



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE ANTICUERPOS CONTRA
APOLIPOPROTEINA A-I Y SU EMPLEO EN
RADIOINMUNOANALISIS

T E S I S

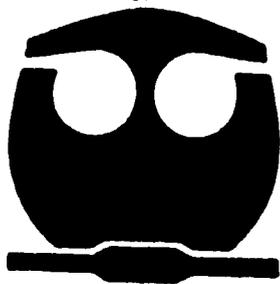
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MAYELA REBECA DORREGO ALMAGUER

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. JOSE ZAMORA GONZALEZ



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

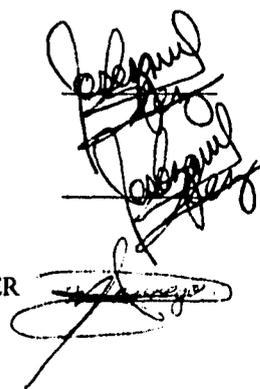
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Presidente	Prof. LAURA PENICHE VILLALPANDO
Vocal	Prof. JOSE ZAMORA GONZALEZ
Secretario	Prof. GRACIELA NAVA DIAZ
1er. Suplente	Prof. FERNANDO GARCIA TAMAYO
2do. Suplente	Prof. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS

**Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Endocrinología del Instituto
Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"**

Asesor	Q.F.B. JOSE ZAMORA GONZALEZ
Supervisor Técnico	Q.F.B. JOSE ZAMORA GONZALEZ
Sustentante	MAYELA REBECA DORREGO ALMAGUER

Handwritten signatures in black ink, corresponding to the names listed in the table. The signatures are written over the printed names of Jose Zamora Gonzalez and Mayela Rebeca Dorrego Almaguer.

Los hombres de carácter son infinitamente más raros que los de talento. El talento puede no ser más que un don de la naturaleza; el carácter es el resultado de mil victorias logradas por el hombre sobre sí mismo.

El talento es una cualidad, el carácter una virtud.

Fénelon (1651-1715)

Sacerdote y escritor francés

DEDICATORIA

A mis padres:

Irving y Maye quienes juntos lograron hacer de mi una persona llena de ilusiones y de metas por cumplir. Un ser humano que lleva dentro de si un sin fin de valores que ustedes me enseñaron. Hoy se concreta una meta que fijamos juntos muchas gracias por su guía y apoyos.

LOS QUIERO MUCHO

A mis hermanos:

Irving e Itzel con todo mi cariño.

Esperando ser siempre para ustedes un buen ejemplo

AGRADECIMIENTOS:

Le doy gracias a Dios por siempre guiar mi camino y por poner siempre en él personas que me han brindado tanto cariño y apoyo.

Mil gracias siempre José por tu paciencia, apoyo y enseñanzas, no sólo por la elaboración de éste trabajo si no por todo lo que personas como tú son capaces de aportar a la gente que les rodea.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Posadas R. por darme la gran oportunidad de trabajar a lado del gran equipo de colaboradores que usted ha formado.

Muchas gracias al Biol. Guillermo Cardoso por abrirme las puertas del laboratorio de endocrinología por tu guía y tus enseñanzas.

Decir gracias Luis es poco para alguien que como tú me apoyo y me ha tenido fé desde el inicio del camino sin ti jamas hubiera logrado llegar al final. Estoy en deuda contigo.

*Mi especial agradecimiento a Sagrario quien me ha aportado tantas cosas bellas.
Gracias por todo lo que me has enseñado pero sobre todo gracias por ser tan buena
compañera.*

*Gracias a mis amigas y compañeras Elena, Carmen, Cynthia y Laura sin ustedes la
vida en la facultad no hubiera sido tan llevadera. Mi cariño para ustedes siempre.*

*A mis amigos de toda la vida Delia, Sandra, Aida, Victor Hugo, Enrique y
Alejandro mi agradecimiento por apoyarme en todo momento, por su cariño, y la alegría
que le han dado a mi vida.*

Muchas gracias Sra Chela por sus palabras de aliento por su cariño y comprensión

Gracias Narda por todo tu apoyo y por saber entenderme y escucharme.

INDICE

CAPITULO I

RESUMEN.....	1
GENERALIDADES.....	3
Estructura y composición de las lipoproteínas.....	4
Clasificación y características físicoquímicas de las lipoproteínas.....	6
Principales apolipoproteínas.....	7
INTRODUCCION.....	8
Composición de las HDL.....	8
Clasificación de las HDL.....	9
Metabolismo de las HDL.....	10
Apo A-I: Estructura y síntesis.....	15
ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS.....	16
Factores que afectan las concentraciones de C-HDL y de APO A-I.....	19
Metodos para la determinación de apo A-I.....	20
Radioinmunoanálisis.....	21
Electroinmunoensayo.....	26
Inmunodifusión Radial Simple y Doble.....	27
ELISA.....	30
Inmunonefelometría.....	32
RESPUESTA INMUNE.....	32
Fases de respuesta primaria y secundaria.....	36
Consideraciones en la preparación de un antígeno.....	39
Elección del animal.....	39
Dosis del antígeno.....	44

CAPITULO II

HIPOTESIS.....	44
OBJETIVO.....	45
MATERIAL Y METODOS.....	46
Preparación del estándar.....	46
Esquema de inmunización.....	48
Marcación y purificación de la apo A-I.....	49
Título del anticuerpo.....	50
Pruebas de especificidad del anticuerpo.....	51
Radioinmunoanálisis.....	51
Pruebas de reproducibilidad, exactitud y sensibilidad del método RIA.....	51

CAPITULO III

RESULTADOS.....	53
DISCUSION	69

CAPITULO IV

BIBLIOGRAFIA.....	75
APENDICE.....	81

RESUMEN

La apolipoproteína A-I (Apo A-I) es el componente proteico principal de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), sus funciones son estructurales, como cofactor de la enzima lecitin colesterol acil transferasa (LCAT) y ligando de receptor de apo A-I en hepatocitos. En base a lo anterior se considera que juega un papel importante en el metabolismo de las lipoproteínas. Diversos estudios epidemiológicos, sugieren que las apoproteínas A-I y B son mejores indicadores de riesgo cardiovascular que los niveles de lípidos y las lipoproteínas por lo que se hace necesario cuantificar las concentraciones de estas apoproteínas. El estándar de apo A-I se obtuvo de plasma de sujetos normolipidémicos sanos. Las HDL fueron separadas del resto de las lipoproteínas por ultracentrifugación secuencial preparativa, posteriormente fueron deslipidadas y sometidas a una cromatografía de exclusión. La caracterización de la Apo A-I se hizo en base a sus características inmunológicas y electroforéticas. Una vez obtenida la apo A-I pura se utilizó como inmunógeno para la obtención de anticuerpos en conejos de la raza Nueva Zelanda menores de 2 años. La inmunización fue intradérmica y multisitial con tres refuerzos cada 28 días con las mismas características del primer inoculo, 10 días después de cada refuerzo se hizo una sangría de prueba para monitorear el título del anticuerpo por el método de inmunodifusión radial, la sangría de cosecha se realizó por punción cardíaca. La apo A-I fue marcada con I^{125} por el método de cloramina T y posteriormente purificada por filtración en gel. La sensibilidad del anticuerpo se determinó por el método de radionmunoanálisis donde una dilución 1:10,000 del antisuero desplaza 50% de unión de la marca, la cual fue

considerada como óptima para llevar la cuantificación de apo A-I por el método de radioinmunoanálisis. La especificidad del anticuerpo se desarrolló mediante pruebas cruzada contra concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas de lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas ricas en triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad y plasma total; el anticuerpo solo reconoce a las lipoproteínas que contienen apo A-I. La sensibilidad del método implementado fue de 0.25 ng; el intervalo de ensayo fue de 5 a 250 ng; la precisión evaluada como coeficiente de variación fue de 3.08% y de 6.1% intraanálisis e interanálisis respectivamente; la exactitud en función del porcentaje de recuperación fue en promedio de 101.4%. Los resultados obtenidos en una misma muestra son similares a los registrados con un método comercial ($r=0.99$). Las concentraciones de apo A-I y del colesterol de HDL se asociaron directa y significativamente ($p<0.001$). Con todo lo anterior se concluye que el método de RIA descrito, es relativamente sencillo, práctico y, cumple con los requisitos de sensibilidad, precisión, exactitud y especificidad para una medición confiable de la apo A-I en plasma humano.

GENERALIDADES

Las lipoproteínas son partículas pseudomicelares solubles en agua, formadas por lípidos (triglicéridos, colesterol y fosfolípidos) y proteínas específicas llamadas apolipoproteínas. La estructura de éstas macromoléculas está sujeta a cambios composicionales constantes, los que son consecuencia de las interacciones entre ellas, así como, con las enzimas y los receptores. Además, existe un ingreso hacia el plasma continuo de partículas nacientes y una remoción constante de partículas viejas. Estos movimientos dan como resultado una gran heterogeneidad en las moléculas de lipoproteínas.

La función primordial de las lipoproteínas es el transporte de lípidos, este sistema permite hacer llegar las moléculas de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos a los tejidos de manera específica. Por otra parte, los triglicéridos que están contenidos en las lipoproteínas también pueden ser hidrolizados a ácidos grasos libres los cuales son transportados en el plasma unidos de forma no covalente con la albúmina, si bien esta forma de transporte no posee el alto grado de especificidad que tienen las lipoproteínas, ambas proveen al organismo un sistema versátil de movilizar sustratos para el metabolismo energético.

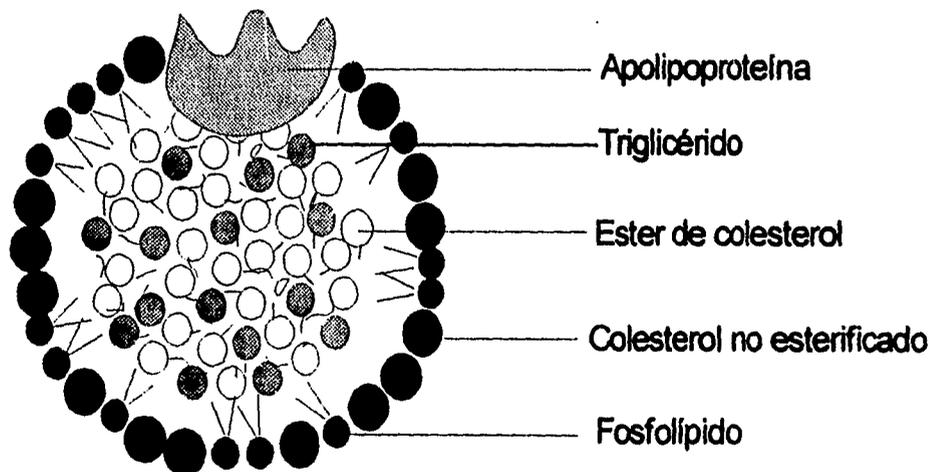
El colesterol es otra de las moléculas transportadas por las lipoproteínas, aún cuando no es utilizado para producir energía, desempeña funciones importantes como componente estructural de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas y ácidos biliares.

Los fosfolípidos, la tercera variedad de lípidos contenidos en las lipoproteínas, también son transportados hacia los tejidos en los que forma parte de las membranas celulares y subcelulares además desempeña un papel fundamental al formar parte de la estructura de las lipoproteínas y/o proporcioná el sustrato necesario para la acción de la enzima encargada de la esterificación del colesterol en el plasma la lecitin acil colesterol transferasa (LCAT)⁽¹⁾.

ESTRUCTURA DE UNA LIPOPROTEINA

Figura 1

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA DE UNA LIPOPROTEINA



Las lipoproteínas pueden ser transportadas en el organismo, debido a su organización estructural, esta se muestra en la figura 1 ya que los componentes no polares o sea los insolubles en agua (ésteres de colesterol y triglicéridos) se encuentran en la parte central de la molécula, las moléculas anfipáticas como los fosfolípidos, las

apolipoproteínas y el colesterol libre exponen sus regiones hidrofílicas hacia la parte externa de la partícula dándole solubilidad a esta, la región hidrofóbica de estas moléculas es dirigida al núcleo de la lipoproteína. Cada una de las lipoproteínas posee una o más subunidades proteicas denominadas apoproteínas estas tienen varias regiones helicoidales con zonas polares y no polares. La función de la apoproteína es principalmente estructural pero algunas de ellas son reconocidas por receptores específicos y/o funcionar como cofactor de las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas.

CLASIFICACION:

Las lipoproteínas pueden ser separadas del plasma en base a sus características fisicoquímicas como densidad, tamaño, carga y contenido de apolipoproteínas. El contenido relativo de lípidos y proteínas determinan la densidad, lo que permite la separación por ultracentrifugación, en base a su índice de flotación, las lipoproteínas han sido clasificadas en: quilomicrones (Qm), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Estas difieren entre sí en tamaño, composición y función. La tabla 1 muestra el lugar de síntesis y las características de las principales lipoproteínas.

Existen principalmente 10 apoproteínas contenidas en las diferentes lipoproteínas, en la tabla 2 se anotan estas apoproteínas, así como, las lipoproteínas que las contienen y sus funciones.

Tabla 1

CARACTERISTICAS DE LAS LIPOPROTEINAS

Nombre	Origen o formación	Densidad (g/ml)	Peso Molecular (Kd)	Tamaño (nm)
Qm	Intestino delgado	0.93	400,000	80-100
VLDL	Hígado	0.93-1.006	10,000-80,000	30-80
IDL	Catabolismo de las VLDL	1.006-1.019	5,000-10,000	25-30
LDL	Catabolismo de las IDL	1.019-1.063	2,300	19-25
HDL	Hígado e intestino delgado	1.063-1.210	175-360	7-10

Tabla 2

PRINCIPALES APOPROTEINAS EN EL PLASMA HUMANO

Nombre	Lipoproteínas	Peso Molecular (Kd)	Función
Apo A-I	HDL, Qm	28,000	<ul style="list-style-type: none"> • Componente estructural de HDL. • Cofactor para la LCAT. • Interacción específica con el receptor en el hígado. • Eleva la actividad fibrinolítica.
Apo A-II	HDL	16,000	<ul style="list-style-type: none"> • Componente estructural de la HDL. • Posiblemente esté involucrada en la modulación de las lipasas lipoproteíca y hepática.
Apo A-IV	HDL, VLDL, Qm	46,000	<ul style="list-style-type: none"> • Componente estructural. • Modula la actividad de la lipasa lipoprotéica.
Apo B-100	LDL, VLDL, IDL	550,000	<ul style="list-style-type: none"> • Interacción con receptor en hígado. • Importante en el transporte de triglicéridos fuera del hígado.
Apo B-48	Qm	250,000	<ul style="list-style-type: none"> • Importante en el transporte de triglicéridos fuera del intestino.
Apo C-I	HDL, Qm, VLDL	6,000	<ul style="list-style-type: none"> • Contiene elementos estructurales para activar la LCAT.
Apo C-II	HDL, Qm, VLDL	7,000	<ul style="list-style-type: none"> • Activador de la lipasa lipoprotéica.
Apo C-III	HDL, Qm, VLDL	7,000	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la lipasa lipoprotéica. • Posiblemente modula la captación de triglicéridos en los remanentes por los receptores hepáticos.
Apo D	HDL, Qm	21,000	<ul style="list-style-type: none"> • Posiblemente interviene en el intercambio de ésteres de colesterol.
Apo E	HDL, VLDL, Qm	34,000	<ul style="list-style-type: none"> • Interacciona con su receptor en el hígado para la captación de colesterol intra y extrahepático

Gerd Schmitz, Elke Williamson. High-density lipoprotein, metabolism, reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology*, 1991, 2:177-189

INTRODUCCION

LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD

Las lipoproteínas de alta densidad son complejos esféricos compuestos por un 50% de proteína y un 50% de lípidos aproximadamente, sus principales componentes lipídicos y protéicos se observan en la tabla 3.

Tabla 3

COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD

Componente	Peso Molecular (Da)	% peso
Lípidos		50
Colesterol	386	3-5
Esteres de colesterol	490-680	15-20
Fosfolípidos	850-1,100	26-32
Triglicéridos	800-1,000	2-7
Proteínas	(Da)	50
Apoproteína A-I	28,000	32.5
Apoproteína A-II	16,000	5
Apoproteína A-IV	46,000	trazas
Apoproteína C-I	6,000	5-7.5
Apoproteína C-II	7,000	trazaa
Apoproteína C-III	7,000	trazas
Apoproteína E	34,000	2
Apoproteína D	21,000	trazas

David I. Silverman, Geoffrey S. High-density lipoprotein Subfracctions. The American Journal of Medicine 1993;9:636-643

Las lipoproteínas de alta densidad se encuentran principalmente en un intervalo de densidad de 1.063 g/ml a 1.210 g/ml, aunque existen HDL enriquecidas con apo E denominadas HDL₁ con densidades inferiores a 1.063 g/ml⁽⁴⁾. Las HDL han sido

separadas en base a su densidad y tamaño por ultracentrifugación zonal, vertical⁽⁶⁾, por precipitación ión selectiva⁽⁶⁾ o electroforésis en gradiente de gel de poliacrilamida^(5,7). Mas recientemente las HDL se han clasificado en base a su composición de apoproteínas^(8,9), las partículas que contienen apo A-I pueden ser separadas por cromatografía de inmunofinidad o electroinmunoensayo en dos subclases las que contienen solo apo A-I (LpA-I) y en las lipoproteínas que presentan apo A-I y apo A-II (LpA-I:A-II). En la tabla 4 se muestran las diferentes subpoblaciones de las HDL separadas por su densidad, tamaño o contenido de apoproteínas.

Tabla 4

SUBFRACCIONES DE HDL

Densidad (g/ml)	Ultracentrifugación		EGG	CIA
	Vertical	Zonal		
1.041-1.09	HDL ₁	HDL ₁		
1.063-1.125	HDL ₂	HDL ₂	HDL _{2b}	LpA-I
			HDL _{2a}	LpA-I:A-II
1.125-1-210	HDL ₃	HDL ₃	HDL _{3a}	LpA-I
			HDL _{3b}	
			HDL _{3c}	LpA-I:A-II

EGG=electroforésis en gradiente de gel de poliacrilamida; CIA=cromatografía de inmunofinidad.

HDL₁ : Es una partícula rica en apo E y apo C, además tiene pequeñas cantidades de apoproteína A-I y A-II. Su diámetro es aproximadamente de 130 a 140 Å, tiene un núcleo central cuatro veces mayor que las HDL₂, su parte central está compuesta principalmente por ésteres de colesterol. De las partículas de HDL esta subfracción es la mas lgera ya que contiene mayor cantidad de colesterol libre y esterificado.

HDL₂ : Estas partículas se componen principalmente por la apoproteína A-I y A-II, tienen un diámetro aproximado de 80 a 100 Å; esta subfracción tiene una proporción mayor de ésteres de colesterol, colesterol no esterificado y fosfolípidos en relación a la subclase mas pesada (HDL₃).

HDL₃ : El principal componente proteico de las HDL₃ son las apoproteínas A-I y A-II, su diámetro es de 70 a 75 Å; esta partícula tiene una mayor proporción de proteína en relación con los lípidos, lo que implica una mayor densidad.

En general, se ha demostrado que el porcentaje de lípidos en las subclases de HDL se incrementa conforme la densidad disminuye. Las concentraciones relativas de colesterol libre y de fosfolípidos son mayores en las fracciones de menor densidad al compararse con las de mayor densidad.

METABOLISMO DE HDL

El metabolismo lipoprotéico tiene un componente exógeno que es el conjunto de procesos a través de los cuales el organismo utiliza los lípidos contenidos en la dieta, y una vía endógena que incluye el transporte, almacenamiento y utilización de los lípidos sintetizados en el organismo. El metabolismo de las HDL se puede observar en la figura 2 la cual es descrita a continuación.

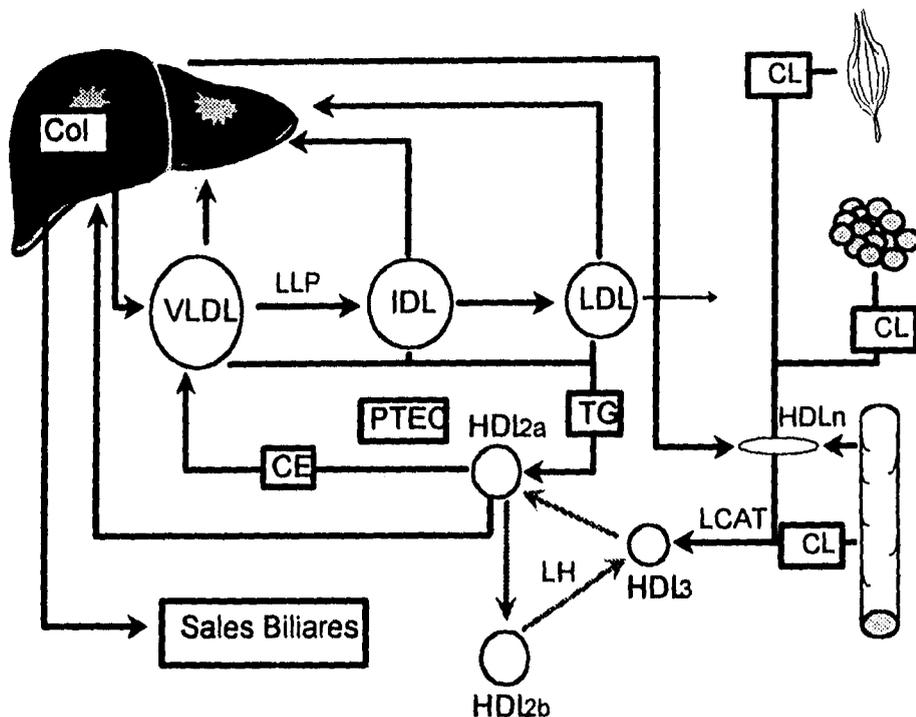
Los principales componentes protéicos de las HDL son la apo A-I y la apo A-II, la primera es sintetizada en el hígado y el intestino delgado y la apo A-II se sintetiza solamente en el hígado, ambas son secretadas con una bicapa de fosfolípidos con pequeñas cantidades de colesterol libre y la enzima LCAT cuya función es transferir el grupo acilo de la fosfatidilcolina al colesterol libre formando ésteres de colesterol.

Cuando estas lipoproteínas son secretadas de esta forma son llamadas HDL "nacientes" o discoides, estas captan el colesterol libre de las células periféricas o de las LDL para esterificarlo. De esta manera al enriquecerse de colesterol esterificado y este al ser insoluble en agua se almacena en la parte central de la partícula dando lugar así a la HDL₃, ésta subfracción es esférica y tiene una proporción más alta de proteína que de lípidos. Por otra parte se conoce que las HDL esféricas pueden ser secretadas por los hepatocitos o enterocitos indicando un ensamblaje intracelular⁽¹⁰⁾. Las HDL₃ van adquiriendo fosfolípidos, colesterol libre y componentes de superficie⁽⁴⁾ convirtiéndose así en una lipoproteína de menor densidad (HDL₂) la cual es rica en colesterol esterificado. Esta interacciona con las lipoproteínas ricas en triglicéridos (Qm, VLDL, IDL) a través de la glicoproteína hidrofóbica CETP (Proteína de transferencia de ésteres de colesterol) cuya función es mediar el intercambio de ésteres de colesterol y componentes de superficie quedando de esta manera como HDL₂ ricas en triglicéridos, siendo así un mejor sustrato para la acción de la lipasa hepática (cuya función es hidrolizar los triglicéridos contenidos en ella) y una vez que esto sucede esta partícula queda nuevamente transformada en HDL₃⁽¹⁰⁾. Las actividades de la LCAT y CETP son mediadas por la apolipoproteína A-I, lo cual sugiere que ésta apoproteína es la clave mediadora del transporte en reversa del colesterol⁽¹⁰⁾.

Las lipoproteínas de alta densidad están involucradas en diferentes procesos metabólicos tales como el transporte de lípidos, formación de ácidos biliares, proliferación de células y hormonas esteroideas.

Figura 2

METABOLISMO DE HDL



Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) han despertado gran interés debido a que en diversos estudios epidemiológicos se ha encontrado que existe una relación inversa, entre sus concentraciones y el riesgo de enfermedad arterosclerosa coronaria (EAC) y sus complicaciones.

La hipótesis para explicar la asociación inversa de HDL y EAC, es que éstas partículas tienen la capacidad de remover el colesterol de las células y este es reciclado desde las HDL al hígado en un proceso llamado transporte reverso del colesterol. Este transporte reverso se refiere a una serie de pasos metabólicos en los cuales el

colesterol libre de las células periféricas es transferido al espacio extracelular, para posteriormente ser esterificado.

El primer paso en este transporte reversa del colesterol es el eflujo de colesterol de las células periféricas hacia las HDL, del cual se han propuesto diferentes mecanismos.

El primer mecanismo es llamado Difusión Bidireccional del colesterol entre la membrana plasmática y el receptor HDL. El colesterol no esterificado de la célula puede migrar por difusión y ser captado por la HDL, este proceso es regulado por el tamaño y composición de la partícula⁽¹¹⁻¹²⁾.

El segundo mecanismo propuesto por Oram y colaboradores⁽¹³⁾ para el eflujo de colesterol, es que el colesterol de las células periféricas es captado por la HDL vía receptor, esto estimula la translocación de colesterol intracelular a la membrana plásmica donde puede este ser removido por la HDL.

El tercer mecanismo es la internalización y procesamiento extralisosomal. Durante este proceso las HDL pueden ser introducidos a la células tomar el colesterol libre de estos y subsecuentemente ser resecretada^(14,15). In vitro la HDL₃ es más eficiente en promover el eflujo de colesterol de las células que las HDL₂.

Una vez transferido el colesterol libre de las células periféricas a las HDL en estas lipoproteínas es esterificado y metabolizado de una manera directa o indirecta:

DIRECTA:

En donde las partículas de HDL son captadas directamente por el hígado, vía receptor de apo A-I o bien por la células del parenquima hepático las cuales pueden captar directamente a las HDL ricas en apo E para ser metabolizadas. Se ha establecido que

en el hígado la selección en la captación de ésteres de colesterol es restringida para las células del parenquima hepático, ya que en estas células los ésteres de colesterol provenientes de las HDL son más eficientes para la síntesis de los ácidos biliares que los ésteres de colesterol derivados de las LDL⁽¹⁶⁾.

INDIRECTA:

Es en donde estos ésteres de colesterol son transferidos a través de la proteína plasmática que transfiere ésteres de colesterol (CETP) a otras lipoproteínas ricas en triglicéridos como los son las VLDL, IDL, LDL y quilomicrones ya que las HDL intercambian su colesterol esterificado por colesterol libre o por triglicéridos. Estas lipoproteínas son captadas eventualmente por el hígado a través de los receptores de apo E y apo B en el hígado.

Otra hipótesis que se ha manejado para tratar de explicar el efecto protector de la HDL es la de evitar el daño oxidativo. En general es aceptado que la oxidación de las LDL juega un papel central en la iniciación del proceso de la arterosclerosis. La LDL oxidada (Ox-LDL) estimula la secreción de monocitos quimioattractantes por las células del endotelio. Mackenness y colaboradores⁽¹⁷⁾ demostraron el efecto protector de las HDL sobre la oxidación de las LDL, ya que la presencia de HDL en una mezcla incubada inhibe la peroxidación, sin embargo la HDL no previene la formación de dienos conjugados en la LDL, lo que sugiere que la función protectora de la HDL sea a nivel de la cascada de peroxidación. Por otra parte se ha sugerido que el poder antioxidante de las HDL es mediado por la paraoxonasa, una enzima de la familia de las esterasas cuya actividad es similar a la fosfolipasa C y D⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. Se ha demostrado

que la paraoxonasa purificada es capaz de inhibir la generación de lípidos peroxidados en la LDL. La función de la paraoxonasa se desconoce hasta ahora, pero parece estar involucrada en la hidrólisis de fosfolípidos hidroperoxidados y con ello prevenir la acumulación de productos oxidados citotóxicos en la LDL.

APOLIPOPROTEINA A-I

La apolipoproteína A-I es el principal componente proteico de las HDL, ya que estas lipoproteínas se encuentra entre el 80 y el 90% de las concentraciones plasmáticas de apo A-I y el resto se encuentra en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL y sus remanentes).

La apo A-I se sintetiza en el hígado y en las células de la mucosa del intestino delgado, tiene una estructura α -helice formada por una cadena de aminoácidos con un peso molecular de 28,100 Da carece de cisteína e isoleucina^(1,19).

La apo A-I recién secretada aparece en el plasma como una lipoproteína de 249 aminoácidos, lentamente procesada hasta alcanzar un tamaño final de 243 aminoácidos. Su estructura consta de una serie repetida de 23 segmentos de aminoácidos, que adoptan una forma helicoidal, lo que constituye un elemento estructural crucial para la unión de lípidos⁽¹⁾.

La apo A-I se encuentra en la circulación en tres diferentes formas:

- a) En las partículas de HDL nacientes.
- b) En forma libre, ya que se han encontrado pequeñas cantidades de apo A-I en forma libre o asociadas con cantidades pequeñas de fosfolípidos en el plasma. La principal evidencia de la existencia de proteínas libres son reportadas en la secreción

de estas en orina⁽²⁰⁾ y otros fluidos corporales como lo es el fluido cerebro espinal⁽²¹⁾. Se ha demostrado que las apoproteínas A-I, A-II y E en forma libre tienen la capacidad de remover el colesterol libre de macrófagos en el ratón⁽²²⁾

c) Como componente de superficie de las lipoproteínas de origen exógeno, ya que estas lipoproteínas son sintetizadas en el intestino delgado, sitio en el cual también hay síntesis de apo A-I. El mecanismo por el cual o por los cuales la apo A-I es liberada a la circulación por estas lipoproteínas se desconoce⁽⁴⁾.

Importancia clínica y epidemiológica de la apoproteína A-I

En 1977 se realizó un estudio de seguimiento por 4 años en población adulta de ambos sexos, en el cual se demuestra que el mejor indicador de riesgo para la EAC fué el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y al analizar la incidencia de la enfermedad en sujetos con concentraciones de C-HDL inferiores a 35 mg/dl (hipoalfalipoproteinemia) y compararlos con aquellos que tenían cifras mayores a 65 mg/dl (hiperalfalipoproteinemia) encontraron que en ambos sexos los sujetos con C-HDL bajo mostraron una incidencia de 8 veces más al compararlos con los sujetos con C-HDL alto ($p < 0.001$). (RM (IC)⁽²³⁾

Desde entonces numerosos estudios han demostrado que las lipoproteínas de alta densidad se asocian de manera inversa con la enfermedad arterial coronaria (EAC) e infarto al miocardio (IM)⁽²⁴⁻²⁷⁾.

Recientemente, el programa Nacional de Educación del Colesterol se ha definido que una concentración de colesterol de HDL menor de 35 mg/dl es un factor de riesgo independiente para la EAC y que una cifra mayor o igual a 60 mg/dl es un factor

protector para la EAC⁽²⁸⁾ se ha demostrado que el incremento de 1 mg/dl en el colesterol de HDL, el riesgo de EAC disminuye aproximadamente de 2-3%^(23,29,30).

Algunos estudios indican que la medición de las concentraciones de las apoproteínas B y A-I son de mejor utilidad para identificar a pacientes con EAC que las concentraciones de colesterol de las lipoproteínas⁽³¹⁻³⁵⁾. Aunque algunos estudios clínicos muestran controversia acerca de que si las concentraciones de apo A-I puedan proveer una mayor información del riesgo para EAC que el que muestra el C-HDL⁽³⁶⁻³⁹⁾. Maceijko en 1983 encuentra que la apo A-I es mejor indicador de EAC valorada angiográficamente al compararlo con las cifras de C-HDL, ya que, el análisis discriminante mostró que la apo A-I tiene un margen de error de 12.9% en la clasificación del paciente en base a la ausencia o presencia de la enfermedad, en cambio el sesgo para el C-HDL fue de 21.3%⁽³⁸⁾.

En un estudio realizado en los descendientes de Framingham⁽⁴⁰⁾ encuentran que la prevalencia de EAC se asocia de manera inversa y significativa con las concentraciones de apo A-I y C-HDL en ambos sexos, lo que sugiere que ambos analitos A-I son buenos indicadores de EAC, tanto en hombres como en mujeres.

La apolipoproteína A-I como el componente estructural más importante de la HDL ha sido asociada con la resistencia a la aterosclerosis. El incremento en la tasa de producción de apo A-I causa elevados niveles de C-HDL y puede estar asociado con la protección de EAC prematura⁽⁴¹⁾. Estos resultados son consistentes con un estudio previo⁽⁴²⁾ en el cual a ratones se les inserta el gen de la apo A-I (transgénicos)

expresando concentraciones elevadas de apo A-I humana, resultando menos susceptibles a la aterogénesis inducida por dieta.

Stampfer⁽³⁹⁾ en un estudio prospectivo con cinco años de duración incluyó hombres entre los 40 y los 84 años, demuestra una asociación inversa entre el C-HDL y el infarto al miocardio, encontrando poco valor predictivo en las concentraciones de las apoproteínas A-I, A-II y B. Por el contrario en otro estudio⁽⁴²⁾ desarrollado en sujetos de ambos sexos las concentraciones de apo A-I, A-II pueden agregar información en la determinación del riesgo de infarto al miocardio.

En un esfuerzo para entender el posible mecanismo por el cual a bajas concentraciones de C-HDL no hay EAC en algunos individuos Rader y colaboradores⁽⁴⁴⁾ realizaron un estudio en cinco sujetos con muy bajos niveles de HDL, apo A-I y apo A-II pero sin evidencia de EAC prematura, en donde por medio de un estudio cinético con isotopos radioactivos reveló que la tasa de producción de apo A-I en los pacientes similar a la de los controles; sin embargo la tasa catabólica de esta proteína esta aumentada en los pacientes al compararse con los controles, esto pudiera estar indicando un eficiente transporte reversa de colesterol siendo este un posible mecanismo para la ausencia de EAC.

Por otro lado el incremento en la tasa de producción de apo A-I causa elevados niveles de C-HDL y puede ser asociado con la protección de la enfermedad arterial coronaria prematura⁽⁴⁰⁾.

El metabolismo de las HDL y sus subfracciones así como sus concentraciones están influenciadas por muchos factores ambientales en los cuales se encuentran dieta, peso, ejercicio, consumo de alcohol, hormonas y fármacos.

En la siguiente tabla se ilustra cómo influyen estos factores en las concentraciones de las subfracciones de HDL así como en la apo A-I.

Tabla 5

FACTORES QUE MODIFICAN LAS CONCENTRACIONES DEL C-HDL Y DE APO A-I

	HDL2	HDL3	Apo A-I
Consumo de alcohol ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾	↑	↑↑	↑
Estrogenos ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾	↑↑	↔	↑
Ejercicio ⁽⁵⁰⁻⁵³⁾	↑↑	↑	↑
Perdida de peso ^(54,55)	↓↓	↑	↑
↑ Dieta de colesterol ^(56,57)	↑↑	↔	↑
↑ Dieta en grasa saturada	↑↑	↔	↑
↑ Dieta de grasa poliinsaturada	↓↓	↔	↓
Farmacos ⁽³⁾			
Niacina	↑↑	↑	↑↑
Gemfibrozil	↑↑	↑	↑↑
Colestiramina	↑	↔	↑
Probucol	↓↓	↔	
Lovastatina	↔	↔	↑

↑↑=Aumento importante; ↓↓=Disminución importante; ↑=Aumento; ↓=Disminución; ↔=Sin cambio.

Recientemente hubo interesantes descubrimientos en la investigación sobre defectos genéticos que influyen en las concentraciones de C-HDL y de la apo A-I, estos datos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6

FACTORES GENETICOS QUE DISMINUYEN LAS CONCENTRACIONES DE C-HDL Y DE APO A-I

Defecto	C-HDL	Apo A-I	Característica
Deficiencia de la LCAT ⁽⁵⁸⁾	↓ ↓	↓ ↓	Presencia de complejos discoidales, Incremento en la tasa catabólica de apo A-I
Apo A-I milano ⁽⁵⁹⁾	↓ ↓	↓ ↓	Incremento en la tasa catabólica de apo A-I
Enfermedad de Tangier ⁽⁶⁰⁾	↓ ↓	↓ ↓	Incremento en la tasa catabólica de apo A-I

METODOS PARA LA CUANTIFICACION DE LAS APOLIPOPROTEINAS

Varios métodos han sido utilizados para la determinación de apolipoproteínas en plasma. En la actualidad, la cuantificación de apolipoproteínas no se realiza como un procedimiento clásico de rutina, debido en primer lugar a que no esta claro hasta qué punto esta información puede ser útil para el medico. No obstante, la determinación de apoproteínas se ha extendido como método de investigación, y se ha desarrollado la tecnología de los métodos empleados con tal finalidad. Algunos de estos estudios han dado ya resultados que apuntan hacia la posibilidad de que al menos unas cuantas apolipoproteínas resultan mejores discriminadores de riesgo de enfermedad aterosclerótica que otro lípidos u otras lipoproteínas. La mayoría de los métodos de cuantificación se basan en la identificación inmunológica de las apolipoproteínas los principales métodos son:

RADIOINMUNOANALISIS (RIA)

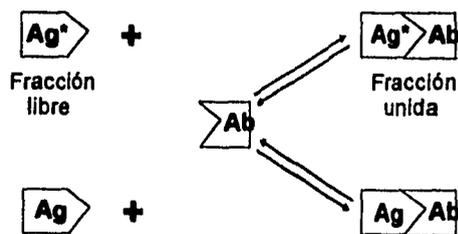
La técnica del radioinmunoensayo fue introducida a la medicina por los investigadores Berson y Yalow en 1956, quienes en 1960 publicaron por primera vez la descripción detallada de este método en relación con la determinación de insulina en el plasma humano. Con este método se demostró además que la reacción antígeno-anticuerpo podía servir de base para medir sustancias circulantes en el plasma. La base fundamental del método radioinmunológico es precisamente la reacción antígeno-anticuerpo, el antígeno marcado con un isótopo radioactivo se une al anticuerpo correspondiente dando lugar al complejo radiactivo antígeno-anticuerpo⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾.

RADIOINMUNOANALISIS COMPETITIVO

El RIA competitivo se basa en una reacción inmunológica de competencia entre dos antígenos uno marcado con un isótopo radioactivo y el otro no marcado buscando ambos la unión con el anticuerpo, como se muestra en la figura 3.

Figura 3

BASE TEORICA DEL RADIOINMUNOENSAYO COMPETITIVO

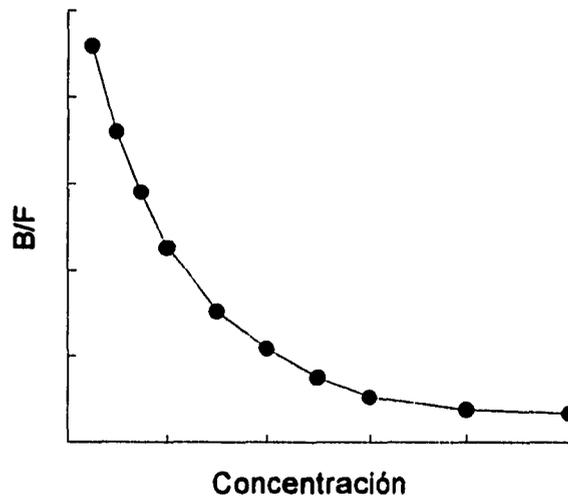


Si la concentración del anticuerpo es constante y si reconoce a los dos antígenos por igual. Se puede concluir que si aumenta la concentración de antígeno no marcado disminuirá la radiactividad del complejo antígeno-anticuerpo.

Por lo tanto, la relación o cociente de antígeno marcado (Ag^*) ligado al anticuerpo (B) y el antígeno libre (Ag) (F) va disminuyendo conforme va aumentando la concentración del antígeno no marcado (Ag) presente en el líquido biológico que se analiza quedando una curva como se muestra a continuación⁽⁶¹⁾.

Figura 4.

RELACION ENTRE B/F Y CONCENTRACION DE ANTIGENO NO MARCADO



Un bajo cociente de B/F significa que una pequeña cantidad de antígeno marcado se ha ligado al anticuerpo y por lo tanto una alta cantidad de antígeno no marcado está presente en la muestra. Un alto cociente B/F indica lo contrario.

La incubación del antígeno y el anticuerpo es un paso que asegura la estabilidad de todos los reactivos y permite alcanzar un equilibrio. La separación del antígeno unido

del libre cuando el equilibrio se ha alcanzado puede llevarse a cabo por medio de diferentes métodos de separación.

Métodos de separación:

En general los métodos de separación pueden ser una fuente de error en el método de radioinmunoanálisis. Estos distinguen entre el anticuerpo unido al antígeno y el antígeno libre, aunque no existe un método ideal, ya que cada uno tiene sus propias limitaciones. Los métodos incluyen cromatografía electroforética, filtración en gel, inmunoprecipitación, separación química, técnicas adsorbentes, separación de fase sólida y polimerización de anticuerpos. Aquí se describen los métodos más comúnmente utilizados para tal separación:

Inmunoprecipitación:

El método de inmunoprecipitación también es conocido como precipitación de doble anticuerpo. Involucra a un primer anticuerpo específico y un segundo anticuerpo menos específico, un anti-IgG el cual va dirigido al primer anticuerpo. Estos al unirse se precipitan formando un complejo inmunoglobulínico. Para separar este complejo se centrifuga, el sobrenadante se elimina y el precipitado representa el complejo unido antígeno-anticuerpo en el cual son determinadas las cuentas por minuto.

Al parecer esta es una simple técnica de separación pero puede tener muchas fuentes de error, como por ejemplo al evaluar el antígeno libre del unido no haciendo una buena centrifugación o al separar mal el sobrenadante. Por otro lado, el primer anticuerpo generalmente tiene una dilución muy grande (1:10), y la reacción con el segundo anticuerpo puede llevar muchos días para llegar al equilibrio, ya que al

agregar mas anticuerpo aumenta al concentración total de inmunoglobulinas. El tiempo que se requiere para que la reacción sea completa varia de acuerdo a la concentración de inmunoglobulinas, así como de la temperatura, osmolaridad y del pH o de los buffers, este se puede acelerar con una separación química como por ejemplo polietinilglicol.

Separación química:

Los métodos de separación química tambien dependen de la solubilidad de los complejos inmunes y del antígeno libre. Muchos sustancias químicas se usan para la separación tales como etanol, sulfito de sodio, sulfato de amonio y ácido tricloroacetico de estas sustancias la mas ampliamente usada es el polietinilglicol el cual puede ser usado solo o en combinación con un segundo anticuerpo. Este método puede ser empleado para determinar una gran variedad de hormonas.

Técnicas adsorbentes:

Las técnicas adsorbentes son capaces de separar pequeñas cantidades de antígenos libres de los complejos antígeno-anticuerpo con está técnica el precipitado contiene la fracción unida, y en el sobrenadante contiene fracción libre la cual es decantada y se evalua la radioactividad del precipitado. La concentración tanto de electrolitos como de proteínas puede afectar este método por interferir en la adsorción superficial. Como ejemplos de estos materiales adsorbentes esta el talco, sílica, resina, proteína A de Sthaphylococcus y celulosa.

Para determinar la concentración del antígeno de la muestra, la inhibición de la reacción inmunológica que dicho antígeno de muestra es comparada con la inhibición

obtenida por las soluciones estándar en una gráfica en la cual en el eje de las ordenadas se anota el porcentaje Ag radioactivo unido al Ac, y en el eje de las abcisas indica la concentración de antígeno no marcado en la muestra. Las curvas estándar obtenidas se pueden graficar en papel semilogaritmico y logit, estas curvas se muestran en la figura 5.

Los puntos de la curva estándar que quedan incluidos en la porción de la recta de la línea marcan los límites de medición del método para dicho antígeno.

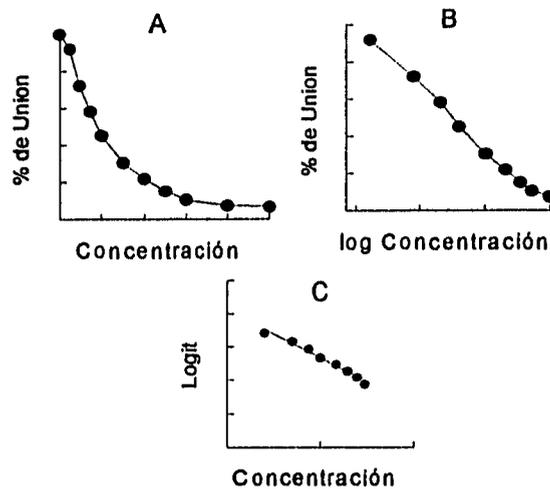
Dentro de las ventajas que tiene el uso del RIA para la determinación de la apolipoproteína están:

- 1.- Un alto grado de especificidad y una sensibilidad que permiten medir cantidades pequeñas de proteína.
- 2.- No se requiere de un gran volumen de muestra para su determinación (500 μ l son suficientes)
- 3.- La posibilidad de automatización del método.

Las desventajas en esta metodología es que requiere de equipo especial y costoso y produce residuos radiactivos. Además el marcaje puede lesionar al antígeno y acortar su vida media provocando con ello que el estándar marcado sea diferente del no marcado o de la muestra desconocida⁽⁶⁴⁾.

Figura 5

CURVAS ESTANDAR DEL RADIOINMUNOANALISIS:



Curvas estándar A) en papel aritmético; B) en papel semilogarítmico; C) en papel logit.

ELECTROINMUNOENSAYO

Este método ha sido de uso extenso y tiene la ventaja sobre el radioinmunoanálisis ya que no requiere el uso de componentes radioactivos. El antígeno es cuantificado por electroforesis en agarosa que contiene su correspondiente anticuerpo este proceso da como resultado un precipitado.

El antisuero es adicionado a la agarosa en una dilución adecuada. Generalmente la sensibilidad es grande a bajas concentraciones del anticuerpo, el dextrano polietilglicol puede ser incorporado al gel para incrementar la sensibilidad.

Las proteínas precipitadas, son teñidas y se cuantifican comparando los picos formados por la proteína purificada que se usa como estándar. Lo importante para

realizar este método es que las muestras y los estándares sean del mismo tamaño molecular y carga.⁽⁶⁴⁾

INMUNODIFUSION RADIAL:

Una de las observaciones sobre las reacciones antígeno-anticuerpo se refiere a la capacidad para precipitar cuando se combina en una proporción equivalente.

La inmunodifusión en gel constituye la base común de una gran variedad de técnicas que permiten realizar desde un análisis cualitativo de mezclas antigénicas hasta una estimación cuantitativa de un antígeno individual.

Si el antígeno reacciona con su anticuerpo específico formando un complejo. La precipitación ocurre en parte por la interacción entre las moléculas y esto es dependiente de su composición, naturaleza, concentración y proporción entre los antígenos y el anticuerpo.

Estas técnicas en geles sólo identifican cualitativamente los antígenos y los anticuerpos, pero mediante otra modificación, empleando la inmunodifusión radial simple, pueden convertirse en cuantitativas.

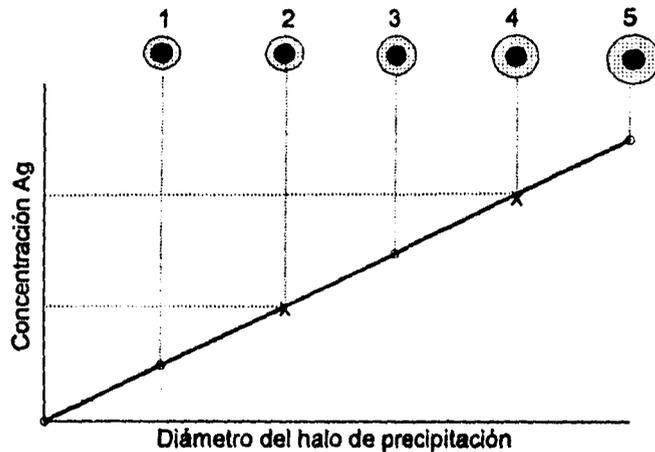
INMUNODIFUSION RADIAL SIMPLE

Se añade anticuerpo al gel dejándose solidificar se hacen pocillos en el agar, se vierte en ellos un volumen del estándar del antígeno en estudio a diferentes concentraciones. El antígeno se difunde hacia el interior de los pocillos para formar complejos solubles con el anticuerpo hasta que se alcanza un punto de equivalencia y los complejos se precipitan formando un anillo.

El area del anillo de precipitación, medida por el cuadrado del diametro del anillo, es proporcional a la concentración del antígeno. Los valores desconocidos se calculan por interpolación en la curva estándar figura 6. Todo el proceso puede invertirse para determinar las concentraciones de anticuerpo desconocidos⁽⁶⁵⁾.

Figura 6

CURVA ESTANDAR DE LOS ANILLOS DE PRECIPITACION



INMUNODIFUSION DOBLE

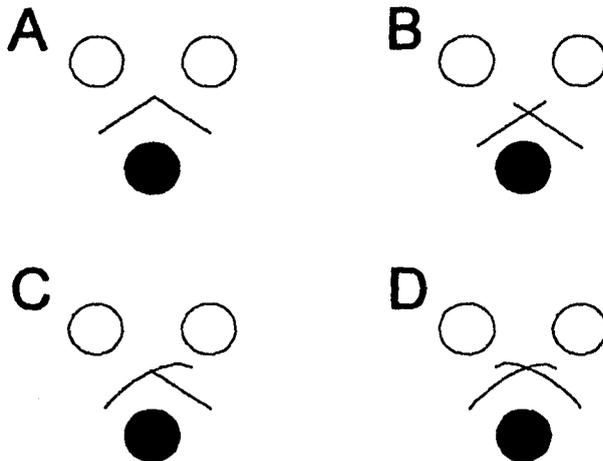
Los geles se vierten y se dejan solidificar, se conforman los pocillos en el gel y se añaden soluciones prueba del antígeno y el anticuerpo.

estas se difunden hacia fuera, al encontrarse forman una línea de precipitación. Si en la solución existen dos antígenos reconocidos por el anticuerpo se forman dos bandas de precipitado independientes.

La Inmunodifusión doble puede ser utilizada para determinar la relación antígeno anticuerpo. Para ello existen patrones básicos figura 7:

Figura 7.

BANDAS DE PRECIPITACION EN LA INMUNODIFUSION DOBLE



a.- Los arcos de precipitación formados entre el anticuerpo y los dos antígenos problema se funden, indicando que el anticuerpo está precipitando epitopes idénticos en cada preparado.

b.- El anticuerpo distingue más de un epitope común a los 2 antígenos que forman arcos de precipitación independientes.

c.-El anticuerpo reconoce un antígeno común en ambas muestras y uno extra en una de las muestras

d.- existe una identidad parcial en donde ambas muestras reaccionan con el anticuerpo mientras que otro anticuerpo reacciona solo con uno u otro de los antígenos. ⁽⁶⁵⁾.

ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS

El método inmunoenzimático ha demostrado tener grandes aplicaciones en una amplia variedad de condiciones. La introducción de inmunoensayos enzimáticos fue realizada por Perlmann así como Van Weemen y Schurs, ofreciendo una atractiva alternativa para los anticuerpos marcados de métodos mencionados previamente. Los inmunoensayos enzimáticos emplean antígeno o anticuerpo conjugados con enzimas; estos ensayos han dado resultados objetivos y son extremadamente sensibles.

Los antígenos o anticuerpos son acoplados a un soporte de fase sólida para lo cual pueden usarse tubos o placas. En gran escala los tubos o microplacas de poliestireno son adecuadas, ya que requieren cantidades pequeñas de reactivo para ser satisfactoriamente cubiertos con el antígeno o el anticuerpo por adsorción pasiva. El exceso de los componentes ya sea de antígeno o anticuerpo que no están ligados son marcados con una enzima, y esta es atacada por el sustrato formando un cromógeno y así es determinada por la cantidad de sustrato que ha sido hidrolizada.

Hay diferentes tipos de ensayos inmunoenzimáticos:

-Detección del anticuerpo usando una enzima: En esta técnica el antígeno es adsorbido en una fase sólida, se lava para eliminar el exceso de antígeno y se adiciona el conjugado, posteriormente se añade el sustrato. Entre cada uno de estos pasos se hacen lavados para eliminar los excesos.

La cantidad de sustrato hidrolizada es igual a la cantidad de anticuerpo presente.

-Detección del antígeno por el método del doble anticuerpo:

Técnica en la cual el anticuerpo es adsorbido en fase sólida posteriormente se adiciona el antígeno, y se añade un segundo anticuerpo marcado con una enzima (el conjugado), se agrega el sustrato para dicha enzima, entre cada uno de estos pasos se hacen lavados para eliminar los excesos. La cantidad hidrolizada de sustrato es igual a la cantidad de antígeno presente.

-Detección del antígeno por el método competitivo por antígeno marcado:

El anticuerpo es adsorbido a una fase sólida, al mismo tiempo en diferentes placas. A una se le adiciona antígeno marcado con una enzima y antígeno no marcado, a la otra placa se le agrega solamente antígeno marcado con la enzima. Posteriormente se adiciona el sustrato a las dos placas; lo que se obtiene es una hidrólisis del sustrato que es igual al antígeno marcado. La diferencia entre una placa y la otra nos da el antígeno no marcado.

En este procedimiento al igual que los demás, entre cada paso se realizan lavados estos lavados son críticos e importantes para asegurar que todas las paredes o tubos sea tratados de la misma manera.

Una adecuada estandarización es la clave para una alta precisión en los inmunoensayos enzimáticos.

Bajo condiciones estrictamente controladas los resultados son expresados con valores de absorbencia, en donde la referencia son los estándares con los cuales se hace una curva en donde la abcisas son el porcentaje de estándar y las ordenadas son la absorbencia. En esta curva son interpolados los valores de absorbencia de las muestras. Este tipo de inmunoensayo tiene una gran diversidad de aplicaciones⁽⁶⁶⁾.

INMUNONEFELOMETRIA:

Las determinaciones nefelométricas son similares a las turbidimétricas. En nefelometría se mide la luz dispersada por las pequeñas partículas en ángulo recto respecto a la luz incidente sobre la cubeta. El grado de dispersión se relaciona con el número y tamaño de partículas en el haz luminoso. El tamaño de la partícula, su forma y la longitud de onda de la luz incidente son variables importantes que hay que controlar. Cuanto más corta es la longitud de onda de la luz incidente, mayor es el grado de dispersión. Una de las ventajas de la nefelometría respecto a las determinaciones turbidimétricas es que las mediciones nefelométricas generalmente tienen mayor precisión. Asimismo para obtener una alta especificidad con elevada precisión se ha combinado una fuente láser con complejos específicos antígeno-anticuerpo. La luz difundida es máxima cuando la reacción termina y se alcanza el estado de equilibrio. Este se obtiene entre 30 y 60 minutos para la mayor parte de las reacciones antígeno-anticuerpo de las proteínas específicas de suero humano. Como resultado en el futuro se utilizará cada vez más en laboratorios clínicos las determinaciones turbidimétricas y especialmente las nefelométricas.⁽⁶⁴⁾

RESPUESTA INMUNE

Los procesos de inmunidad dependen fundamentalmente de la capacidad para reconocer células y sustancias extrañas al organismo. Cuando el material extraño, que puede ser incluso una proteína como las que contiene el polen o la sangre, o una partícula de naturaleza no biológica, a la que se denomina antígeno ha entrado, entonces se inicia una serie de reacciones de defensa.

El sistema inmune utiliza dos mecanismos de respuesta uno mediado por células en donde intervienen las células T y B y las llamadas células de la tercera población. Las células T y B tienen receptores de superficie para el antígeno. Las células T se desarrollan en el timo mientras que las células B se diferencian en el hígado fetal. Las células de la tercera población no poseen receptores de superficie para el antígeno, estas probablemente se desarrollan en la médula ósea. Esta población contiene linfocitos citotóxicos. Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores que se enumeran como CD1, CD2, etc. el término CD se refiere a la designación de agrupamientos, (Cluster designation). Uno de los primeros métodos para diferenciar entre las células T y B se basó en la capacidad de las primeras para unirse a los eritrocitos de carnero mediante la molécula CD2. Sin embargo, el marcador definitivo de las células T es su receptor antigénico (TCR). Las células de la tercera población se caracterizan todas ellas por una morfología linfocitaria granulosa, estas en comparación con las células T presentan un mayor número de gránulos. Las células T citotóxicas con restricción del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) son una subpoblación de linfocitos pequeños que se derivan de precursores no líticos. La mayoría tiene un marcador CD8 y reconocen antígenos asociados con las moléculas de clase I del CMH, el papel más importante de estas células puede consistir en la eliminación de las células infectadas por virus. Las células agresoras inespecíficas sin restricción del CMH, se ha visto que diversas poblaciones de células poseen propiedades citolíticas inespecíficas sin restricción del CMH. Entre ellas se encuentran las células presentes de forma natural

en las poblaciones del bazo y sangre periférica denominadas agresoras naturales (NK "por sus iniciales en inglés") y las células agresoras activadas por linfocinas denominadas LAK, estas se activan al aumentar las concentraciones de IL-2.

Otro de los mecanismos de defensa dentro del sistema inmune es el mediado por los anticuerpos. Los antígenos y los anticuerpos tienen sitios de reconocimiento químico que permiten la unión estrecha de unos con otros. El sitio de unión del anticuerpo con el antígeno se llama sitio antigénico. La unión del antígeno con el anticuerpo tiene lugar a través de la formación de múltiples uniones no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Vander Waals e hidrofóbicas) entre el antígeno y los aminoácidos, estas uniones son débiles, al compararse con las uniones covalentes. Cada antígeno provoca la formación de un anticuerpo específico, el cual neutraliza al antígeno. Esto puede ocurrir de varias maneras: 1.-Cubriendo los sitios antigénicos activos del antígeno 2.- agregándolos 3.- precipitándolos o lisando las células que los contienen, ayudando a la fagocitosis de las bacterias, entre otras. Tanto las células como los anticuerpos se distribuyen a los tejidos del organismo utilizando el torrente sanguíneo, penetrando a este a través de las paredes capilares. Para la inducción de formación de anticuerpos es necesario que el antígeno extraño y los linfocitos entren en contacto. La habilidad de una molécula para inducir una respuesta inmune está determinada por la estructura química de la molécula que va a ser administrada y por la capacidad de reconocimiento a este compuesto por parte del huésped. Sin embargo, hay algunas sustancias que no pueden inducir una fuerte respuesta inmune, en estos casos, el sistema inmune puede ser manipulado para incrementarla, ya que existen moléculas

que se unen al sitio antigénico pero sin inducir respuesta inmune y son llamados haptenos, para lograr dicha respuesta se unen a macromoléculas llamadas acarreadores.

La producción de anticuerpos para una respuesta fuerte, es controlada induciendo y regulando la diferenciación de los mismos, los pasos son controlados por la presencia de un antígeno y por la comunicación célula a célula entre las células B y T. En general, para que un compuesto incite una respuesta primaria y posteriormente una respuesta secundaria es necesario que un epítopo se una al anticuerpo de la célula B ya que estas células son presentadoras de antígeno no así las células T que no captan antígeno libre si no que reconocen cuando se halla en la superficie de otras células especializadas presentadoras de antígeno (CPA), capaces de estimular la división celular de las células T. Las CPA realizan una serie de funciones estrechamente relacionadas que dan lugar a la activación de los linfocitos T, incluido el procesamiento del antígeno, durante el cual grandes segmentos antigénicos, se degradan a fragmentos mas reconocibles por parte de las células T. Las CPA incluyen los fagocitos mononucleares, las células B, las células dendríticas y macrófagos entre otras. Los fragmentos antigénicos se asocian a las moléculas del CMH de clase I o II. Las células T reconocen fragmentos antigénicos asociados a moléculas del CMH en la superficie de otras células. Aunque todas las células expresan las moléculas del CMH de clase I, la expresión de las clase II queda limitada a las CPA, éstas son potencialmente capaces de presentar antígeno a las células T cooperadoras restringidas de clase II, que controlan el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Por

consiguiente, la expresión de las moléculas del CMH de clase II es la clave de la presentación del antígeno. La importancia relativa de las células B en la presentación del antígeno es mayor si se hallan preparadas y activadas en las respuestas de anticuerpo secundarias. En cambio las respuestas primarias los receptores de la célula B son de menor afinidad, por consiguiente no tan eficaces para capturar el antígeno⁽⁷⁰⁾

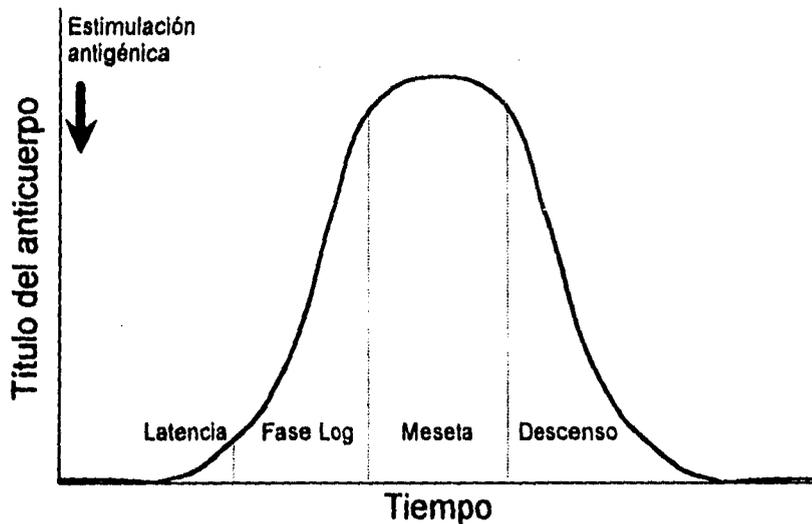
RESPUESTA DE ANTICUERPOS PRIMARIA Y SECUNDARIA

Cuando un individuo entra en contacto con un antígeno por primera vez, las células de su sistema inmunitario reconocen dicho antígeno y, producen una reacción inmunitaria o bien se hacen tolerantes a él, según las circunstancias presentes. La reacción inmunitaria puede adoptar la forma de inmunidad mediada por células o implicar la producción de anticuerpos dirigidos contra el antígeno, el tipo de reacción dependerá del modo como se presenta el antígeno a los linfocitos, y muchas reacciones inmunológicas muestran ambas clases de respuesta. En un segundo contacto con el antígeno, el tipo de respuesta depende en gran parte del resultado de la primera estimulación antigénica, pero la cantidad y la calidad de las respuestas son diferentes⁽⁶⁷⁾. En la figura 8 se muestran las fases de respuesta primaria después de una estimulación antigénica.

- 1.- Fase de latencia, durante la cual no se detectan anticuerpos.
- 2.- Fase de incremento (Log), en la que el título de anticuerpo se eleva en forma logarítmica.
- 3.- Fase de meseta, en donde se estabiliza el título de anticuerpo.
- 4.- Fase de descenso en la que los anticuerpos son eliminados o catabolizados.

Figura 8

FASES DE RESPUESTA PRIMARIA



El examen de las respuestas consecutivas a los contactos antigénicos primario y secundario demuestran que esas respuestas difieren en cuatro aspectos principales.

A.- Evolución cronológica. La respuesta secundaria tiene una fase de latencia más corta y una meseta y fase de descenso prolongadas.

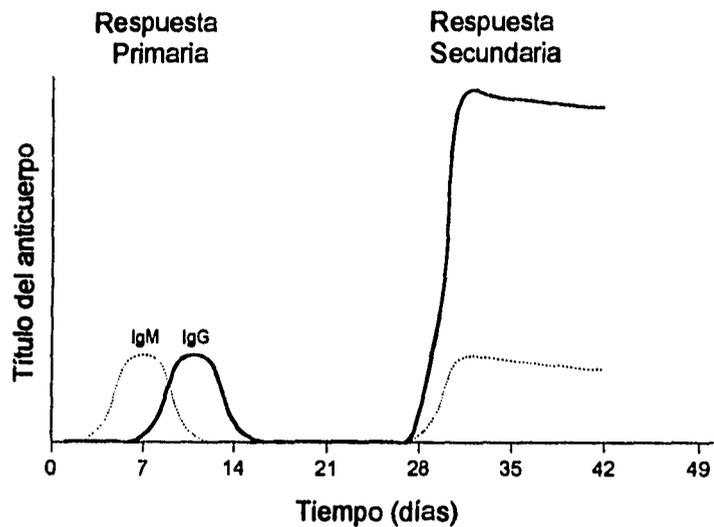
B.- Título de anticuerpo. El nivel de anticuerpos durante la fase de meseta es mucho más alto en la respuesta secundaria, generalmente diez veces superior, e incluso algo más en algunos casos, al nivel alcanzado en la fase de meseta de respuesta primaria.

C.- Clase de anticuerpo. En la respuesta primaria, los anticuerpos IgM constituyen una proporción principal, mientras que la respuesta secundaria se compone, casi por completo de anticuerpos IgG.

D.- Afinidad de los anticuerpos. La afinidad de los anticuerpos es comúnmente, mucho mayor en la respuesta secundaria, y está denominada "maduración de afinidad". Las características de las respuestas de anticuerpo primaria y secundaria se comparan en la siguiente figura.

Figura 9

COMPARACION DE LAS FASES DE RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA



La unión del antígeno a la superficie del anticuerpo de la célula B es absolutamente necesaria ya que esta unión determina la especificidad de los anticuerpos resultantes, como el sitio de unión del antígeno sobre la superficie del anticuerpo.

Cuando el inmunógeno entra a la célula B esta es degradada y estos fragmentos migran hacia la superficie asociados a moléculas de clase II. Este complejo de antígeno y proteínas se une al receptor de las Th.

La unión física entre estas dos células es esencial en el paso de diferenciación de las células B a las células plasmáticas.

CONSIDERACIONES PARA LA PREPARACION DE UN ANTIGENO

El objeto de preparar un antígeno para ser usado en la inmunización, es inducir con éste la respuesta inmunológica en el animal específica para este antígeno, por ello la alta especificidad de los anticuerpos que se quieran obtener está en base a una buena purificación del antígeno. Además es necesario técnicas de estandarización incluyendo cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida como un paso final de purificación. Los antígenos purificados de esta manera producen una buena respuesta inmunológica.⁽⁶⁸⁾

Tener antígenos puros provee en el mejor de los casos una buena producción de anticuerpos sin embargo, no todos los antígenos puros incitan una buena respuesta y no hay pruebas para determinar si un antígeno es inmunogénico.

Dependiendo del origen del antígeno, en la preparación de este puede usarse amortiguadores, ácidos ó básicos o desnaturizante.

Para las rutas de inmunización diferentes a la intravenosa, la presencia de pequeñas cantidades de detergentes y un pH no fisiológico o concentración salina es un serio problema.

ELECCION DEL ANIMAL:

La elección del animal para inmunizaciones está determinada por cuatro puntos.

- 1.- Cuanto suero se necesita
- 2.- De que especie es el antígeno aislado.

3.- Si son monoclonales los anticuerpos que se necesitan.

4.- Cuánto antígeno es viable.

Hay un amplio rango de especies vertebradas que pueden ser usadas para la producción de antisuero. Las cinco comúnmente usadas en el laboratorio son: conejos, ratones, ratas, hamsters y cobayos.

Tipicamente una sola sangría de estos animales produce 25 ml de suero en el conejo, 100-200 μ l en el ratón y de 1-2 ml en rata, hamsters o cobayo. Sólo cuando se requieren grandes volúmenes de suero se requieren animales más grandes, como el cerdo, caballos y monos los cuales son usados comercialmente .

Por razones prácticas, los conejos representan una buena opción para la producción de antisuero policlonal, además son fáciles de manejar y de mantener, se les puede hacer repetidas sangrias y los anticuerpos que producen están bien caracterizados y son fácilmente purificados.

Los animales tales como, ratas, ratones, hamsters y cobayos no son animales de elección para la producción de anticuerpos policlonales, porque solo pequeños volúmenes de suero pueden ser obtenidos.

Para la producción de anticuerpos monoclonales, tanto los ratones como ratas pueden ser usados. Muchos laboratorios utilizan razas puras de ratas y ratones, la genética de la respuesta inmológica ha sido estudiada, los genes que afectan tanto la calidad como la cantidad de esta respuesta está en diferentes loci, pero estos están asociados con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II, los cuales frecuentemente son los más importantes.⁽⁶⁸⁾

Para estimular de manera no específica la respuesta inmológica están lo llamados adyuvantes. El uso prudente de los adyuvantes es esencial para inducir una fuerte respuesta inmunológica para antígenos solubles.

La acción de los adyuvantes no está completamente entendida, pero muchos adyuvantes incorporan dos componentes, uno es una sustancia designada para formar un depósito protegiendo al antígeno para que no sea catabolizado rápidamente, para la formación de este depósito es el uso de aceites minerales o hidróxido de aluminio.

Los aceites minerales son usados como adyuvantes de Freund's, en donde el inmunógeno es preparado en una emulsión de aceite -agua.

Para el hidróxido de aluminio el inmunógeno es adsorbido para formar precipitados o ser atrapados durante la precipitación. Las alternativas para este sistema incluyen liposomas o surfactantes sintéticos. Los liposomas son efectivos cuando el inmunógeno es incorporado dentro de la capa lipídica.

El segundo componente necesario para que un adyuvante sea efectivo es una sustancia que estimule la respuesta inmunológica de una manera no específica. Estas sustancias actúan elevando el nivel de péptidos solubles, factores del crecimiento conocidos como linfocinas. Estas estimulan la actividad de las células que procesan el antígeno directamente y causan inflamación local en el sitio de inyección.

Las dos bacterias que son usadas comúnmente como adyuvantes es la Bordetella pertusis y Mycobacterium tuberculosis, cuando es usada la bacteria completa primero hay que inactivarla. La inmunomodulación mediada por B. pertusis incluye a lipopolisacáridos y a la toxina pertusis, esta ha sido purificada y esta disponible

comercialmente. M. tuberculosis es la más común encontrada en el adyuvante completo de Freund's. El componente activo de M. tuberculosis está localizado en el péptido muramilo MDP.

Generalmente los adyuvantes son administrados en las primeras aplicaciones del antígeno.

El adyuvante más utilizado es el de Freund's, este es una emulsión aceite-agua preparada con aceites no metabolizables, esta mezcla contiene al M. tuberculosis y es llamado adyuvante completo de Freund's y cuando carece de éste es conocido como adyuvante incompleto de Freund's.

El adyuvante de Freund's es el mejor adyuvante ya que da una estimulación fuerte y prolongada respuesta, sin embargo la principal desventaja de este adyuvante es que puede formar granulomas agresivos y persistentes por esta razón no puede ser usado en los humanos.

Para evitar efectos colaterales la primera inyección se da con el completo mientras que para levantar la respuesta se aplica el incompleto de Freund's. O bien para evitar estos efectos se prefiere como adyuvante el hidróxido de aluminio, donde el inmunógeno queda atrapado en el hidróxido de aluminio la estimulación no es específica aunque frecuentemente puede ser usada B. pertussis a pesar de que con ello se reintroducen los efectos colaterales que pueden darse cuando se usa el adyuvante de Freund's.

Cuando el hidróxido de aluminio no lleva dicha bacteria puede ser inyectada en cualquier sitio, pero cuando lleva esta, todos los sitios pueden ser usados excepto la vía intravenosa ⁽⁶⁹⁾

DOSIS DEL ANTIGENO:

Los dos criterios más importantes que deben ser tomados en cuenta para determinar la dosis adecuada son los siguientes:

- 1.- Que la dosis sea óptima para obtener una fuerte respuesta.
- 2.- Que la dosis mínima sea la que induzca la producción de un antisuero policlonal útil, ya que mucho del material inyectado puede ser catabolizado antes de levantar una respuesta inmune.

La eficiencia de los procesos puede variar otros factores, como ruta de inoculación, el uso de adyuvante y la naturaleza intrínseca del antígeno.

La cantidad mínima de antígeno capaz de inducir una respuesta inmunológica depende también de la naturaleza del antígeno y del huésped⁽⁶⁸⁾.

HIPOTESIS

El método de RIA cumple con las características principales de un "buen método".

Si uno de los métodos que tienen mayor sensibilidad para medir apo A-I es el radioinmunoanálisis y para realizarlo es necesario contar con un estándar y anticuerpos específicos, entonces podemos aislar apo A-I de la sangre periférica humana como fuente de esta proteína y usando diferentes cortes de densidad, primero para aislar a la lipoproteína de alta densidad cuyo principal componente protéico es la apo A-I, procediendo después a su purificación para poder usarla como antígeno e inocularla a conejos de la raza Nueva Zelanda para inducir así la síntesis de anticuerpos policlonales y poder medir la concentración de apo A-I por medio de esta técnica.

OBJETIVO:

1.- Obtener apo A-I con suficiente pureza para ser utilizada como estándar y como antígeno en la formación de anticuerpos policlonales de conejo contra apo A-I para servir posteriormente en la cuantificación de esta proteína por el radioinmunoanálisis.

MATERIAL Y METODOS

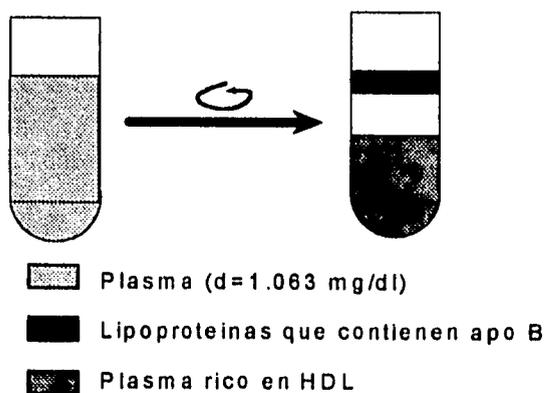
Obtención de la muestra: En ayuno de 12 horas se obtuvo sangre venosa de sujetos normolipidémicos, la muestra fue colectada en tubos con EDTA como anticoagulante a una concentración final de 1 mg/ml de sangre. El plasma se separó de paquete celular por centrifugación a 1500 rpm, durante 10 minutos a 4° C.

Preparación del estándar: La separación de las HDL del plasma se realizó por ultracentrifugación secuencial preparativa en una ultracentrífuga modelo L8-80 M de Beckman Instruments. La separación se fundamenta en base a la densidad de hidratación de la lipoproteína^(69,70).

El plasma obtenido se ajustó, empleando un picnómetro, a una densidad de 1.063 g/ml con KBr (Apéndice A) y se sometió a ultracentrifugación en un rotor 60 Ti a 45,000 rpm por 24 horas a 4° C, el sobrenadante se desecha, ya que ahí se encuentran las partículas con una densidad menor a 1.063 g/ml y en el infranadante se obtiene un plasma rico en HDL esto se muestra en la siguiente figura.

Figura 11

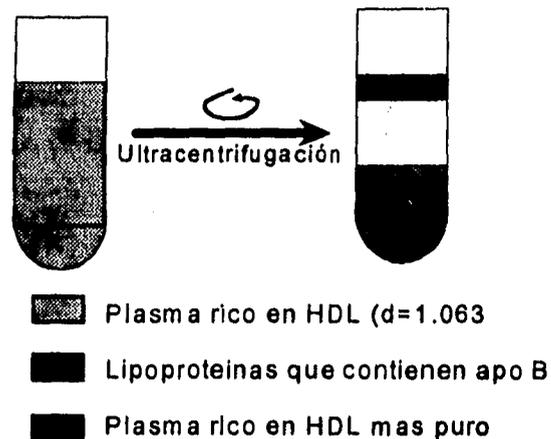
OBTENCION DE LA HDL POR ULTRACENTRIFUGACION



El infranadante (plasma rico en HDL) se lleva al volumen original del plasma y se ajusta a una densidad de 1.210 g/ml con KBr sólido se centrifuga a 45,000 rpm a 4° C por 48 horas, se separa el sobrenadante y se repite el paso anterior para obtener una HDL más limpia esto se muestra en la figura12.

Figura 12

FASE DE LAVADO DE LA HDL POR ULTRACENTRIFUGACION



La HDL separada se deslipida con una mezcla orgánica de eter-etanol (relación 3:1) en frío, mezclándose con un volumen igual de muestra. Se agita vigorosamente (en vortex) y se deja reposar por 5 minutos en frío, después se centrifuga por 5 minutos a 1500 rpm a 4° C obteniéndose en la fase acuosa las apos solubles de las HDL, entre ellas la apo A-I; este paso se repite para asegurar la completa deslipidación de la HDL^(71,72). La fase acuosa se dializa contra tris-urea (urea 8M, tris 0.1 pH 7.4) en membrana de diálisis de 10,000 Da de exclusión por 24 horas.

Al dializado se le determina la concentración de proteína por el método de Lowry⁽⁷⁴⁾ usando como estándar albúmina sérica bovina (Apéndice B), y se enfrenta contra anticuerpos policlonales comerciales por inmunodifusión radial simple con agarosa al 0.8% en PBS (fosfatos 0.1 M y NaCl 0.9%), con el objeto de verificar la presencia de apo A-I (66) (Apéndice C).

La muestra se cargó en una columna de cromatografía empacada con Shephadex G-75 de 90 cm de largo X 2 cm de diámetro, equilibrada con tris-urea (urea 8 M, tris 0.1 M pH 7.4) y monitoreada a 280 nm con un detector UV marca Gilson. Se colectaron fracciones de 40 gotas⁽⁷¹⁾.

La apo A-I se rastreó en base a sus propiedades inmunológicas por inmunodifusión radial en cada uno de los picos obtenidos. El pico con reconocimiento del anticuerpo se concentró y se hizo una segunda cromatografía en las mismas condiciones anteriores.

La apo A-I se concentró y se cuantificó proteína por Lowry.

La pureza de la preparación se comprobó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% según el método descrito por Laemmli^(74,75) (Apéndice D).

La apo A-I se cuantificó en proteína y se hacen alicuotas de 0.5 mg por alicuota y se liofilizó. El liofilizado se almacenó a -70 grados centígrados.

ESQUEMA DE INMUNIZACION:

La apo A-I se reconstituye con 300 µl de agua bidestilada y se le agrega adyuvante completo de Freund's en una relación 1:1. Se inmunizaron a conejos de la raza Nueva Zelanda menores de 2 años y mayores de 6 meses que tuvieran un peso de 1.5 Kg.

La mezcla antigénica se inoculó intradérmicamente y multisitial en el lomo del conejo.

El primer refuerzo fue a los 28 días después de la primera inmunización, el segundo refuerzo fue 28 días después y el tercer refuerzo fue a los 28 días siguientes, antes de cada refuerzo se hizo un sangrado parcial en la vena marginal de la oreja para monitoreo, por inmunodifusión radial. Diez días después del último refuerzo se hizo una sangría de prueba para medir el título del anticuerpo. La sangría de cosecha se llevo acabo 16 días después por punción cardíaca.

MARCACION DE LA APOLIPOPROTEINA A-I:

Para hacer la determinación del título de anticuerpos se utilizó el método de radioinmunoanálisis de tipo competitivo. En primer lugar se realizó la marcación de apo A-I por el método de cloramina T^(76,77) para lo cual se usaron los siguientes reactivos.

- 1 mCi de Nal 125
- De 25-30 µg de Apolipoproteína A-I
- 0.44 mg/ml de solución fresca de cloramina T
- 1.93 mg/ml metabisulfito de sodio
- Amortiguador de fosfatos 0.05 M pH de 7.6
- Amortiguador de fosfatos 0.5 M
- Columna de 0.9 X 30 cm Sephadex G-50 fino
- Amortiguador de barbital 0.05 M EDTA 1 mM pH 8.6

PROCEDIMIENTO

En un tubo de ensaye se coloca el volumen equivalente de 1mCi de I125, agrega la proteína y se le añaden 16 µl del amortiguador de fosfatos 0.5M pH 7.6 Y 10 µl de la solución de cloramina T se mezcla bien y se incuba durante 3 minutos. Pasado este

lapso agregar 5 µl de la solución de metabisulfito de sodio y 500 µl de amortiguador de barbital para separar el yodo unido del libre. En una columna empacada con sephadex G-50 y equilibrada con amortiguador de barbital se carga la muestra colectando fracciones de 25 gotas por tubo, las fracciones son monitoreadas en un contador (Packard multiprias 1) se hace el cromatograma gráficamente las cuentas por minuto (cpm) contra el número de fracción y se hace un pool con el primer pico.

PURIFICACION DE LA MARCA

REACTIVOS:

- Amortiguador de barbital con albúmina sérica bovina (Barbital 0.05M, ASB 2%, EDTA 1mM pH 8.6)
- Columna de 1.5 X 30 cm empacada con Sephadex G-75

PROCEDIMIENTO

La purificación de la marca se lleva a cabo en una columna de Sephadex G-75 fino y equilibrada con amortiguador de barbital con 2% de albúmina sérica bovina (ASB) y carga el volumen necesario de la marca en la columna y eluye con el amortiguador de barbital más ASB, y se colectan 40 fracciones de 25 gotas por fracción y se gráficas la radioactividad presente en cada fracción contra el número de fracción.

DETERMINACION DEL TITULO DE ANTICUERPOS

El título se determinó por RIA a una cantidad de proteína marcada constante (aproximadamente 20,000 cpm) se le agregan cantidades decrecientes del antisuero y observa con ello la unión del antígeno (apo A-I) con el anticuerpo grificándose la radioactividad presente contra la dilución del anticuerpo.

RADIOINMUNOANALISIS

Una vez obtenida la apo A-I y determinada la cantidad de anticuerpo necesaria, se realizó el método de radioinmunoanálisis en fase líquida empleando proteína A de Staphylococcus aureus para separar el complejo antígeno-anticuerpo ya que esta proteína tiene afinidad por la región Fc del anticuerpo^(78,79).

Empleando concentraciones constantes de apo A-I marcada y diferentes concentraciones de apo A-I para establecer la curva estándar. El porcentaje de unión está en relación a la concentración de apo A-I en las muestras.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La sensibilidad del método se calculó en base al porcentaje de unión mostrado para una concentración de 0 determinado 10 veces sacando el promedio menos dos desviaciones estándar calculando los límites de confianza

PRUEBAS DE PRECISION

Esta se llevo acabo usando tres sueros con concentraciones baja, media y alta de apo A-I y se reportaron como coeficientes de variación

PRUEBAS DE EXACTITUD

Esta se evaluó por la adición de concentraciones conocidas de apo A-I en muestras.

PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad del método se evaluó por comparación del método comercial que se fundamenta en la nefelometría cinética y comparando con el RIA.

PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD:

Con las pruebas de especificidad se mide la capacidad del anticuerpo de reconocer otros compuestos relacionados estructuralmente al antígeno que lo produjo. Estas se realizaron midiendo la proporción en que los compuestos desplazan al antígeno radioactivo de su unión con el anticuerpo.

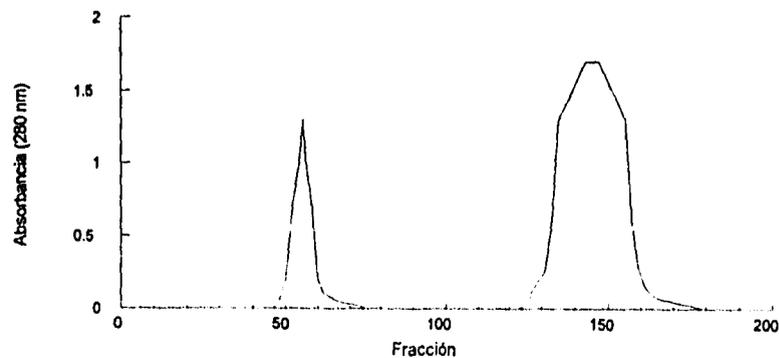
RESULTADOS

Una vez obtenida la fracción de las HDL por ultracentrifugación secuencial preparativa, esta es deslipidada con la mezcla orgánica (éter:etanol) y dializada contra el amortiguador de urea-tris, cabe mencionar que en todos los pasos la apo A-I se rastreó por inmunodifusión radial con un anticuerpo comercial contra apo A-I. Las apoproteínas de las HDL se separaron por cromatografía de exclusión en columna, la fracción con reactividad al anticuerpo comercial de apo A-I se colectó y se concentró para posteriormente hacer una segunda cromatografía bajo las mismas condiciones anteriores.

La Figura 1 nos muestra el cromatograma de la purificación de la apo A-I, en la cual la fracción con reconocimiento al anticuerpo comercial contra la proteína fue el segundo pico. Las fracciones correspondientes a este pico se concentraron y se dializaron contra bicarbonato de amonio, para después ser divididas en alicuotas de 800 µg y congeladas a -70° C.

Figura 13

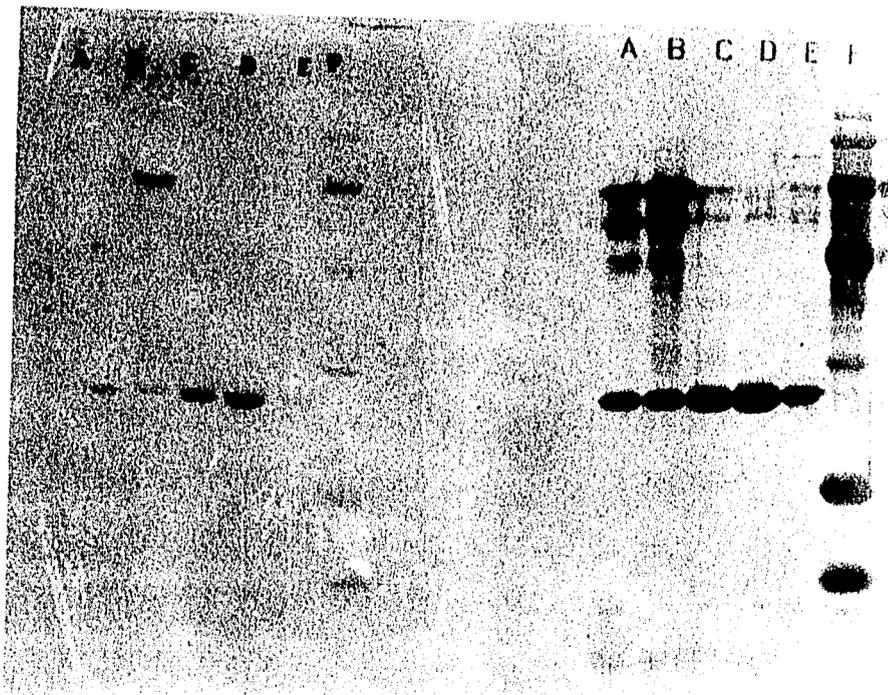
PURIFICACION DE LA APO A-I POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION



Una vez que la proteína es reconocida por el anticuerpo demostrando que las propiedades inmunológicas de la apo A-I no se modificaron, el siguiente paso tuvo por objeto verificar las características físicas y la pureza de la preparación, por lo cual se procedió a realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en la cual se incluyeron algunos pasos del proceso de separación y purificación de la apoproteína A-I. La tinción se llevó a cabo por dos métodos diferentes uno con de azul de coomasie (Fig 14A) y con la técnica de nitrato de plata (Fig 14B).

Figura 14

ELECTROFORESIS DE LA SEPARACION Y PURIFICACION DE APO A-I



En la figura 14 podemos observar en el carril A a las apos solubles de las HDL después de la diálisis; en el B la fase acuosa de las HDL deslipidadas; en el C la Apo A-I obtenida en el proceso; en el D igual que C pero al doble de concentración de proteína; en el E la Apo A-I comercial y finalmente en el F estándares de peso molecular bajo de Bio-Rad que incluían a la Fosfolipasa B (94.7 Kd), Albúmina sérica (65.2 Kd), Ovoalbúmina (45.0 Kd), Anhidrasa carbónica (31.0 Kd), Inhibidor de tripsina (21,5 Kd), Lisosima (14.4 Kd).

Los carriles A y B nos muestra etapas previas a la purificación, se puede notar que al someter la muestra a la cromatografía, la proteína de interés se muestra como una sola banda al compararla en la tinción con comassie (panel A), lo que implica que la apo A-I se encuentra libre de contaminantes, pero se puede observar la gran diferencia en la sensibilidad entre una y otra técnica en la tinción, ya que hay bandas que no son detectadas por el azul de Commasie y que son captadas con la tinción de plata (panel B). Cuando comparamos el carril C donde tenemos el producto de final del proceso no observamos diferencia entre las bandas que se encuentran entre los 31,000 y los 21,500 daltones, en base a lo anterior la preparación de la apo A-I es lo suficiente pura y con una migración electroforética similar al estándar comercial que se encuentra en el carril E.

Una vez que se tiene a la apo A-I pura y viable es liofilizada para una mejor conservación y posteriormente es utilizada como inmunogéno para la producción de anticuerpos.

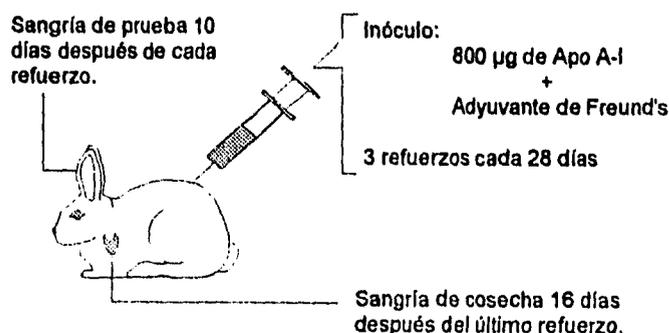
PRODUCCION DE ANTICUERPOS

ESQUEMA DE INMUNIZACION

La figura 15 nos muestra brevemente el esquema de inmunización, 800 µg de apo A-I se reconstituye con 300 µl de agua bidestilada y se le agrega adyuvante completo de Freund's en una relación 1:1. Los conejos utilizados para la producción de anticuerpos fueron menores de dos años y mayores de 6 meses de la raza Nueva Zelanda con un peso promedio de 1.5 Kg. La mezcla antigénica se inoculó intradérmicamente y multisitio en el lomo del conejo. Se hicieron tres refuerzos cada 28 días con las mismas características del inóculo. 10 días después de cada refuerzo se hizo una sangría de prueba en la cual se obtuvo 5 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo, el suero se separó por centrifugación y se almacenó a -70° C, con la finalidad de monitorear el título de anticuerpo. Una vez obtenido un título adecuado, se procedió a llevar a cabo la sangría de cosecha 16 días después del tercer refuerzo, esta se hizo por punción cardíaca hasta obtener toda la sangre posible, aproximadamente 42 ml, lo que se tradujo en 20 ml del antisuero contra apo A-I.

Figura 15

ESQUEMA DE INMUNIZACION



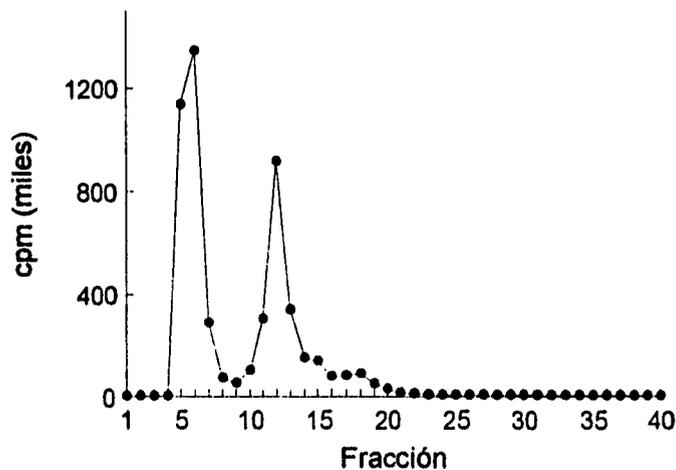
MARCACION Y PURIFICACION DE LA APO A-I

La marcación de la Apo A-I con 125 se realizó por el método de la Cloramina T.

La separación de la proteína marcada del yodo libre se realizó por cromatografía de exclusión (Sephadex G-50). La figura 16 muestra el cromatograma en el cual se observan dos picos, el primero corresponde a la proteína marcada debido a que más del 90% de la radioactividad presente se encontraba en sustancias precipitables al ácido tricloroacético (proteína) y el segundo pertenece al yodo libre, ya que menos del 10% de la actividad estuvo presente en el precipitado al incubarlo con el ácido tricloroacético. Las fracciones del primer pico fueron colectadas y se le agregó albúmina sérica bovina a una concentración final del 2% y se almacenó en refrigeración.

Figura 16

CROMATOGRAMA DE LA MARCACION DE APO A-I

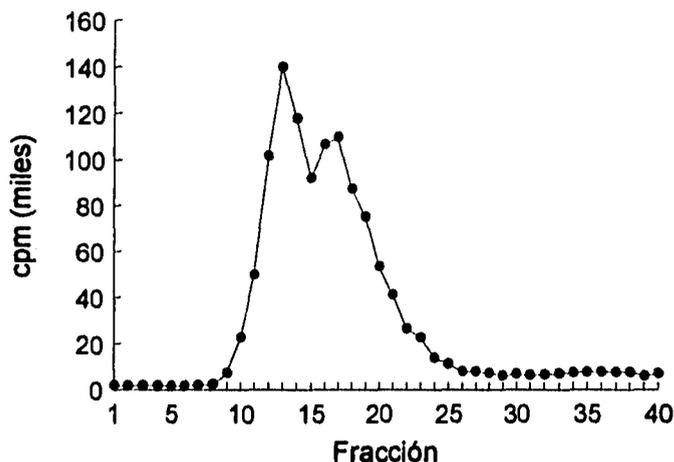


Con el fin de eliminar la influencia de la radiolisis ó proteólisis se procedió a realizar otra cromatografía de exclusión (Sephadex G-75). El resultado del cromatograma se

muestra en la Figura 17, se puede observar dos picos principales con más del 90% de la radioactividad presente precipitaba en presencia del ácido tricloroacético.

Figura 17

CROMATOGRAMA DE LA PURIFICACION DE LA APO A-I MARCADA

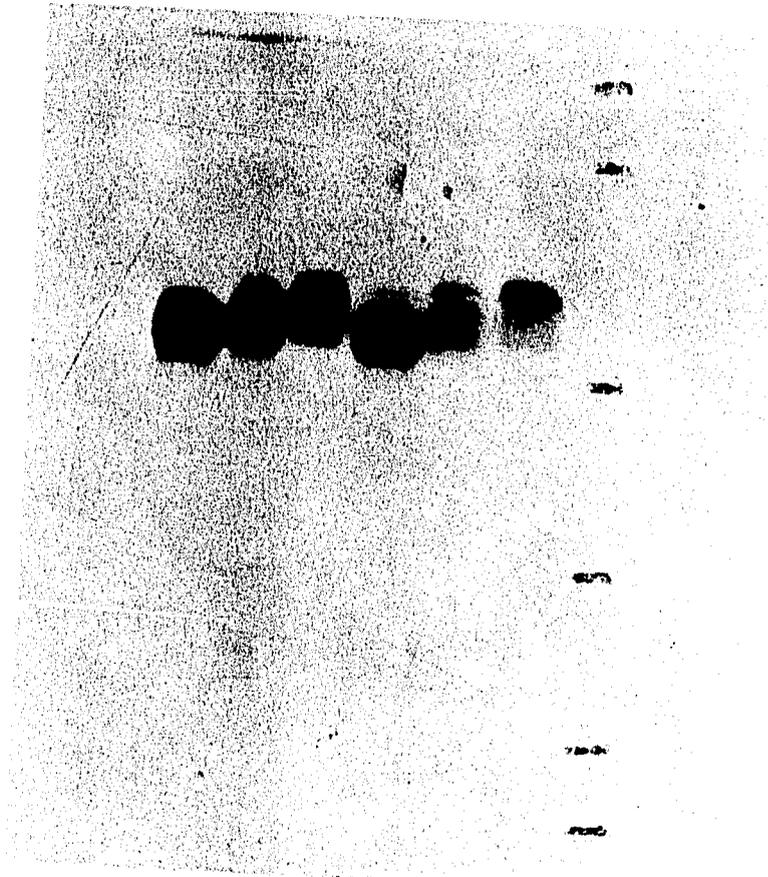


Para tratar de identificar cual de los 2 picos correspondía a la apo A-I, se llevo a cabo una electroforesis en gel del poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y β -mercaptoetanol, el gel se tiño con azul de comassie y después se sometió a una autoradiografía. La figura 18 muestra el resultado de la autoradiografía; el primer y cuarto carril es la fracción obtenida del primer pico de la marcación, el segundo y quinto carril es el primer pico obtenido durante la purificación de la apo A-I- 125 y el tercer y sexto carril el pico 2 de la purificación de la marca, en todas las muestras se ajustó a 50,000 cpm/carril, en el último carril se señalan los estándares de peso molecular. Como se puede observar no existen diferencias entre los picos

muestreados, su migración electroforética es equivalente a la de la apo A-I, además los 2 picos de la purificación son reconocidos por anticuerpos contra apo A-I.

Figura 18

AUTORRADIOGRAFIA DE APO A-I MARCADA



TITULACION DEL ANTICUERPO

Una vez obtenido el estándar marcado con ^{125}I y el anticuerpo se procedió a determinar el título del anticuerpo por el método del radioinmunoanálisis, empleando diferentes diluciones del antisuero en presencia de cantidades constantes del trazador

(apo A-I-I¹²⁵), la separación del complejo inmunológico se realizó con células de *Staphylococcus aureus* como fuente de proteína A, la cual tiene afinidad por la región Fc del anticuerpo. En la tabla 7 se muestra el protocolo de la titulación.

Tabla 7

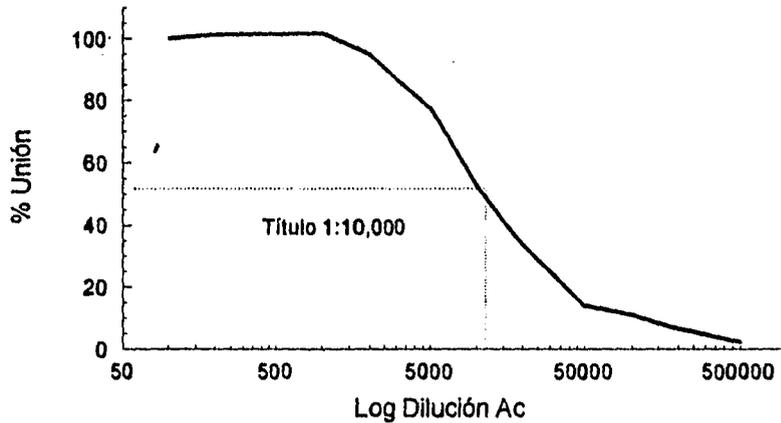
PROTOCOLO DE LA TITULACION DEL ANTICUERPO

No de Tubo	Etiqueta	Anticuerpo	BBSA	Tween 20	Apo A-I-I ¹²⁵	Proteína A
1-3	Total	-----	-----	-----	100 µl	-----
4-6	U. I	-----	350 µl	50 µl	100 µl	100 µl
7-9	1:100	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
10-12	1:200	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
13-15	1:500	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
16-18	1:1000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
19-21	1:2000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
22-24	1:5000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
25-27	1:10000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
28-30	1:20000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
31-33	1:50000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
34-36	1:100000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
37-39	1:200000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl
40-42	1:500000	100 µl	250 µl	50 µl	100 µl	100 µl

En la figura 19 se presenta la curva de titulación del antisuero contra apo A-I, al graficar el logaritmo de la dilución del anticuerpo contra el porcentaje de unión. En ella se muestra que la dilución necesaria para desplazar al 50% la cantidad del antígeno marcado era 1:10,000.

Figura 19

CURVA DE TITULACION

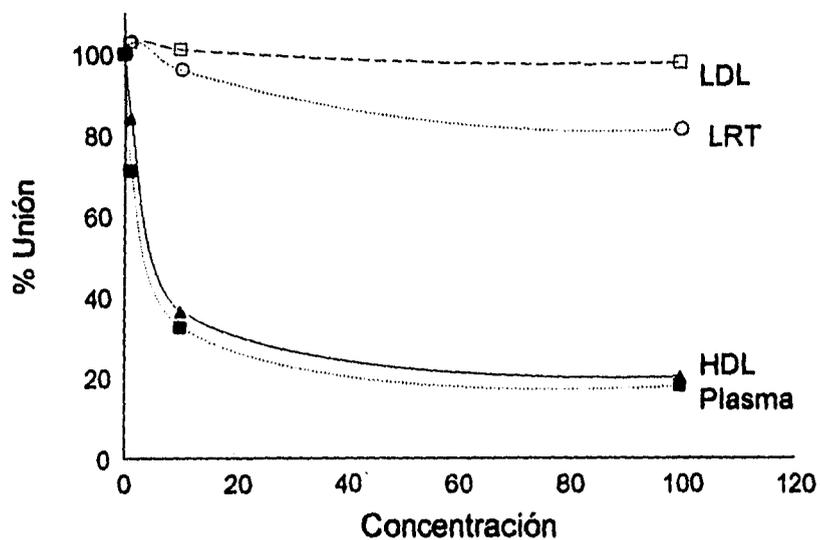


ESPECIFICIDAD

Para comprobar que los anticuerpos obtenidos fueran específicos para la apoproteína A-I, se diseñó un ensayo de reacción cruzada enfrentando el anticuerpo con concentraciones 1, 10 y 100 veces mayores a las fisiológicas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT), plasma y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La figura 20 nos muestra el resultado de el ensayo donde podemos observar que el anticuerpo no se une a las LDL, ya que con concentraciones muy superiores a las fisiológicas solo desplaza a la apo A-I marcada en 3%, a diferencia con las LRT donde el desplazamiento es del 20%, HDL y plasma tienen un comportamiento similar en su reacción con el anticuerpo.

Figura 20

ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO EVALUADA POR RIA



RADIOINMUNOANALISIS

Una vez obtenido el estándar de apo A-I y el título del anticuerpo se procedió al montaje de la técnica de radioinmunoanálisis para la cuantificación de la apoproteína A-I en plasma según el siguiente protocolo (tabla 8).

La figura 21 muestra una curva tipo del RIA y en el recuadro superior la transformación lineal de la misma con los parámetros de la recta, podemos observar una alta correlación, la concentración necesaria de apo A-I para poder unir el 50% de los sitios del anticuerpo presente fue de 69.88 ng y la dilución del plasma para poder ser interpolado en la curva fue de 1:2000.

Figura 21

CURVA ESTANDAR DEL RADIOINMUNOANALISIS

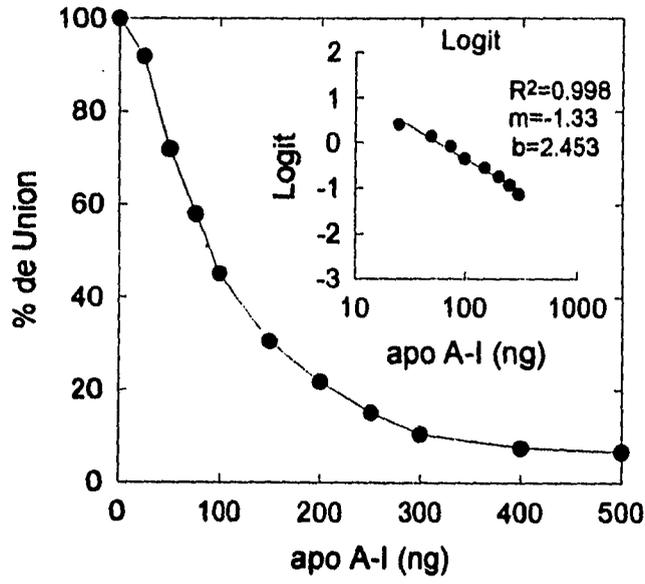


Tabla 8

PROTOCOLO DE RADIOINMUNOANALISIS PARA LA CUANTIFICACION DE APO A-I

No. de tubo	Etiqueta	Estándar Apo A-I	Muestra	BBBSA (μ l)	Tween 20 (μ l)	Anticuerpo (μ l)	Apo A-I ^[125] (μ l)	Proteína A (μ l)
1-3	Totales	—	—	—	—	—	100	—
4-6	U.I	—	—	350	50	—	100	100
7-9	"0"	—	—	250	50	100	100	100
10-12	25	5	—	245	50	100	100	100
13-15	30	10	—	240	50	100	100	100
16-18	75	15	—	235	50	100	100	100
19-21	100	20	—	230	50	100	100	100
22-24	150	30	—	220	50	100	100	100
25-27	200	40	—	210	50	100	100	100
28-30	250	50	—	200	50	100	100	100
31-33	300	60	—	190	50	100	100	100
34-36	400	80	—	170	50	100	100	100
37-39	500	100	—	150	50	100	100	100
40-42	Muestra	—	100	150	50	100	100	100
n - n+2	Muestra	—	100	150	50	100	100	100

SENSIBILIDAD

Para determinar la concentración mínima detectable en el ensayo, que presenta una diferencia del 5% con respecto al estándar "0". La sensibilidad se calculó a partir del estándar "0" determinado 10 veces por triplicado, y tomando como límite de detección la concentración correspondiente a 2 desviaciones estandar por abajo del valor promedio. La sensibilidad calculada fue de 0.256 ng.

PRECISION

La precisión del método RIA implementado en función de los coeficientes de variación intra e interanálisis en tres sueros de concentración diferente, se reportan en la tabla 9.

Tabla 9

COEFICIENTES DE VARIACION INTRAANALISIS E INTERANALISIS DEL METODO DE RIA IMPLEMENTADO

	Concentración de Apo A-I		
	109 mg/dl	117 mg/dl	153 mg/dl
C.V. Intraanálisis n=24	3.08%	2.6%	2.15%
C.V. Interanálisis n=7	6.1%	5.7%	5.5%

EXACTITUD

La exactitud del método se evaluó mediante la prueba de recuperación, en la cual se adicionaron a 3 sueros control perfectamente valorados dos concentraciones

conocidas de apoproteína A-I (60 y 120 mg/dl), y se calcularon los porcentajes de recuperación, los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

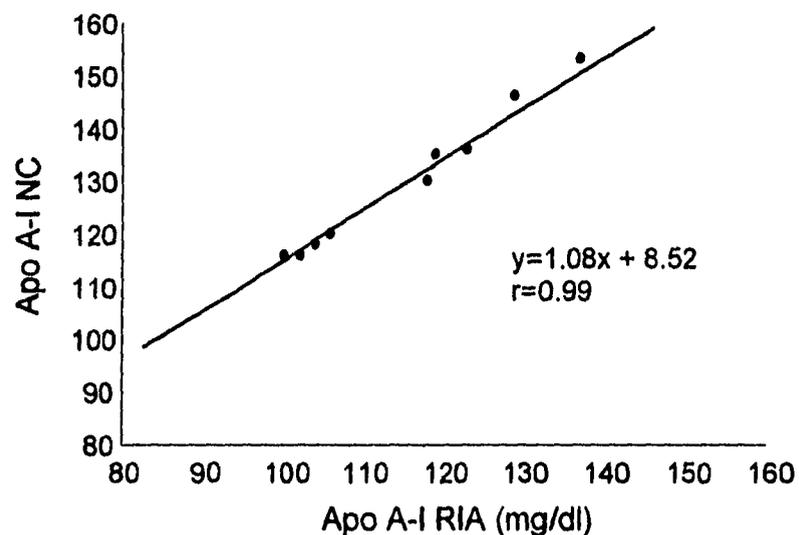
PORCENTAJES DE RECUPERACION

CONTROL	Apo A-I (mg/dl)	Apo A-I agregada (mg/dl)	Recuperación (%)
BAJO	109.5	60	97.4
		120	98.6
MEDIO	117.2	60	101.5
		120	91.3
ALTO	153.2	60	102.9
		120	116.6

En la figura 22 se muestran los resultados del análisis de correlación realizado en 9 muestras de plasma en las cuales se cuantificó la concentración de apo A-I por el método de RIA implementado y por un método comercial que se fundamenta en la nefelometría cinética (NC). Se observa que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos con ambos métodos y muestran un alto coeficiente de correlación ($r=0.99$).

Figura 22

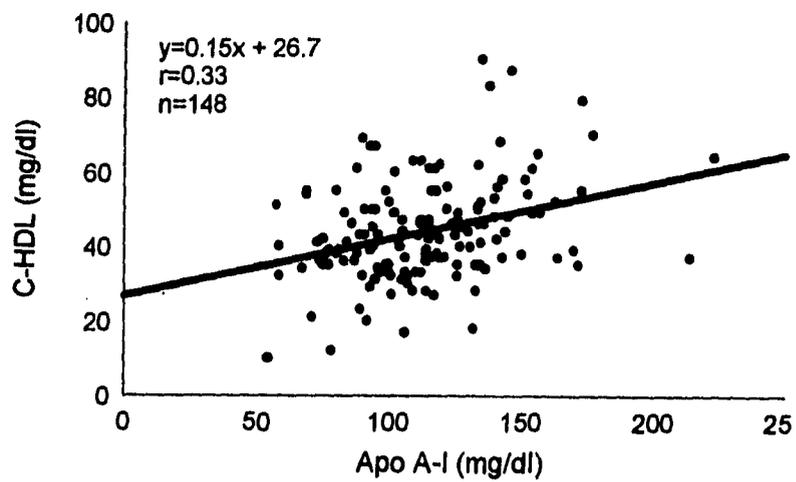
CORRELACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE APO A-I DETERMINADAS POR RIA Y POR NEFELOMETRIA CINETICA



Con el método implementado se cuantificó la concentración de apo A-I en 148 sujetos participantes (80 mujeres y 68 hombres) de una encuesta realizada en el Distrito Federal, los resultados expresados como media \pm desviación estándar son de 117 ± 31.5 mg/dl en las mujeres y 110.6 ± 26.1 mg/dl en hombres. Para conocer el grado de asociación entre las concentraciones de apo A-I y el colesterol de HDL se procedió a realizar un análisis de regresión lineal, el resultado puede observarse en la figura 23, aunque la correlación es baja fué altamente significativa ($p < 0.001$).

Figura 23

CORRELACION ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE C-HDL Y DE APO A-I



DISCUSION

Las lipoproteínas de alta densidad han despertado gran interés debido a que diversos estudios epidemiológicos han encontrado que tiene una relación inversa, entre sus concentraciones y el riesgo de enfermedad arterial coronaria⁽²⁵⁻³⁰⁾, algunos estudios indican que el aumento en 1 mg/dl de C-HDL se traduce en una disminución del riesgo a desarrollar la enfermedad coronaria de 2-3%^(25,28), más aún, estudios prospectivos⁽⁸⁰⁻⁸²⁾ sugieren que es el mejor predictor de EAC.

Las partículas de HDL están envueltas en diferentes procesos metabólicos tales como el transporte de lípidos, formación de ácidos biliares, síntesis de esteroides, transporte reversa del colesterol, agente protector de la membrana celular, además evita la oxidación de lipoproteínas aterogénicas⁽¹⁻⁴⁾. Experimentos in vitro han mostrado que las HDL pueden promover el intercambio de colesterol con las células periféricas^(2-4,10), todos los mecanismos anteriores son los que le confieren el papel antiaterogénico a las HDL.

La apolipoproteína A-I es el principal constituyente proteico de las HDL y dentro de sus principales funciones se encuentra el que sea necesaria para la esterificación del colesterol libre, debido a su capacidad de activar a la enzima encargada de esta función (LCAT)⁽⁸³⁻⁸⁴⁾, además de ser el ligando para el receptor que da las señales para el eflujo de colesterol e iniciar el transporte en reversa del colesterol^(2,3,10-12). Por otra parte, la apo A-I se asocia de manera inversa con la enfermedad arterial coronaria⁽⁸⁷⁾, aunado a que algunos estudios muestran que la apo A-I plasmática es el mejor predictor de la presencia de EAC^(37,38).

En las últimas décadas se han utilizado infinidad de inmunoensayos para la cuantificación de apoproteínas, estos métodos dependen principalmente de las características del anticuerpo

empleado, las cuales están en función de la clase de antígeno, dosis del antígeno usada en la inmunización y de la especie animal.

El método que más destaca para la cuantificación de la apo A-I es el RIA, por su alta sensibilidad, además de que este puede ser fácilmente automatizado. En la actualidad en nuestro país, existe la necesidad de crear recursos materiales propios que mejoren la calidad y reduzcan el costo de los ensayos, en base a lo anterior el objetivo del presente trabajo fue la preparación de la apoproteína A-I lo suficientemente pura para poder ser usada como antígeno en la producción de anticuerpos contra esta proteína, además de ser empleada como estándar en la cuantificación de la apo A-I en plasma, mediante la técnica de radioinmunoanálisis, .

La apoproteína A-I se obtuvo por cromatografía de exclusión previa separación y deslipidación de las HDL. La electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido considerada suficiente para caracterizar y evaluar la pureza de proteínas aisladas^(88,89), La caracterización y pureza de la apo A-I se llevo a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida, resultando una proteína sin contaminantes como se observa en el panel B de la figura 14, aunque se observan algunos contaminantes en proporciones no importantes, al teñir con AgNO₃ panel A de la misma figura un método 100 veces más sensible que el del azul de Coomassie. La viabilidad inmunológica de la apo A-I se evaluó por doble inmunodifusión, en función de su reconocimiento con anticuerpos comerciales específicos, lo que indicó que la pureza y viabilidad de la preparación eran óptimas para poder ser usada como antígeno y producir anticuerpos.

Los anticuerpos usados en los inmunoensayos de apo A-I generalmente son obtenidos en conejos o cabras en respuesta a la inmunización con apo A-I purificada, el esquema de inmunización utilizado en el presente trabajo ha sido ampliamente usado^(71,89,90). El antisuero se monitoreó entre

cada refuerzo por inmunodifusión enfrentandose con la apo A-I purificada. Algunos estudios han purificado el anticuerpo por cromatografía de afinidad con Apo A-I o HDL unida a Sepharosa 4B^(91,92), en el presente trabajo no consideramos adecuado purificar el anticuerpo debido a que el antisuero es más estable.

El método de cloramina T empleado para marcar la apoproteína A-I ha sido ampliamente usado^(93,94). El resultado de la marcación puede notarse en la figura 16, donde previamente se filtró en gel para eliminar el Iodo no unido a la proteína, la purificación de la marca se muestra en la figura 17, donde los dos picos muestran afinidad por el anticuerpo, además la autorradiografía revela que no existe diferencia entre los dos picos, por lo que se concluye que la apo A-I se encuentra formando complejo monómero-dímero, ya que, una de las propiedades de la apo A-I es asociarse de manera reversible en función de la temperatura, presión y fuerza iónica^(95,96).

La sensibilidad del anticuerpo se determinó por el RIA, una dilución 1:10,000 del antisuero fue la concentración necesaria para desplazar al 50% la apo A-I¹⁻¹²⁵. La especificidad se llevo a cabo por una prueba cruzada con concentraciones fisiológicas y suprafiológicas de LDL, LRT, Plasma y HDL, donde se demuestra que la LDL es incapaz de desplazar al antígeno marcado de manera considerable, caso contrario al desplazamiento mostrado por las lipoproteínas que contienen apo A-I (LRT, HDL) y el plasma.

El empleo del método de radioinmunoanálisis para la cuantificación de apo A-I ha sido muy extenso^(71,91,92,97,98) la mayoría de los métodos utilizan para la separación del complejo antígeno-anticuerpo y del antígeno libre un 2º anticuerpo. En este trabajo el método de RIA emplea para separar el antígeno unido del libre a células completas e inactivadas de *Staphilococo Aureus*⁽⁹⁹⁾ que funcionan como una fase absorbente, cuya proteína A (antígeno A) tiene afinidad por el fragmento

Fe de las inmunoglobulinas, además, la inclusión del tensoactivo Tween 20 en el sistema reduce la unión inespecífica⁽¹⁰⁰⁾, con estas modificaciones se reduce significativamente el tiempo de incubación, con lo que resulta una disminución de un día en la duración del ensayo.

Las características del método implementado y de otros inmunoanálisis que cuantifican la apo A-I se muestran en la tabla 11, en la que se puede observar que los resultados son similares a los obtenidos en otros RIAs, pero mejora de manera importante la precisión al compararse con los otros inmunoanálisis, por otro lado los resultados obtenidos en 148 sujetos de población abierta residentes del Distrito Federal son semejantes a los valores encontrados con los diferentes métodos.

Tabla 11

Características principales de diferentes métodos empleados en la cuantificación de apo A-I

	RIA	ELISA	EIA	IDR	NC	RIA*
Anticuerpo	P, M	P, M	P	P, M	P	P
Sensibilidad (ng)	0.3-10	0.1-0.5	100	100	150	0.25
Intervalo de ensayo (ng)	1-200	0.5-15	100-500	200-800	200-500	5-250
C.V. intracensayo (%)	3-9	4-8	3-5	6	3-7	3.08
C.V. interensayo (%)	5-10	8-10	3-9	10	6-7	6.1
Valores normales (mg/dl)	100 ± 20	150 ± 20	120 ± 20	120 ± 10	120 ± 20	114 ± 29

RIA=radioinmunoanálisis; ELISA=inmunoanálisis con enzimas adsorbidas; EIA=electroinmunoanálisis; IDR=inmunodifusión radial; NC=nefelometría cinética; P=policlonal; M=monoclonal; C.V.=coeficiente de variación.

* En este trabajo.

La exactitud del método evaluada por la adición de concentraciones conocidas de apo A-I en la muestra fue de 101.4 en promedio, aunque como se esperaba, la determinación de concentración superiores a 250 mg/dl el margen de error es mayor.

La alta correlación encontrada entre el método de RIA y un método comercial para cuantificar Apo A-I que se fundamenta en la nefelometría cinética indica que los valores obtenidos en una misma muestra son similares, independientemente del método que se emplee.

La alta correlación entre las concentraciones de apo A-I y las cifras del colesterol de HDL ha sido generalmente aceptada, la baja correlación ($r=0.33$), aunque altamente significativa ($p<.001$) reportada en este trabajo, puede ser en parte explicada al alto consumo de carbohidratos en la población Mexicana, lo que se traduce en una elevación importante en las concentraciones de triglicéridos, anomalía comunmente asociada a una disminución en las cifras de colesterol de HDL, resultados que concuerdan a lo informado en dos estudios transversales realizados en población abierta de la Ciudad de México⁽¹⁰¹⁻¹⁰²⁾, además las cifras de apo A-I no difieren en forma significativa a la reportada en otros estudios (tabla 11). Un meta-análisis que incluyo 30 estudios⁽¹⁰³⁾ concluye que el coeficiente de variación biológica para el C-HDL es de 7.4%, este coeficiente reportado para la apo A-I es inferior al del colesterol de HDL⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁵⁾, además la variabilidad biológica interindividual del C-HDL es mayor al de la apo A-I, por lo que, cambios ambientales y en el estilo de vida afectan menos las concentraciones de apo A-I en relación al colesterol de las HDL, lo que implicaría que las diferencias en la asociación de la apo A-I y el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad podría ser mediada por cambios composicionales en esta lipoproteína.

En 1993 la Federación Internacional de Química Clínica⁽¹⁰⁶⁾ dirigió un proyecto de estandarización para la medición de apo A-I y apo B, donde se utilizó un material de referencia certificado de apo A-I avalado por la OMS. Los coeficientes de variación entre laboratorios oscilan de 2.1% a 5.6%, en la cuantificación de 50 muestras por 30 diferentes sistemas en 25 laboratorios.

Las guías del Programa Nacional de Educación del Colesterol recomienda que el coeficiente de variación analítica en la medición del colesterol de HDL debe ser inferior al 3%, objetivo que también debe ser alcanzado en la cuantificación de apo A-I.

El desarrollo en la última década de métodos sensibles y específicos para la cuantificación de las apoproteínas plasmáticas, ha contribuido de manera significativa para el entendimiento del desajuste metabólico en la patogenia de las dislipidemias en el humano, por lo que la implementación de este método podría ser utilizado en la cuantificación de apo A-I en las lipoproteínas para su análisis composicional previa separación por ultracentrifugación o por cromatografía de exclusión en sujetos con cardiopatía coronaria.

En conclusión la preparación de la apo A-I tuvo la suficiente pureza y reactividad inmunológica para poder producir anticuerpos específicos en conejo e implementar un método de RIA que cumple con las exigencias de un buen método en sensibilidad, especificidad, precisión, exactitud y reproducibilidad para la determinación confiable de la apo A-I en plasma o suero humano y con ello poder aportar elementos para el mejor conocimiento de la enfermedad arterial coronaria y en consecuencia una reducción en la morbimortalidad por enfermedad coronaria en nuestra población.

BIBLIOGRAFIA:

1. Zorrilla, E. *Lípidos Sericos en la Clínica México D.F.* Ed. Interamericana 1973 30-57.
2. Schmitz G, Williamson E. High-density lipoprotein, metabolism, reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Lipidology*, 1991, 2:177-189
3. Silverman DI, Geofry S. High-density lipoprotein Subfracctions. *Am. J. Med* 1993,9:636-643
4. Eisenberg S. High-density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res* 1984,25:1017-1045
5. Anderson D.W, Nichols A.V. Pan S.S, Lindgren F.T High density lipoprotein distribution: resolution and determination of three major components in a normal population. *Atherosclerosis* 1977,29: 161-179
6. Albers J.J, Warnick G.R Wibe D. Multy- laboratory comparison of three heparin Mn²⁺ precipitation procedures for estimating cholesterol in high density lipoprotein *Clin Chem* 1978,24:853-6
7. Nichols AV, Blanche P.J, Gong E.L Gradient gel electrophoresis of human high density lipoproteins In : Lewis L.A, Opplt J.J, editors. *Handbook of electrophoresis. Vol III.* BocaRaton, F.L CRC Press, 1983:29-47
8. Cheung M.C, Albers J.J. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography, particles containing A-I and A-II particles and particle containing A-I but no A-II. *J. Biol Chem.* 1984,259:12201-12209
9. Chung MC. and JJ. Albers. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J. Lipid Res* 1982,23:747-753.
10. Pieters MN.Schouten D. and Van Berckel TJ. In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. *Biochem Biophys Acta.* 1994, 1225: 125-134
11. Phillips, M.C, Mc Lean, L.L, Stoudt, G.W. Mechanism of cholesterol efflux from cells. *Atherosclerosis* 1980, 36:409-22
12. Karlin, J.B, Johnson W.J, Benedict, Cholesterol efflux between cells an high density lipoprotein *C.R Journal. Biol. Chem.* 1987,262:12557-12564
13. Slotte J.P., Oram J.F. and Bierman, E.L. *J. Biochem* 1987,262:12904-12907
14. Schinith G. Robenek H, Lohmann U, Assman G. *EMBO J* 1985,4:613-622
15. Kambouris, A.M. Roach P.D, Calvert, G.D. Retroendocytosis of high density lipoprotein by human hepatoma cell line, HepG2 *Arterisclerosis* 1990,10:582-590
16. Pieters M.N. Schouten D, Bakker H. Selective uptake of cholesteryl esters from apo E-free high density lipoproteins by rat parenchymal cells in vivo is efficiently coupled to bile acid synthesis. *Biochem J.* 1991,280:359-365
17. Mackness MT, Abbott C, Arrols. The role of high-density lipoprotein and lipid soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation *Biochem J.* 1993,294:829-834
18. Kelso G.J, Staiatt W.D, Ritcher R. J. Furlong C.E. Apolipoprotein J associated with paroxonasa *Biochem.* 1994, 33:832-839
19. Tall AR. Metabolic and genetic control of HDL cholesterol levels *J. Intern Med.* 1992,231:661-668
20. Segal P.L.I, Gidez Apolipoprotein of high density lipoprotein in the urine of normal subjets *J. Lipid Res* 1979,20:784-785
21. Rohcim, P.S M. Carey Apolipoprotein in human cerebrospinal fluid *Proc Natl. Acad Sci U.S.A* 1979, 76:4646-4649
22. Hara H, Yokoyama S. Role of apolipoproteins in cholesterol efflux from macrophages to lipid microemulsion: proposed of a putative model for the pre-beta high density lipoprotein pathway. *Biochem* 1992,31:2040-2046

23. Gordon T, Castell WP, Marthana C, Jortland H. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. *Am J Med* 1977;62:707-714
24. Miller GJ. High density lipoproteins and atherosclerosis. *Annu Rev Med* 1980. 31:97-108
25. Gordon T, Castell WP, Marthana C, Jortland H. Diabetes, blood lipids and the role of obesity in coronary heart disease in the woman The Framingham study. *Ann Intern Med.* 1977 87:93-97
26. Albers JJ, Cheung MC, Hazzard WR. High-density lipoproteins in myocardial infraction survivors. *Metab.* 1978;27:479-85
27. Miller NE, Forde OH, Thelle DS, Mjos OD. The Tromso Heart-Study: high-density lipoprotein and coronary heart disease : a prospective case-control study. *Lancet* 1977;1:965-8
28. The Expert Panel 1993. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *J Am Assoc.* 1993;269:3015-3023
29. Gordon DJ, J. Knok, JL. Probstfield, R. Superko and HA. Tyroler foer the LRC Program. High density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation* 1986, 74: 1217-1225
30. Manninen, V, L. Tenkanen, P. Koskinen, J.K Huttunen Join Effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study: Implications for treatment. *Circulation* 1992, 85: 37-45
31. Marcovina, S. and Albers JJ. Standardization of immunochemical determination of apolipoproteins A-I and B. A report on the International Federation of clinical Chemistry Meeting of Standarization of apolipoproteins A-I and B measurements (Basis for future consesus), Vienna, Austria. April 18-19 *Clin Chem* 1989;35: 2009-2015
32. Austin, MA. MC. King, KM. Vranizan and RM. Krauss. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990, 82: 495-506
33. Freedman, DS, SR. Srinivasan, CL Shear, FA. Franklin, LS Webber, and GS Berenson. The relation of apolipoproteins A-I and B in children to parental myocardial infraction. *N. Engl J. Med.* 1986, 315:712-726
34. Reinhart, RA, K. Gani. MR Arnott and SK Broste. Apolipoproteins A-I and B predictors of angiographically defined coronary artery disease. *Arch Intern Med.* 1990, 150: 1629-33
35. Naito, H. The clinical significance of apoprotein measurements. *J. Clin Immun* 1986, 9: 12-20
36. Avogaro PG-Cazzolato G. Bittolo Bon and G.B Quinici. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for the atherosclerosis? *Lancet* 1979, 1: 901-3
37. Kottke, BA, AR. Zinsmeister, DR Holmes, Jr, RW Kneeller, BJ. Hallaway, and SJ. T. Mao. Apolipoproteins and coronary artery disease *Mayo Clin Proc* 1986, 61: 313-320
38. Maciejko JJ, Holmes DR., Kottke BA, Apolipoproteina A-I as a marker of angiographically assessed coronary-artery disease *N. Engl J. Med.* 1983;309:385-389
39. Stampfer M.J, Saluni S. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infraction *N. Engl J. Med.* 1991, 325 (6): 373-380
40. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels in the Framingham offspring study. *J. Lipid Res* 1994;35: 871-881
41. Rader D.J, Schafer J.R, Lohse P, Ikewaki K, Thomas F. Incresed production of apolipoprotein A-I associated with elevated plasma levels of high-density lipoprotein, apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-II in a patient with familial hyperalphalipoproteinemia. *Metab.* 1993;42:1429-1434

42. Rubin E.M, Krauss R.M, Spagler E.A Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A-I Nature 1991,353:265-267
43. Buring J.E, O'Connor G.T.Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, apo A-I and apo A-II and increased risk of myocardial infarction.Circulation 1992,85 (1): 22-29
44. Rader D.J, Ikewaki K.Very low high density lipoproteins without coronary atherosclerosis. Lancet 1993,342:1455-1458
45. Fraser GE, Upsdell M. Alcohol and other discriminants between cases of sudden death and myocardial infarction . Am J Epidemiol 1981, 114:462-76
46. Friedman LA, Kimball AW. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. Am J Epidemiol 1986,124:481-9
47. Gaziano JM, Buring JE, Breslow JL. Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. N Engl J Med 1993, 329:1829-34.
48. Albers JJ, Wahl PW. Quantitation of apolipoprotein A-I of human plasma high density lipoprotein Metabolism. 1976,25(6):633-643
49. Walsh BW, Li H, and Sacks FM Effects of postmenopausal hormone replacement with oral and transdermal estrogen on high density lipoprotein metabolism.J. Lipid Res. 1994, 35:2083-2093
50. Williams PT, Krauss RM, Wood PD, Lindgren FT, Giotas C, Vranizan KM. Lipoprotein subfractions of runners and sedentary men. Metabolism 1986,35:45-52
51. Cowan GO. Influence of exercise on high-density lipoproteins. Am J. Cardiol 1983,52:13B-6B
52. Huttunen JK, Lansimies E, Voutilainen E, et al. Effect of moderate physical exercise on serum lipoproteins. A controlled clinical trial with special reference to serum high-density lipoproteins. Circulation 1977, 60:1120-9
53. Hicks AL, Mac Dougall JD, Muckle TJ. Acute changes in high-density lipoprotein cholesterol observations with exercise of different intensities. J. Appl Physiol 1987,63:1956-60
54. Eckel RH, Yost TJ. HDL subfractions and adipose tissue metabolic in the reduced-obese state. Am J. Physiol 1989,256:E740-6
55. Sopko G; Leon AS, Jacobs DR, et al. The effects of exercise and weight loss on plasma lipid in young obese men. Metabolism 1985, 34:227-36
56. Ehnholm C, Huttunen JK, Pietinen P et al. Effect of a diet low in unsaturated fatty acids on plasma lipids, lipoproteins and HDL subfractions. Arteriosclerosis 1984,4:265-9
57. Shepard J, Packer CJ, Patsch JR, Gotto AM Taunton OD. Effects of dietary saturated and polyunsaturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apo A-I. J Clin Invest 1978, 61:1582-92
58. Rader D.J, Ikewaki K, Duverger N. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (apo A-II) and high-density lipoprotein containing apo A-II in classic Lecitin:cholesterol acyltransferase deficiency an fish-eye disease. Journal Clin. Invest 1994,93:321-330
59. Roma P, Gregs R.E, Menglis In vivo metabolism of mutant form of apolipoprotein A-I. apo A-I milano associated with familial Hypoalphalipoproteinemia.J. Clin. Invest 1993, 91:1445-1452
60. Dauchateu P, Rade D, Duverger N. Tainger disease: Isolation and characterization of Lp A-I, Lp A-I:A-II and Lp A-IV particles from plasma Biochem Biophys Acta 1993,1182:30-36
61. Pikler G..Radioimmunoassay. Rev Invest. Clin 1973, 25 (1):55-66
62. Bailey GS.Radioimmunoassays. Methods in biology "proteins" Jhon M. Walker,Clifton, New Jersey Ed. Humana Press 1984 335-347
63. Larsen J. and William D. Odell General principles of radioimmunoassay. Rose 110-115

64. Henry JB. Diagnostico y tratamiento clinicos por el laboratorio Salvat 8ava edici3n pag 242.
65. Bailey S Immunodiffusion in gels „Methods in biology “proteins” Jhon M. Walker, Clifton, New Jersey Ed. Humana Press 1984 301-310
66. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine Bull World Health Organ 1976, 53: 55-64
67. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Inmunologfa. London U.K, Salvat. 2da. edicion 1991
68. Lane P. Antibody a laboratory manual 1989 Ed Harlow U.S.A. 55-114, 555-612
69. Dormans PJ, Swinkels DW, Graaf J. Single- spin Density -Gradient ultracentrifugation v.s Gradient gel electrophoresis: Two methods for detecting Low- density lipoprotein heterogeneity compared. Clin Chem 1991, 37 (6): 853-858
70. Patsch W, Scholfeld G, Gotto AM and Patsch JR. Characterization of human High Density Lipoproteins by zonal ultracentrifugation. The Journal of biological chemistry 1980, 255(1) :3178-3181
71. Schonfeld G. and Pfeleger B. The structure of human high density lipoproteins and the levels of apolipoprotein A-I in plasma determined by radioimmunoassay. The Journal of Clinical Investigation 1974, 54: 236-246
72. K.K Steinberg, GR Cooper, SR Graiser and M. Rosseneu. Some Considerations of Methodology and Standardization of Apolipoprotein A-I Immunoassays. Clin Chem 1983, 29:415-426.
73. 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
74. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 1970, 227:680-685
75. A.T Andrews Electrophoresis theory, techniques, and biochemical and clinical application Oxford Science Publications 2a Ed.
76. Hunter, W.M, and Greenwood, F.C Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity Nature 1962, 194:495-496
77. Bolton A.E and W.M Hunter The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to I 125 containing acylating agent. Biochem J. 1973, 133:529-539
78. Zigales, B, Colli W. Identification of Trypanosomatid surface antigens with a Protein A-bearing Staphylococcus aureus as Immunoabsorbent. In genes and antigens of parasites. A Laboratory Manual. Morel, CM. Editor WHO 1984.
79. Goding JW. Use of Staphylococcal protein A as an immunological reagent. J. of Immunol. Meth, 1978, 20:241-253
80. Goldbourt U. Medalie JH. High density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease: The israeli ischemic Heart Disease Study. Am J. Epidemiol. 1979, 109:296-308.
81. Castelli WP. Cardiovascular disease in women. Am J. Obstet gynecol. 1988, 158:1553-1560
82. Bass KM, Newschaffer CJ, Klang MJ, Bush TL. Plasma lipoprotein levels as a predictors of cardiovascular death in women. Arch Intern Med. 1993, 153:2209-2216.
83. Glomset JA. The plasma lecithin cholesterol acyltransferase reaction. J. Lipid Res 1968, 9:155-167.
84. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochem Biophys Res Commun 1972. 46:1493-1498
85. Mao SJT, Gotto AM Jr, Jackson RL. Immunochemistry of plasma high density lipoproteins, radioimmunoassay of apo lipoprotein A-II. Biochemistry 1975, 14:4127-4131.

86. Scanu AM, Edelstein C. Solubility in aqueous solutions of ethanol of the small molecular weight peptides of the serum very low density and high density lipoproteins: Relevance to the recovery problem during delipidation of serum lipoproteins. *Anal Biochem* 1971,44:576-588.
87. Miller NE. Association of high density lipoprotein subclasses and apolipoprotein with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J.* 1987,113:589-597.
88. Davis BJ. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964,121:404-427.
89. Weber K, Osburn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969,244:4406-4412
90. Assmann G, Smootz E, Adler K et al. The lipoprotein abnormality in Tangier disease: Quantitation of A proteins. *J Clin Invest* 1977,59:565-575.
91. Fainaru M, Glangcaud MC, Eisenberg S. Radioimmunoassay of human high density lipoprotein apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta* 1975, 386:432-443
92. Mao SJT, Miller JP, Gotto AM Jr, Sparrow JT. The antigenic structure of apolipoprotein A-I in human high density lipoproteins. Radioimmunoassay using surface-specific antibodies. *J Biol Chem* 1980, 255:3448-3453
93. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Biochem J* 1963,89:114-123.
94. Freychet P, Roth J, Neville DM. Monoiodoinsulin: Demonstration of biological activity and binding to fat cells and liver membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1971, 43:400-408.
95. Vitello LB, Scanu A. Studies on human serum HDL, self association of apo A-I in aqueous solutions. *J Biol Chem* 1976, 251:1131-1136.
96. Formisano S, Brewer HB Jr, Osborne JC. Effect of pressure and ionic strength on self-association of apo A-I from the human high density lipoprotein complex. *J Biol Chem* 1978, 253:354-359.
97. Karlin JB, Juhn DJ, Starr JJ, et al. Measurement of high density lipoprotein A-I in serum by radioimmunoassay. *J. Lipid Res* 1976,17:30-37.
98. Tall AR, Blum CB, Forester GP, Nelson CA. Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. *J. Biol Chem* 1982,257:198-207.
99. Forsgren A, Sjoquist J. "Protein A" from *S. aureus*. A pseudoimmune reaction with human globulin. *J. Immunol* 1966,97:822-827.
100. Maciejko JJ, Mao SJT. Radioimmunoassay of apolipoprotein A-I. Application of a non-ionic detergent (Tween 20) and solid-phase staphylococcus. *Clin Chem* 1982,28:199-204.
101. Gonzalez VC, Stern MP, Valdez R, Haffner HP. Niveles de lípidos sanguíneos y riesgo aterogénico en la población urbana. *Rev. Inv. Clin* 1993,45:127-132.
102. Posadas RC, Yamamoto KL, Lerman GI, Zamora GJ. The prevalence of NIDDM and Associate Coronary Risk Factors in Mexico City. *Diabetes Care* 1994,17(12):1441-1448.
103. Smith SJ, Cooper GR, Myers GL, Sampson EJ. Biological variation in concentrations of serum lipids. Sources of variation among results from published studies and composite predicted values. *Clin Chem* 1993,39:773-781.
104. Kafonck SD, Derby CA, Bachorik PS. Biological variability of lipoproteins and apolipoproteins in patients referred to a lipid clinic. *Clin Chem* 1992,38:864-872.
105. Marcovina SM, Gaur VP, Albers JJ. Biological variability of cholesterol, triglyceride, low- and high-density lipoprotein cholesterol, lipoprotein (a), and apolipoprotein A-I and B. *Clin Chem* 1994,40:574-578.

ESTE TEXTO NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

106. Marcovina, S., Albers JJ, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry Standardization projet for Measurements of Apolipoprotein A-I And B. III: Comparability of apolipoprotein A-I values by use of international reference material. Clin Chem 1993, 39: 773-781.

APENDICE A

Para conocer la densidad del plasma se utilizó un picnómetro de la siguiente manera:

Se peso en la balanza analítica el picnómetro seco, el picnómetro con agua destilada y el picnómetro con el plasma. Para conocer la densidad del agua se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Peso del picnómetro con agua} - \text{Peso del picnómetro seco} = \text{Peso del Agua}$$

Por lo tanto:

$$\text{Densidad del agua} = \text{Peso del agua} / \text{Volumen del picnómetro}$$

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. Para calcular la densidad de la muestra primero se calcula el peso de la muestra de igual manera que se calculo el peso del agua, una vez obtenido esto se tiene que:

$$\text{Densidad de muestra} = \text{Peso de muestra} / \text{Volumen del picnómetro.}$$

Una vez obtenido la densidad de la muestra se utilizó la siguiente fórmula para calcular la cantidad de bromuro de potasio (KBr), que se necesita para llevar el plasma a la densidad deseada:

$$(\text{Densidad KBr} - \text{Densidad deseada}) / \text{Densidad deseada} - \text{Densidad de la Muestra} = N$$

N= cantidad de KBr necesaria para obtener la densidad deseada.

APENDICE B

Lowry:

La mayoría de los métodos para determinar concentraciones de proteína es la hidrólisis ácida seguida por el análisis de aminoácidos .

Las proteínas en solución absorben la luz U.V a 280 nm debido fundamentalmente al triptofano, pero también a la tirosina y a la fenilalanina.

El método de Lowry el cual es uno de los métodos mas ampliamente utilizados para la determinación de proteínas el cual utiliza el reactivo de folin (reactivo de fenol, ácido fosfotungstomolíbdico) el cual oxida compuestos fenólicos tales como tirosina, triptofano e histidina obteniéndose un color azul oscuro.

REACTIVOS:

1.- Reactivo formador de complejos.

Se usan tres soluciones :

Solución A: 2% (w/v) Carbonato de sodio en agua bidestilada.

Solución B: 1% (w/v) sulfato de cobre pentahidratado en agua destilada.

Solución C: 2% (w/v) tartrato de sodio en agua bidestilada.

2.- Hidróxido de sodio 2N.

3.- Reactivo de Folin

4.- Estándar de albúmina: se usa una solución stock de la proteína albúmina sérica bovina 1 mg/ml y la curva se prepara por diluciones.

Para la determinación de la proteína A-I se siguió este procedimiento usando como estándar albúmina sérica bovina (1mg/ml).

CURVA ESTANDAR (Lowry):

Muestra	No de tubo	BSA (μ l)	Agua (μ l)	Solución "C" (ml)	Folin (μ l)	Muestra (μ l)
B	1	--	400	2.0	100	--
Estandar 1	2	5	395	2.0	100	--
Estandar 2	3	10	390	2.0	100	--
Estandar 3	4	20	380	2.0	100	--
Estandar 4	5	40	360	2.0	100	--
Estandar 5	6	60	340	2.0	100	--
Estandar 6	7	80	320	2.0	100	--
Estandar 7	8	100	300	2.0	100	--
Pre-cromatografía	9	--	390	2.0	100	10 μ l
	10	--	390	2.0	100	10
	11	--	380	2.0	100	20
	12	--	380	2.0	100	20
Pico I 2a. Cromatografía	13	--	390	2.0	100	10
	14	--	390	2.0	100	10
	15	--	380	2.0	100	20
	16	--	380	2.0	100	20
Pico II 2a Cromatografía	17	--	390	2.0	100	10
	18	--	390	2.0	100	10
	19	--	380	2.0	100	20
	20	--	380	2.0	100	20

APENDICE C

INMUNODIFUSION

Amortiguador de fosfatos 0.01M (PBS)

Se preparó un gel de agarosa al 0.8 % de la siguiente manera se pesaron 200 mg de agarosa para 25 ml de PBS el cual se calentó previamente para que la agarosa se disolviera de una manera homogénea, una vez disuelta se vertieron 10 ml en una caja petri de 12 cm de diámetro por 1 cm de alto y se dejaron enfriar.

APENDICE D

ELECTROFORESIS

El término electroforesis es usado para describir la migración de las partículas en un campo eléctrico bajo condiciones de velocidad constante.

La electroforesis en gel de poliacrilamida es probablemente una de las técnicas más ampliamente usadas para el análisis de proteínas. La poliacrilamida constituye un medio de soporte inerte cuya porosidad es fácilmente ajustable mediante modificaciones previas a su polimerización en la solución de acrilamida. En esta técnica las proteínas reaccionan con un detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) o lauril sulfato de sodio para formar complejos cargados negativamente.

Los colorantes estándar utilizados para la tinción en electroforesis son el azul brillante de Coomassie el ponceaus y el negro amido. Para la detección de componentes menores en geles se aumenta la resolución para ello la tinción con plata es muy sensible. La tinción con azul de coomasie usa una solución ácido acético-metanol es un método de tinción muy sensible. Después de decolorar se encuentra que las bandas frecuentemente duran de uno a dos días. Las bandas que contienen 0.1 µg de proteína puede ser detectada.

La tinción con plata es un método altamente sensible para la determinación de proteína, esta tinción es 100 veces mas sensible que la tinción de azul de Coomasie

ELECTROFORESIS POR EL METODO DE LAMMLI

Solución A: Acrilamida al 30 % P/V + Bisacrilamida 0.8 % P/V

Solución B: Tris HCl 1.5 M pH 8.8

Solución C: Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %

Solución D: Tris HCl 0.5 M pH 6.8

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

TEMED

Agua destilada

Glicerol

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 estar predeterminada.

Agua: La cantidad necesaria para ajustar el volumen requerido

Amortiguador de muestra:

Solución D 0.625 ml

Solución C 1.0 ml

Beta-mecaptoetanol .25 ml

1 % de azul de bromofenol 0.1 ml

Glicerol 0.525 ml

Amortiguador de corrida 5X

Tris HCl 250 mM 30 gr

Glicina 1.92 M 144 gr

SDS 0.5 % 5 gr

pH 8.3

Tinción con azul brillante de Coomasie

Azul brillante de Coomasie 2.5 gr

metanol 450 ml

Acido acético 100 ml

APENDICE E

En una placa de 3.5 X 8.3 cm se preparó un gel de electroforésis al 5% en el cual se colocaron las siguientes muestras en el primer y cuarto carril, el primer pico de la marcación , en el segundo y quinto carril el segundo pico de la purificación y en el tercer y sexto carril está el primer pico de la purificación. La electroforésis se corrió a 60 volts durante 15 minutos y a 90 volts por una hora, finalmente se fijo el gel en una solución de 45 % de metanol y 10 % de ácido acético. Se tiño durante dos horas con azul de coomasie a 40 grados durante 45 minutos y se destiño con la misma solución de fijado. Finalmente se seco. Este gel se colocó en una placa fotosensible en un cuarto oscuro, se fijó con cinta adhesiva y se colocó entre dos placas de aluminio que lo protegían perfectamente de la luz, se mantuvo a -70 grados durante 6 horas aproximadamente. Posteriormente se procedió a revelar la placa.

Finalmente tenemos que la placa fotosensible que al ser revelada nos muestra las posiciones de la proteína marcada.