas con acetato radiactivo en cultivo de tejidos, se demostró que al añadir suero en el medio de cultivo, las células producían poco colesterol. Cuando las lipoproteínas eran removidas del medio, la síntesis de colesterol aumentaba.

FIG. 4.- Esquema del metabolismo de las LDL .



Los triglicéridos de la IDL son hidrolizados por la lipasa hepática de triglicéridos (LHTG), las apo C () y E () son transferidas a HDL, y solo conservan Apo B-100 (). Las moléculas resultantes son las LDL las cuales son capturadas por el receptor de membrana Apo B100/E ().

Estudios en hígado de rata hechos por Bucher y Lynen (25) y Sperstein (26), demostraron que la actividad de la enzima clave para la síntesis del colesterol, la reductasa 3-hidroxil 3-metil CoA (reductasa HMGCoA), disminuye cuando se aumenta la ingestión de colesterol, y esta reducción limita la síntesis de colesterol. Desde la segunda mitad de la década de los 70s, Goldstein y Brown (27), realizaron experimentos para medir la actividad de la HMGCoA reductasa en extractos de fibroblastos cultivados. Cuando los fibroblastos se desarrollaron en presencia de suero la actividad fue baja. Al removerse las lipoproteínas del medio de cultivo la actividad se elevó hasta 50 veces en 24 horas y rápidamente se redujo al devolver las lipoproteínas al medio. Por medio de experimentos con las dos lipoproteínas que más colesterol acarrean dentro del organismo, LDL y HDL, solo LDL fue efectiva para la reducción de la actividad de la enzima, aún cuando se encontraba en cantidades menores a 5 microgramos.

El colesterol derivado de LDL en el lisosoma, demostró ser el segundo mensajero responsable de la baja actividad de la HMGCoA reductasa. Ahora se sabe que el colesterol derivado de LDL actúa a muchos niveles, incluyendo la inhibición de la transcripción del gen de la HMGCoA, y acelera la degradación de esta enzima. Este proceso permite que la célula dependa del colesterol externo derivado de la captura mediada por receptores de LDL. También regula otros dos procesos que se encargan de coordinar la estabilidad del contenido de colesterol celular: activa a la enzima esterificadora de colesterol, la colesterol acil CoA acil transferasa (ACAT), por medio de ella un exceso de colesterol puede ser almacenado en el citoplasma en gotas de ésteres de colesterol. También suprime la síntesis de receptores de LDL, disminuyendo la concentración de su ARNm. Esto último permite a la célula ajustar el número de receptores para introducir suficiente colesterol de acuerdo a sus requerimientos metabólicos sin causar una sobreacumulación de colesterol. Por medio de este mecanismo regulatorio las células mantienen constantes sus niveles de colesterol no esterificado, a pesar de las grandes variaciones que pudiera haber en el aporte externo (22-24).

A nivel sistémico los receptores de LDL cumplen con una segunda función que es crítica para el desarrollo de la aterosclerosis; remueven a las LDL del torrente sanguíneo (23,24). El número de receptores que la célula expone en su superficie varía con su contenido de colesterol. Cuando el contenido es alto disminuye el número de receptores. Este mecanismo protege a la célula de un exceso de colesterol, pero a un alto precio para el organismo, con la reducción de receptores decrece también el número de LDL removidas de la circulación, por ello las concentraciones de esta lipoproteína en el plasma se van elevando, y esto puede contribuir a la aterogénesis (23).

Sólo 30% de la LDL circulante es capturada a través de los receptores, de la cual el 75% tiene lugar en el hígado, aunque existen otros órganos con grandes requerimientos de colesterol que también tienen un elevado número de receptores, por ejemplo, la glándula adrenal y el ovario (24).

Los otros dos tercios de LDL son tomados por las células periféricas a través de receptores de baja afinidad, por otros sitios de unión a lipoproteínas en la membrana celular, o por vías no específicas. Esta última vía incluye a los receptores llamados receptores "basurero" que se encuentran en los macrófagos, monocitos y otras células del sistema retículo endotelial. La expresión de los receptores basurero, no está regulada por el contenido del colesterol celular, sino que continúa captando lipoproteínas constantemente y esto puede originar una sobreacumulación sustancial del colesterol. Por último, la LDL puede también entrar por pinocitosis.

1.9.2.4. Metabolismo de las HDL.

Las HDL están constituidas principalmente por apolipoproteínas (AI, AII, C y E), fosfolípidos y ésteres de colesterol (6,19-21).

Las principales apolipoproteínas que constituyen las HDL son sintetizadas en el hígado y en el intestino delgado. Estas proteínas pueden ser secretadas con lípidos y se les llama HDL nacientes. La mayor proporción de los fosfolípidos y apolipoproteínas destinados a las HDL son inicialmente secretados en las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Durante la lipólisis de estas partículas, los lípidos

de superficie (fosfolípidos y colesterol libre), y las apoproteínas Apo AI, AII y C, son transferidas a las HDL. El colesterol libre y los fosfolípidos también pueden ser aportados por las membranas celulares. El colesterol libre proveniente de otras lipoproteínas (quilomicrones, VLDL, LDL, IDL), enterocitos y células endoteliales, es cedido a las HDL. La enzima lecitina colesterol acetil transferasa, que se encuentra asociada a las HDL, transforma el colesterol libre y los fosfolípidos en ésteres de colesterol y lisofosfolípidos e interviene en la entrada de más fosfolípidos y colesterol a las HDL (19-21).

Las HDL recién formadas tienen una apariencia esférica y contienen lípidos neutros, o bien pueden tener la forma de un disco constituido por una bicapa de fosfolípidos que contiene apolipoproteínas. Las HDL esféricas pueden ser vistas en organelos secretorios, como en los enterocitos o hepatocitos, lo cual indica que son ensambladas intracelularmente. Por otro lado, las HDL discoides no se han visto dentro de las células y es probable que se formen extracelularmente, por ejemplo, al ser hidrolizadas las HDL recién secretadas ricas en triglicéridos (21).

Las HDL reciben de modo continuo el colesterol libre procedente de todas las células del organismo (6). El primer paso de este proceso es la unión de las HDL con la superficie de las células, lo cual parece estar mediado por receptores para Apo AI. Durante este proceso la HDL no es internalizada, sino que el colesterol libre derivado de las células es esterificado por la LCAT y transferido al centro de las HDL (18).

En los humanos la mayor parte de los ésteres de colesterol formados en las HDL son transferidos a las lipoproteínas ricas en triglicéridos por medio de la proteína acarreadora de ésteres de colesterol (una glucoproteína hidrófoba que facilita el intercambio de lípidos neutros y fosfolípidos entre las lipoproteínas) y esta actividad es aumentada durante la lipólisis. Las HDL enriquecidas de triglicéridos pueden ser hidrolizadas por la lipasa hepática (HL), removiendo los lípidos. Esta enzima también tiene una actividad de fosfolipasa por lo cual los lípidos superficiales de HDL son removidos también (21).

1.10. Importancia clínica de los lípidos y las lipoproteínas

1.10.1. Asociación entre colesterol y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad arterial que se reconoce como la causa principal de muerte en Estados Unidos y Europa (18,19). Esta enfermedad involucra arterias de gran y mediano calibre y se caracteriza por un espesamiento focal de la porción interna de la pared arterial, en asociación con depósitos grasos. La aorta es la más comúnmente afectada pero también las arterias ilíacas, femorales, coronarias y cerebrales (28).

La aterosclerosis puede interferir, progresiva o abruptamente con el flujo sanguíneo del corazón ó cerebro, causando problemas serios, como un infarto cerebral o miocárdico (28)

Varios estudios han mostrado claramente que factores como la concentración alta de lípidos en el plasma, presión sanguínea elevada y el hábito de fumar, influyen notablemente en el desarrollo de las complicaciones clínicas, pero falta aclarar la secuencia de los eventos patológicos a nivel celular (28). Actualmente los investigadores han comenzado a explorar los procesos de esta enfermedad en términos de la biología de la mayor parte de las células involucradas (28). Factores como hiperlipidemia, disfunción hormonal y el incremento de presión arterial pueden lesionar el endotelio y alterar las condiciones de la barrera endotelial al paso de los componentes de la sangre (29).

Se ha inducido aterosclerosis en animales experimentales por medio de una dieta alta en grasas, con la que se elevan los niveles plasmáticos de colesterol hasta 500 ó 1000 mg/dl. Estas dietas altas en grasas y colesterol pueden elevar los niveles de LDL apareciendo poco a poco lesiones ateroscleróticas. Estudios de este tipo demostraron la correlación directa entre el incremento del nivel de colesterol, su duración, los cambios celulares y el desarrollo de lesiones proliferativas (30).

En estudios epidemiológicos se ha observado que los niveles crónicamente elevados de lipoproteínas plasmáticas, particularmente LDL, se asocian con un incremento en la aterogénesis (30). Las pruebas de investigación clínica sugieren que puede ser benéfico bajar los niveles de LDL plasmática, ya que la reducción del

colesterol se relaciona con la menor incidencia de aterosclerosis (30).

Por todo lo anterior, se considera de importancia medir los lípidos y lipoproteínas en plasma de los sujetos adultos e indicar medidas terapéuticas con dieta y/o fármacos en los casos de sujetos con valores altos de colesterol. Más recientemente (31-35) se ha señalado que la cuantificación de la Apo B₁₀₀ puede ser de más utilidad para identificar a los sujetos en riesgo mayor de desarrollar aterosclerosis y sus complicaciones.

1.11. Métodos para la medición de apoproteínas

Existen cinco métodos para cuantificar apolipoproteínas sanguíneas:

1.11.1. Análisis de unión enzimática en inmunoabsorbente (ELISA).

Este método utiliza los mismos elementos del radioinmunoanálisis y presenta una sensibilidad semejante obviando el uso de radioactividad y problemas de estabilidad del ¹²⁵I. Se ha trabajado intensamente en su estandarización para la cuantificación de Apo-B y se ha propuesto como un buen método de referencia (36-37).

1.11.2. Electroinmunoanálisis (EIA).

La presencia de Apo B en muchas lipoproteínas de diferente composición, talla y movilidad puede complicar los inmunoensayos. En el electroinmunoanálisis la migración de la fracción VLDL y LDL en el gel varía con la concentración de agarosa, y la movilidad de las proteínas está en función de la preservación y tratamiento de la muestra de suero (36).

1.11.3. Inmunodifusión radial (IDR).

En este análisis se mide el anillo de precipitación formado alrededor del pozo del antígeno para cuantificar la concentración del antígeno en la muestra. Esta técnica depende del estándar y de que la partícula a medirse sea similar. Este problema no es fácil de resolver por las diferencias de tamaño que existen entre LDL, VLDL y quilomicrones. La difusión del suero en agarosa de 15g/L durante 18 h cuantifica Apo B sólo en la fracción de LDL, la de VLDL no contribuye

al análisis (38,39).

I.11.4. Inmunonefelometría.

En este método se mide la turbidez causada por la formación del complejo antígeno-anticuerpo en solución. La medición se puede hacer después de dos horas de incubación en un nefelómetro de punto final y es proporcional a la concentración del antígeno si el anticuerpo está en exceso. Para cuantificar la Apo B serica total con exactitud, el tamaño del complejo VLDL-Anticuerpo debe ser reducido y aproximado al tamaño del complejo LDL-Anticuerpo añadiendo lipasas o detergentes no iónicos a la muestra del suero. La mayor ventaja de este método es que es sencillo y seguro con tiempos cortos de incubación, así como de fácil automatización y puede trabajarse con un gran número de muestras (34,39).

I.11.5. Radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis se basa en una reacción antígeno anticuerpo en la que dos antígenos, uno radioactivo y el otro no radioactivo, compiten por la unión a un anticuerpo específico (40,41).

Al mezclar soluciones estándar de una proteína en concentraciones conocidas con una cantidad constante y conocida del antígeno marcado y del anticuerpo, los dos antígenos competirán por unirse al anticuerpo (por lo general a la inmunoglobulina G). Si la concentración del anticuerpo es limitada y si reconoce y une a los dos antígenos por igual, se puede concluir que la concentración de proteína no marcada que se encuentra en la muestra a medir, ó en diluciones del estándar, dará lugar a una disminución de la radioactividad del complejo antígeno-anticuerpo. Por lo tanto el cociente proteína radioactiva ligada al anticuerpo (U)/proteína radioactiva libre (L), disminuye conforme aumenta la concentración de la hormona no radioactiva presente. La concentración en una muestra problema se obtiene por comparación de la inhibición observada en esa muestra con aquella producida por una serie de soluciones patrón que contiene cantidades conocidas de la proteína no marcada.

Es posible medir cantidades en el orden de nanogramos ó menores de un antígeno específico aún con la presencia de otras proteínas en concentraciones billones de veces más altas. Esto significa que el método es capaz de detectar cantidades traza de cualquier sustancia que pueda actuar como antígeno ó hapteno. La resolución está limitada principalmente por la especificidad de la preparación de anticuerpo y por la actividad específica del antígeno marcado (42) (figura 5).

En cuanto al radioinmunoanálisis de Apo B100, el desplazamiento de las curvas estándar obtenidas con LDL, VLDL y quilomicrones es paralelo, indicando que el RIA cuantifica Apo B en todas las fracciones de lipoproteínas. Sin embargo, la cantidad de Apo B medida en quilomicrones y VLDL puede ser sensible a la estructura propia de estas partículas debido a que se ha visto que se incrementa con la lipólisis (36).

I.12. Anticuerpos

Uno de los aspectos importantes del sistema de control homeostático en los animales, es el mecanismo de protección e inmunidad contra sustancias extrañas e infecciones. Los procesos de inmunidad dependen fundamentalmente de la capacidad para reconocer células y sustancias que sean ajenas al organismo. Cuando el material extraño, que puede ser incluso una proteína como las que contiene el polen, sangre, o una partícula de naturaleza extraña no biológica, al que se le denomina antígeno ha entrado, entonces se inicia una serie de reacciones de defensa (17).

El sistema de inmunidad presente en el organismo utiliza dos mecanismos de respuesta: uno mediado por células (linfocitos) que reacciona produciendo y liberando células sensibilizadas al antígeno (1,7,8,16,17) que puede combatir infecciones ocasionadas por hongos y virus o iniciar el rechazo de tumores, tejidos extraños y órganos transplantados, y otro de tipo humoral, que reacciona sintetizando y secretando anticuerpos dirigidos específicamente contra el antígeno, funciona contra infecciones bacterianas y reinfecciones ocasionadas por virus (8,17,43).

Los antígenos y los anticuerpos tienen sitios de reconocimiento químico que permiten la unión estrecha de unos con otros. El sitio de

combinación del anticuerpo con el antígeno se llama sitio antigénico. Existen moléculas que se unen a este sitio antigénico pero no pueden inducir una respuesta inmune llamados haptenos, y para lograrlo se unen a macromoléculas llamadas acarreadores. La parte del antígeno que puede combinarse con el sitio antigénico de un anticuerpo se llama determinante antigénico (1,17,43,44).

Cada antígeno provoca la formación de un anticuerpo específico, el cual a su vez neutraliza al antígeno. Esto puede suceder de diferentes maneras: cubriendo los sitios activos del antígeno, agregándolo, precipitándolo o rompiendo a las células que lo contienen, ayudando a la fagocitosis de las bacterias entre otras. Por cualquiera de estas formas los anticuerpos inactivan a los gérmenes invasores o a las moléculas extrañas (17).

Tanto las células como los anticuerpos se distribuyen a los tejidos del organismo utilizando el torrente sanguíneo, y penetran a éstos a través de las paredes de los capilares. Los linfocitos se hallan en gran concentración en los nódulos linfáticos y en los sitios en donde se producen como la médula ósea, el timo y el bazo (17).

Los anticuerpos son proteínas producidas por las células plasmáticas en respuesta a un estímulo antigénico (45). Son proteínas globulares del tipo de las gamaglobulinas y se encuentran circulando en el plasma (45).

I.12.1. Estructura

Los anticuerpos ó inmunoglobulinas (Ig) están constituidos en forma general por dos cadenas pesadas unidas a dos cadenas ligeras mediante puentes disulfuro. Por ejemplo las IgG tienen un peso molecular aproximado de 160,000 y están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas. Dos son cadenas pesadas (cadenas H) de un peso molecular de 60,000 y dos cadenas ligeras (cadenas L) con un peso molecular de 20,000, cada una de ellas unidas por puentes disulfuro, cada cadena polipeptídica a su vez consta de tres regiones diferentes: constante (C), de unión (U) y variable (V). Las tres regiones de las cadenas H son diferentes a las de las cadenas L por lo tanto las IgG constan de seis regiones: C_H, J_H, V_H, C_L, J_L y V_L.

cada una de estas seis regiones está determinada por un conjunto separado de genes (9,17,45-47).

I.12.2. Clasificación.

Las inmunoglobulinas se han dividido en diferentes clases de acuerdo a sus características fisicoquímicas y biológicas. Existen cinco grandes clases de inmunoglobulinas en el plasma humano y se les llaman IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (8,43,45).

Las inmunoglobulinas G constituyen la principal clase de anticuerpos de la sangre. Se producen abundantemente durante la respuesta inmunitaria secundaria. La región Fc de las moléculas de IgG se une a receptores específicos de las células fagocíticas tales como los macrófagos y los leucocitos polimorfonucleares, aumentando así la eficiencia con la que las células fagocíticas pueden ingerir y destruir al antígeno (8,45,47).

La IgM es la principal clase de anticuerpo segregada a la sangre en las primeras fases de una respuesta primaria con anticuerpos. En su forma segregada la IgM es un compuesto de cinco unidades de cuatro cadenas y por ello tiene en total 10 centros de unión al antígeno, estos pentámeros son todavía más eficaces que las moléculas de IgG en cuanto a la activación del sistema del complemento. La IgM también es la primera clase de anticuerpos producidas por las células B diferenciadas (43,45).

Aunque todas las clases de anticuerpos pueden existir en forma ligada a la membrana (como receptores de superficie celular, específicos del antígeno) o en forma segregada hidrosoluble, la IgM y la IgD son las clases que se encuentran predominantemente en las células B en reposo, sorprendentemente muy pocas células B se activan alguna vez para segregar anticuerpos IgD, se desconoce la función de esta clase de anticuerpos aparte de su función como receptores del antígeno (43,45).

La IgA es la principal clase de anticuerpos en las secreciones externas por lo cual protege estructuras como la glándula mamaria, el intestino, la conjuntiva, el aparato respiratorio y urogenital contra la acción nociva de diversos microorganismos. Las moléculas de IgA son dímeros unidos por una cadena J y en las mucosas contienen

también una proteína producida por las células epiteliales conocida como componente secretor que puede proteger a las moléculas de IgA de ser digeridas por las enzimas proteolíticas de las secreciones (43,45).

Los anticuerpos E se unen con una elevada afinidad a unas proteínas receptoras específicas de las superficies de las células cebadas de los tejidos y a la de los leucocitos basófilos de la sangre, con lo cual al entrar de nuevo el antígeno que indujo su formación, reaccionan promoviendo la liberación de mediadores químicos por parte de las células cebadas y de los basófilos (43,45).

I.12.3. Respuesta primaria y respuesta secundaria en la producción de anticuerpos.

El sistema inmune tiene memoria. Esto es porque los animales desarrollan una inmunidad a largo plazo contra muchas enfermedades virales comunes después de la exposición inicial al virus. Este fenómeno puede ser demostrado en animales experimentales. Si un animal es inyectado una vez con un antígeno A su respuesta inmune tanto celular como humoral aparece, y después de un periodo de tiempo de algunos días se eleva rápida y exponencialmente hasta un límite, después del cual gradualmente va decayendo. Este es el curso de una respuesta inmune primaria, que ocurre en un animal ante la primera exposición al antígeno (43). Si después de algunas semanas, meses o aún años el mismo animal es reinyectado con el mismo tipo de antígeno A, éste puede producir una respuesta inmune secundaria que es muy diferente a la primaria. El periodo de tiempo de inicio se acorta, la respuesta se magnifica y su duración se prolonga. Esta respuesta secundaria refleja la memoria inmunológica específica para el antígeno A. Si al animal en cambio se le da un antígeno diferente en vez de la segunda inyección del antígeno A, la respuesta es típicamente primaria y no secundaria.

La teoría de selección clonal provee un útil concepto para entender la base celular de la memoria inmunológica. En un animal maduro las células T y B se encuentran en los órganos linfoides secundarios en una mezcla de al menos tres estados de diferenciación que pueden ser designados como células vírgenes, células de memoria y

células activadas (43,48).

Después de que los linfocitos B han madurado a células B vírgenes y se han desplazado de la médula ósea hacia la periferia, pueden vivir solo algunos días como células circulantes sin que ningún antígeno interactúe con los anticuerpos de su superficie y se desencadene su desarrollo y maduración (44).

Cuando las células vírgenes se encuentran a un antígeno por primera vez algunas de ellas son estimuladas para multiplicarse y se transforman en células activas, las cuales se definen como células que están comprometidas en montar una respuesta (células T activas que median la respuesta celular, y células B activas las que secretan anticuerpos). Algunas células vírgenes son estimuladas para multiplicarse y madurar hacia células de memoria que no montan una respuesta inmune, pero que han sido inducidas a llegar a ser células activas en un futuro encuentro con el mismo antígeno (43).

Los linfocitos vírgenes se encuentran en los tejidos linfoides secundarios por un corto tiempo ya que lo más probable es que en un período breve se encuentren con el antígeno (43).

La células de memoria, por otro lado, viven por muchos meses o aún años sin dividirse, recirculando continuamente en la sangre y en los tejidos linfoides secundarios. Las células de memoria responden más rápidamente a los antígenos que las células vírgenes (43,44,46).

De acuerdo a este esquema, la memoria inmunológica es generada durante la respuesta primaria debido 1) a la proliferación de células activadas por el antígeno, creando de esta manera muchas células de memoria mediante un proceso conocido como expansión clonal, 2) a que las células de memoria tienen una vida mucho más larga que las células vírgenes y pueden recircular por la sangre y órganos linfoides secundarios y 3) debido a que cada célula de memoria es capaz de responder más rápidamente a un antígeno que una célula vírgen (43,44,46).

Muchos eventos celulares ocurren en el encuentro de un anticuerpo con un antígeno, dentro de los cuales se incluyen la activación de la proliferación, la secreción de anticuerpos, la producción de IgG y de otras clases de anticuerpos secundarios y la producción de células de memoria (44). La activación permite la

síntesis de clases secundarias de anticuerpos.

Las clases de anticuerpo IgD, IgE e IgA, no juegan un papel en los estados tempranos de una respuesta inmune debido a que ellos no se encuentran en las superficies de las células vírgenes B. Por esta razón ellos se refieren como clases secundarias de anticuerpo. Las células activadas inician la síntesis de IgM e IgD (44).

La progenie de una sola célula activada puede ser variable en las clases de anticuerpos que produce. Cuando una célula B se encuentra a un antígeno inicialmente produce IgM pero, la clase secundaria de anticuerpo como IgG llega a ser predominante.

La última progenie de linfocitos B activados son las células plasmáticas y las células de memoria. En el proceso de activación se incrementa el número de tipos de progenie. Las células plasmáticas pueden secretar cualquiera de las siete clases de inmunoglobulinas pero debido a que sufrieron una recombinación durante su maduración cada célula produce solo una clase de anticuerpo. Las células de memoria son además capaces de sintetizar múltiples clases de anticuerpos. Cuando las células de memoria responden al antígeno producen anticuerpos principalmente de clase secundaria. Durante el segundo encuentro con el antígeno hay una respuesta inmediata de IgG de una magnitud mucho más grande que la respuesta inicial. Si durante la segunda inmunización de un antígeno se inocula otro la IgM responde predominantemente al nuevo antígeno (44).

La mayoría de los antígenos tienen varios determinantes antigénicos diferentes en sus superficies que estimulan la producción de anticuerpos o la respuesta de células. Algunos determinantes son más inmunogénicos (inductores de inmunidad) que otros, de modo que la reacción entre ellos puede dominar la respuesta general, se dice que tales determinantes son inmunodominantes. Como cabría esperar en un sistema que actúa por selección clonal por lo general, incluso un único determinante antigénico activa muchas clonas diferentes, cada uno de las cuales produce un centro de unión al antígeno con una afinidad diferente para el determinante. Por ejemplo, la estructura de un antígeno X puede interpretarse de muchas maneras distintas y por ello puede estimular la producción de cientos de especies diferentes de anticuerpos anti-X cada uno producido por una clona de

células B diferente. Tales respuestas se denominan policlonales. Cuando solo responden unas cuantas clonas, se dice que la respuesta es oligoclonal, y cuando la respuesta total es producida por una sola clona de células B o T se habla de una respuesta monoclonal. La respuesta a la mayoría de los antígenos son policlonales. Los anticuerpos en este sentido reciben el nombre de la respuesta policlonales, oligoclonales o monoclonales (10). Estas características del sistema inmune se utilizan ampliamente con fines de experimentación. En nuestro caso los hemos aplicado al inocular LDL aislada de plasma humano en conejos de la raza Nueva Zelanda para inducir la formación de anticuerpos policlonales.

Por la gran importancia que tiene el medir Apo B-100 en plasma humano se diseñó un proyecto cuya hipótesis fue la siguiente:

II. HIPOTESIS.

Si el método que presenta la mayor sensibilidad para medir Apo B-100 es el radioinmunoanálisis y para realizarlo es necesario contar con un estándar y anticuerpos específicos, entonces podemos aislar LDL de sangre periférica humana como fuente de Apo B-100 por medio de su densidad de hidratación, utilizando diferentes cortes de densidad dentro del rango de densidades de las LDL e inocularla en conejos de la raza Nueva Zelanda para inducir la síntesis de anticuerpos policlonales y usar estos dos elementos para medir la concentración de Apo B-100 en circulación por esta técnica.

Para demostrar la hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

III. OBJETIVOS.

- 1.- Obtención de la LDL pura a partir de suero humano como fuente de Apo B-100 para utilizarla como estándar y antígeno.
- 2.- Inducir la formación de anticuerpos en conejo para LDL y Apo B-100.
- 3.- Probar que los anticuerpos son útiles para cuantificar Apo B-100 en plasma humano por la técnica de radioinmunoanálisis.

IV. METODOLOGIA.

IV.1 Obtención del estándar de LDL

IV.1.1 Colección de la muestra de sangre.

Con la finalidad de obtener una poza heterogénea de plasma, en cada preparación del estándar de LDL se utilizó sangre de al menos tres sujetos.

Para estandarizar la toma de muestra se instruyó a los voluntarios para presentarse por la mañana en ayuno de un mínimo de 12 hrs. Al llegar cada persona guardó reposo en posición sedente durante 15 o 20 minutos (49). Posteriormente se les colocó un torniquete para facilitar la localización de la vena antecubital, y se retiró al introducir la aguja en la vena para evitar una posible hemoconcentración.

Se obtuvieron 40 ml de sangre por persona, mismos que se repartieron en tubos de vidrio limpios que contenían EDTA como anticoagulante a una concentración final de 1 mg/ml de sangre. Se invirtió varias veces cada tubo para homogenizar el EDTA con la sangre y se mantuvieron en hielo hasta terminar con la colección de muestras de todos los voluntarios. Para separar el plasma del paquete celular los tubos se centrifugaron a 314.9g (1800 rpm), a 4°C, durante 20 minutos.

IV.1.2. Separación de la LDL de plasma humano.

El procedimiento utilizado para aislar a la LDL del plasma humano fue por el método de ultracentrifugación secuencial preparativa. Este procedimiento está basado en la separación de las lipoproteínas del plasma según su densidad de hidratación.

Para la obtención del estándar de LDL se utilizaron tres cortes dentro de los límites de densidad de las LDL y fueron: 1.03 g/ml, 1.065 g/ml y 1.05 g/ml con el objeto de recuperar la fracción de LDL con densidad 1.03 g/ml - 1.05g/ml, ya que estos límites son los más utilizados para lograr un estándar puro (31,36,37,50,51).

IV.1.2.1 Ultracentrifugación 1 ($d = 1.03 \text{ gr/ml}$).

Esta ultracentrifugación tuvo por objeto separar todas las partículas plasmáticas con densidad menor o igual a 1.03 gr/ml,

dentro de las cuales se encuentran las siguientes lipoproteínas: quilomicrones que pudieran aún circular en el plasma, VLDL, IDL y parte de las LDL con densidad de 1.019 a 1.03 gr/ml.

El plasma recién obtenido tuvo una densidad aproximada a 1.03 gr/ml, por lo que el plasma sin ajuste previo de densidad se distribuyó en tubos de polialdmero con capacidad de 38.5 ml y se centrifugaron a 143,406 g (45,000 rpm) durante 18-20 hr a 10°C.

Para sellar la parte superior del tubo se utilizaron tapones de aluminio especiales para este tipo de tubo en cada una de las centrifugaciones. Todas las ultracentrifugaciones se llevaron a cabo en una ultracentrifuga Beckman mod. LB - 80 M utilizando el rotor 60 Ti.

Concluido el tiempo de ultracentrifugación se retiraron con cuidado los tapones y los tubos se introdujeron en hielo. En la parte superior del tubo se encontró la zona de flotación de las lipoproteínas con densidad menor a 1.03 g/ml (figura 5-A). Esta zona se recolectó por aspiración utilizando una trampa de vacío, manteniendo el tubo en posición vertical (figura 6), y se guardó una alícuota.

El resto del plasma, ya sin lipoproteínas ricas en triglicéridos, (sin Qu, VLDL, IDL, y LDL con densidad menor de 1.03 gr/ml), se homogenizó agitándolo suavemente para continuar con la siguiente centrifugación, y se guardó una alícuota de éste.

IV.1.2.2. Ultracentrifugación 2 ($d = 1.063$ g / ml).

Del plasma obtenido en la ultracentrifugación 1 se separaron por flotación las partículas con densidades iguales o menores a 1.063 gr/ml, dentro de la que se encuentran, principalmente, las LDL con densidad de 1.03 a 1.063 gr/ml y algunas HDL con densidad igual o menor a 1.063 gr/ml.

Se llevó al plasma sin lipoproteínas ricas en triglicéridos a una densidad de 1.063 g/ml y se centrifugó a 143,406 Xg (45,000 rpm), durante 26 a 28 hrs a 10°C. Al terminar la ultracentrifugación 2 se observó en la parte superior del tubo a las lipoproteínas con densidades menores a 1.063 gr/ml separadas por una zona clara y transparente del resto del plasma (figura 5-B).

FIG. 5.- Esquemas de la distribución de las lipoproteínas en el tubo



Lipoproteínas con densidades menores a 1.03 g/ml. (VLDL, IDL y LDL ligeras).

Lipoproteínas con densidades menores a 1.03g/ml (LDL, HDL)

$d = 1.03 \text{ g/ml}$

A

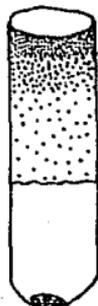


Lipoproteínas con densidades menores a 1.063 g/ml. (LDL y HDL ligeras)

Lipoproteínas y resto de proteínas plasmáticas con densidades mayores de 1.063 g/ml.

$d = 1.063 \text{ g/ml}$

B



Lipoproteínas con densidades menores o iguales a 1.05 g/ml (LDL 1.03-1.05 g/ml)

Lipoproteínas con densidades mayores a 1.05 g/ml (LDL 1.05-1.063 g/ml y HDL 1.063 g/m)

$d = 1.05 \text{ g/ml}$

C

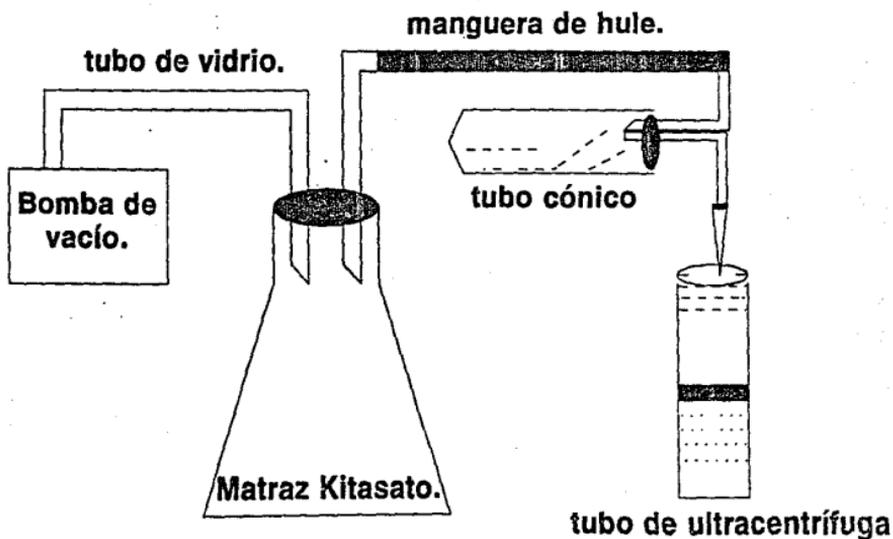


Estándar de LDL concentrado. (LDL 1.03-1.05 g/ml).

$d = 1.019 \text{ g/ml}$

D

FIG. 6.- Esquema del procedimiento empleado para aspirar a las lipoproteínas del tubo de ultracentrífuga.



Por medio del vacío las lipoproteínas se recolectaron dentro del tubo de ensaye.

Las lipoproteínas se recolectaron por aspiración, se guardó una alícuota y el resto se descartó.

Para conocer la densidad del plasma en todos los casos se utilizó un picnómetro de la siguiente manera:

a) Se pesó en la balanza analítica:

- el picnómetro seco,
- el picnómetro con agua destilada y desionizada,
- y el picnómetro con el plasma.

b) Para conocer la densidad del agua se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso del picnómetro con agua.}}{\text{peso del picnómetro seco.}} - \frac{\text{peso del picnómetro seco.}}{\text{peso del agua.}} = \text{densidad del agua.}$$

$$\text{peso del agua.} / \text{volumen del picnómetro.} = \text{densidad del agua.}$$

Fue necesario obtener la densidad del agua para conocer la densidad específica de la muestra, que se obtiene dividiendo la densidad de la muestra entre la densidad del agua.

c) Densidad de la muestra:

$$\frac{\text{peso del picnómetro con la muestra.}}{\text{peso del picnómetro seco.}} - \frac{\text{peso del picnómetro seco.}}{\text{peso de la muestra.}} = \text{densidad de la muestra.}$$

$$\text{peso de la muestra.} / \text{volumen del picnómetro.} = \text{densidad de la muestra.}$$

Conociendo la densidad de la muestra se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de bromuro de potasio (KBr), que se necesita para llevar al plasma a la densidad requerida:

$$\frac{\text{densidad del KBr.}}{\text{densidad deseada.}} - \frac{\text{densidad deseada.}}{\text{densidad de la muestra.}} = N$$

$$\text{densidad del KBr.} - N \cdot X = \text{volumen de la muestra.}$$

X = Cantidad de KBr que se le agregó al plasma para llevarlo a la densidad deseada.

IV.1.2.3. Ultracentrifugación 3 (Densidad 1.05 gr/ml).

Durante esta ultracentrifugación las LDL con densidades menores a 1.05 gr/ml se separaron por flotación de las LDL y HDL con densidades mayores a 1.05 gr/ml (figura 5-C).

La fracción de plasma obtenida en la ultracentrifugación 2 (con lipoproteínas con densidad menor a 1.063 se ajustó a 1.05 gr/ml por medio de la fórmula ya descrita. Se ultracentrifugó a 140,400 X g (45,000 rpm) durante 24-26 hrs. Al terminar la ultracentrifugación se recolectaron las lipoproteínas que flotaron y se preparó para concentrarla por medio de la ultracentrifugación 4.

IV.1.2.4. Ultracentrifugación 4 (Densidad 1.019 gr/ml).

Para concentrar la fracción de plasma obtenida en la ultracentrifugación 3 que contiene a las LDL con densidades entre 1.3 - 1.05 g/ml se ajustó la densidad a 1.019 gr/ml, diluyéndola con una solución de NaCl 0.9% + EDTA 1mM (densidad de 1.006 gr/ml) por medio de la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{densidad de la muestra.} - \text{densidad deseada.}}{\text{densidad deseada.} - \text{densidad de la solución diluyente.}} \times \text{Volumen de la muestra.} = X$$

X = volumen de la solución diluyente que se agregó a la muestra para llevarla a la densidad deseada.

Se ultracentrifugó a 146,406g (45,000 rpm) durante 20 hrs a 10°C. Esta ultracentrifugación se llevó a cabo para concentrar las LDL, (figura 5-D) y para diluir el Bromuro de potasio en la muestra. Al terminar la ultracentrifugación se aspiró cuidadosamente todo el sobrenadante, dejando aproximadamente 1ml para resuspender la proteína, después en un ambiente estéril se pasó por un filtro Millipore de 0.22 um de poro y se colocaron alícuotas de 100ul en tubos con tapón de rosca que se almacenaron a 4°C.

IV.2 Cuantificación de la proteína.

Para la determinación del constituyente proteico de la LDL obtenida se siguió el procedimiento descrito por Lowry *et al.* (52), usando como estándar albúmina sérica bovina (1mg/ml).

IV.2.1. Curva estándar.

Tanto la curva estándar como las muestras problema se analizaron por duplicado. Se siguió el esquema que se muestra a continuación.

Esquema de la curva patrón

No.tubo	ASB (ug)	agua (ul)	estándar (ul)	Sol. C (ml)	Folin (ul)
1	0	400	-	"	100
2-3	5	395	5	"	"
4-5	10	390	10	"	"
6-7	20	380	20	"	"
8-9	40	360	40	"	"
10-11	60	340	60	"	"
12-13	80	320	80	"	"
14-15	100	300	100	"	"

Se pipeteó el agua, luego el estándar o la muestra diluida y después la solución C (Apéndice A1), los tubos se agitaron y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 100 ul de reactivo de Folin-Ciocalteu phenol (Sigma Chemical Co. St. Louis, M.O.) agitando inmediatamente.

IV.3. Caracterización de la LDL obtenida.

Para la caracterización de la LDL se emplearon las técnicas de electroforesis (37,38,61,53,54) en gel de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE) descrito por Laemmli *et al.* (55) (Apéndice A2) e inmunodifusión radial (54,56). Con la electroforesis se comprobó el peso molecular de la proteína al compararla con estándares de peso molecular, así como la pureza de la preparación al teñir el gel y analizarlo por densitometría, con la inmunodifusión radial se demostró que el estándar obtenido era inmunológicamente reconocido por anticuerpos específicos contra LPL (Behring).

IV.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS).

VI.3.1.1. Preparación de los geles.

Se preparó una placa de gel de poliacrilamida al 7%, utilizando un gel de 3.5% en la parte superior como concentrador (apéndice A2a).

IV.3.1.2. Preparación de las muestras.

Se calculó la cantidad de proteína que debía someterse a electroforesis, de acuerdo a la sensibilidad de la técnica de tinción utilizada, 10 ug de proteína de la preparación de LDL, y 40 ug de proteína total de las diferentes alícuotas guardadas durante la separación de la LDL.

Para comparar los pesos moleculares de las proteínas de las muestras se utilizaron estándares de peso molecular alto, obtenidos de BIO-RAD. De acuerdo a la concentración de cada alícuota, el volumen requerido para la electroforesis varió, cuando fue necesario se agregó agua hasta completar 30 ul a este volumen se le añadió otro volumen igual de amortiguador de muestra (apéndice A2b)

Se colocaron los 60 ul de muestra preparada en tubos cónicos con tapa hermética y se agitaron vigorosamente, se sumergieron en agua hirviendo durante 5 minutos para completar la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para concentrar el vapor desprendido dentro del tubo durante la ebullición. El blanco se hizo con agua y amortiguador de muestra en proporción 1:2. El esquema fue el siguiente:

Esquema para la electroforesis

Muestra	concentración mg/ml	volumen para 40ug (ul)	dilución	volumen de análisis (ul)	H ₂ O (ul)	amortiguador de muestra (ul)
Plasma	92.2	0.43	1:100	30	-	30
VLDL	14.7	2.7	1:10	"	-	"
HDL-LDL	562.4	0.072	1:400	"	-	"
LDLS	1285.8	31.0	-	"	-	"
HDL	256.3	0.16	1:100	16	14	"
		Volumen para 10				
LDL	3.3	3	1:10	30	-	"
Estándares				2	28	"

IV.3.1.3. Procedimiento.

La electroforesis se corrió en un gel de 8.5 x 3.7 cm aplicando una corriente eléctrica constante de 120 volts hasta que la marca de azul de bromofenol llegó al límite inferior del gel (aproximadamente 1hr), utilizando amortiguador de corrida (apéndice A2c).

Las proteínas se fijaron al gel sumergiéndolo en una solución de metanol-ácido acético-H₂O (45%:10%:45%), durante toda la noche en agitación constante en un recipiente cubierto. Posteriormente se pasó el gel a una solución de metanol-ácido acético-H₂O (25%:10%:65%) por un mínimo de 1hr. Después se procedió a la tinción del gel.

IV.3.2. Tinción del gel con Azul Brillante de Coomasie.

En trabajos similares informados en la literatura (54,57) la pureza de la preparación se analiza tiñendo las proteínas con azul brillante de Coomasie, cuyo límite de sensibilidad es de 100 ng. La tinción se hizo de la siguiente manera:

Después de fijado el gel se sumergió en la solución colorante (apéndice A3) durante 1hr a 40°C y con agitación constante. Se destiñó con la solución metanol-ácido acético-H₂O (45%:10%:45%).

Para conservar los geles, se utilizó un secador de geles Ephortec a una temperatura de 100°C durante 2 hr. Este aparato se conecta al vacío para eliminar el vapor desprendido por el gel al calentarse, el vapor es condensado en una trampa de vacío fría.

IV.3.2.1. Cálculo de los pesos moleculares de las proteínas

Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron de la siguiente manera:

- 1) Se obtuvo el RF de las proteínas de cada carril (apéndice B1).
- 2) Se graficó el logaritmo del peso molecular de los estándares en función de su RF.
- 3) Se linealizó la gráfica por mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta $y=m(x) + b$.
- 4) Sustituyendo en la ecuación de la recta el valor de RF de cada proteína desconocida se obtuvo el logaritmo del peso molecular de dicha proteína.
- 5) Se obtuvo el antilogaritmo del valor anterior y éste fue el valor

del peso molecular.

IV.3.3. Densitometría.

Se hizo un análisis por densitometría para determinar el porcentaje de pureza de la preparación de LDL, a una longitud de onda de 525 nanómetros.

IV.3.4. Inmuno-difusión radial.

Para realizar algunas pruebas control de los procedimientos empleados para la obtención de anticuerpos, se prepararon geles de agarosa al 0.7% en cajas de petri (apéndice A4) a las cuales se les hicieron orificios equidistantes a uno central para los siguientes experimentos:

Con el objeto de verificar que durante el procedimiento de separación de la LDL ésta no perdió sus propiedades inmunogénicas, se colocaron distintas diluciones la lipoproteína recién obtenida en la periferia y al centro un anticuerpo anti apo B100 (Behring).

Pruebas similares a la descrita se realizaron con los anticuerpos y la LDL obtenidos en el laboratorio.

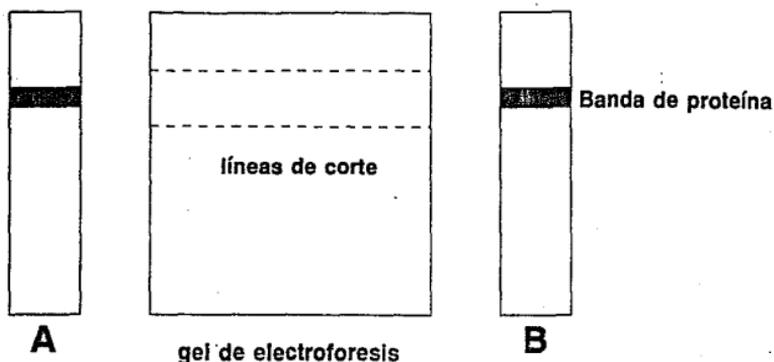
IV.4 Obtención de anticuerpos contra LDL.

IV.4.1. Inmunización.

Toda la información para diseñar el esquema de inmunización se obtuvo de la literatura (58).

Se eligieron dos formas de antígeno. La forma 1 fue la LDL, aislada por medio de ultracentrifugación secuencial preparativa y consistió en agregar a 1mg de LDL el volumen necesario de una solución NaCl 0.9% para completar 1 ml, y a éste se le añadió 1 ml de Adyuvante de Freund completo. Para homogenizar la mezcla se pasó varias veces por una jeringa con aguja del número 21 o se agitó 30 segundos en el vórtex. La forma 2 consistió en obtener a la Apo B100 de 1mg de LDL por medio de electroforesis en gel al 5% de poli-acrilamida con SDS (LDL en PAGE-SDS) (apéndice B2). En este caso se utilizó acrilamida como adyuvante (figura 7).

FIG. 7.- Esquema del procedimiento utilizado para localizar la banda de proteína en el gel de electroforesis para la inmunización de los conejos (antígeno forma 2).



A y B representan las tiras laterales del gel de electroforesis teñidas con azul de Coomassie con las que se ubicó la posición de la migración electroforética de la Apo B-100. Los cortes se realizaron 0.5 cm por arriba y por abajo de la banda teñida de proteína.

IV.4.1.1. Esquema de inmunización.

Se utilizaron 4 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 1.5 Kg. Dos conejos fueron inoculados con antígeno forma 1, los refuerzos se dieron durante 4 periodos de 28 días y los sangrados cada 14 días después de la inoculación, 10 meses después se repitieron los 4 refuerzos antes de hacer el título final del suero. Y dos conejos fueron inoculados con en antígeno forma 2, se aplicó el primer refuerzo a los 28 días después de la inoculación, el segundo en el día 84 y se tituló el suero.

IV.4.1.2. Patrón de inyecciones, dosis del antígeno y vía de inoculación.

Para ambas formas de presentación del antígeno el patrón de inyecciones que se siguió fue de dosis continua, es decir, en la primera inoculación y en todos los refuerzos se aplicó 1 mg de proteína.

La vía de inoculación fue subcutánea. Cada inóculo se hizo con 200 μ l, con una distancia de 1.5 cm aproximadamente uno de otro, en un total de 8-10 sitios por conejo.

IV.4.1.3. Obtención de los sueros.

IV.4.1.3.1. Sangría de prueba:

Con el fin de tener una estimación de la producción de anticuerpos anti LDL, se colectaron 10 ml de sangre de la oreja y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 ó 2 hrs hasta que se formó un coágulo consistente y se dejó en refrigeración durante toda la noche para que se contrajera. Después se removió el coágulo de las paredes y se centrifugó a 1800 rpm durante 20 minutos. Se retiró el suero del coágulo y se guardaron pequeñas alícuotas en tubos con tapa hermética a -70°C .

IV.4.1.3.2. Sangría de cosecha.

Una vez conocido el título del suero y habiendo demostrado su utilidad en el RIA se procedió a obtener toda la sangre posible por medio de punción cardíaca (apéndice B3).

IV.5. Determinación del título de los sueros.

La titulación de los sueros obtenidos se realizó por el método de Radioinmunoanálisis (40,41).

Parte del estándar de LDL preparado en el laboratorio se marcó con ^{125}I por el método de cloramina T. Posteriormente se purificó una alícuota de esta marca en una columna de Sepharosa 6B y se utilizó como trazador.

IV.5.1. Marcación de la LDL con ^{125}I

La técnica de marcación es el procedimiento para lograr que un radioisótopo se incorpore a una molécula. Para marcar la Apo B100 expresada en las LDL con ^{125}I se utilizó el método de Cloramina T (51,59) (apéndice B4).

La Cloramina T es una sal sódica del derivado N-monocloro del p-tolueno sulfonamida. En una solución acuosa produce ácido hipocloroso y por tanto es un agente oxidante.

La química de la yodación es esencialmente una sustitución con yodo dentro de los anillos aromáticos de los grupos tirosina. La reacción se detiene por la adición de un agente reductor como es el metabisulfito de sodio.

El yodo ^{125}I constituye un marcador químico estable y altamente eficiente.

Una vez marcada la proteína se debe separar del yodo no unido a proteína por medio de una columna de Sephadex G-50 cuyos límites de exclusión son 1,500-30,000 daltones, equilibrada con amortiguador de Barbital 0.05M (apéndice A5a).

Se colectaron fracciones de 1 ml y de cada una se estimó la radioactividad en cuentas por minuto (CPM), datos con los que se construyó un cromatograma como el que se muestra en la gráfica 1. En él se observan 2 picos, de acuerdo a la exclusión del gel, la LDL con un peso molecular teórico de 250,000 debía salir al término del volumen vacío, para determinar si esto se cumplía se analizó cada pico por medio de una autorradiografía.

VI.5.1.1. Autorradiografía.

Con las fracciones superiores del primer y segundo pico se obtuvo una poza de proteína marcada. de cada uno y se analizaron por

medio de una autorradiografía (apéndice B5).

Con esta técnica se determinó si la proteína marcada correspondía a la Apo B-100 de la LDL.

Al precipitar una alícuota de la poza de proteína marcada, se obtuvo el porcentaje de proteína que contenía (apéndice B6).

IV.5.1.2. Almacenamiento del antígeno marcado

A la poza de LDL marcada se le agregó albúmina sérica bovina al 10% en una relación 1:1.5. Y se mantuvo a 5°C.

IV.5.2. Purificación de la LDL-¹²⁵I

Una vez marcada la proteína debe pasar por un proceso de purificación o limpieza debido a que durante el procedimiento de marcaje puede ocurrir deterioro de la proteína y una pérdida de su actividad biológica. La purificación se realizó en una columna de cromatografía con un gel de Sepharose 6B cuyos límites de exclusión son 10,000-4,000,000 daltones, empacada y equilibrada con amortiguador de barbital 0.05M + 2% ASB (apéndice B7). Se colectaron fracciones de 900ul y se contaron durante 0.1 minuto en un contador de radiaciones gamma. Con los valores de cada tubo expresados en CPM se construyó el cromatograma como el que se muestra en la gráfica 2. En este cromatograma se identifican 3 picos a los cuales se les analizó por medio de una autorradiografía de la misma manera que se hizo para los picos de la marcación.

VI.5.3. Titulación de los anticuerpos anti Apo B-100.

La titulación de los anticuerpos permite conocer la dilución necesaria del anticuerpo anti Apo B100 con la cual se logra unir del 60 al 80% de la Apo B-100 marcada. Esta concentración de anticuerpos permite una competencia equilibrada entre la apo B100 marcada y no marcada por los sitios antigénicos específicos del anticuerpo. Se utilizaron diluciones progresivamente crecientes de antisuero las cuales fueron incubadas con cantidades constantes de proteína radioactiva.

Las diluciones del anticuerpo fueron de 1:100 hasta 1:500,000 el siguiente esquema:

ESQUEMA PARA LA TITULACION DE ANTICUERPOS

No de tubo	BBA	Ac ApoB	LDL ^{125I}	Proteína A
1-3	-	-	100ul	-
4-6	400ul	-	"	100ul
7-9	300ul	100ul	"	"
10-12	"	1:200	"	"
13-15	"	1:500	"	"
16-18	"	1:1000	"	"
19-21	"	1:2000	"	"
22-24	"	1:5000	"	"
25-27	"	1:10000	"	"
28-30	"	1:20000	"	"
31-33	"	1:50000	"	"
34-36	"	1:100000	"	"
37-39	"	1:200000	"	"
40-42	"	1:500000	"	"

La incubación se llevó a cabo durante 48hr a una temperatura de 4°C, la separación de la fracción de LDL^{125I} unida al anticuerpo y la fracción libre se llevó a cabo con proteína A de Staphylococcus aureus (58), esta proteína se une a la porción IgG del anticuerpo formando un complejo antígeno-anticuerpo-proteína A que es separado fácilmente por medio de centrifugación.

Después de 30 minutos de agregada la proteína A a cada tubo se agregaron 2 ml de amortiguador de barbital, se agitaron y centrifugaron a 15,760g (12500 rpm) durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el complejo antígeno-anticuerpo precipitado en el tubo se contó durante 1 min en el contador de radiaciones gamma.

Los porcentajes de unión de Apo B-100 marcada (ver cálculos más adelante) se graficaron en función de la dilución del antisuero (gráficas 3 y 4).

IV.5.4. Radioinmunoanálisis de Apo B100.

Una vez preparado el estándar de Apo B100 y obtenidos los anticuerpos se realizó el RIA para esta apolipoproteína.

Se agregaron cantidades conocidas de estándar por triplicado de

una solución que contenía 0.5ng/ul, se hizo una dilución 1:3000 de las muestras de plasma a medir y se utilizó el esquema siguiente:

ESQUEMA DE LA CURVA ESTANDAR

no.tubo	cantidad (ng)	BRS (ul)	Estandar (ul)	¹²⁵ I-LDL (ul)	Ac. LDL (ul)	Prot A. (ul)
1-3	CT	-	-	100	-	-
4-6	UI	400	-	"	-	100
7-9	"0 Est"	500	-	"	100	"
10-12	5	290	10	"	"	"
13-15	10	280	20	"	"	"
16-18	15	270	30	"	"	"
19-21	20	260	40	"	"	"
22-24	25	250	50	"	"	"
25-27	30	240	60	"	"	"
28-30	40	220	80	"	"	"
31-33	50	200	100	"	"	"
34-36	75	150	150	"	"	"
37-39	100	100	200	"	"	"
40-42	150	-	300	"	"	"
			muestra 1:3000			
muestra A						
43-45		200	100	100	100	100
muestra B						
46-48		"	"	"	"	"
muestra C						
49-51		"	"	"	"	"

La curva estándar incluyó los siguientes parámetros:

Cuentas totales (CT): las cpm de estos tubos representan la cantidad de radioactividad añadida a todos los tubos. Este valor nos permitió conocer el porcentaje de unión que presentaba el anticuerpo en el tubo 0 estándar para verificar que su dilución fuera la correcta.

Unión inespecífica (UI): representa la radioactividad unida al material de ensayo (tubo de ensayo, amortiguador etc.).

"0 estándar" (0 est): representa el mayor valor de radioactividad que es posible encontrar unida al anticuerpo.

Las diluciones del estándar y anticuerpo así como los tubos de ensayo se trabajaron sobre hielo. Se inició luego la incubación por 48 horas a 4°C y se procedió a la separación de las fracciones unida y libre tanto en los tubos estándar como en los que contenían la muestra a medir de la misma manera que se hizo para la titulación de anticuerpo. Una vez separadas las fracciones unida y libre se contó

la fracción unida por un minuto en un contador automático de radiaciones gamma y se reportó en CPM.

VI.5.4.1. Cálculo de resultados.

Se obtuvo la media (B) de cada triplicado de las cuentas de la curva estándar y de las muestras, se le restó la unión inespecífica (UI) y este valor se expresó como el porcentaje de unión con respecto al 100% de unión (B estándar) (Bo). Con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ radioactividad unida} = B - UI / B_o \times 100$$

Los porcentajes de unión se graficaron en papel milimétrico en función de las concentraciones del estándar no marcado obteniendo una curva de tipo logarítmica la cual se linealizó con el método Logit (60) obteniéndose la ecuación de la recta (apéndice BB).

VI.6. Prueba de especificidad.

Para comprobar que los anticuerpos solo reconocían a la Apo B100 se diseñó un ensayo de reacción cruzada con Apo AI y HDL.

Un experimento preliminar se hizo por medio de inmunodifusión en el que también se colocaron las alícuotas guardadas durante el aislamiento de la LDL (que contienen mezclas de lipoproteínas), de la siguiente manera:

Se colocaron en la periferia cada una de las alícuotas guardadas durante la obtención de la LDL (PT, Ou-VLDL, LDL-HDL, LDL, HDL, además ASB y Apo AI que se aisló en el laboratorio.) y al centro de las placas 1 y 2 los anticuerpos de los conejos inoculados con el antígeno forma 1. En las placas 3 y 4 los anticuerpos de los conejos inoculados con el antígeno forma 2. Esta prueba también se hizo con los orificios colocados en triángulo en uno de ellos el anticuerpo, ya en los laterales las proteínas.

Por último se colocaron alícuotas de los diferentes sangrados de cada conejo para visualizar el incremento del título de anticuerpos.

La especificidad por el método de RIA se evaluó como el porcentaje de desplazamiento que cada concentración de Apo AI, HDL y la fracción de lipoproteínas con densidades menores a 1.03 g/ml (Ou, VLDL, IDL, y parte de las LDL), ocasionó al antígeno radiactivo de la

unión con los anticuerpos y se expresó como el porcentaje de reacción cruzada.

El ensayo se describe a continuación.

Se construyó una curva estándar de 5 ng-300 ng. A los tubos problema se les añadieron diferentes concentraciones de Apo AI y HDL, una cantidad constante de LDL marcada y la dilución de anticuerpo que une el 60-70 % del antígeno marcado. El esquema de la curva estándar fue el mismo que anteriormente se explicó y el esquema para demostrar la reacción cruzada fue el siguiente:

ESQUEMA DE ESPECIFICIDAD

No. de tubo	Cantidad de HDL ó AI	BBS	AI ó HDL	¹²⁵ I-LDL	Ac-LDL	Prot A
43-45	50	290	10ul	100ul	100ul	100ul
46-48	100	280	20ul	"	"	"
49-51	150	270	30ul	"	"	"
52-54	200	260	40ul	"	"	"
55-61	300	240	60ul	"	"	"
62-64	500	200	100ul	"	"	"

V. Resultados.

El rendimiento de LDL que se obtuvo en la preparación del estándar fue de 0.1282 +/- 0.042 mg/ml de plasma. A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de LDL por mililitro de plasma .

TABLA 4.- Rendimiento de LDL por mililitro de plasma

PREPARACION	PLASMA (ml)	LDL (mg/ml)
A	38.5	0.145
B	15.5	0.122
C	42.0	0.198
D	66.0	0.078

En la figura 8 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% con SDS en donde se visualiza la separación de las diferentes proteínas del plasma durante los pasos seguidos para la obtención del estándar.

La curva patrón para estimar los pesos moleculares de las proteínas se basó en las distancias recorridas por los estándares de peso molecular conocido.

Los parámetros que describen la curva de pesos moleculares son: $\log Y = -0.8746(X) + 5.536$.

Obteniéndose de esta manera los siguientes pesos moleculares para los estándares:

TABLA 5.- Diferencias entre el peso molecular obtenido y el peso teórico.

NOMBRE	PESO MOLECULAR (DALTONES)	PESO MOLECULAR OBTENIDO*	% DIFERENCIA
Miosina de músculo esquelético de conejo	200 000	203,783	1.89
Beta galactosidasa	116250	116,470	0.192
Fosforilasa beta	97400	93,121	4.39
Albumina serica bovina	66200	66,570	0.557
Ovoalbumina	45000	45,848	1.88

* PESO MOLECULAR = ANTILOGARITMO DE Y, SE EXPRESA EN DALTONES.

FIG 8.- Electroforesis de las alicuotas guardadas durante la obtención del estándar de LDL.

Estandares de peso molecular alto.

Miosina de músculo esquelético de conejo.

Pm: 200,000 daltones.

Beta-galactosidasa.

Pm: 116,250 daltones.

Fosforilasa-beta.

Pm: 97,400 daltones.

Albumina sérica bovina.

Pm: 66,200 daltones.

Ovoalbumina.

Pm: 45,000 daltones.



En esta figura se muestra la electroforesis de las muestras guardadas en cada una de las ultracentrifugaciones para la obtención del estándar de LDL.

El carril A contiene plasma total, B y C alicuotas de la centrifugación 1 (densidad 1.03 g/ml), D y E alicuotas de la centrifugación 2 (densidad 1.063 g/ml), F estándar de peso molecular alto (45000 a 200000 daltons), G carril blanco, H,I,J, muestras del estándar de LDL (H= LDL "ligeras", I= LDL "intermedias" y J= LDL "pesadas").

El número de bandas de proteína en cada muestra y sus pesos moleculares se muestran a continuación.

TABLA 6.- Número y pesos moleculares de las proteínas contenidas en cada una de las muestras guardadas

MUESTRA	CARRIL	NO. DE BANDAS	PM
Plasma total	A	6	189,137-47,590
ULTRACENTRIFUGACION 1			
Densidad menor a 1.03 gr/ml	B	4	66,570-55,246
Densidad mayor a 1.03 gr/ml	C	6	189,137-47,590
ULTRACENTRIFUGACION 2			
Densidad mayor a 1.063g/ml	D	5	83,264-51,275
Densidad menor a 1.063g/ml	E	5	254,886-51275
ULTRACENTRIFUGACION 3			
Densidad 1.03-1.05g/ml	H,I,J.	1	254886

Desde el carril A hasta el E la proteína común a todos ellos es la albúmina, con un peso molecular de 66,570 daltones.

El carril E contiene la fracción de lipoproteínas con densidad de 1.03- 1.063 g/ml en él, son aparentes dos bandas de proteína que no logran apreciarse en los carriles anteriores, una banda de 254,886 daltones (que corresponde a la Apo B 100) y una banda de 189,137 daltones.

El carril F muestra los estándares de peso molecular alto (45000 -200,000 daltones) que consta de las siguientes proteínas: Ovaalbúmina (45,000), albúmina sérica bovina (66,200), Beta fosforilasa (97,400), Beta galactosidasa (116,250), Miosina de músculo esquelético de conejo (200,000)

El carril G sirvió de blanco, en él se colocó amortiguador de muestra y agua, para comprobar que ni el amortiguador de muestra ni el de corrida están contaminados con ninguna proteína y también para checar que ninguna de las muestras contaminó los carriles vecinos durante las maniobras para montar el equipo de electroforesis.

Los carriles H, I, y J corresponden a la fracción de LDL con densidad de 1.03 - 1.05 g/ml obtenida en la ultracentrifugación 3 (figura 5-C). Todos los carriles contienen 20 ug de proteína.

En el carril H se observa la LDL más ligera (densidad = 1.03g/ml), en el carril I a la LDL intermedia (densidad 1.04 g/ml) y en el carril J la LDL más pesada (densidad 1.05 g/ml). Esta división de la última centrifugación fue arbitraria, se dividió a la franja de flotación en tres partes de acuerdo a su distribución en el tubo, la LDL ligera se concentró en el tope del tubo formando un banda anaranjada fuerte, la LDL intermedia se veía anaranjada pero menos concentrada y se encontraba debajo de la anterior y la LDL pesada formaba una franja amarilla tenue debajo de las anteriores, notándose que la LDL más ligera es la menos contaminada por una proteína de peso molecular 189,137 daltones según se observa en la electroforesis.

Como se puede ver en la figura 9, el análisis por densitometría de esta electroforesis carril I, mostró una pureza mayor del 95%. Cada mes se obtuvo un estándar de LDL para inyectar proteína pura y fresca durante todo el lapso de tiempo que duró el esquema de inoculación. En ese período la pureza varió del 95-98%. (figura 9 A y B).

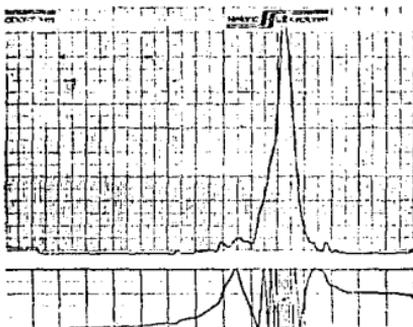
En la gráfica 1 se muestra el cromatograma de la marcación con yodo 125 (I^{125}) por el método de Cloramina T, en el cual se observan dos picos.

Debido a las características del gel usado en esta columna (Sephadex G50), que tiene un límite de exclusión de 1500 a 30,000 daltones, se esperaba que la LDL con un peso molecular teórico de 250,000 daltones eluyera inmediatamente después del volumen vacío de la columna, es decir en el pico 1. El volumen vacío fue de 7 ml.

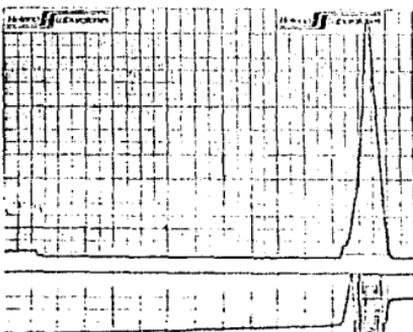
Para verificar que en este pico se encontraba la proteína marcada se hizo un análisis por autorradiografía de cada pico, en donde se mostró que la migración electroforética del pico número 1 correspondió a la LDL y la marca radioactiva del pico 2 migró junto con el frente de la electroforesis, el cual posiblemente contenía el yoduro no unido a proteína. La precipitación con ácido tricloroacético al 10% del pico 1 fue de 80-90% y la del pico 2 menor al 10%. Por lo anterior se pudo determinar que el pico 1 contenía a la LDL marcada.

FIG.9.- Densitometría de la electroforesis del estándar de LDL.

A

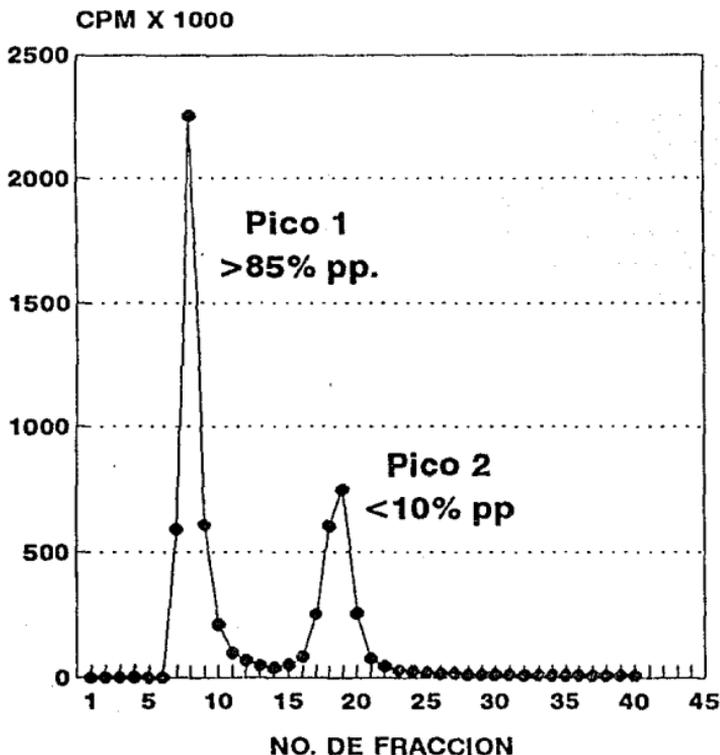


B



A: pureza 95t
B: pureza 98t

**GRAFICA 1.- MARCACION DE LDL CON 125-I
POR EL METODO DE CLORAMINA T.**



En este cromatograma se diferencian dos picos, el primero corresponde a las LDL marcadas con 125-I, con un porcentaje de precipitación con ATCA mayor al 85%, el segundo contiene el 125-I no unido a proteína con un porcentaje de precipitación por ATCA menor al 10%.

La actividad específica de la marcación fue de 0.0055 uCi/ug de LDL.

La gráfica 2 corresponde al cromatograma de la purificación de una alícuota de la proteína marcada en donde se muestran tres picos.

De acuerdo al gel utilizado (Sephacosa 6B) que tiene unos límites de resolución de 10,000 a 4,000,000 y tomando en cuenta que la LDL tiene un peso molecular teórico de 150,000 daltonos, nuevamente se esperaba que la LDL saliera después del volumen vacío es decir, en el pico número 1. El volumen vacío fue de 16 ml.

La autorradiografía de estos picos reveló que el pico 1 contenía a la LDL marcada ya que la marca radioactiva de este pico correspondió a la migración electroforética de la LDL. El pico 2 contenía proteínas marcadas de menor peso molecular a la LDL y el pico 3 mostró una marca radioactiva al mismo nivel que el frente de la electroforesis (posiblemente era el yoduro no unido a proteína). La precipitación de estos picos con ácido tricloroacético fue la siguiente: pico 1 = 80-90%, pico 2 = 40-50%, pico 3 = menor al 10%.

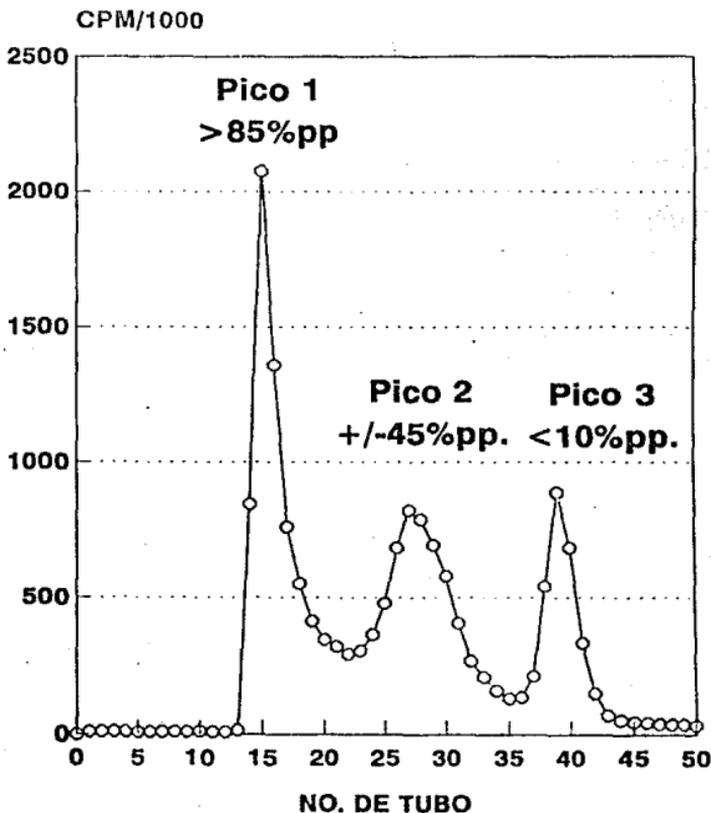
Por lo tanto el pico del cual se obtuvo la poza de LDL marcada en todos los ensayos fue del pico 1.

En la gráfica 3 se muestran las titulaciones finales del suero de los conejos inoculados con el antígeno forma 1. Como se puede observar los títulos útiles para el ensayo con Apo B100 fueron de 1:15,000 para el suero Y40 y de 1:10,000 para el suero Y41.

En la gráfica 4 se muestran los títulos obtenidos en los sueros de conejos inoculados con el antígeno forma 2. El título útil para el ensayo de Apo B100 obtenido en estos sueros fueron de 1:2000 en ambos casos.

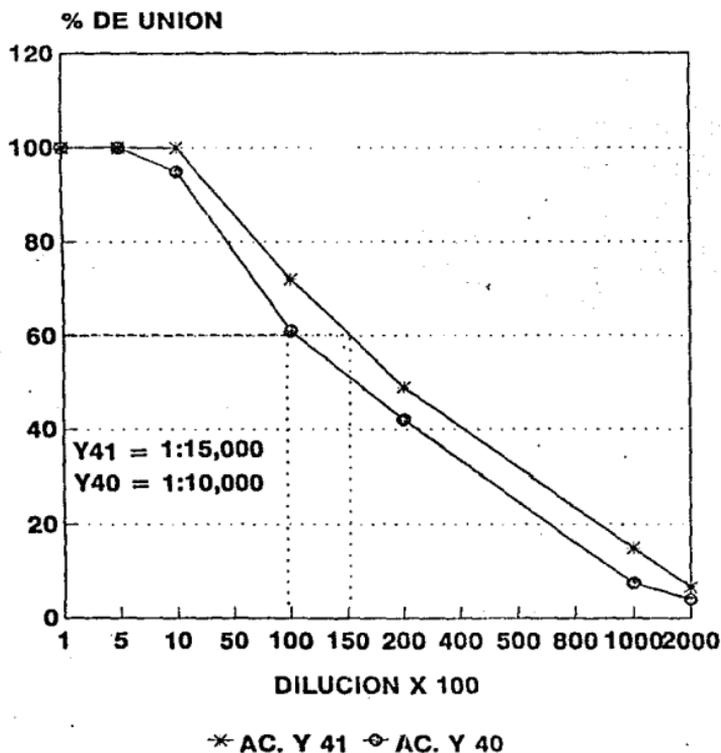
En la gráfica 5 a y b, se muestra la curva estándar promedio obtenida con los anticuerpos de los conejos inoculados con el antígeno forma 1 (Y40 y Y 41) +/- la desviación estándar, además se puede observar la regresión de la curva por el método Logit-log y la ecuación de la recta para cada anticuerpo. Cada punto de las curvas representa el promedio de 4 ensayos en el primer caso y de 2 ensayos en el segundo caso. Siendo para Y40, $y = -0.967(X) + 0.913$, $r = 0.991$ y para Y41, $y = -0.943(X) + 1.5$, $r = 0.9913$.

GRAFICA 2.- PURIFICACION DE LDL 125-I



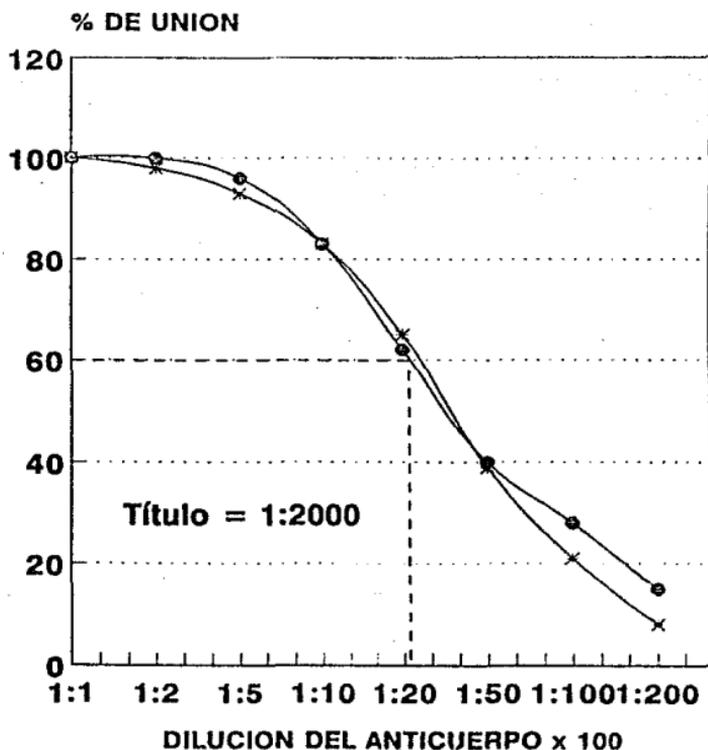
En este cromatograma se diferencian tres picos, el pico 1 corresponde a las LDL marcadas con 125-I (>85% de precipitación con ATCA), el pico 2 contiene proteínas de menor peso molecular a la LDL (45% pp/ATCA) y el pico 3 contiene el 125-I no unido a proteína (<10% pp/ATCA).

GRAFICA 3.- TITULACION DEL SUERO DE LOS CONEJOS INOCULADOS CON EL ANTIGENO FORMA 1.



Se muestran los valores del título de los sueros útiles para el RIA de Apo B-100 (60% unión).

GRAFICA 4.- TITULACION DEL SUERO DE LOS INOCULADOS CON EL ANTIGENO FORMA 2.



Se muestra el valor del título útil de ambos sueros para el RIA de Apo B-100 (60% de unión).

La gráfica a a y b representa el mismo análisis para la curva promedio obtenida con los conejos inoculados con el antígeno forma 2 (E3 y E4). Cada punto de las curvas representa el promedio de 4 análisis para cada anticuerpo. Siendo para E3, $y = -0.914(X) + 0.7197$, $r = 0.996$ y para E4, $y = -0.749(X) + 0.898$, $r = 0.992$.

El valor del 50% de unión de cada anticuerpo en la curva estándar se muestra a continuación:

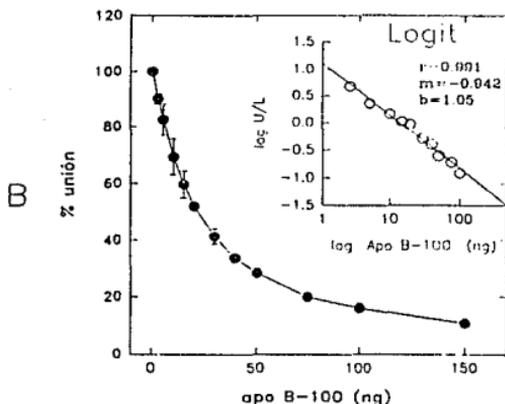
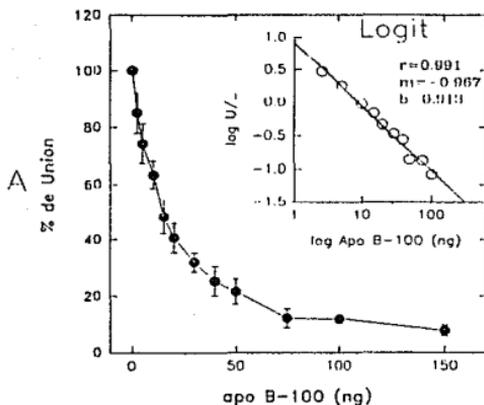
TABLA 7.- Nanogramos de LDL requeridos por cada anticuerpo para alcanzar el 50% de unión en la curva estándar.

ANTICUERPO	LDL (ng)
Antígeno forma 1.	
Y40	8.79 ng.
Y41	13.02 ng.
Antígeno forma 2.	
E3	6.14 ng.
E4	15.80 ng.

En la figura 10 A y B se muestra el ensayo por inmunodifusión radial para probar la reacción cruzada del anticuerpo de los conejos inoculados con el antígeno forma 2 al enfrentarlo a todas las alícuotas guardadas durante la obtención del estándar para ver si reconoce o no a las proteínas contenidas en ellas, además de Apo A1, HDL y albúmina sérica bovina.

El pozo 1 contiene plasma total, el pozo 2 a las lipoproteínas con una densidad menor a 1.03 g/ml (quilomicrones, VLDL, IDL y LDL), en el pozo 3 a las lipoproteínas con densidades mayores a 1.03 gr/ml (HDL y LDL), el pozo 4 el estándar de LDL, en el pozo 5 Albúmina sérica bovina, en el pozo 6 Apo A1, en el pozo 7 HDL y en el pozo 8 PBS. Todos los pozos contenían 200 ug de proteína. La banda de precipitación de los complejos antígeno anticuerpo se formó entre los pozos 1,2,3 y 4. Aún cuando los pozos 1,2 y 3 contienen también LDL, solo en los pozos 1 y 2 se puede observar un halo de complejos antígeno anticuerpo muy cerca de los pozos pero sin llegar a ser tan evidentes como en el pozo 4. En la figura 10-A se utilizó el suero del conejo Y40 y en la figura 10-B el suero del conejo Y41.

GRAFICA 5.- Curvas estándar promedio con los anticuerpos obtenidos con el antígeno forma 1.

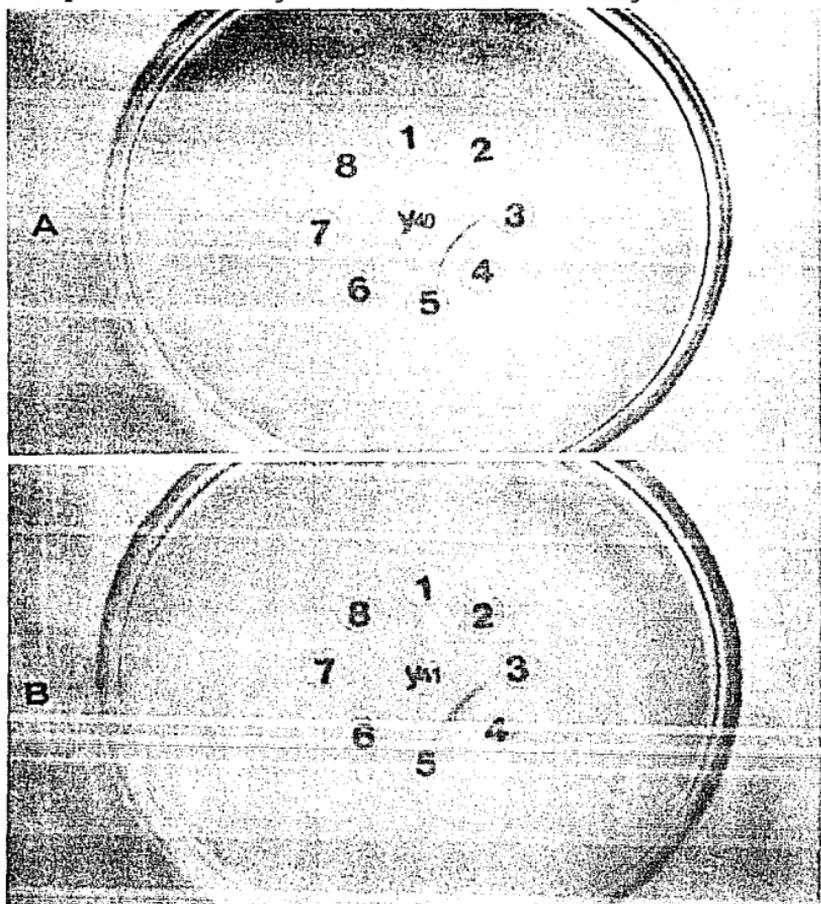


En estas graficas se muestran las curvas promedio con los anticuerpos obtenidos con el antígeno forma 1 +/- DS. Cada punto de la curva representa el promedio de 4 ensayos en A (Y40) y 2 ensayos en B (Y41)

En el recuadro se observan la gráfica y los valores de la linealización de la curva por el método logit.

Los valores de cada curva para obtener el 50% de unión son en A : 8.79 ng de LDL y en B 13.02 ng de LDL

FIG.10.- Ensayo de reacción cruzada por inmunodifusión radial de los anticuerpos de los conejos inoculados con el antígeno forma 1.



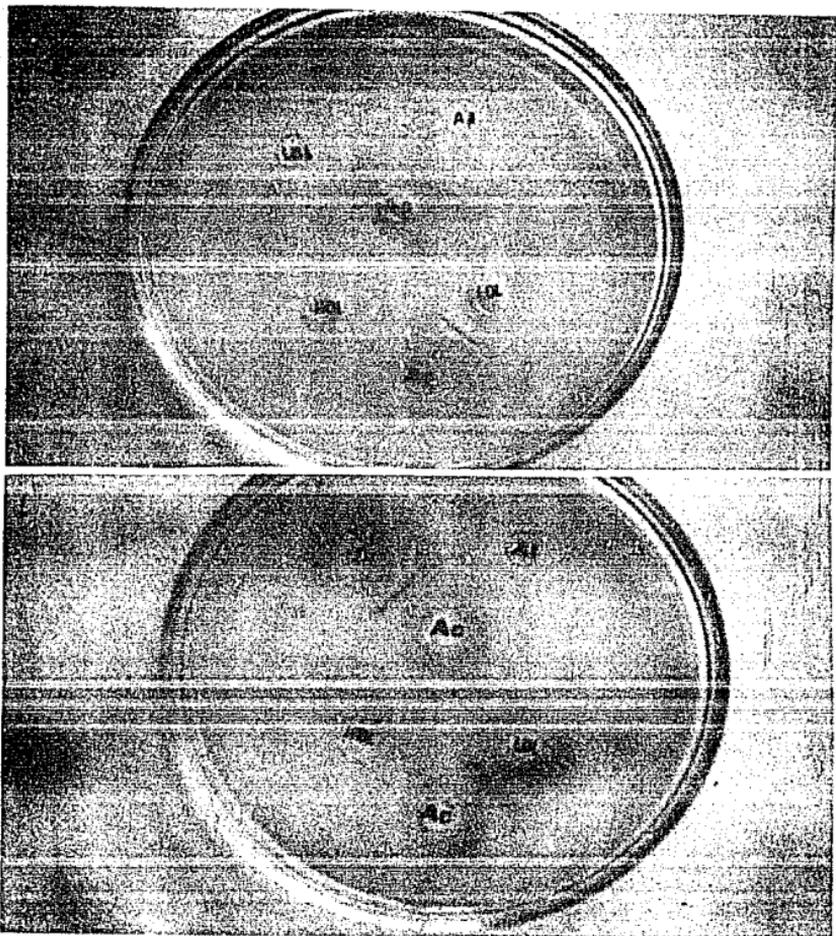
Se muestra el ensayo de reacción cruzada para los anticuerpos Y40 y Y 41 en gel de agarosa al 0.7%.

El pozo 1 contiene plasma total, el pozo 2 y 3 alícuotas de la primera centrifugación (densidad menor y mayor de 1.03 g/ml respectivamente), el pozo 4 contiene el estándar de LDL, pozo 5 Albúmina sérica bovina, pozo 6 HDL, pozo 7 Apo AI, pozo 8 PBS. Todos los pozos contenían 200 ug de proteína.

En la figura 11 A y B se muestra la técnica de Inmudifusión radial para el suero de los conejos inmunizados con el antígeno forma 1 enfrentándolos a HDL, LDL y Apo AI. La banda de precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo solo aparece entre los pozos de anticuerpo y LDL, no detectándose esta en los pozos con HDL y Apo AI.

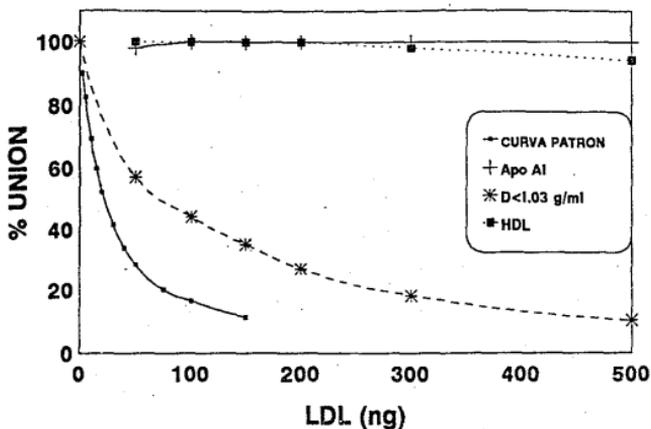
En la gráfica 7 se muestra el ensayo de reacción cruzada con los anticuerpos de uno de los conejos inoculados con el antígeno forma 1 (Y 48), evaluado como el porcentaje de interferencia con el 100% de unión resultando para Apo AI del 2% con 50 ng de Apo AI en el ensayo, que equivale a trabajar con un plasma de concentración de 150 mg/dl de Apo AI y del 6% con 500 ng de C-HDL que equivale a trabajar con un plasma con concentraciones de 1500 mg/dl de C-HDL siendo los límites fisiológicos de Apo AI de 124 ± 25 mg/dl, y para C-HDL, 29 mg/dl - 120 mg/dl.

FIG.11.- Ensayo de reacción cruzada para Apo AI y HDL de los anticuerpos inoculados con el antígeno forma 2 por inmunodifusión radial.



Se muestra el ensayo de reacción cruzada por inmunodifusión radial en gel de agarosa al 0.7% para los anticuerpos E3 en A y E4 en B.

GRAFICA 7.- REACCION CRUZADA DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON EL ANTIGENO FORMA 1.



En esta gráfica se muestra el ensayo de reacción cruzada para el suero del conejo Y41. Se enfrentó al anticuerpo contra Apo A1 y HDL, además de las lipoproteínas con densidades menores a 1.03 g/ml (VLDL, IDL y LDL ligeras).

VI. Discusión.

Hasta hace pocos años, la investigación de varios tipos de dislipoproteinemias ha sido confinada a la medición de lípidos en suero y/o plasma, sin embargo el estudio de la fisiología de las lipoproteínas plasmáticas y el importante papel que desempeñan las apolipoproteínas en ella, ha valorado la importancia de cuantificar su concentración en el plasma.

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) transportan la mayor parte del colesterol circulante en el humano y representan la principal fuente de colesterol para las células. Los niveles crónicamente elevados de la LDL están relacionados con el desarrollo e incremento de la aterogénesis según numerosos estudios epidemiológicos (9-13). La apoproteína B-100 es la encargada del reconocimiento a nivel celular de estas lipoproteínas, ya que interactúa con los receptores de tejidos contribuyendo a la internalización y degradación de las LDL. Debido a que la Apo B-100 representa la entidad funcional de la LDL, su cuantificación es muy importante y por ello ha despertado gran interés biológico y clínico, sin embargo, no se ha explotado todo el potencial de la medición de la Apo B-100 en los laboratorios de investigación y clínicos debido a problemas en la obtención de un material de referencia adecuado y al hecho de que aún no se ha estandarizado un método de referencia para su medición (31,36).

Una variación significativa en la medición de apolipoproteínas tanto en las técnicas empleadas como en los materiales de referencia utilizados ha limitado la oportunidad de definir los valores de referencia para uso clínico.

Dentro de los métodos que se han utilizado para medir la Apo B-100, el radioinmunoanálisis destaca por su alta especificidad y sensibilidad, y para su realización es importante contar con materiales confiables.

Para medir Apo B-100 por cualquier técnica se requiere de manera indispensable de un estándar de esta apoproteína. Se ha reportado que ésta en forma libre de lípidos no puede mantenerse estable y usarse como referencia (31) porque pierde propiedades inmunológicas y electroforéticas. Se ha sugerido utilizar como

estándar primario la lipoproteína de baja densidad (LDL), ya que contiene más de un 95% de Apo B-100. En las técnicas inmunológicas otra condición importante es la obtención de anticuerpos específicos contra la Apo B-100.

Por los problemas metodológicos anteriores, uno de los objetivos de este trabajo fue aislar LDL como estándar primario de Apo B-100 para utilizarlo como antígeno en la obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra esta apolipoproteína.

Para realizar los objetivos anteriores se utilizó una técnica laboriosa que emplea como mínimo 80 hr de centrifugación y cuatro ajustes de densidad, los cuales requieren de un especial cuidado en el cálculo de los volúmenes y las sales agregadas, en la homogenización del plasma con ellas, en el sellado correcto de los tubos de ultracentrifuga y en la aspiración correcta de la franja de proteína deseada después de la ultracentrifugación.

Los puntos críticos de la obtención del estándar fueron:

- a) Emplear solo plasma de sujetos que cumplan con 12 horas de ayuno, ya que al centrifugar plasma de personas en no ayuno se observó, que es difícil eliminar completamente por una sola centrifugación la gran concentración de quilomicrones, además de que las franjas de distribución de proteínas después de la primera ultracentrifugación no están claramente separadas.
- b) En el laboratorio se practicaron dos formas de iniciar la ultracentrifugación. Una de ellas consistió en diluir el plasma antes de la primera ultracentrifugación con solución salina 0.9% + 1mM de EDTA, y después ajustarlo a 1.03 g/ml, y la segunda, centrifugar el plasma directamente sin dilución, ya que como se mencionó anteriormente, el plasma siempre presentó una densidad muy cercana a 1.03 g/ml y los resultados fueron prácticamente los mismos.
- c) Otro punto crítico fue el aspirar correctamente la franja de proteína en cada densidad.
- d) Uno de los problemas que se presentó frecuentemente durante el inicio de la obtención de la LDL, fue la agregación de proteínas en el plasma durante los cambios de densidad de una ultracentrifugación a otra. Se observó que al agregar directamente soluciones de bromuro de potasio o solución salina a 4°C al plasma centrifugado a 10°C, se

presentó esta agregación, debido probablemente al cambio brusco de temperatura.

Algunos autores recomiendan usar inhibidores de crecimiento y antiagregantes en el plasma antes de la separación de las lipoproteínas para prevenir el crecimiento de microorganismos y la agregación de las lipoproteínas durante su obtención (57,61). Por ello, al plasma se le agregó azida de sodio al 0.01 % y EDTA 1 mM. La concentración de EDTA se mantuvo a lo largo de todos los ajustes de densidad, ya que todas las soluciones empleadas la contenían, pero la concentración de azida de sodio se diluyó en cada ajuste de densidad. En las técnicas citadas en la literatura está descrito que las concentraciones de los inhibidores se recupera al dializar el estándar con solución salina con las mismas concentraciones de los inhibidores. En este trabajo se sustituyó la diálisis por la centrifugación 4, ya que además de concentrar el estándar de LDL, el ajuste de densidad a 1.019 g/ml requirió de una dilución de más del doble del volumen obtenido, con lo cual se diluyó el exceso de bromuro de potasio. Esto se comprobó en la medición de proteínas por el método de Lowry ya que cuando el estándar contenía sales, la medición no podía realizarse porque la mezcla de reacción se enturbiaba. Para evitar que el estándar se contaminara con microorganismos se pasó por un filtro Millipore de 0.22 μ m en un medio estéril.

La obtención del estándar de LDL se hizo por medio de la técnica de ultracentrifugación secuencial preparativa. Debido a que no existen límites exclusivos de densidad de las diferentes clases de lipoproteínas, es indispensable el empleo de una ultracentrífuga para la separación de un estándar primario de Apo B-100. En muchas ocasiones el hecho de no contar con estos aparatos limita a un número restringido los laboratorios en donde se puede obtener dicho estándar, sin embargo, existen en México instituciones y centros de investigación en los cuales se cuenta con estos equipos costosos.

En la literatura se ha descrito el uso de diversos ajustes de densidad para obtener dicho estándar. Algunos de ellos son:

- 1.03 - 1.05 gr/ml (refs. 36,37,50).
 1.025 - 1.05 gr/ml (ref. 51).
 1.02 - 1.05 gr/ml (refs. 57,61).
 1.19 - 1.063 gr/ml (refs. 59,62).
 1.03 - 1.063 gr/ml (ref. 54)

Se ha tratado recientemente de unificar criterios para estandarizar esta metodología en los límites de densidad, tiempos de ultracentrifugación, temperatura para ultracentrifugación y almacenamiento, así como soluciones empleadas entre otros factores.

Se escogieron los límites de 1.03 - 1.05 gr/ml por varias razones. En primer lugar se encontró que entre estos límites se localiza la mayor cantidad de LDL (51). Además, en estas densidades se evita contaminación por IDL (1.006-1.019 g/ml), que es rica en apo C y E y se excluyen las HDL (1.063-1.125 g/ml) (36).

Al utilizar la densidad de 1.063 g/ml se eliminan del plasma prácticamente todos los contaminantes, quedando solo en calidad de contaminante la HDL y un poco de albúmina. El ajuste de densidad posterior (1.03 g/ml) elimina esos contaminantes dejando solo a la LDL como se muestra en la electroforesis (figura 8) y en la densitometría (figura 9).

Para elegir los tiempos y velocidad de centrifugación no se siguió un procedimiento previamente descrito. Estas variables se ajustaron en base al manual de laboratorio volumen VIII del Laboratorio Central de Lípidos de la Escuela de Medicina de Baylor (59), a una recopilación de la literatura, a la experiencia personal y al rotor utilizado.

La temperatura promedio reportada se encuentra entre 4°C y 10°C eligiéndose la de 10°C.

El rendimiento en la obtención del estándar fue de 0.1282 +/- 0.042 mg de LDL/ml de plasma. No tenemos un valor de referencia para compararlo, pero para las necesidades del laboratorio esta cifra es suficiente. Esta LDL se usó para inocular a los cuatro conejos durante los dos primeros refuerzos y posteriormente solo a los del antígeno forma 1, así que aún con el promedio más bajo de 3 mg, se contaba con 1 mg más para otros experimentos. En promedio, el tiempo

total de centrifugación, desde la ultracentrifugación 1 hasta la 4, fue de 90 h.

Como puede verse en la tabla 4, la recuperación de las primeras 4 preparaciones casi se mantiene constante, excepto en la última donde el rendimiento fue menor. Durante la estandarización de la obtención de LDL, como ya se mencionó, se notó que al agregar las soluciones salina o de KBr a temperatura de 4°C al plasma recién tomado o acabado de ultracentrifugar a 10°C, las proteínas se agregaban y al filtrar el estándar final mucha de la proteína se quedaba en él. Tal vez esto ocurrió en la última preparación.

El 95% de las proteínas que conforman a la LDL son Apo B-100. En la electroforesis de las diferentes alícuotas guardadas durante la obtención de la LDL (figura B), puede notarse que la banda de Apo B-100 se hace evidente hasta la centrifugación número 2 (densidad 1.063 gr/ml). Esta Apo B-100 se ve contaminada por una alta proporción de albúmina y otras proteínas plasmáticas de menor peso molecular que logran ser eliminadas en el siguiente corte de densidad (1.05 gr/ml), quedando menos del 10% de la proteína de peso molecular de 189,137 daltones (según la densitometría del gel), de ahí que sea importante utilizar estas dos densidades para asegurar la pureza del estándar.

La diferencia entre los pesos moleculares encontrados en este trabajo y los teóricos para los estándares posiblemente se deba a errores metodológicos.

De acuerdo a la densitometría de la electroforesis se tiene más de un 90% de pureza en la proteína y en algunos casos llegó a 98% lo que demuestra que siguiendo cuidadosamente el método se puede obtener un estándar puro.

Se hizo una IDR con anticuerpos contra LDL antes de la inoculación con el fin de determinar si los procedimientos para obtener el estándar alteraban las propiedades inmunogénicas de la Apo B-100 expresada en las LDL. La primera IDR se hizo con anticuerpos comerciales (Behring) y las subsecuentes con los anticuerpos de los sangrados periódicos de los conejos, encontrándose que no hubo alteración en dichas propiedades.

En el cromatograma de la marcación (gráfica 1), se observaron invariablemente dos picos, en el primero de ellos se encontró a la

LDL marcada de acuerdo a la resolución del gel (50,000 a 250,000 daltones), lo cual se demostró por una autorradiografía de cada pico en donde el gel teñido con azul de Coomassie mostró la migración electroforética de la proteína no marcada, y debajo del gel se distinguió la marca radioactiva que dejó la migración de cada uno de los picos en la placa fotosensible. Se puede notar que la posición de la proteína no marcada y marcada es la misma, lo que indica, que el pico número 1 contenía la LDL marcada y que esta proteína no había sido afectada en sus propiedades electroforéticas durante la marcación.

La actividad específica de la marcación fue de 0.0055 uCi/ μ g.

En el cromatograma de la purificación (gráfica 2) se observaron invariablemente tres picos, el primero de ellos contenía la mayor cantidad de proteína marcada (según la precipitación con ácido tricloroacético al 10%) y se demostró, por medio de autorradiografía, que solo la marca radioactiva de ese pico tenía las mismas propiedades electroforéticas que la LDL no marcada, por lo tanto, ese fue el pico del cual se obtuvo la poza de LDL marcada para hacer el ensayo correspondiente. En la autorradiografía del pico 2 se detectaron proteínas con menor peso molecular, posiblemente fracciones de LDL dañadas por radiólisis.

Los anticuerpos obtenidos con el antígeno forma 1 cuentan con un título útil para el ensayo con Apo B-100 de 1:15,000 (Y40) y de 1:10,000 (Y41) y los obtenidos en los sueros de conejos inoculados con el antígeno forma 2 alcanzaron el título de 1:2000 para ambos casos. La diferencia entre los dos métodos en cuanto al título radica en la respuesta inmunológica individual al antígeno, y en el número de refuerzos que se les aplicó.

Los anticuerpos obtenidos con las dos presentaciones del antígeno mostraron ser útiles en el RIA, ya que con ellos se pudieron obtener curvas estándar reproducibles (gráficas 5 y 6 a y b).

El anticuerpo del conejo E3 inoculado con el antígeno forma 2 mostró tener la mayor sensibilidad, ya que necesitó la menor cantidad de LDL (6.14 ng) para llegar al 50% de unión en la curva estándar (tabla 7). De acuerdo a la sensibilidad obtenida de las curvas estándar, en cuanto al valor del 50% de unión en orden decreciente,

se encuentra que: E3 > Y41 > Y40 > E4.

Con los anticuerpos almacenados a -70°C se obtuvieron curvas estándar reproducibles como las aquí presentadas, al descongelar un anticuerpo y dejarlo durante 19 días a 4°C las curvas se mantuvieron con la misma pendiente, pero, la pendiente disminuyó desde -1.11 a -0.9 al transcurrir 26 días a 4°C .

De acuerdo a la inmunodifusión radial (figura 10 y 11), los anticuerpos no mostraron reacción cruzada con Apo AI ni HDL. Como ya se mencionó este experimento fue preliminar al RIA ya que no se pueden sacar conclusiones veraces de los resultados obtenidos con esta técnica debido a que los anticuerpos serían empleados en una técnica de mayor sensibilidad como es el RIA. El ensayo de reacción cruzada por la técnica de RIA de uno de los sueros obtenidos de los conejos inoculados con LDL más Adyuvante, en donde se colocaron concentraciones muy superiores a las fisiológicas (desde 150 mg/dl hasta 1500 mg/dl de Apo AI y HDL) demostró que no existe reconocimiento por dichas proteínas.

En las placas de inmunodifusión se formaron bandas de complejos antígeno-anticuerpo en los pozos 1 (Plasma total), 2 (lipoproteínas con densidades menores a 1.03 g/ml) y 4 (estándar de LDL). En los pozos 1 y 2 solo logra apreciarse un halo muy cercano al pozo del antígeno. Esto se debe a que la migración por difusión está en función de la concentración del Ag y del Ac. En plasma total y en la fracción de menor densidad a 1.03 g/ml, las concentraciones de LDL, es decir, del Ag, son muy bajas debido a las diluciones practicadas. En cambio, en el pozo 4 que contiene al estándar de LDL, logra verse una banda mucho más evidente de complejos antígeno-anticuerpo.

Una vez demostrado que los anticuerpos son específicos para LDL, que no reconocen HDL ni Apo AI en concentraciones fisiológicas, y que pueden obtenerse curvas estándar útiles en el RIA, podemos decir que con estos anticuerpos pueden determinarse las concentraciones de Apo B100 en plasma por esta técnica, sin que la presencia de estas proteínas interfieran en la medición.

No se tuvo oportunidad de enfrentar a los anticuerpos con otras apoproteínas por no contar con ellas. De acuerdo a los límites de densidad que se utilizaron para separar la LDL, las lipoproteínas

contaminantes pudieran ser IDL (1.019g/ml) y HDL₂ (1.063g/ml), y la contaminación solo pudo ocurrir en el caso de no ajustar correctamente las densidades o aspirar la franja de proteína en el tubo de ultracentrifuga de manera incorrecta. En cuyo caso las apolipoproteínas contaminantes serían por parte de la IDL, Apo C y E, y por parte de las HDL₂, Apo AI, AII, AIV, C y E. De todas ellas, la apoproteína más concentrada que podría interferir en la medición de Apo B en plasma es la Apo AI, ya que constituye el 65% de las proteínas de las HDL₂, las otras apoproteínas varían entre el 10 y 3 %.

Aún cuando los porcentajes de estas apoproteínas sean bajos sería recomendable que antes de utilizar los anticuerpos para la medición de Apo B₁₀₀ en plasma, se enfrente a los anticuerpos contra dichas apoproteínas para tener un control de calidad más estricto.

Actualmente con los anticuerpos obtenidos se están realizando estudios para medir por medio del RIA las concentraciones de Apo B-100. Uno de ellos tiene por objeto conocer la distribución de las concentraciones de esta lipoproteína en una muestra de la población adulta mexicana. Los estudios restantes son de tipo metabólico, con los cuales se realiza un seguimiento de las variaciones en cuanto a las concentraciones de esta apolipoproteína durante un tratamiento dietario.

VII. CONCLUSIONES.

- 1.- El estándar de LDL que se obtuvo a partir de plasma humano con la metodología anteriormente descrita mostró una pureza mayor al 90%
- 2.- Las propiedades inmunológicas de la Apo B-100 expresada en la LDL no fueron alteradas durante los procedimientos de su obtención por lo que pudo utilizarse como antígeno para inducir la formación de Ac policlonales en conejos de la raza Nueva Zelanda.
- 3.- Los títulos obtenidos con el antígeno 1 fueron superiores a los del antígeno 2. Esta diferencia radicó más que a la forma del antígeno al número de refuerzos y al tiempo en que permaneció en contacto el antígeno con el organismo.
- 4.- Las curvas estándar realizadas muestran una sensibilidad individual en cada conejo. Por lo tanto la respuesta inmunológica individual es parte importante tanto del título alcanzado como de la afinidad de los Ac resultantes.
- 5.- El ensayo de especificidad contra Apo AI y HDL, en concentraciones superiores a las fisiológicas por las técnicas de IDR y RIA demostró que los Ac. no reconocen ninguna de estas proteínas, por lo tanto son específicos para Apo B-100.
- 6.- Es probable que los anticuerpos solo reconozcan a la Apo B-100 expresada en la LDL con densidad de 1.03-1.05 gr/ml. Para probar si reconocen también a la Apo B-100 expresada en la VLDL,IDL y LDL ligeras se debe enfrentar a los anticuerpos contra estas proteínas puras.
- 7.- El estándar de LDL marcado y no marcado así como los Ac obtenidos con las dos formas de presentación del antígeno son útiles en la técnica de RIA para medir Apo B100 en plasma humano.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Beck,W. Fisiología celular, molecular y sistemática. Publicaciones Cultural. México. D.F. 1977:25-35,48-59,596-628,806-850.
- 2.- Karip,G. Biología Celular. Ed. Mc Graw-Hill. México D.F. 1987:39-48,74-79,112-124.
- 3.- Lehninger,L.A. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, INC. New York. USA. 1982: 45-63,683-705,759-761.
- 4.- Junqueira,J. Biología Celular. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México. D.F.1984: 42,47.
- 5.- Chuit-García,C., T. Schweizer y P. Musch. Glúcidos porque, como, cuanto. Nestec. S.A. México D.F. 1987: 1-5.
- 6.- Zorrilla,E. Lípidos Séricos en la Clínica. Ed Interamericana. México D.F. 1973: 3-40 .
- 7.-Jensen,D. Fisiología. Ed. Interamericana. México. D.F. 1980: 790-867 .
- 8.- Avers,J. Biología celular. Grupo Editorial Iberoamericana. México. D.F. 1983: 25-42 pag.
- 9.- Roberts.A.B., A.M.Lees., R.S.Lees., H.W.Strauss., J.T.Fallon., J. Taveras. and S.Kopiwoda. Selective accumulation of Low Density Lipoproteins in damage arterial wall. J Lipid Res 1983;24:1160-1167.
- 10.- Grundy,S.M. Cholesterol and coronary heart disease. A new era. JAMA 1986;256:2849-2858.
- 11.- Gotto,A.M. Colesterol and atherosclerosis. Lipid Rev 1987;1:1-6.
- 12.- Steinberg,D. and J.L.Witztum. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. JAMA 1990;264:3047-3052.
- 13.- .Morel,D.W., J.R.Hessler. and G.M.Chisolm. Low Density Lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. J Lipid Res 1983;24:1070-1076.
- 14.- Marcos,E., A.Mazur., P.Cardot. and Y.Rayssiquier. Quantitative determination of apolipoproteins B in bovine serum by radial immunodifusion. Comp Biochem Physiol 1989;94B:171-173.
- 15.- Sparks,C. and J.B.Marsh. Analysis of lipoprotein apoproteins by SDS - GEL filtration column chromatography. J Lipid Res 1981;22:514-518.
- 16.- Galloway, J. Diabetes Mellitus. Ed. Medical Profession by the Lilly Research Laboratories. Indianapolis, Indiana.1988:33-38.

- 17.- Ondarza, R. *Biologia moderna*. Ed. Trillas. México. D.F. 1983:17-62,67-91,200-216.
- 18.- Brown, M.S. and J.L. Goldstein. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 1983;72:743-747.
- 19.- Mahley, R.T., S.C. Innerarity, Jr., Rall, and K. H. Weisgraber. Plasma lipoproteins: apoproteins structure and function. *J Lipid Res* 1984;25:1277-1294.
- 20.- Stein, Y. Plasma lipoproteins and their metabolism. *Lipid Rev* 1987;1:37-44.
- 21.- Tall, A. Plasma High Density Lipoproteins. Metabolism and Relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990;86:379-384.
- 22.- Oram, J.F. Cholesterol trafficking in cells. *Current Opinion Lipid* 1990;1:416-421.
- 23.- Brown, M.S. and J.L. Goldstein. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 1984;251:58-66.
- 24.- Brown, M.S. and J.L. Goldstein. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-46.
- 25.- Bucher, N., K. McGarrah, E. Gould, and A. Loud. Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal fasting X irradiated cholesterol-fed, Triton or delta 4 Cholesten-3-one-treated rats. *J Biol Chem* 1959;234:262-267
- 26.- Sperstein M D. *Curr Top Cell Regul* 1970;2:65
- 27.- Goldstein, J.L. and M.S. Brown. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:2804-2808..
- 28.- Ross, R. and J.A. Glomset. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 1973;180:1332-9.
- 29.- Ross, R. and J.A. Glomset. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976;295:369-77,402-5.
- 30.- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
- 31.- Marcovina, S. and J.J. Albers. Standardization of the immunochemical determination of apolipoproteins A1 and B: A report on the International Federation of Clinical Chemistry Meeting on Standardization of apolipoprotein A1 and B measurements (Basis for

Future Consensus), Vienna, Austria April 18-19. Clin Chem 1989;35:2009-2015.

32- Austin, M.A., M.C.King., K.M.Vranizan. and R.M.Krauss. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. Circulation 1990;82:495-506.

33- Freedman, D.S., S.R.Srinivasan., C.L.Shear., F.A.Franklin., L.S. Webber, and G.S.Berenson. The relation of apolipoproteins A-I and B in children to parental myocardial infarction. N Engl J Med 1986;315:712-726.

34.- Reinhart, R.A., K.Gani., M.R.Arndt., and S.K.Broste. Apolipoproteins A-I and B as predictors of angiographically defined coronary artery disease. Arch Intern Med 1990;150:1629-1633.

35.- Naito, H. The clinical significance of apoprotein measurements. J Clin Immun 1986;9:12-20.

36.- Rosseneu, M., R.Vercaemst., K.K.Steinberg. and G.R.Cooper. Some considerations of methodology and standardization of apolipoprotein B immunoassays. Clin Chem 1983;29:427-433.

37.- Albers, J.J., M.S.Lodge. and L.K.Curtiss. Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay as a candidate reference method for the measurement of apolipoprotein B-100. J Lipid Res 1989;30:1445-1458.

38.- Lulato-Bosa, A.J., J.L.Adolphson. and J.J.Albers. Evaluation of the measurement of Apo B protein of plasma Low Density Lipoprotein by Radial immunodiffusion. J Lipid Res 1985;26:995-1001.

39.- Bachorik, P. and T.Cloey. Rate Immunonephelometry and Radial Immunodiffusion Compares for Apolipoproteins AI and B Assay. Clin Chem 1989;35:2236-2241.

40.- Pikler, G.M. El Radioinmunoensayo. 1973. Rev Invest Clin (Mex.) 1973;25:51-66.

41.- Pedraza-Chaverri, J., M.C.C.Sanchez., M.E.Ibarra-Rubio., C.Cruz., E.Tapia. y J.C.Peña. Producción de anticuerpos contra angiotensina II. Rev Invest Clin (Mex.) 1988;40:245-251.

42.- Pedraza-Chaverri, J., A.Zuñiga-Estrada, M.E.Ibarra-Rubio., C.Cruz., E. Tapia. Producción de anticuerpos policlonales para la cuantificación del decapeptido angiotensina I por radioinmunoanálisis. Rev Invest Clin (Mex.) 1988;40:365-377.

43.- Alberts, B., D.Bray., J.Lewis., M.Raff., K.Roberts., J.D.Watson. Molecular Biology of the cell. 1990. Ed. Garland Publishing. U.S.A. 1019-1081.

44.- Darnell, J., H.Lodish. and D.Baltimore. Molecular Cell Biology. Ed. Sci. Am. Books. 1990. 647-653.

- 45.- Patología general veterinaria.1987.Ed Trigo-Tavera F. y A. Mateos Poumian.U.N.A.M. México D.F. 273-327.
- 46.- Tonegawa,S. The molecules of the Immune System. Sci Am 1985;253:122-131.
- 47.- Leder,P. The Genetics of antibody diversity. Sci Am 1982;246:70-79.
- 48.- Gordon,A.L. and G.Nossal. The Clonal-Selection Theory. Sci Am 1987;257:50-57.
- 49.- Bachorik,P.S.,J.J.Albers,R.D.Ellefson,J.P.Kane,P.D.Wood, and G.R.Cooper.Collection of blood samples for lipoprotein analysis. Clin Chem 1982;28:1375-1378.
- 50.- Albers,J.J., V.G.Cabana. and W.R.Hazzard. Immunoassay of human plasma apolipoprotein B. Metabolism 1988;24:1339-1351.
- 51.- Schonfeld,G., S.Robert., P.K.George. and B.Pfleger. Assay of total plasma apolipoprotein B concentrations in humans subjects. J Clin Invest 1974;53:1458-1467.
- 52.- Lowry,O.H., N.J.Rosebrough., L.Farr. and R. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275.
- 53.- Brown,W.V., R.I.Levy. and D.B.Fredrickson. Studies of the proteins in human plasma very low density lipoproteins. J Biol Chem 1969;244:5687-5691.
- 54.- Alaupovic,P., D.M.Lee. and W.J.McConathy. 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 1972;260:680-685.
- 55.- Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
- 56.- Eaton,P. and M.Kipnis. Radioimmunoassay of beta lipoprotein-protein of rat serum. J Clin Invest 1969;48:1387-1396.
- 57.- Cardin,A.D., K.R.Witt., C.L.Barnhart. and R.L.Jackson. Sulphydryl chemistry and solubility properties of human plasma apolipoprotein B. Biochemistry 1982;21:4503-4511.
- 58.- Lane,D. 1989. Antibodies. A laboratory manual. Ed. Harlow. USA. 1-20,50-65,104-129.

59.- Determination of apolipoprotein B (Apo-B) in plasma by radioimmunoassay. Manual de Laboratorio, Laboratorio Central de Lípidos del Departamento de Medicina del Colegio de Medicina de Baylor. Aric protocol B. Lipid and lipoprotein determinations. Version 1.0. 1987. 46-50 .

60.- Bedolla, N., A. Ulloa-Aguirre., J. Landeros. y G. Pérez-Palacios. Analisis de datos y control de calidad en el Radioinmunoanálisis. I. Guia para la evaluación de resultados. Rev Invest Clin (Méx.) 1984;36:179-192.

61.- Steel, J.C.H. Jr. and J.A. Reynolds. Characterization of the lipoprotein B polypeptide of human plasma Low Density Lipoprotein in detergent and denaturant solutions. J Biol Chem 1979;254:1633-1638.

62.- Gotto, A.M., W.V. Brown., R.I. Levy., E. Birnbaumer. and D.S. Fredrickson. Evidence for the identity of the major apoprotein in LDL and VLDL in normal subjects and patients with Familial Hyper Lipoproteinemia. J Clin Invest 1972;51:1486-1494.

IX. APENDICE A.

REACTIVOS.

Se obtuvieron los siguientes reactivos del Laboratorio Baker Analyzed: Acido etilendiaminotetracético (EDTA), carbonato de sodio anhidro, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio decahidratado, sulfato de cobre pentahidratado, tartrato de sodio, glicerol, metanol, ácido acético, fosfato monobásico, dibásico y tribásico así como agarosa y ácido tricloroacético.

Del Laboratorio Merck se obtuvo: solución de cloruro de sodio al 0.9%, bromuro de potasio, acrilamida y bisacrilamida.

Del Laboratorio Sigma Chemical Company se compró: albumina sérica bovina, Tris, duodecil sulfato de sodio (SDS), persulfato de amonio, N-N-N'N' tetrametil etilen diamina (TEMED), barbital sodíco base, folin ciocalteu, azul de bromofenol y glicina).

Del Laboratorio Pharmacia Fine Chemical se obtuvo: Sephadex G-150 y Sepharosa 6B.

Del Laboratorio ICN se compró: azul brillante de Coomassie, ¹²⁵I y cloramina T.

Del Laboratorio Mallinckrodt se obtuvo: Metabisulfito de sodio.

SOLUCIONES

1.-TECNICA DE LOWRY (50).

Solución A 20 gr de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) disolverlo en NaOH 0.1N hasta 1 litro.
Molaridad final 0.188.

ó
53.965gr de bicarbonato de sodio con 10
moléculas de agua ($\text{NaHCO}_3 + 10 \text{H}_2\text{O}$) +
4.0 gr NaOH
Disolverlos en agua y aforar a un litro.
Guardar a temperatura ambiente.

Solución B 0.5 gr de sulfato de cobre pentahidratado
($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) +
1.0 gr de tartato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Disolver primero el sulfato de cobre en
agua y agregar el tartato de sodio.
aforar a 100 ml. Guardar a 4°C

Solución C 1ml sol A + 0.02 ml de B

ASB 1mg/ml

En todas las soluciones se utilizó agua destilada y desionizada.

2.-ELECTROFORESIS POR EL METODO DE LAMMLI (50).

Solución A Acrilamida al 30 % p/v + bisacrilamida 0.8% p/v
Se filtra y guarda a 4°C.

Solución B Tris - HCl 1.5 M. pH = 8.8.
Guardar a 4°C

Solución C Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %.
Guardar a temperatura ambiente

Solución D Tris - HCl 0.5 M. pH 6.8.
Guardar a 4°C.

Persulfato de amonio (PSA). (15 mg / ml).

TEMED.

Agua destilada y desionizada.

Glicerol.

a) Preparación del gel.

La proporción de cada solución para elaborar el gel se obtiene de la siguiente manera :

Solución A El porcentaje que se desee de acuerdo al
volumen final.

Solución B La cuarta parte del volumen final.

Solución C 1% del volumen total

PSA (15 mg/ml)

TEMED La cantidad óptima de estos dos elementos
necesita ser predeterminada.

H₂O La cantidad necesaria para ajustar el volumen
requerido

Glicerol En algunos casos la diferencia de densidad de
O. sacarosa acrilamida puede ser suficiente para formar un
buen gradiente. Si la diferencia es menor del
10% se recomienda agregar un 5 o 10 % de
sacarosa a la solución con concentración menor.

b) Amortiguador de muestra

sol D	0.625 ml
sol C	1.0 ml
Beta Mercaptoetanol	0.25 ml
1% Azul de Bromofenol	0.10 ml
Glicerol	0.525 ml

c) Amortiguador de corrida 5x.

250.0 mM	TRIS - HCl	30.0 gr
1.92 M	Glicina	144.0 gr
0.5%	SDS	5.0 gr
pH		8.3.

Preparación:

Disolver el TRIS y la Glicina en 800 ml de agua. Aparte disolver el SDS en 100 ml de agua. Combinar todo y ajustar el pH a 8.3 con HCl. Hacer una dilución 1:5 antes de utilizarlo.

3.-TINCION CON AZUL BRILLANTE DE COOMASIE.

-Solucion colorante.

Disolver 2.5g de Azul Brillante de Coomasie en 400 ml de metanol, filtrarlo, llevar a 450 el filtrado con metanol, agregar 100 ml de ácido acético, aforar a un litro con agua.

4.-INMUNIDIFUSION.

-Amortiguador de fosfatos 0.01M (PBS).

Disolver 0.01M de fosfato mono, di ó tribásico, en 900ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.1 con HCL y aforar a un litro con agua destilada.

-Placas de inmunodifusión

Se preparó un gel de agarosa al 0.7% de la siguiente manera: de acuerdo al volumen final se pesó la cantidad necesaria de agarosa y se agregó PBS, en cantidad suficiente, se introdujo una barra magnética para agitarlo y se marcó el nivel al que llegó el agua, se mantuvo a una temperatura elevada (70-80°C), sin que llegara a hervir y en agitación constante hasta que la mezcla quedó completamente transparente y sin grumos. Finalmente se retiró la barra magnética y se aforó al volumen original con agua destilada y desionizada se mezcló nuevamente y sin dejarla enfriar se repartieron 10 ml en cajas petri de 12cm de diámetro x 1cm de alto y se dejaron enfriar hasta que el gel estuvo formado. Se guardaron a 4°C.

5.- RADIOINMUNOANALISIS.

a) Amortiguador de Barbitol sodico 0.05mM.

- Barbitol sodico 0.05mM
- EDTA 1mM.
- pH = 8.6

Pesar 10.31 g de Barbitol sódico (PM. 206.2 g/l), 0.372 g de EDTA (PM. 372.25 g/l). Disolver primero el Barbitol y después el EDTA. finalmente ajustar el pH a 8.6. Guardar a 4°C

De la misma manera que el amortiguador de fosfatos anteriormente descrito se prepararon los siguientes amortiguadores variando la concentración y el pH.

- b) Amortiguador de fosfatos 0.05M pH 7.5.
- c) Amortiguador de fosfatos 0.5M pH 7.5.

X. APENDICE B

1.- Obtención de los pesos moleculares de las proteínas en la electroforesis por medio del RF.

A) Se obtuvieron los logaritmos de los pesos moleculares de los estándares.

B) Se calculó el RF de cada uno por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Distancia de migración de la proteína}}{\text{distancia de migración del indicador}} = \text{RF.}$$

C) Se graficó el logaritmo del peso molecular del estándar en función de su RF.

D) Se linealizó la recta por medio de mínimos cuadrados y se obtuvieron los valores de la recta m, b, y el coeficiente de correlación r.

E) Se sustituyeron los valores RF de las proteínas desconocidas en la fórmula

$$\log Y = M(X) + B$$

F) Finalmente se obtuvo el antilogaritmo de Y y este fue el peso molecular de la proteína.

2.- Preparación del antígeno forma 2.

Para preparar la forma 2 del antígeno, se utilizó una placa de gel de poliacrilamida al 5%, con un gel concentrador de 3.3% que solo ocupaba 4 ó 5 mm de la parte superior.

Al volumen ocupado por 1 mg de la LDL se le agregó un volumen igual de amortiguador de muestra y se agitó. Se calentó durante 5 minutos y se centrifugó a baja velocidad durante 5 minutos. Se colocó en la parte superior del gel y se corrió la electroforesis a 120 v, dejando salir el frente durante 1 hr más para que la proteína penetrara hasta la mitad del gel, (aproximadamente 2 hr en total).

La proteína se fijó con una solución de metanol-ácido-acético-agua (45%-10%-45%), durante toda la noche en agitación constante. Se cortaron dos tiras de 0.5 cm, una de cada lado del gel, se marcaron para identificarlas posteriormente y se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie. El resto del gel y las tiras teñidas se pasaron a una solución de NaCl 0.9% durante un mínimo de 1 hr en agitación y se hizo al menos un cambio de la solución. Esto se hizo con el objetivo de eliminar del gel el exceso de ácido acético ya que la proteína se inoculó junto con el gel y podría lastimar a los conejos.

Las tiras se colocaron junto al resto del gel en el mismo lugar de donde se cortaron utilizando como referencia las marcas de cada una y de esta manera se podía ver la orientación y la altura a la que la proteína había corrido. El gel se cortó a 0.5 cm de los límites de la banda de proteína (FIG.7). Esta banda de gel se cortó en pedacitos con una navaja y se introdujo por la parte posterior de una jeringa

sin embolo, después se inserto el embolo y se aspiró 1 ml de solución salina NaCl 0.9%. Y se hizo pasar por una aguja del número 18 varias veces hasta que pasó con facilidad posteriormente por agujas del no. 19, 20 y 21, hasta que pasó suavemente. El volumen final de ésta emulsión no pasó de 3ml.

3.- Sangría de cosecha.

Para realizar la punción cardiaca se sujetó al animal en una plancha de restricción. Posteriormente se hizo una punción en el corazón, una vez ubicada la aguja en el sitio donde se extraía sangre se fijó y se procedio a obtener toda la sangre posible.

4.- Marcación de proteínas por el método de cloramina T.

Se hidrató la cantidad necesaria de Sephadex G-50 con amortiguador de barbital 0.05M para una columna de 30cm de largo x 0.9 de diametro. La columna se desgasificó y empacó. Para equilibrarla se utilizaron aproximadamente 100 ml del mismo amortiguador.

En un tubo de ensaye se colocó un volumen equivalente a 1 mCi de ¹²⁵I, se agregaron 30 ug de LDL y 30 ul de amortiguador de fosfatos 0.5M y finalmente se agregaron 10 ul de cloramina-T de una solución con 0.44ug/ul en amortiguador de fosfatos 0.05M. Se mezcó bien y se esperaron 3 minutos, inmediatamente se agregaron 5ul de una solución de metabisulfito de sodio de (1.33ug/ul), en amortiguador de fosfatos 0.05M, para detener la reacción finalmente se agregaron 500 ul de amortiguador de barbital y se agitó.

Se cargo la muestra en la columna previamente empacada y equilibrada y se eluyó con amortiguador de barbital. Se colectaron 80 fracciones de 1 ml cada una y se contaron por 0.1 min en el contador gamma los resultados obtenidos en cuentas por minuto (CPM) se graficaron contra el numero de fracciones (FIG.20) y se hizo un pool con las fracciones superiores del primer pico.

5.- Autorradiografía.

En una placa de 3.5 x 8.3cm se preparó un gel de de electroforésis al 5%, en el cual se colocaron las siguientes muestras en carriles separados: 100000 del pico 1, 100000 cpm del pico 2 y 15 ug del estándar no marcado. La electroforésis se corrió a 60 volts durante 15 minutos y a 90 volts por una hora finalmente se fijó el gel en una solución de 45% metanol y 10% ácido acético. Se tiñó durante dos horas con azul de Coomassie a 40°C durante 45 minutos y se destiño con la misma solución de fijado. Finalmente se seco. Este gel se colocó sobre una placa fotosensible en un cuarto oscuro, se fijo con cinta adhesiva y se colocó entre dos planchas de aluminio que lo protegían perfectamente de la luz, se mantuvo a -70°C durante 6 hr aproximadamente. Posteriormente se procedió a revelar la placa.

Finalmente tenemos el gel teñido con azul de Coomassie que nos muestra la posición de la proteína no marcada y debajo del gel tenemos la placa fotosensible que al ser revelada nos muestra la posición a la que corrió la proteína marcada. Idealmente estas dos posiciones deben ser las mismas ya que la alícuota de proteína que se

muestra en el gel es la misma que la proteína que se marcó.

Con esta técnica se puede determinar si la proteína se marcó y si corresponde a la Apo B-100 de la LDL.

6.- Precipitación de la proteína marcada.

Al precipitar una alícuota del pool obtenido con las fracciones superiores de dicho pico se obtuvo el porcentaje de proteína que contenía. La precipitación se hizo de la siguiente manera:

Se contaron 10 ul de ese pool durante 1 min en el contador de rayos gamma. Se agregaron 200 ul de ABS 10% y 2 ml de ácido tricloroacético frío se agitó e incubó durante 10 min, a 4°C, y se centrifugó durante 11 min a 12500rpm (15760g), se decantó el sobrenadante y se contó precipitado y sobrenadante durante 1 min. Con estos valores se obtuvo el porcentaje de proteína que contenía el pool, por ejemplo:

tubo con 10 ul de la marca = 619184.5cpm
 precipitado = 520115cpm = 84% del total
 sobrenadante = 99069.5cpm = 16 % del total

Por lo tanto de las cpm de la alícuota del pool obtenido 84% de ellas contenían la proteína marcada.

7.- Purificación de la proteína marcada.

Se hidrató el gel de Separosa 6B en amortiguador de barbital 0.5M con ASB 2% se desgasificó y empacó en una columna de 30 cm de largo x 1.6 de diámetro. La columna se equilibró con 100ml del mismo amortiguador. Se cargó el volumen necesario del pool en la columna y se eluyó. Se colectaron 80 fracciones de 1.5 min cada una (aproximadamente 900ul), se contaron por 0.1min en el contador de rayos gamma, se hizo un pool con el primer pico y se mezcló bien.

8.- Análisis Logit- log.

En este análisis para cada uno de los triplicados se encuentra un valor Y de la siguiente manera

$$Y = 100 - \frac{U - UNE}{U_0 - UNE}$$

En donde :

U = radiactividad unida presente en el tubo.
 UNE = promedio de los valores de radiactividad en los tubos para unión no específica
 U₀ = Promedio de los valores de unión máxima (0 estándar)

Posteriormente se obtiene el valor Logit Y :

$$\ln \frac{Y}{100-Y}$$

La gráfica se construye poniendo el Logit Y para cada valor en función del logaritmo de la concentración y se obtiene la linearización por mínimos cuadrados, resultando los valores de pendiente (a), intercepto Y (b) y coeficiente de correlación (r).