



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estandarización y Validación preliminar del sistema de ELISA para  
cuantificar el nivel de la Proteína Transferidora de Ésteres de  
Colesterol (CETP) plasmática y la transferencia de tecnología para su  
utilización a gran escala**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**MARGARITA VALDEZ GONZÁLEZ**



MÉXICO, DF, 2006.



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.



---

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Adriana Camacho Villanueva
Vocal	Prof. Juan Manuel Rodríguez
Secretario	Prof. Jaime Mas Oliva
1 <sup>er</sup> . Suplente	Prof. Iván Alejandro Franco Morales.

Sitio en donde se realizó el tema:  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México

Tutor  
Dr. Jaime Mas Oliva



Firma del tutor

Sustentante  
Margarita Valdez González



---



## Oficiales

El más sincero agradecimiento al Dr. Jaime Mas Oliva, quien fue tutor y guía para el desarrollo de este trabajo científico. Además, por ser una persona importadora siempre de ideas colosales para el crecimiento del laboratorio y el inspirador para girar mi vida hacia el campo de la investigación. Gracias por su confianza.

Al jurado conformado por los Profesores: Adriana Camacho Villanueva, Juan Manuel Rodríguez e Iván Alejandro Franco Morales, quienes leyeron, corrigieron y aportaron ideas para enriquecer esta tesis.

A la M. en C. Blanca Delgado Coello por su asesoría, apoyo técnico y académico para el desarrollo de este trabajo.

A los Laboratorios Silanes, al Dr. Jorge Paniagua y a Araceli Olguín por colaborar en este trabajo de investigación.

Al Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE por el material otorgado para realizar parte del desarrollo experimental.

A mi grandiosa Universidad Nacional Autónoma de México, que desde adolescente me enseñó una visión diferente de ver el mundo y me obsequió un estilo para vivir. Ahora llevo el azul en mi sangre y el oro en mi corazón. Con ello hago el reconocimiento también hacia sus profesores, académicos y administrativos.



**La verdadera amistad es como la fluorescencia,  
resplandece mejor cuando todo se ha oscurecido.**

*Rabindranath Tagore (1861-1941)*

Esta tesis está dedicada a mami Luz porque gracias a ella he disfrutado de una vida placentera y ha sido el motor para lograr este objetivo. Agradezco su apoyo, entusiasmo y paciencia, te amo mamá.

A la memoria de mi mama Jaci quien seguramente se encuentra gozando de otras delicias. De ella guardo unos cuantos secretos y algunas lágrimas para el final de cada mes. Te pienso mucho abue y te extraño.

A mi hermana Yazmín a quien quiero muchísimo, deseo agradecerle todas las cosas que con ella aprendí, por todos los juegos que compartimos y por la oportunidad que me ha brindado para creer que todo puede ir mejor.

A mis tíos con el más sincero cariño Luis, Karla, Jesús, Martha, Raul, Ana, Lupita, Julio, Alejandro, Susan, Mary y Daniel, por ayudar en mi formación con su sabiduría y experiencia, de diferente manera los quiero mucho a todos. A mis primos sabios y ansiosos que van locos por la vida deseando ser felices: Yetlanetzi, Geraldine, Alí, Luis Carlos, Julio, Moy, Ulises, Martha, Paty, Jorge, Armando y Víctor.

A Jair por creer en mí, por llenarme de nuevas ilusiones a cada momento y por enseñarme lo que podría ser la verdadera esencia del amor.

A mis adorables hermanas del alma e incondicionales cómplices con quienes descubrí que la amistad verdaderamente existe y que podemos aderezarla día a día con los mejores ingredientes: Guadalupe Canchola (Maldita) y Sandra Rodríguez (Bruja), las admiraré y querré siempre. A mis fabulosos amigos de la facultad: Itzhel García (Itzhelilla) a quien quiero mucho y agradezco por compartir conmigo tan lindas experiencias, a Ernesto Jiménez (Chore), Paco Figueroa (Pato), Adriana Armenta, Susan Rodríguez, Paty Cisneros, Claudia



Luis (Gorda), Héctor Ramírez (Artista), Francisco Valdés (Aspanucín) y el famosísimo Negro, Oliver Martínez. A ellos no solo dedico unas líneas de este documento, dedico todos los fantásticos momentos que juntos hemos vivido. Y de una manera muy especial a Jeimy Ruiz porque no hubo tiempo ni palabras para poder recompensarle el placer de haberla conocido.

Gracias porque día a día podemos encontrar personas maravillosas que enriquecen nuestra alma y nuestra mente. Los Mas del laboratorio 322 Norte me dieron su cariño, su apoyo y su asesoría: Blanquius Delgado, Juan Peluche, Lucy Alonso, Natalia Manzano, Malena Gutiérrez, Pablo Reyes, Paola Mendoza, Raquel Trejo, Lupita García, Salvador Damián y mi querida Vicky Vieyra. De los laboratorios vecinos y que ahora también son parte de mi historia: Paola Moreno, Lorena Morales, Genaro Vázquez, Marce Sosa, Silviux Escobedo, Juan el Master. Con un especial cariño a Marquito Briones y a Héctor Rincón quienes han sido geniales desde que los conozco.

A mis amigos Silanoicos: Araceli Olguín, Laura Uribe, Ana Alonso, Alma Buelna, Norma Cruz, Margarita Flores, Constantino Beltrán, Fernando Flores, Gabriel Sandoval, Hector Ocampo e Hilda Vázquez, gracias por su incondicional apoyo y recibimiento en el admirable equipo de trabajo que conforman.

A mis amigos de juego y no precisamente del “poker” Karina Silva, Enrique Arteaga (Kobe) y al fabuloso equipo del IFC: Nachito, Aurey, Ivette, Juan, Manuel, Miguel y Sergio, porque con ellos el básquet se vuelve algo fantástico.

Esto pareciera ser sólo una pequeña parte incluida en mi trabajo de investigación, sin embargo quien me conoce sabe que es mucho más que eso. Reconocer a cada mañana el rayo de sol que fortalece e ilumina mi vida y a todo lo que le da marcha a mi fe, simplemente es extraordinario. Ojala todos pudiéramos reflejarnos en medio de unas líneas al final de un buen viaje. Ahora yo tengo esa gran oportunidad y por ese sencillo hecho, mi más profundo agradecimiento.



Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
1.1 Metabolismo de lípidos.....	11
1.2 Proteína transferidora de ésteres de colesterol.....	15
1.3 Aterosclerosis.....	18
1.4 CETP y la aterosclerosis.....	21
1.5 Pruebas clínicas útiles en el diagnóstico de la aterosclerosis.....	23
1.5.1 Perfil de lípidos.....	23
1.5.2 Medición de CETP como complemento al perfil de lípidos.....	24
2. Antecedentes.....	26
2.1 Determinación del nivel de CETP plasmática.....	26
2.2 Diseño del péptido antigénico y producción de anticuerpos.....	27
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos particulares.....	29
4. Material y métodos.....	30
4.1 Obtención del estándar de oro.....	30
4.1.1 Purificación de CETP plasmática.....	30
4.1.2 Cromatografía de intercambio iónico.....	30
4.1.3 Cromatografía de afinidad.....	31
4.2 Cuantificación de proteína.....	33
4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	34
4.4 Inmunoanálisis tipo Western blot.....	34
4.5 Inmunoanálisis tipo Dot blot.....	35
4.6 Sistema de diagnóstico para cuantificar el nivel de CETP plasmática.....	36
4.7 Estandarización del sistema de ELISA.....	37
4.8 Validación del sistema.....	40
4.8.1 Selectividad.....	41
4.8.2 Límite de cuantificación.....	41
4.8.3 Exactitud.....	41



---

4.8.4 Precisión.....	42
4.8.5 Robustez.....	43
4.8.6 Linealidad.....	43
5. Resultados.....	45
5.1 Obtención del estándar de oro.....	45
5.2 Cuantificación de CETP purificada.....	50
5.3 Validación.....	51
6. Discusión.....	56
7. Conclusiones.....	60
8. Apéndice.....	61
9. Bibliografía.....	65



---

Apo	Apolipoproteína
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados Celsius
CETP	Proteína ésteres de colesterol (Cholesteryl ester transfer protein)
cm	Centímetro
CT	Colesterol Total
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DS	Desviación estándar
ECV	Enfermedades cardiovasculares
ELISA	Ensayo Inmunoenzimático Absorbente (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ES	Error estándar
FE	Factores etiológicos
FR	Factores de riesgo
g	Gramo
h	Hora
HDL	Lipoproteína de alta densidad (High density lipoprotein)
IA	Índice aterogénico
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia (Intermediate density lipoprotein)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IRMA	Ensayo Inmunoensayométrico
kDa	Kilodaltones
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LCAT	Lecitin Colesterol Acil Transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
Log 10	Logaritmo base 10
LPL	Lipoproteína lipasa
m	Metro



---

mA	Miliamperes
mg	Miligramos
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
Pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos (Phospholipid transfer protein)
PM	Peso molecular
Pmáx	Presión máxima
RNA	Ácido ribonucleico
UNAM	Ácido ribonucleico mensajero
Rpm	Revoluciones por min
s	Segundo
TBS	Tris-Amortiguador salino
Tg	Triglicéridos
TMB	Tetrametilbencidina
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (Very low density lipoprotein)
WR	Reactivo de trabajo "Método de BCA"
DTNB	Ácido 5,5' -Ditio-bis-2-Nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HCl	Ácido clorhídrico
NaCl	Cloruro de sodio
SDS	Dodecil sulfato de sodio



La aterosclerosis es un padecimiento asociado al trastorno del metabolismo de lípidos que permanece asintomático durante años. Puede iniciar desde la infancia y llevar a la oclusión arterial con sus manifestaciones clínicas entre la cuarta y quinta décadas de vida. El método de diagnóstico en uso considera la evaluación de los "Factores de Riesgo Coronario", entre ellos se encuentran los niveles elevados de colesterol total y niveles de LDL y HDL. Sin embargo, estos parámetros sólo permiten establecer un "indicio clínico de riesgo de aterosclerosis". La detección oportuna y el tratamiento adecuado de estas anomalías reducirían de manera importante la incidencia del proceso aterosclerótico (Alonso *et al*, 2003; Lerman *et al*, 1994). En este trabajo, presentamos la validación de una nueva prueba diagnóstica complementaria a los métodos rutinarios utilizados para evaluar el riesgo de aterosclerosis. Ésta estrategia se sustenta con la cuantificación de los niveles plasmáticos de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol (CETP) complementada con un estándar biológico y un estándar sintético. Trabajos anteriores han demostrado que CETP tiene un papel central en el metabolismo de las lipoproteínas promoviendo intercambios de ésteres de colesterol y triglicéridos, participando en el desarrollo de enfermedad coronaria arterial. La determinación y cuantificación de la proteína aumentará la certeza en el diagnóstico y facilitará la identificación temprana de individuos asintomáticos así como el seguimiento clínico de pacientes ya diagnosticados (Alonso *et al*, 2003; Lerman *et al*, 1994).



## 1.1 Metabolismo de lípidos

El colesterol es un constituyente esencial de las membranas celulares y también es precursor de ácidos biliares y hormonas esteroideas. La célula satisface su necesidad de colesterol mediante un balance entre síntesis e ingesta a través de la dieta. Sin embargo, por ser prácticamente insoluble en agua no puede ser transportado en el plasma sanguíneo de manera libre, razón por lo que es esterificado y empaquetado junto con proteínas transportadoras específicas o **apolipoproteínas (Apo)**, formando las llamadas **lipoproteínas plasmáticas** (Nelson *et al*, 2005).

Las lipoproteínas plasmáticas están determinadas por su sitio de síntesis, su composición lipídica y su contenido de apolipoproteínas, las cuales son esenciales en el transporte de los lípidos, ya que actúan como señalizadores para dirigir a las lipoproteínas hacia tejidos específicos o para la activación de enzimas específicas (Tabla1) (Nelson *et al*, 2005).

Las lipasas y las proteínas transferidoras de lípidos son las responsables de la transformación secuencial de las lipoproteínas. Entre las lipasas destaca la lipoproteína lipasa (LPL), localizada en el endotelio de los capilares en músculo y tejido adiposo. Una de sus funciones es la de retirar los triglicéridos de las lipoproteínas al ser reconocida por la Apo C para ser posteriormente metabolizados en el tejido muscular (Fielding *et al*, 1996). La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) son responsables de enlazar el metabolismo entre lipoproteínas. En el plasma, CETP es responsable de todo el intercambio de lípidos neutros (ésteres de colesterol y triglicéridos) y de aproximadamente el 30% de la transferencia de fosfolípidos entre las lipoproteínas. Por otro lado, PLTP facilita el intercambio sólo de fosfolípidos entre lipoproteínas, y no tiene actividad de transferencia de lípidos neutros (Tall, 1995).

**Tabla 1.** Clasificación de las lipoproteínas de acuerdo a su densidad y composición (Nelson et al, 2005)

LIPOPROTEÍNA	ORIGEN	CLASES DE APOPROTEÍNAS	DENSIDAD (g/L)	COMPOSICIÓN (% w/w)				
				PROTEÍNA	FOSFOLÍPIDOS	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO	TRIGLICÉRIDOS
Pre $\beta$ -HDL	Hígado e Intestino	A-I, CI, CII	> 1.21	70	25	5	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
HDL-3			1.12-1.21	55	25	3	16	1
HDL-2			1.063-1.12	43	30	5	20	2
HDL-1		A-I, A-II, Cs, E	< 1.063	32	36	6	23	2
Quilomicrones	Intestino	B-48, A-I, A-II, CII, E	~ 0.96	2	105	< 1	< 1	93
Remanentes de Quilomicrones	Plasma		< 1.109	8	10	4	4	74
VLDL	Hígado	B-100, CI, CII, CIII, E	< 1.006	10	15	6	14	53
IDL	VLDL	B-100, Cs, E	1.006-1.019	18	22	7	23	31
LDL	VLDL	B-100	1.019-1.063	21	21	9	42	4



Los *quilomicrones* constituyen las lipoproteínas de mayor tamaño. Contienen en su interior una elevada porción de triglicéridos derivados de la dieta y en su superficie las apolipoproteínas Apo B-48, Apo E y Apo C-II (Fielding *et al*, 1996). Son sintetizados en el retículo endoplásmico de las células epiteliales que recubren el intestino delgado para posteriormente trasladarse a través del sistema linfático donde entran al torrente circulatorio. La Apo C-II activa la lipoproteína lipasa de los capilares de los tejidos adiposo, cardiaco, muscular esquelético y mamario, permitiendo la liberación de ácidos grasos a éstos tejidos, donde serán almacenados como combustible. Los quilomicrones que han sido desprovistos de la mayor parte de sus triglicéridos pero que aún contienen colesterol, Apo E y Apo B-48, se transportan a través del torrente sanguíneo y posteriormente son degradados en los lisosomas para que sus constituyentes sean reciclados (Figura 1).

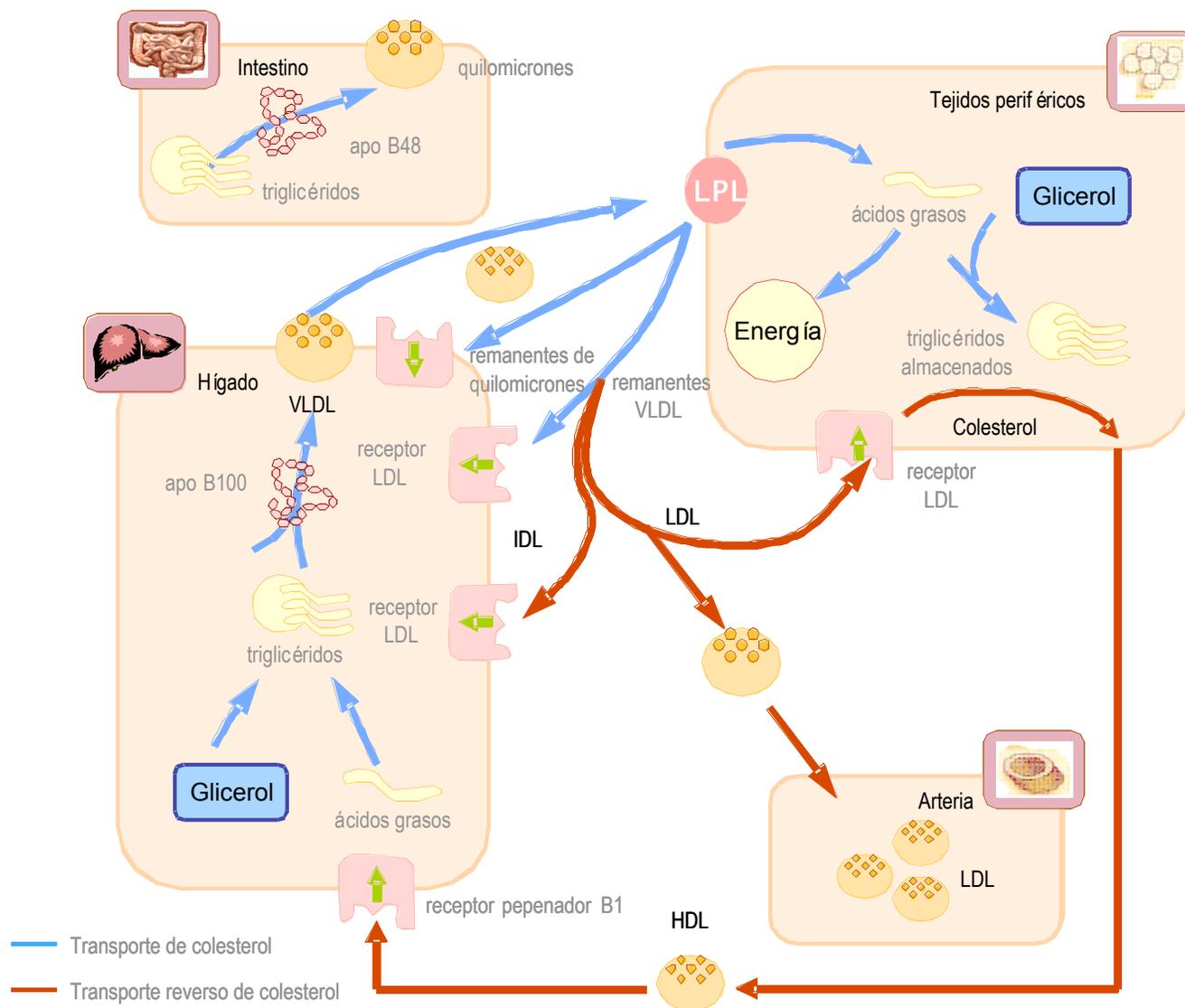
Cuando en la dieta hay una mayor ingesta de ácidos grasos o de carbohidratos que los requeridos, éstos se convierten en triglicéridos en el hígado y se agrupan con algunas apolipoproteínas formando *lipoproteínas de muy baja densidad* (VLDL). Además de triglicéridos, las VLDL contienen colesterol y ésteres de colesterol, Apo B-10, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo E (Tabla 1) y se transportan en la sangre desde el hígado hasta el músculo y tejido adiposo, donde nuevamente es activada la lipoproteína lipasa por Apo C-II liberando ácidos grasos y triglicéridos.

En el paso en el que las VLDL pierden parte de sus triglicéridos se forman los remanentes de VLDL mejor conocidos como *lipoproteínas de densidad intermedia* (IDL). Algunos de estos remanentes pierden la totalidad de sus triglicéridos dando lugar a las *lipoproteínas de baja densidad* (LDL), las cuales son muy ricas en colesterol, ésteres de colesterol y principalmente Apo B-100. Esta apolipoproteína juega un papel muy importante en el reconocimiento de receptores de las LDL localizadas en la membrana celular de los tejidos donde son transportados tanto el colesterol como sus ésteres para su captación.

Brevemente, la fijación de LDL a su receptor específico da inicio a la endocitosis mediada por receptor, donde el complejo LDL–receptor es internalizado en la célula dentro de un endosoma. Este endosoma se fusiona con un lisosoma que contiene enzimas



hidrolíticas para los ésteres de colesterol, liberando colesterol y ácidos grasos al citosol, asimismo la Apo B-100 se degrada en aminoácidos que son liberados igualmente al citosol, pero el receptor se recicla y regresa a la superficie para internalizar una nueva partícula.



**Figura 1.** Metabolismo de lipoproteínas. Se muestran las dos principales rutas del transporte de colesterol con la participación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), baja densidad (LDL), densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Modificado de Baynes J., 1999).



Las *lipoproteínas de alta densidad* (HDL) contienen Apo AI y transportan principalmente colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado. Las HDL's recién formadas o pre $\beta$ -HDL, tienen alta densidad y pocos lípidos, son efectivas receptoras del colesterol libre de la superficie celular de los tejidos periféricos. Su densidad decrece al acumular lípidos, convirtiéndose en pre $\beta$ -HDL discoidales o HDL-1. La maduración de estas partículas está determinada por la lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT), responsable de la esterificación del colesterol libre. Una vez esterificado el colesterol, pasa de la superficie celular al interior de la HDL transformándose esta partícula en HDL-3. Mientras más colesterol libre y fosfolípidos se transfiere de las LDL a las HDL-3, estas partículas se transforman mediante la intervención enzimática de la LCAT en HDL-2. Las HDL-2 son moléculas que finalmente transportan el colesterol de tejidos periféricos al hígado. Este fenómeno de transporte de colesterol es denominado "transporte reverso". Sin embargo, parte del colesterol asociado a HDL puede ser transferido de nuevo a lipoproteínas que contienen Apo B (Fielding *et al*, 1996).

El colesterol que entra en las células puede incorporarse en membranas o ser nuevamente esterificado para su almacenamiento. En condiciones de homeostasis, la velocidad de síntesis de colesterol se ve reducida una vez que la cantidad disponible de colesterol a partir de LDL es suficiente, impidiendo así su acumulación excesiva. Sin embargo, si hay una producción no regulada de colesterol y un alto consumo en la dieta, fácilmente se superan los niveles requeridos para el organismo causando enfermedades graves como lo es la aterosclerosis.

## **1.2 Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)**

Entre las moléculas que participan en la homeostasis de lípidos se puede distinguir particularmente a la Proteína Transferidora de Esteres de Colesterol (CETP, por sus siglas en Inglés Cholesterol ester transfer protein), la cual promueve el homointercambio de ésteres de colesterol entre lipoproteínas de alta densidad (HDL) y baja densidad (LDL), y el heterointercambio de ésteres de colesterol y triglicéridos entre HDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el plasma sanguíneo (Tall, 1995).



CETP es una glucoproteína hidrofílica, termoestable y altamente conservada en varias especies de mamíferos, con un punto isoeléctrico que oscila entre 4.6 y 5.4. El peso molecular de la isoforma humana deducido del DNA complementario (DNAC) es alrededor de 53kDa, sin embargo, en geles desnaturizantes se distinguen bandas de 66 y 74 kDa, de las cuales se han purificado principalmente dos fracciones de 66 y 69 kDa. La diferencia entre los pesos moleculares puede deberse a distintos grados de glucosilación de la asparagina presente en el residuo 341 (Stevenson *et al*, 1993 y Tall, 1995).

La secuencia inferida del DNAC de CETP humano incluye 476 aminoácidos con alto contenido de residuos hidrofóbicos, de los cuales los aminoácidos 88, 240, 341 y 396 son sitios de glucosilación (Tall, 1995). La isoforma de humano presenta 81% de homología con la isoforma de conejo, si se compara con los 496 aminoácidos que constituyen a la CETP de conejo y las dos terceras partes de los cambios son sustituciones conservativas (Nagashima *et al*, 1988). A nivel de secuencia de RNAm estas especies comparten una homología del 85% (Quinet, 1993). Los últimos 26 aminoácidos del carboxilo terminal presentan una estructura típica de  $\alpha$ -hélice anfipática, de los cuales los residuos F481, L488, F491 y L495 se encuentran directamente involucrados en el intercambio de ésteres de colesterol. Las modificaciones en dicha estructura o en la asparagina del residuo 341, pueden conducir a la disminución en el reconocimiento de los lípidos traduciéndose en una baja actividad de transferencia (Au-Young *et al*, 1992; Wang, 1993; Bolaños *et al*, 1998). Asimismo, la actividad transferidora parece ser modulada mediante la cantidad de CETP presente en el plasma y de inhibidores circulantes (Nagashima *et al*, 1988).

El hígado es el órgano que presenta los niveles más altos de RNAm codificante para CETP, sin embargo el tejido adiposo es el que contribuye más a los niveles circulantes en plasma, debido a la proporción superior en masa corporal. Otros órganos que expresan RNAm de CETP son el bazo, intestino delgado, riñón, músculo esquelético, músculo cardíaco y glándulas suprarrenales, sin embargo, el bazo de conejo no tiene cantidades detectables de RNAm. Los niveles en plasma varían enormemente entre las especies. El análisis de Northern blot de hígado revela cantidades significativas de RNAm de CETP en humano, mono y conejo, así como niveles no detectables en cerdo, ratón y rata (Nagashima *et al*, 1988).



Tanto CETP humana como la de conejo tienen características hidrofóbicas, lo que se encuentra altamente relacionado con la función en la transferencia de lípidos neutros. A nivel de estructura ambas presentan gran similitud. Se ha observado que en estas dos especies la actividad de CETP plasmática es alta, y ambas son susceptibles a aterosclerosis inducida por la dieta, mientras que especies como la rata cuya actividad de CETP es baja presentan resistencia a estas enfermedades (Nagashima *et al*, 1988).

La expresión del gen de CETP es regulada mediante procesos inflamatorios, hormonales y estímulos nutricionales. Una dieta rica en grasa induce de manera importante el incremento de la actividad de CETP indicada con el aumento de transferencia de ésteres de colesterol de HDL a VLDL y LDL; además, se ha reportado el aumento del RNAm de CETP hepático en diferentes especies, incluyendo conejos, hámsters, monos y humanos. Esta regulación puede representar un mecanismo homeostático para el inicio del transporte reverso del colesterol (Oliveira *et al*, 1996).

El efecto de la dieta sobre la transferencia de ésteres de colesterol mediada por CETP, ha sido claramente observado en estudios de ratones transgénicos. En ratones en los que se expresa el gen de CETP humano o de mono, puede inducirse de 2 a 6 veces la actividad de la proteína, comprobándose principalmente por una reducción significativa en la cantidad de la fracción HDL en plasma. De hecho, observaciones recientes sugieren que el efecto de una dieta alta en colesterol sobre el perfil de lipoproteínas plasmáticas puede estar principalmente expresado mediante el mecanismo de transferencia de lípidos de CETP. El incremento resultante de la proporción de VLDL y LDL sobre HDL en plasma de ratón transgénico alimentado con una dieta alta en colesterol ha sido asociado con el aumento de la severidad y progresión de lesiones ateroscleróticas, lo cual indica que alteraciones de la distribución de colesterol en plasma mediadas por CETP son potencialmente aterogénicas (Lagrost 1994).

Estudios *in vitro* realizados en una línea celular enterocítica de humano (CaCO-2), indicaron que los ácidos grasos pueden aumentar la expresión de CETP. Los efectos de los ácidos grasos dietéticos en la actividad de CETP en plasma, demostraron ser dependientes



del grado de saturación de su cadena acil-carbonada. Se encontró asociada la ingesta de ácidos grasos *cis*-insaturados con la reducción significativa de la actividad de transferencia de ésteres de colesterol comparada con dietas enriquecidas de ácidos grasos *trans*-insaturados (Lagrost 1994).

### 1.3 Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica asociada al trastorno del metabolismo de lípidos, caracterizada por la lesión sistémica de las arterias, que se define como el engrosamiento focal de la íntima, constituido por cúmulos de grasa, capas de tejido conjuntivo y una zona de necrosis, encontrándose con frecuencia atrofia de la media. Condicionada por trastornos metabólicos, la aterosclerosis se debe a la acumulación de lípidos, básicamente colesterol libre y esterificado, en las paredes de los vasos sanguíneos (Fielding, 1996).

Este padecimiento puede iniciar desde la infancia y permanecer asintomático durante años, llevando a la oclusión arterial con sus manifestaciones clínicas entre la cuarta y quinta décadas de vida y es de especial interés en población mexicana, debido a que las cardiopatías isquémicas constituyen ya la tercera causa de muerte de individuos en edad productiva (INEGI, 1998).

Desde el punto de vista etiopatológico, un ateroma es una placa fibroadiposa localizada en la capa íntima de la pared vascular. Consta de un núcleo formado por lípidos, desechos celulares y una cubierta fibrosa constituida por macrófagos, células musculares lisas y fibras de colágeno. Las moléculas lipídicas localizadas en el centro de la lesión provienen del plasma cuando en una fase inicial las LDL's atraviesan la capa de células endoteliales e ingresan a la capa subendotelial, donde quedan atrapadas entre las fibrillas de la matriz extracelular. Aparentemente, este proceso no es mediado por receptores sino por el contrario, constituye un fenómeno de difusión pasiva que depende de la concentración de este tipo de lipoproteínas en plasma. Una vez en la íntima, atrapadas en microdominios aparecen fenómenos oxidativos que modifican a los ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos y a



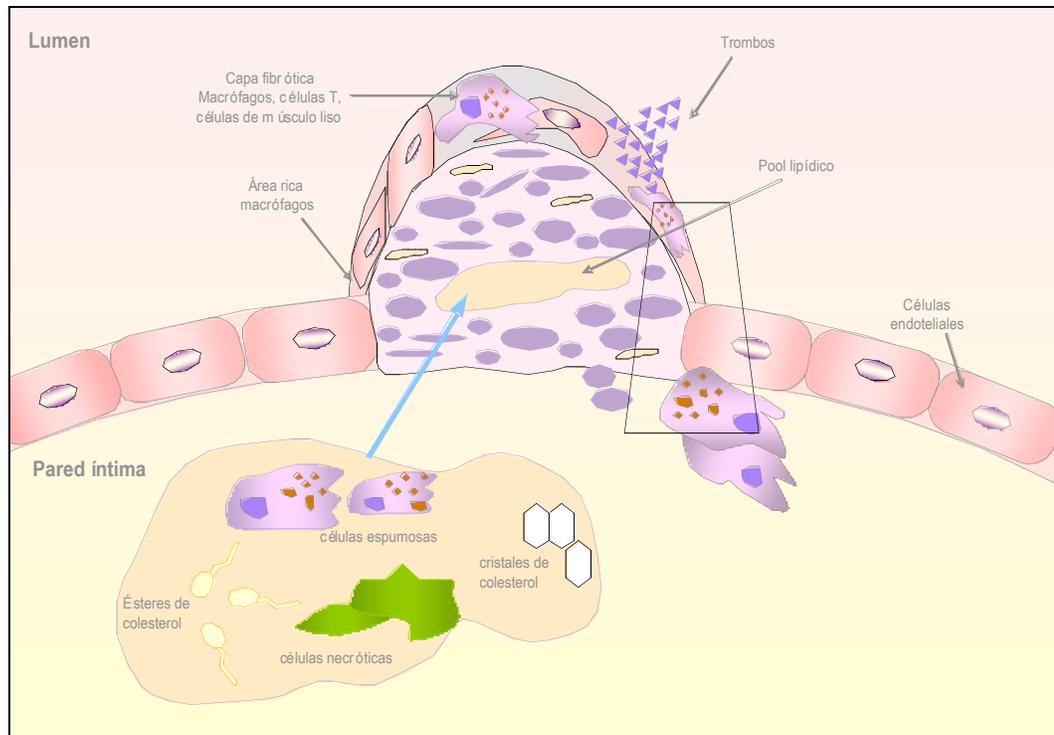
la Apo B, dando origen a las LDL modificadas.

Las LDL modificadas inducen la producción de proteínas quimiotácticas de monocitos y factor estimulante de colonias de macrófagos, igualmente estimulan la secreción de interleucina 1 en los miocitos y la expresión de moléculas de adhesión intercelular en la superficie del endotelio. Esto estimula la migración, concentración y activación de macrófagos en la íntima, produciendo mayor liberación de sustancias oxidantes dando origen a las LDL's oxidadas.

Los macrófagos en condiciones normales poseen receptores específicos para LDL, los cuales intervienen en el proceso selectivo de endocitosis. Sin embargo, este mecanismo depende de la concentración de lipoproteínas en el interior de la célula de tal forma que se detiene cuando los niveles intracelulares alcanzan un umbral crítico. Paralelamente, debido a mecanismos de oxidación, la Apo B sufre modificaciones estructurales de tal magnitud que no es reconocida por sus receptores, sino por receptores pepenadores o "scavenger", que no están sujetos a fenómenos de retroalimentación negativa. De esta manera, penetran cantidades masivas de lípidos que se acumulan en el citoplasma y confieren un aspecto característico al macrófago, dando lugar a las células espumosas. Los macrófagos activados producen diversas citocinas y factores de crecimiento que potencian la cascada inflamatoria. Además inducen la proliferación de músculo liso y depósito de colágeno, fenómenos relacionados con la maduración del ateroma (Figura 2).

En una etapa subsiguiente, estos compuestos terminan por destruir la célula con liberación de su contenido hacia el espacio extracelular. El lugar ocupado por los macrófagos es remplazado por una zona necrótica que confiere inestabilidad a la placa ateromatosa favoreciendo su ruptura con la aparición consiguiente de fenómenos trombóticos locales.

Las partículas HDL en el plasma atraviesan el endotelio y remueven el colesterol de células involucradas en el ateroma. De acuerdo con lo anterior, la acumulación de colesterol en el ateroma se debe a un desequilibrio entre el recambio LDL-HDL de lípidos a través del endotelio.



**Figura 2.** Formación de placa aterosclerótica. Proceso que favorece la formación de células espumosas y el enriquecimiento del depósito de colesterol. Niveles elevados de LDL en plasma, favorecen el depósito de colesterol en la lámina elástica de la íntima (Modificado de Baynes, J., 1999).

El ser humano se enfrenta a diversos factores que pueden alterar su salud, como los factores etiológicos (FE) y factores de riesgo (FR). Los primeros son llamados porque se ha comprobado que tienen algún efecto específico que puede desencadenar la enfermedad; entre ellos pueden mencionarse la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus, el tabaquismo, niveles elevados de LDL, niveles bajos de HDL y alteraciones en las apolipoproteínas. Por ejemplo en los pacientes diabéticos, la aterosclerosis es una de las principales causas de morbi-mortalidad. Estos pacientes tienen de dos a cuatro veces más riesgo de presentar enfermedad coronaria y de cuatro a cinco veces más posibilidades de desarrollar enfermedad vascular cerebral y periférica.

Con los factores de riesgo la correlación no ha sido probada, sin embargo, puede existir la posibilidad de que estén relacionados con el desarrollo de la enfermedad (Alonso *et al*, 2003 y Lerman *et al*, 1994).



## 1.4 CETP y aterosclerosis

CETP promueve el homointercambio de ésteres de colesterol entre HDL y LDL, y el heterointercambio de ésteres de colesterol y triacilglicéridos entre HDL y VLDL. Su efecto sobre el metabolismo de las HDL tiene influencia sobre su contenido de ésteres de colesterol, modificando su composición, tamaño y estructura esférica. Aún cuando CETP también interviene en el transporte reverso del colesterol, su capacidad aterogénica no depende de su efecto sobre el nivel de HDL, sino sobre la distribución de su población.

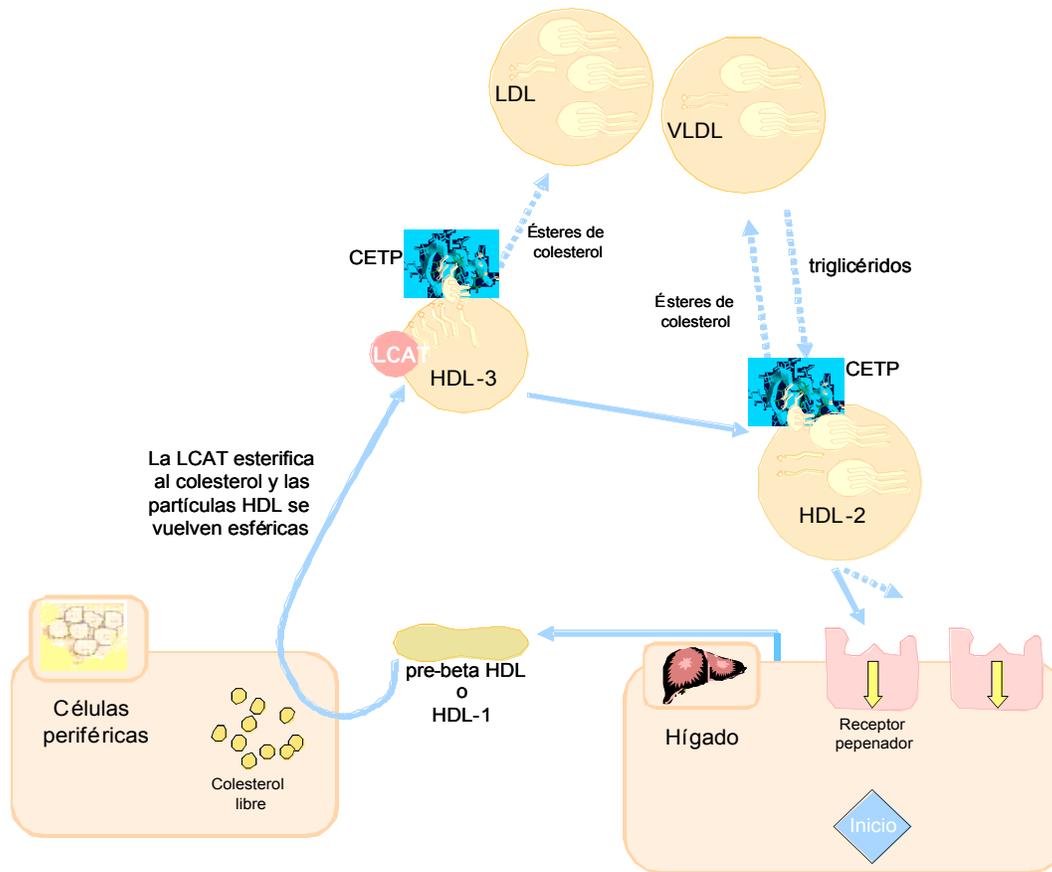
El efecto de CETP en la aterosclerosis depende del metabolismo de las lipoproteínas, debido a que induce altos niveles de LDL y VLDL, ambas asociadas con el progreso de la aterosclerosis. CETP participa en la remoción de ésteres de colesterol, estimulando su transferencia de HDL a VLDL, LDL y quilomicrones que son retiradas del plasma por el hígado con procesos mediados por receptor (Fielding, 1996); sin embargo, concentraciones altas de colesterol asociadas a LDL, deficiencia en la capacidad de remoción de éstas partículas y saturación de los receptores, son factores aterogénicos (Marotti *et al*, 1993).

En humanos con deficiencia genética de CETP se reportan niveles de HDL muy por arriba de los niveles de sujetos normales (hiperalfalipoproteinemia), tales individuos parecen tener una menor incidencia de enfermedad coronaria (Inazu *et al*, 1992; Lagrost, 1994; Tall, 1995). De igual manera, especies que carecen de manera natural de CETP tienen resistencia a este tipo de enfermedades, sólo cuando se crean animales transgénicos con el gen de CETP, se observa el decremento en el tamaño y niveles de HDL.

Algunos autores aseguran que la relación de CETP frente a los niveles de HDL e incidencia de enfermedad coronaria arterial es significativamente afectada por factores como tabaquismo, obesidad (Freeman *et al*, 1994) y alcoholismo, así como polimorfismos de CETP (Corbex *et al*, 2000). En respuesta a la hiperlipidemia, tanto endógena como exógena se estimula la expresión de CETP y el recambio de colesterol de los tejidos periféricos a HDL, lo que incluye la estimulación de LCAT. Este mecanismo optimiza el recambio de colesterol libre y esterificado en los tejidos periféricos (Figura 3).



La utilidad de la detección y cuantificación de CETP radica en su importancia en el metabolismo de las lipoproteínas y en el desarrollo de enfermedad coronaria arterial (Marotti *et al*, 1993). Por otro lado, en estudios con animales alimentados con dietas altas en colesterol, se ha encontrado un complejo patrón de respuesta de los niveles del RNAm de CETP en tejidos periféricos, que resultan en el incremento equivalente de la actividad de CETP en plasma (Oliveira *et al*, 1996; Ritsch *et al*, 1993).



**Figura 3.** Transferencia de lípidos. Participación de la Proteína Transferidora de ésteres de Colesterol (CETP) (Modificado de Baynes, J., 1999).



## 1.5 Pruebas clínicas útiles en el diagnóstico de la aterosclerosis

### 1.5.1 Perfil de lípidos

En la actualidad la única manera para determinar indirectamente el riesgo de una persona para desarrollar enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis es mediante datos clínicos y un perfil de lípidos en sangre. De rutina se cuantifican los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos (Tg), niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) e índice aterogénico (IA).

Para la determinación de estos parámetros se ha utilizado la fórmula Friedewald:

$$\text{LDL} = \text{CT} - (\text{HDL} + \text{Tg}/5)$$

Este cálculo se realiza cuando el nivel de Tg es menor a 400 mg/dl, niveles superiores a éste se miden directamente en el laboratorio. Los criterios para considerar un caso de dislipidemia se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Límites de cuantificación para el perfil lipídico.

PERFIL	DESEABLE	LIMÍTROFE	ALTO RIESGO
Colesterol total (mg/dl)	< 200	200 – 239	> 240
Colesterol LDL (mg/dl)	< 130	130 – 159	> 160
Colesterol HDL (mg/dl)	Hombres: > 40 Mujeres: > 50		< 35
Triglicéridos (mg/dl)	< 150	150 - 249	> 400
Índice aterógeno	< 4.5		

Para establecer si existen o no desórdenes metabólicos en los niveles de lípidos plasmáticos, se consideran los valores limítrofes como condiciones de riesgo y niveles superiores a estos se consideran como de alto riesgo. Este criterio es de uso regular en clínica y se ha establecido en correlación con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV).



En el caso en que al menos tres de las variables se combinan en condiciones limítrofes y de alto riesgo, por ejemplo LDL es  $\geq 130$  mg/dl, Tg  $\geq 200$  mg/dl y HDL  $\leq 35$  mg/dl, se considera la existencia de una dislipidemia, sin embargo, el perfil de lípidos no puede directamente evaluar la presencia o ausencia de enfermedad cardiovascular, permitiendo sólo establecer un acercamiento clínico de riesgo de aterosclerosis. Por tal motivo consideramos que los reportes clínicos rutinarios deben incluir parámetros cuantitativos más confiables que incrementen la certeza en el diagnóstico de la aterosclerosis y faciliten la identificación oportuna de individuos asintomáticos, de esta manera se reduciría considerablemente la incidencia de este proceso.

### 1.5.2 Medición de CETP como complemento al perfil de lípidos

En el presente trabajo se propone la determinación de los niveles CETP como complemento a los estudios de rutina, debido a que esta proteína se encuentra estrechamente relacionada con el incremento de los niveles de colesterol total y LDL, favoreciendo el desarrollo de enfermedad coronaria arterial, lo que le confiere capacidad aterogénica. Por otro lado, es un hecho que la carencia de CETP plasmática en algunas especies, se asocia con la resistencia al desarrollo de las enfermedades asociadas a la hipercolesterolemia (Nagashima *et al*, 1988).

A la fecha se conocen varios sistemas para la cuantificación de CETP, entre ellos se encuentra un ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA), reportada por Guyard-Dangremont *et al*. (1994) cuyo diseño utiliza el anticuerpo monoclonal TP1 dirigido contra el extremo carboxilo terminal. Recuérdese que los 26 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína, conforman una  $\alpha$ -hélice anfipática, de la cual su región hidrofóbica está directamente involucrada en la transferencia de ésteres de colesterol. Este anticuerpo fue generado por Hesler *et al*. en 1988. Clark *et al*. (1995) utilizaron dos anticuerpos monoclonales para el desarrollo de dos sistemas, un ensayo de ELISA en sandwich y un ensayo inmunoradiométrico o IRMA. Thomas *et al*. (1996) proponen un par de anticuerpos monoclonales, ATM192 y J16-14, como herramientas útiles en técnicas como inmunotransferencia tipo Western y ELISA, sin embargo están dirigidos contra los residuos



131-142 de los 425 aminoácidos que componen CETP humana, por lo tanto no reconocen el extremo carboxilo.

Los sistemas de ELISA para la cuantificación de CETP, tanto en células en cultivo, como en plasma humano, presentan serias limitantes debido a las complicaciones técnicas y a la naturaleza de los equipos requeridos para su uso, además de que estos sistemas son de uso restringido y no se han podido aplicar en clínica. Tal es el caso de la patente estadounidense USO5770355, registrada por Brocia *et al* (1998), titulada “Heart disease test kit and method of determining a heart disease risk factor and efficacy of treatment for heart diseases”, que requiere de la síntesis de una partícula artificial y el uso de colesterol acoplado a una molécula fluorescente, y por lo tanto de un equipo necesario para medir fluorescencia.

En esta tesis se presenta el manejo y la validación inicial de un sistema para la cuantificación de CETP, con el propósito de adaptarse a las necesidades del uso en clínica, y cuyo registro de patente está en proceso. En el registro de patente, se presenta como “Motivo de la Invención” el proporcionar un sistema para detectar y cuantificar los niveles de CETP, en muestras biológicas y sintéticas de manera sencilla y rápida, que permita mejorar la detección, diagnóstico y seguimiento de individuos con riesgo de aterosclerosis, con o sin manifestaciones clínicas relacionadas a esta patología, y que se encuentren o no incluidos en grupos de riesgo, pretendiendo la incorporación de este sistema a protocolos y equipos de uso rutinario en laboratorios de clínica humana.

Con base en el resultado de esta prueba, se puede hacer el seguimiento de los pacientes ya diagnosticados, evaluar la seguridad de los programas de prevención y la efectividad de las dietas y/o tratamientos.



## 2.1 Determinación del nivel de CETP plasmática

En estudios anteriores no se han establecido límites para los niveles de CETP, ni puntos de corte en base a las otras categorías de los factores de riesgo, sin embargo, Ritsch en 1993 observó un rango entre 0.644 a 1.694  $\mu\text{g/ml}$  y una media de 1.1 ( $\pm 0.22$ )  $\mu\text{g/ml}$  usando un método inmunoradiométrico, en este estudio sólo se incluyeron 30 sujetos europeos normolipidémicos. En 1995 Clark R.W. *et al*, empleando el sistema IRMA en 44 sujetos normolipidémicos estadounidenses, establece una media de 2.1 ( $\pm 0.36$ )  $\mu\text{g/ml}$ , con un rango entre 1.28 a 2.97  $\mu\text{g/ml}$ .

En el 2001, Alonso *et al*, establecieron cuatro categorías para los niveles de CETP plasmática en base a un grupo de estudio, cuya muestra inicial estuvo compuesta por 256 sujetos. De acuerdo a los resultados, los niveles de CETP se encontraron entre 0.39 y 9.66  $\mu\text{g/ml}$  (7.344 y 181.917 pmol/ml) y la media fue de 2.3  $\mu\text{g/ml}$  ( $\pm 1.6$ ). Además de las diferencias entre las medias de estas poblaciones, se observó que el rango de datos en la población mexicana fue más amplio, lo que pudo compararse con los resultados de la población reportada por Zhuang *et al* (2001) con una media de 1.84 ( $\pm 1.55$ )  $\mu\text{g/ml}$  con un rango que va de 0.23 a 7.7  $\mu\text{g/ml}$ , determinado con 1128 sujetos sanos mediante un ensayo de ELISA en sándwich.

Alonso *et al* asentaron las categorías y los puntos de corte entre ellas (Tabla 3) de acuerdo a la correlación mostrada entre los niveles de CETP y las diferentes categorías de las variables CT, LDL e IA.

Tabla. 3 Niveles de CETP. Puntos de corte

CATEGORÍAS	DESEABLE	LIMÍTROFE	ALTO RIESGO	SOBRE-EXPRESIÓN
CETP $\mu\text{g/ml}$	$\leq 0.80$	0.81 – 1.80	1.81 – 5.99	$\geq 6.0$



## 2.2 Diseño del péptido antigénico y producción de anticuerpos

El péptido sintético CETP H486-S496 fue diseñado con la secuencia del carboxilo terminal de la proteína y sintetizado por Alpha Diagnostic Internacional, San Antonio Texas, USA (Tabla 3). Incluye un aminoácido de cisteína adicional en el amino terminal, para dirigir el acoplamiento a KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) y presenta un solo sitio de reconocimiento al sistema inmune que se utilizará como antígeno de referencia en la preparación de las curvas estándar. Cabe señalar que las KLH son proteínas acarreadoras de alto peso molecular que son comúnmente utilizadas para unirse a diferentes epítopes poco antigénicos, como péptidos menores de 50 aminoácidos. Esta unión estimula una respuesta inmune para la producción de anticuerpos.

La secuencia del péptido se encuentra dentro del motivo de unión a ésteres de colesterol y corresponde a la secuencia del residuo H486 al S496 de CETP de conejo, incluyendo tres de los cuatro residuos que son de especial importancia para mantener la capacidad de unión a lípidos, estos son: F481, L488, F491 y L495 (Alonso *et al*, 2003). Cabe señalar que el péptido sintético CETP H486-S496 no presenta homología con otros epítopes de CETP ni con otras proteínas, en cambio presenta alta similitud con el carboxilo terminal de CETP de varias especies, 100% con la de humano y mono, y 90% con la de hámster.

El péptido se encuentra en presentación de polvo fino blanco, cristalino, liofilizado y debe almacenarse en un lugar fresco y seco a 20 °C. Se utiliza para la preparación de la curva estándar en el ensayo de ELISA diluido en amortiguador de PBS pH 7.4.

### Caracterización fisicoquímica del Péptido sintético CETP H486-S496

Peso Molecular	1373.90 m.w.
Longitud (aminoácidos)	12
Secuencia	CHLLVDFLQSL
1 microgramo	727. 855 pmoles
Coefficiente de extinción molar	120±5%
1 Absorbancia a (280 nm)	11.45 µg/µl
Punto isoeléctrico	5.09



El péptido sintético se utilizó para obtener el anticuerpo policlonal IgY anti-CETP. Este anticuerpo policlonal se emplea como anticuerpo primario, específico para el motivo de la unión a lípidos neutros de CETP, útil tanto en estándares sintéticos como en muestras de plasma. Los anticuerpos se obtienen en gallinas de la línea Leghorn, inoculando por vía subcutánea, usando un protocolo estándar de 63 días. Una vez aisladas las IgY's de 12 huevos fueron titulados por técnica de ELISA.

Gallina # C638 Fecha de sangrado # 1 3/8/2005, # 2 3/22/2005

Gallina # C639 Fecha de sangrado # 1 3/8/2005, # 2 3/22/2005

Se utiliza un anticuerpo primario dirigido contra albúmina sérica bovina (BSA) (IgY anti-BSA) como control tanto en ELISA como Western blot y se confirma la especificidad de ambos anticuerpos utilizando como antígenos el péptido sintético libre, CETP purificada, el péptido sintético y CETP purificada acoplados a BSA y BSA (control negativo).

#### *Condiciones de almacenamiento*

Todos los lotes de anticuerpo primario y secundario deben llegar perfectamente etiquetados, certificados y refrigerados. Después de cotejar la información, se preparan alícuotas pequeñas (100µl) y se almacenan a temperatura de -4° C.

La información contenida en este trabajo se incluye en la Patente internacional en trámite de la Comunidad Europea, Canadá y E.U., de acuerdo al Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes. Registrada con apoyo de Laboratorios SILANES BIOCLON S.A. de C.V., con número de publicación internacional WO 02/32935.



#### **Objetivo general**

Efectuar la validación preliminar del método inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) en muestras plasmáticas de una población mexicana, llevando a cabo de manera simultánea la transferencia tecnológica del Instituto de Fisiología Celular a los Laboratorios Silanes.

#### **Objetivos particulares**

- Estandarizar el ensayo de ELISA para la detección y cuantificación de CETP.
- Obtener un estándar biológico llamado estándar de oro que sirva de referencia para la cuantificación de CETP en plasma.
- Estandarizar el ensayo de ELISA usando el estándar biológico y el anticuerpo específico contra CETP.
- Realizar las diferentes pruebas que incluye un estudio de Validación: 1) Límites bajos de detección y cuantificación, 2) Sensibilidad, 3) Linealidad 4) Exactitud, 5) Precisión y 6) Robustez.



#### 4.1 Obtención del estándar de oro

##### 4.1.1 Purificación de CETP plasmática (Figura 4).

Para la obtención de CETP se usaron dos paquetes de plasma sanguíneo de individuos sanos (180ml cada uno) proporcionados por el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE a los que se agregó con agitación constante los siguientes reactivos: estreptomicina 0.1%, benzamidina 0.01%, inhibidor de tripsina 0.01%, sulfato de gentamicina 320 mg/ml, ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) 1.5 mM y se ajustó la densidad ( $\delta$ ) a 1.21 g/ml con KBr, todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C (Pattnaik *et al*, 1978).

Para el ajuste de densidad fue necesario el empleo del siguiente factor:

$$\text{Factor } (\delta = 1.21 \text{ g/ml}) = 0.3265$$

$$gKBr = ml_{\text{plasma}}(0.3265)$$

$$gKBr = 360ml(0.3265) = 117.54gKBr$$

El plasma se colocó en tubos Quick-Seal de 39 ml sellados con calor y se centrifugaron durante 48 h a 39,000 rpm en un rotor 60 Ti a 4°C. Al finalizar la centrifugación se obtuvieron 3 fracciones. La primera de ellas es la de mayor densidad que contenía a las lipoproteínas, esta fracción se desechó y se recuperó la fracción clara intermedia que contiene a CETP (Pattnaik *et al*, 1978). Esta fracción fue dializada en una membrana (*Cellu Sep, Cut off = 3,500*) durante 48 h con dos cambios de 7 litros de amortiguador para diálisis: NaCl 4 M, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 7.4 y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min. El precipitado formado se eliminó y se recuperó el sobrenadante para utilizarlo de inmediato en las siguientes etapas.

##### 4.1.2 Cromatografía de intercambio iónico

Se empleó una columna de fenil-sefarosa CL-4B de 2.6 x 40 cm, la cual se lavó con amortiguador inicial de diálisis NaCl 4 M, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 7.4 y se equilibró con el amortiguador de diálisis únicamente. La preparación cruda de CETP (60 ml aprox.) se pasó a través de la columna y se lavó con 1 litro del amortiguador ya mencionado. Se eluyó



con el amortiguador NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 7.4 y finalmente con agua. De ambas eluciones se colectaron fracciones de 5 ml aproximadamente a un flujo promedio de 50 ml/h.

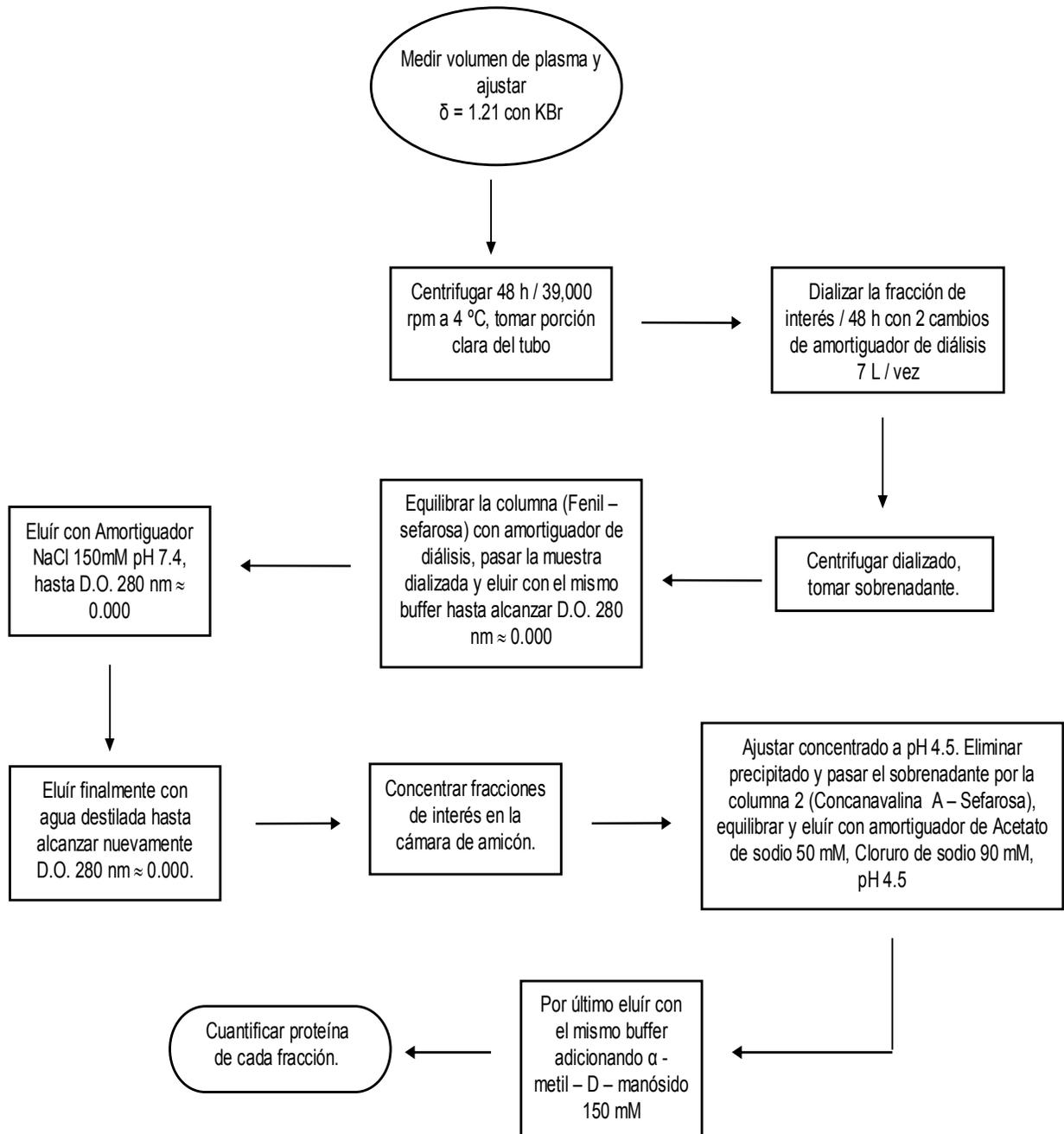
Se leyeron todas las fracciones en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm y las que registraron los valores más altos de absorbancia se concentraron en una cámara de amicón (*GRACE & Co, 50mL, Pmax 75psi, 5.3 kg/cm<sup>2</sup>*) empleando membranas YM 30 (*Ultrafiltration membranes, DIAFLO-GRACE & Co*), hasta un volumen promedio de 20 ml. Para guardar la columna por un largo periodo se agrega azida de sodio al 0.02% al amortiguador de diálisis.

#### 4.1.3 Cromatografía de afinidad

El volumen final concentrado se ajustó a pH 4.5 adicionando 1/9 del volumen total de acetato de sodio 0.5 M pH 4.5, se centrifugó 2 min a 1500 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual se pasó a través de la segunda columna de Concanavalina-Sefarosa de 1.0 x 10 cm equilibrada con acetato de sodio 50mM, NaCl 90mM, pH 4.5. Posteriormente se lavó la muestra empleando el mismo amortiguador para equilibrar la columna.

Finalmente se eluyó la columna con el mismo amortiguador adicionando  $\alpha$ -metil-D-manósido 150 mM y se colectaron fracciones de 1.0-1.5 ml, a velocidad no mayor a 10 ml/h. Estas fracciones se concentraron en el amicón de 20 ml empleando membranas YM 30 y a este concentrado se le cuantificó la cantidad de proteína empleando el método Protein Assay Reagent BCA (Pierce Rockford, IL, USA) (Figura 4).

La columna se lavó empleando el amortiguador Tris 50 mM más  $\alpha$ -metil-D-manósido 150 mM, pH 7.4, posteriormente agua y finalmente acetato de sodio 50mM NaCl, 90 mM, pH 4.5. Debe agregarse azida de sodio al 0.02% a este último amortiguador si la columna se guardará por un periodo de tiempo largo sin utilizarse.



**Figura 4.** Diagrama de flujo para la purificación de CETP. Ajuste de la densidad del plasma humano, diálisis y cromatografía en columna



## 4.2 Cuantificación de proteína

Se agruparon las fracciones de la purificación que contenían CETP (fracciones correspondientes a la curva rosa y azul de la figura 7) en tres grupos: 88, 92 y 102, para cuantificar la cantidad de proteína en cada grupo y realizar las pruebas de especificidad de los anticuerpos. Los tres grupos se reunieron en un solo concentrado para comenzar con las pruebas de validación.

La detección y cuantificación de proteína total se realizó mediante el método colorimétrico Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit. Este sistema utiliza ácido bicinconínico (BCA) para detectar el ión cuproso  $\text{Cu}^{+1}$ , cuando  $\text{Cu}^{+2}$  es reducido con la proteína en un ambiente alcalino. La reacción produce un complejo con dos moléculas de BCA y una del ión ( $\text{Cu}^{+1}$ ) exhibiendo una coloración púrpura, el cual es detectable a 562 nm y lineal, si se incrementa la concentración de proteína.

Se preparó la curva estándar de ocho puntos por duplicado en una placa de ELISA a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina 2 mg/ml en vehículo salino al 0.9% y azida de sodio al 0.05%. En la respuesta lineal de la curva de BSA se interpolaron los valores de absorbancia leídos de las muestras plasmáticas y de las fracciones colectadas en la purificación, efectuando previamente el siguiente procedimiento:

- Reactivo de trabajo (WR): se mezclaron 25 partes del reactivo Micro BCA™ MA, 24 partes del reactivo MB y 1 parte del reactivo MC, se agitó hasta desaparecer la turbidez y obtener una solución verde translúcida. Esta solución al igual que la curva estándar deben prepararse al momento de ser utilizados.
- Muestras plasmáticas: se tomaron alícuotas de 1 y 2  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma en microtubos de 0.5 ml y se mezclaron con acetona-agua al 60%. Se centrifugaron 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Las preparaciones se dejaron secar 10 min a 20°C y se resuspendieron en 300  $\mu\text{L}$  de WR. Se diluyeron 150  $\mu\text{l}$  de la muestra anterior por duplicado con 150  $\mu\text{l}$  de agua destilada.



- Fracciones colectadas: se colocaron 10 y 20  $\mu\text{l}$  de las fracciones por duplicado en los pozos de la placa para ELISA, se diluyeron en 150  $\mu\text{l}$  con agua destilada y se les adicionó 150  $\mu\text{l}$  de WR (sin tratamiento con acetona 60%). Se incubó 30 min a 60°C y se leyó la densidad óptica a 562 nm en el lector de placas (Microplate Reader BIO – RAD).

### 4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína (28  $\mu\text{l}$  aproximadamente) de las fracciones mencionadas anteriormente y se corrieron en geles de poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') en condiciones desnaturalizantes, utilizando concentraciones para el gel separador de 7.5% y 12% (Apéndice). Las muestras plasmáticas y los controles tanto negativos como positivos también se analizaron mediante este método. Las condiciones de corrida usadas fueron de 100 voltios a 20 °C durante 2 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para visualizar las proteínas.

### 4.4 Inmunoensayo tipo Western blot

Las membranas de nitrocelulosa poseen la propiedad de fijar en forma no covalente una gran variedad de macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas, por lo que pueden ser utilizadas como soporte sólido en ensayos inmunoenzimáticos. La transferencia de las proteínas se realizó utilizando membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (*Trans-Blot Transfer medium BIO–RAD, Hercules, CA, USA*) en un sistema húmedo aplicando una corriente de 300 mA durante 2 h a 4°C. El amortiguador utilizado para transferir las proteínas fue el siguiente: Trizma Base 25 mM, Glicina 0.194 M y Metanol al 20%.

La eficiencia de la transferencia se evaluó con la visualización de las bandas de las proteínas, mediante la tinción con colorante rojo de Ponceau (Figura 9) y el exceso del cual se removió con lavados de agua destilada. Paralelamente el gel se tiñó con azul de Coomasie para verificar si la transferencia fue completa. En este caso, las inmunotransferencias se realizaron para verificar en que fracciones se encontraba la proteína



de interés, además de estandarizar las condiciones para el uso de los anticuerpos IgY anti-CETP, anti-BSA y anti-Chicken IgY acoplado a peroxidasa.

Al comenzar con el inmunoanálisis Western blot fue necesario bloquear la membrana para evitar el reconocimiento inespecífico del anticuerpo. Para ello se preparó una solución al 2.5 % de leche descremada (Apéndice) en amortiguador Tris-HCl 20 mM, NaCl 15 mM, pH 7.6 (TBS) y tween al 0.1% y se incubó la membrana en 20 ml durante 1 h a 20°C. Se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario IgY anti-CETP diluido 1: 15,000 en TBS-tween 0.1% toda la noche a 4°C. Los lavados fueron de tres ciclos de 15 min cada uno en TBS-tween 0.1% a 20°C. Se incubó el segundo anticuerpo anti-Chicken IgY diluido 1: 20,000 en TBS-tween 0.1% por 2 h a 20°C. Al terminar la incubación, se repitió el lavado con TBS-tween 0.1% con la adición de un cuarto ciclo con amortiguador de TBS únicamente. La visualización se realizó mediante la detección por quimioluminiscencia con ECL (*Pierce, Rockford, IL, USA*) exponiendo en series de tiempo de 0.5, 1, 5, 10 y 20 min sobre placas auto-radiográficas X – OMAT (*Kodak Rochester, NY, USA*).

#### 4.5 Inmunoanálisis tipo Dot blot

Debido a que el número de alícuotas colectadas en la purificación está por arriba de 100, puede utilizarse el sistema de transferencia tipo Dot blot que permite analizar hasta 96 fracciones en una membrana de nitrocelulosa a fin de localizar de manera rápida y eficaz la fracción donde se encuentra CETP. Una vez fijado el antígeno en la membrana, se siguió un procedimiento similar al descrito para realizar un inmunoensayo tipo Western blot. La diferencia de este tipo de inmunoanálisis comparada con el Western blot, es el procedimiento para fijar el antígeno en las membranas, el cual se realiza a vacío.

Se adsorbieron 100 $\mu$ L de cada una de las 92 fracciones colectadas y muestras de plasma sobre las membranas de nitrocelulosa y se evaporó su diluyente a vacío. La membrana se bloqueó con 2.5 % de leche descremada en TBS-tween 0.1% a 20°C por 1 h. La solución de bloqueo se retiró y se incubó con el anticuerpo IgY anti-CETP diluido 1:15,000 a 4°C durante 12 h. Los lavados fueron de tres ciclos de 15 min cada uno con TBS-



tween 0.1% a 20°C. El anticuerpo secundario anti-Chicken IgY en dilución de 1:20,000 se incubó a 20°C durante 2 h y por último la membrana se lavó nuevamente con tres ciclos de TBS-tween 0.1% a 20 °C y un último ciclo de TBS sin tween. La visualización se realizó como se mencionó anteriormente, hasta conseguir la mejor señal.

#### 4.6 Sistema de diagnóstico en ELISA para cuantificar el nivel de CETP

El propósito principal del presente trabajo de tesis es llevar a cabo la validación de una nueva prueba diagnóstica complementaria al método en uso, en colaboración con los Laboratorios Silanes. Este sistema consiste en la cuantificación de los niveles plasmáticos de CETP basado en un inmunoensayo de ELISA indirecta, en el cual se puede predecir en sujetos la posibilidad de padecer aterosclerosis. La segunda parte del trabajo se enfoca a la transferencia de tecnología de éste sistema entre el Instituto de Fisiología Celular y las instalaciones de los Laboratorios Silanes para su posterior escalamiento.

El sistema descrito en la figura 5, consiste en un método de ELISA indirecta que involucra las siguientes herramientas clave para su uso en clínica e investigación: (1) Un péptido sintético diseñado con la secuencia de los últimos 11 aminoácidos del carboxilo terminal de CETP cuyos datos se muestran en la tabla 3, (2) un anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido sintético IgY anti-CETP generado en gallinas Leghorn (Alpha Diagnostic Internacional, San Antonio Texas, USA) (Alonso *et al*, 2003). La validez de este sistema se realiza contra el *Estándar de Oro* (CETP purificada de plasma). (3) El *Estándar de Oro* es a su vez evaluado con pruebas de especificidad con el anticuerpo IgY Anti-CETP mediante inmunoensayos de tipo Western-blot y Dot-Blot (4).

En este ensayo, la placa de ELISA de 96 pozos es sensibilizada con el péptido sintético como estándar de referencia y las muestras plasmáticas a cuantificar. Al ser incubados con el anticuerpo específico IgY anti-CETP se puede detectar y cuantificar CETP en correlación con la curva estándar.



Para preparar la solución stock del péptido sintético, se pesó 1mg aproximadamente, y se disolvió en 1 ml de amortiguador PBS pH 7.4. Se calculó la concentración real utilizando los parámetros del programa DNASTar y se diluyó hasta una concentración final de 6.0  $\mu\text{g/ml}$ .

$$\text{Abs}_{280\text{nm}} = 0.134$$

$$\text{Concentración} = 1.4728 \text{ mg/ml}$$

#### 4.7 Estandarización del sistema de ELISA

El sistema utiliza una microplaca para ELISA de 96 pozos (C96 MicroWell™ Plates Polystyrene, MaxiSorp™) en la que se acopló una curva de péptido sintético CETP H486-S496 en ocho diluciones seriales por triplicado. La curva estándar del péptido abarcó una concentración inicial de 0,0 a 6  $\mu\text{g}$  por pozo, en diluciones 1:2 sobre una matriz de PBS 7.4 y Plasma de rata<sup>1</sup> (Figura 12). Igualmente, se acoplaron las muestras plasmáticas problema en el mismo amortiguador tomando 100 $\mu\text{l}$  de una dilución 1:100 y sin tratamiento previo alguno. La placa se cubrió con egapack para evitar evaporación irregular de las soluciones. El acoplamiento se realizó a 4° C toda la noche.

Se retiró las soluciones antigénicas lavando tres veces con 300  $\mu\text{l}$  de PBS–tween 0.1% cada una en el lavador de placas (Immunowash Microplate Washer-Program 3) y se bloqueó con 200  $\mu\text{l}$  de Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 0.3% en PBS–Tween 0.1% incubando 1 h a 37° C.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se lavó la placa tres veces con PBS–tween 0.1% y se incubó con 100  $\mu\text{l}$  del Anticuerpo primario policlonal IgY Anti-CETP H486–S496 en dilución 1:5,000 en PBS durante 30 min a 37° C. Al final de la incubación se lavó nuevamente. Se preparó una dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario IgY Anti-Chicken conjugado a peroxidasa (PIERCE, Rockford IL, USA) en PBS para incubar la placa con 100  $\mu\text{l}$  durante 30 min a 37° C. Al finalizar esta incubación, se lavó tres veces con PBS–Tween

---

<sup>1</sup> La rata es un mamífero que carece de CETP y su plasma en dilución 1:2 en PBS proporciona la matriz ideal para el estándar sintético. Puede utilizarse otro plasma knock out de CETP



0.1% y una con PBS sin tween.

El revelado se efectuó adicionando en cada pozo 100  $\mu$ l de tetrametilbencidina 0,01 mol/l (TMB) incubando la placa 30 min a 37° C en oscuridad. La reacción colorimétrica se detuvo agregando 100 $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y se leyó a 450 nm en el espectofotómetro.

Para llevar a cabo la estandarización y tener las pruebas de validación preliminar del método, fue necesario introducir los pasos del método en el programa Bioworks del robot BIOMEK 2000 en los Laboratorios Silanes, estos pasos se traducen como instrucciones para ser ejecutadas por el robot.

El procedimiento de validación (5), inició con la transferencia de tecnología a los Laboratorios Silanes, la normalización del método así como el empleo del Robot BIOMEK 2000 (6), un protocolo, que reguló el control de materias primas, estándares de referencia, incluyendo la verificación, calibración y control del equipamiento (7). Finalizó con la determinación de los parámetros de validación (8) con fin de normalizar el error inter e intralaboratorio, lo que nos llevará a la meta final de escalamiento.

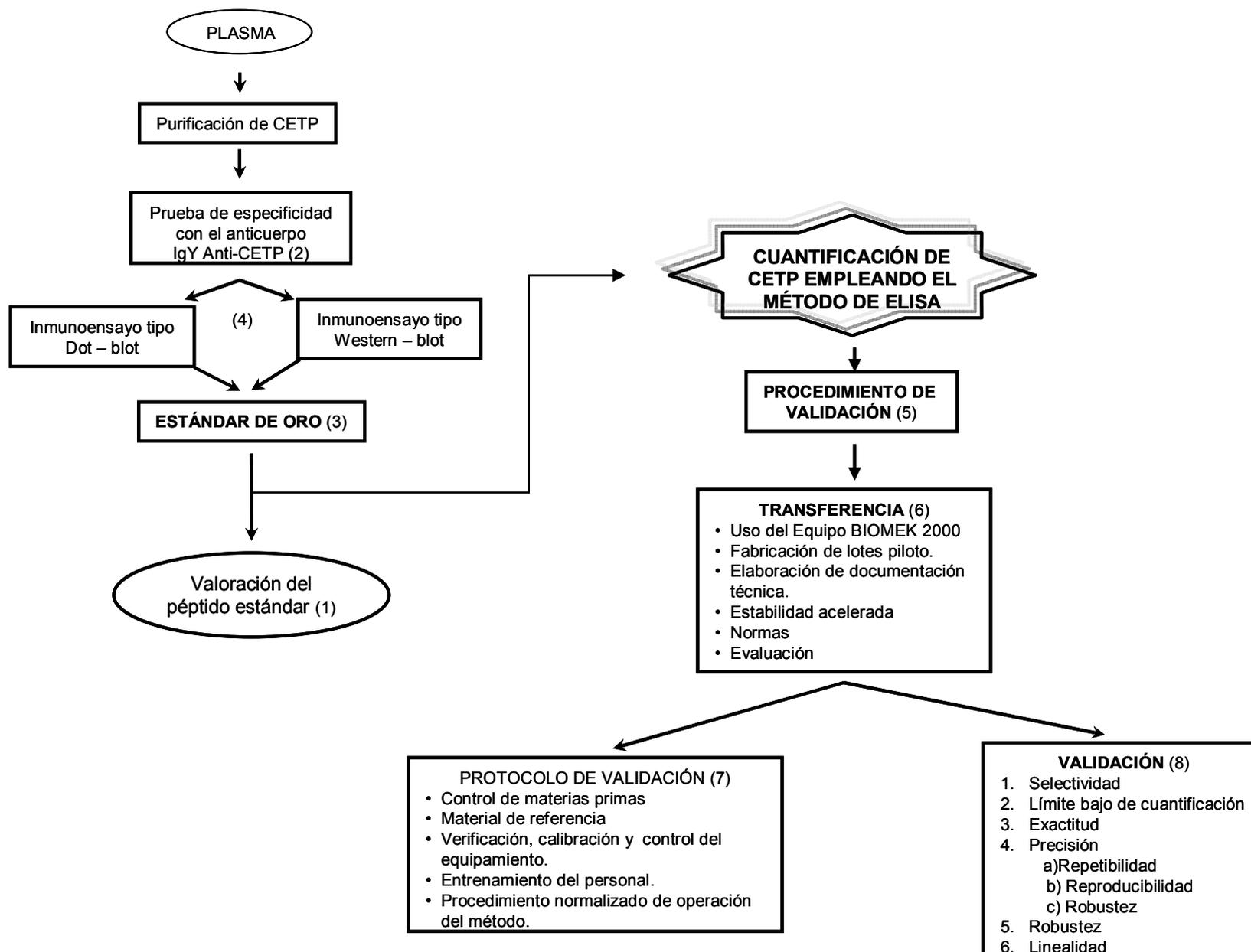


Figura. 5 Esquema para la cuantificación de CETP v el inicio de su



#### 4.8 Validación del sistema

Al llevar a cabo la validación preliminar del sistema de ELISA para la cuantificación de CETP se analizó si el método era lo suficientemente confiable para cumplir con los requisitos de un laboratorio clínico que desee ofrecer un estudio más completo. En la validación de cualquier proceso bioanalítico se debe contar con evidencia documental de que el sistema se comporta consistentemente de acuerdo a las especificaciones de calidad requeridas por el cliente. En este caso en particular, los Laboratorios Silanes es la empresa con la que se estableció un convenio para la elaboración y el seguimiento del proyecto, comenzando con la estandarización de la técnica para el diagnóstico de aterosclerosis hasta concluir con la producción y comercialización del sistema.

Para el montaje de la metodología de validación bioanalítica se siguió el procedimiento descrito en el protocolo Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. DoHHS, FDA; May 2001BP, cuyo objetivo es obtener en forma experimental, los valores que servirán como criterios de confianza del método bioanalítico.

Para ello fue necesario verificar el funcionamiento del equipo de medición ya calificado. Fue primordial contar con los procedimientos normales de operación o diagramas de flujo para el manejo adecuado del equipo desde el encendido hasta el apagado. Se realizó el inventario de los reactivos que se necesitaron en la estandarización (identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, conservación del reactivo puro y en solución), señalando las cantidades requeridas diariamente y las exigencias para su limpieza. Por último se establecieron las guías para la limpieza del material y la disposición de los desechos.

Los procedimientos detallados para la preparación y análisis tanto de reactivos, estándares y muestras, se establecieron de acuerdo al tiempo de vida media de cada uno, así como su estabilidad. El intervalo de aplicación del método se definió de acuerdo a los criterios reportados en la literatura, el interés específico (clínico) y los ensayos preliminares en el laboratorio del Dr. Jaime Mas en el Instituto de Fisiología Celular en la UNAM. Una vez



logrado esto, se planeó una estrategia de validación y se evaluaron los puntos que se describen y detallan a continuación.

### 4.7.1 Selectividad

Es la habilidad del método analítico para diferenciar y cuantificar específicamente a CETP en presencia de otros componentes en la muestra. La selectividad evalúa la confiabilidad de las mediciones ante la presencia de interferencias y estas puede disminuir o aumentar la señal atribuida al analito. Se monitorea a través del análisis de la muestra blanco en la matriz adecuada (plasma) obtenida de al menos de seis fuentes.

### 4.7.2 Límite bajo de cuantificación

El valor mínimo del estándar en la curva de calibración debe ser aceptado como el límite de cuantificación de acuerdo a las condiciones siguientes:

- Se define como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco más 10 veces la desviación estándar de la media de blancos.
- Esta respuesta debe ser inidentificable y reproducible con una precisión del 20% y una exactitud del 80–120%.

Los límites bajos de detección y cuantificación se calcularon teóricamente con los datos obtenidos a partir de la curva de calibración en el ensayo de linealidad.

### 4.7.3 Exactitud

Describe la aproximación del resultado obtenido y el valor de concentración real del de la referencia. La exactitud es determinada con la réplica del análisis de las muestras con cantidades conocidas del analito. Debe medirse usando un mínimo de 5 determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de 3 concentraciones en el rango de concentración esperado.



El valor significativo debe estar dentro del 15% del valor real, exceptuando el límite bajo de cuantificación, el cual no debe desviarse por arriba del 20%. La desviación significativa del valor verdadero sirve para medir la exactitud.

### 4.7.4 Precisión

Describe las réplicas de mediciones individuales del péptido sintético cuando el procedimiento es aplicado repetidamente para alícuotas múltiples de un solo volumen de la matriz biológica. Debe medirse usando un mínimo de 5 determinaciones por concentración y se recomienda un mínimo de 3 concentraciones en el rango de las esperadas.

Esta determinación se divide en repetibilidad o precisión de una sola corrida analítica (intra-laboratorio) y en reproducibilidad o precisión de varias corridas (inter-laboratorio). La primera aporta una idea de la variabilidad cuando un método es aplicado por un solo analista, dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes, y la segunda puede involucrar diferentes analistas, equipo, reactivos y laboratorios. Las medidas de la precisión se definen en términos de la desviación estándar y del coeficiente de variación (CV). Se determina para cada nivel de concentración, donde el CV no debe exceder el 15%, exceptuando el límite bajo de cuantificación que no debe exceder el 20%.

Para obtener la repetibilidad se hicieron 3 determinaciones de una curva de calibración del péptido sintético CETP H486-S496 evaluada por un solo analista y por triplicado, la cual consistió en ocho puntos abarcando concentraciones de 0.188 a 6.0  $\mu\text{g/ml}$ . Para determinar la reproducibilidad, se siguió el mismo procedimiento evaluado por un segundo analista en el laboratorio de Fisiología Celular.



#### 4.7.5 Robustez

La robustez es la variabilidad del método obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones de análisis, tales como equipo, tiempo de incubación, temperatura, etc. Se evaluó mediante el procedimiento de Youden y Steiner probando el efecto de 5 variables con sólo dos análisis de una muestra. En primer lugar se eligió estratégicamente estas variables, examinando el método escrito e identificando aquellas etapas que posiblemente pueden afectar a los resultados finales, además de aquellas otras variables “habituales” (concentración de reactivos, temperatura, tiempo de incubación, etc.). Cada variable se estudió mediante un valor alto (A, B,..., E) y otro bajo (a, b,..., e) realizando cada determinación por triplicado.

Los puntos a cubrir una vez concluida la validación son la obtención del producto, fabricación de lotes piloto, exhaustiva elaboración de documentación técnica, estabildades, normas, evaluaciones y optimización del sistema.

#### 4.7.6 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de la CETP en las muestras plasmáticas. Para los métodos espectrofotométricos, en el intervalo lineal se calcula la recta de regresión de **y** sobre **x** mediante el método de los mínimos cuadrados que permita interpolar la concentración de muestras mediante una ecuación del tipo:

$$y = mx + b$$

Se probó la linealidad del método estadísticamente al evaluar seis soluciones por triplicado en un rango de concentraciones de 0.188 a 6.0 µg de péptido sintético, en diluciones seriales 1:2. Se determinó la regresión lineal y se calcularon los coeficientes de correlación **r** y **r**<sup>2</sup>. Para esta prueba también se determinó el coeficiente de variación y la desviación estándar (Figura 12).



Pendiente: 
$$m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Intercepto: 
$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Coefficiente de correlación: 
$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$$

Coefficiente de correlación al cuadrado:  $r^2$



## 5.1 Obtención del estándar de oro

### 5.1.1 Purificación de la CETP

Para conseguir una preparación enriquecida de CETP, fue necesario obtener a las proteínas en una fracción de plasma libre de lipoproteínas ( $\delta > 1.21$  g/ml) mediante la combinación de una ultracentrifugación secuencial, una cromatografía en columna de intercambio iónico y una cromatografía en columna de afinidad, usando resinas de Fenil-sefarosa y de Concanavalina A-sefarosa, respectivamente (Pattnaik *et al*, 1978).

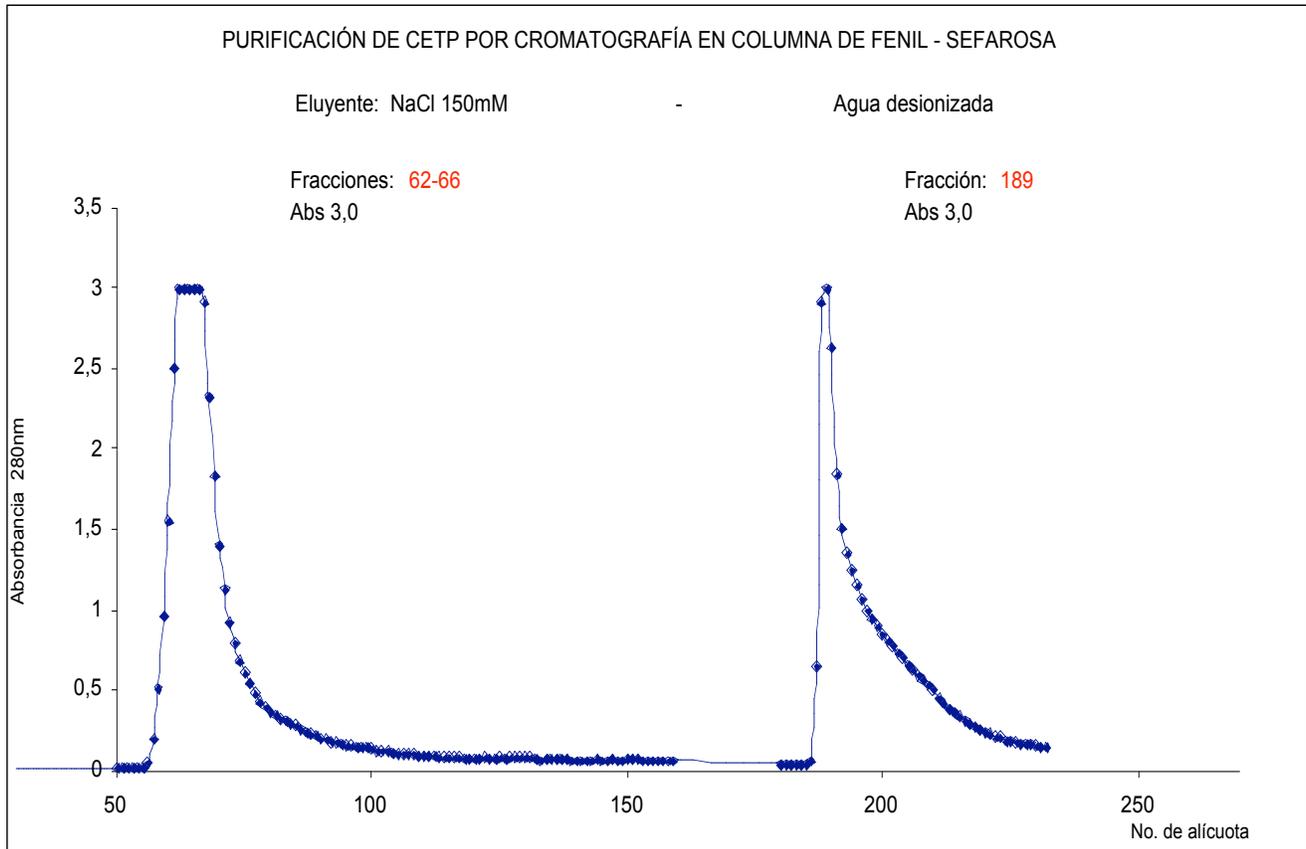
En el primer paso de la purificación, se utilizó una cromatografía de Fenil-sefarosa que se eluyó con amortiguadores de diferente fuerza iónica. Debido a que CETP es una glucoproteína con características hidrofóbicas, fue fuertemente retenida en la resina durante el primer lavado con amortiguador NaCl 4 M, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 7.4 con un volumen aproximado de 1.5 litros a velocidad de 50ml/h, por lo que proteínas no afines a la resina fueron desechadas (este volumen es amarillento y no es necesario colectarlo en fracciones pequeñas). Se eluyeron las proteínas poco afines a la resina al bajar la fuerza iónica cambiando la concentración de cloruro de sodio a 150 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 7.4, colectándose 180 alícuotas de 3 ml cada una a la misma velocidad y se leyó su absorbancia a 280 nm de cada fracción hasta llegar prácticamente a una lectura igual a 0 (primer señal). Al disminuir completamente la fuerza iónica con agua destilada se eluyeron las proteínas hidrofílicas, entre ellas CETP (Figura 6).

Se concentraron 50 fracciones (aproximadamente 100 ml) que describen la segunda señal en la gráfica. El volumen final obtenido (20 ml) se ajustó a pH 4.5 con acetato de sodio 0.5M pH 4.5 e inmediatamente se precipitó un grupo de proteínas en su mayoría albúmina sérica humana que fue observada en el carril 11 de los geles de poliacrilamida (Figura 9 y 10). Se centrifugó 2 min a 1500 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual fue sometido a la segunda columna de Concanavalina-Sefarosa.

La columna se eluyó con acetato de sodio 50mM, NaCl 90mM, pH 4.5 y las proteínas eluidas quedaron comprendidas entre las fracciones 8-40. La elución de esta columna



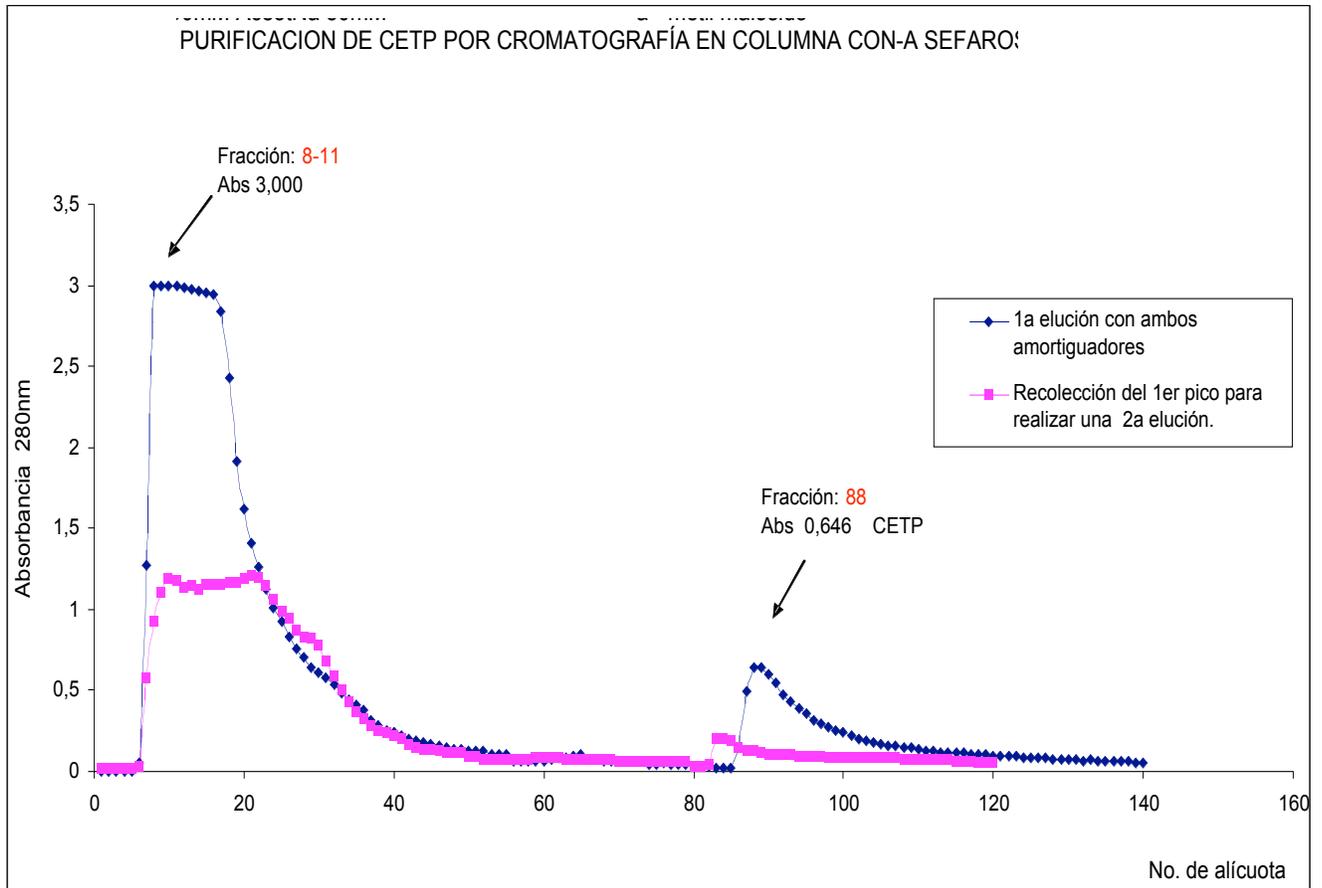
continuó con el mismo amortiguador adicionando  $\alpha$ -metil-D-manósido 150 mM a una velocidad promedio de 30 ml/h provocando que las glucoproteínas muy afines a la resina se desprendieran y eluyeran para quedar comprendidas entre las fracciones 86-120 (Figura 7).



**Figura 6.** Cromatografía en columna de fenil-sefarsa eluída con amortiguadores de diferente fuerza iónica: NaCl 150 mM y agua destilada colectando 180 y 50 fracciones respectivamente.



A pesar de la eficiencia de las columnas, el grupo de fracciones que describen al primer pico de la gráfica contenían poco CETP, por lo que se reunieron y nuevamente se eluyeron para recuperar la mayor cantidad de proteína posible (curva rosa).

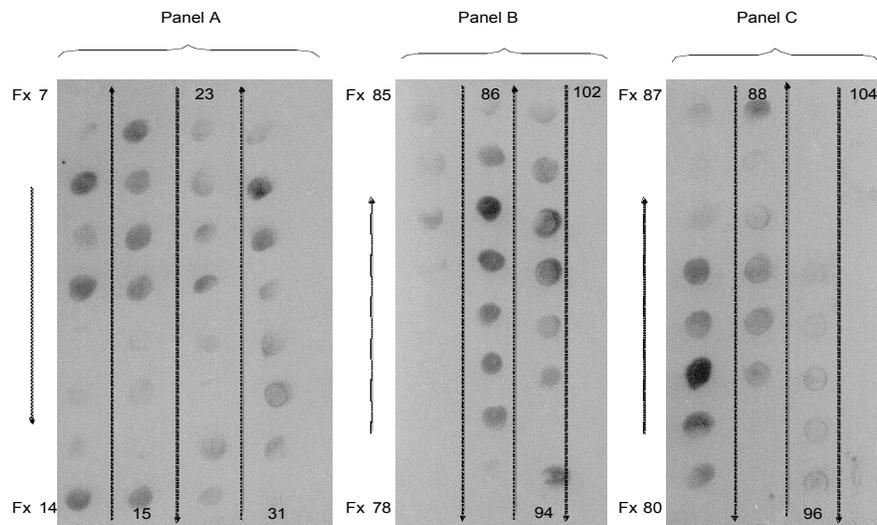


**Figura 7.** Cromatografía en columna de Concanavalina A-sefarosa eluida con NaCl 90mM y NaCl 90mM +  $\alpha$ -metil-D-manósido. Primera elución (curva azul). Segunda elución de las fracciones 1 – 40 de la primera elución (curva rosa).



### 5.1.2 Inmunoensayos tipo Dot blot

Se fijaron a vacío las fracciones que contenían mayor concentración de proteína (100\_μl / fracción) sobre el sistema Dot blot y se probaron con el anticuerpo IgY anti-CETP. En la figura 8 puede observarse la señal de las 96 fracciones seleccionadas que se fijaron en la membrana de nitrocelulosa divididas en tres paneles. El primer panel evalúa la recolección de CETP en las fracciones eluidas de la columna de fenil sefarosa. El panel B y C muestran las fracciones que se eluyeron en la columna de Concanavalina-A Sefarosa. Las señales más intensas son las alícuotas que contienen mayor cantidad de proteína.



**Figura 8.** Rastreo de CETP en su purificación mediante transferencia tipo Dot blot y evaluación del anticuerpo IgY anti-CETP. Señal de las fracciones colectadas en la Columna de Concanavalina-A Sefarosa. Panel A: Fracciones colectadas en la primera elución (Curva azul, Fig. 7) # 7-38; Panel B: Colectadas en la segunda elución (Curva azul) # 78-109; Panel C: colectadas en la segunda elución (Curva rosa) #80-111.

### 5.1.3 Inmunoensayos tipo Western blot

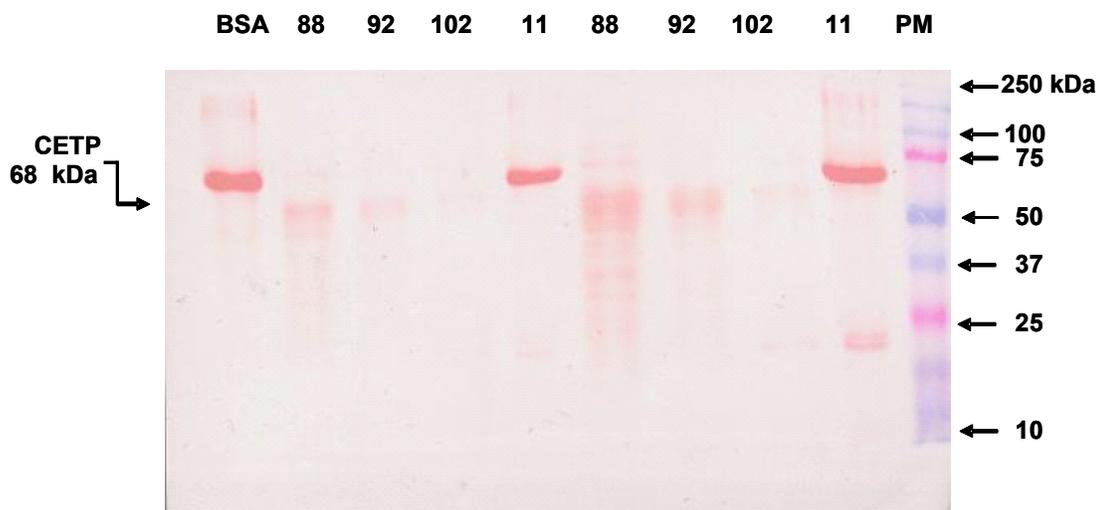
Por último se realizó una electroforesis SDS-PAGE con las fracciones donde se encuentra CETP. Se cargaron 20\_μg de CETP de las fracciones principales aisladas en cada pozo por duplicado, 3\_μg del control negativo (BSA) y 2.5\_μl del Marcador de Peso (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo sobre una membrana de



nitrocelulosa y se tiñó con colorante rojo de Ponceau (Figura 9). Fue necesario lavar la membrana para retirar todo el colorante antes de iniciar el inmunoensayo tipo Western blot, así como estandarizar las condiciones de uso para los anticuerpos IgY anti-CETP y anti-BSA (Figura 10).

En el pozo 1 se colocaron 3  $\mu$ g de BSA que sirvió como control negativo, el cual exhibe un peso muy cercano a la CETP y nos ayudó a monitorear la especificidad del anticuerpo IgY anti-CETP. En los tres siguientes pozos se observan las bandas de las alícuotas colectadas en la columna de Concanavalina A Sefarosa que contienen CETP (segunda señal) y que se concentraron en los grupos 88, 92 y 102; el cuarto carril muestra una sola banda con peso de 73 kDa correspondiente a la alícuota No. 11 de la misma columna (primer señal). En el último carril se adicionaron 2.5  $\mu$ l del marcador de peso Precision Plus.

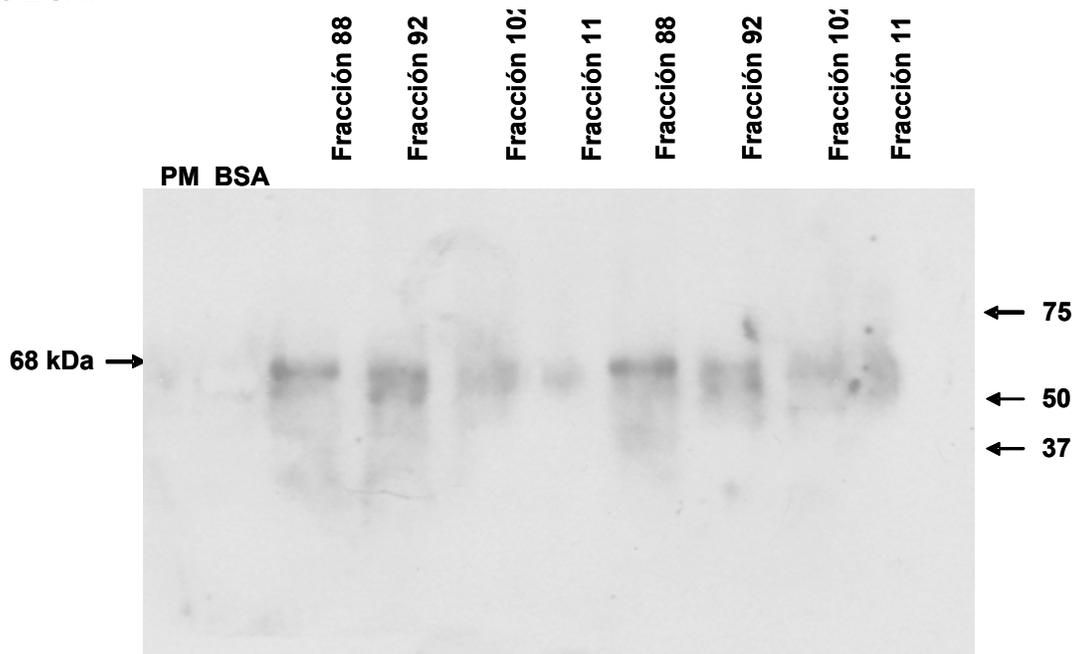
El peso de CETP detectado en la membrana es de 68 kDa y la fracción que contiene mayor cantidad de proteína fue la 88. La banda que se detectó en el carril marcado con el número 11 pesa 75 kDa y se comprobó la existencia de BSA al realizar el Western blot con el anticuerpo control IgY anti BSA.



**Figura 9.** Detección de CETP en las fracciones correspondientes al último paso de la purificación. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se tiñeron con colorante rojo de Ponceau. En el carril 1 se observa el control negativo de BSA.



En la detección de CETP por quimioluminiscencia con ECL se puede observar a los 20 min una banda más intensa en los carriles correspondientes a las fracciones 88 y 92 con peso de 68 kDa y que concuerda con su duplicado; una banda más tenue a la misma altura de la fracción 102, que denota menor concentración de proteína y una ausencia de banda en el carril de BSA.



**Figura 10.** Detección de CETP purificada con el anticuerpo específico primario IgY anti-CETP mediante transferencia tipo Western blot. En el carril 2 se observa el control negativo de BSA.

## 5.2 Cuantificación de CETP purificada

Se utilizó el método de BCA para cuantificar indirectamente la fracción de CETP purificada con un estándar de Albúmina sérica bovina (BSA). Se muestra un ensayo cuantitativo en el que se encontró una concentración final de 0.730 mg/ml al interpolar en la curva estándar. La concentración inicial del estándar de BSA fue de 2mg/ml y la regresión lineal de la curva fue la siguiente:

$$b = 0.1727$$

$$m = 0.0822$$

$$r = 0.9943$$

$$r^2 = 0.9885$$



CETP	_l	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	x-blanco	y-b	x=y-b/m	_g/_l
	10	0.908	0.920	0.914	0.798	0.625	7.605	0.761
	20	1.447	1.433	1.440	1.324	1.151	14.002	0.700
Promedio								0.730

### 5.3 Validación

Para delimitar los límites bajos de detección y cuantificación, se realizó un ensayo de ELISA utilizándose el péptido sintético CETP H486-S496 como antígeno estándar. Tanto los controles positivos como negativos (BSA) se aplicaron por triplicado.

#### 5.3.1 Selectividad

El anticuerpo reconoció específicamente a la CETP purificada y al péptido sintético CETP H486-S496 en los análisis realizados. No se encontraron diferencias significativas al adicionar CETP purificada o péptido sintético a una matriz diferente.

#### 5.3.2 Límite de cuantificación

La mínima concentración del estándar de CETP que se puede determinar con un nivel aceptable de precisión (repetibilidad) y exactitud es de 0.113  $\mu\text{g/ml}$ .

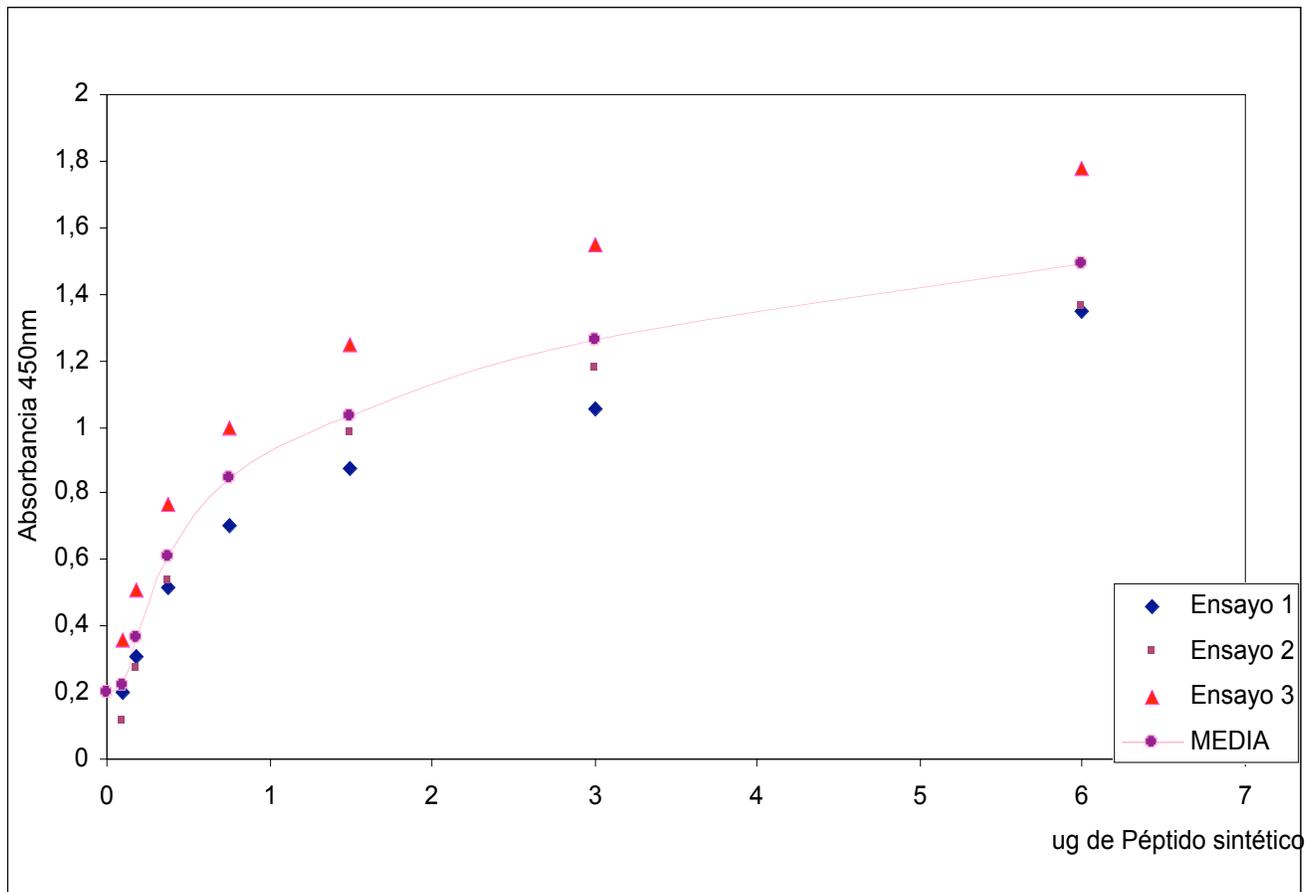
#### 5.3.3 Exactitud

Entre las concentraciones: alta, media y baja de los estándares no se encontraron variación en los triplicados tanto del péptido sintético como de la proteína purificada, sin embargo al ser comparadas, los porcentajes de recobro muestran diferencias significativas y no entran en el límite de aceptación. Para el péptido sintético los porcentajes fueron de 121.9, 120.1 y 119.2%. Sin embargo, aunque existe diferencia significativa de magnitud comparando ambas curvas de calibración, se puede mejorar este criterio ya que ambas muestran el mismo comportamiento.



### 5.3.4 Precisión: Repetibilidad y Reproducibilidad

Se calculó la desviación estándar (DS), el coeficiente de variación (CV) y su porcentaje con un intervalo de confianza del 95% para cada prueba tomando los datos completos de los tres ensayos.



**Figura 11.** Repetibilidad de la curva estándar con concentraciones del péptido sintético CETP H486-S496 de a 6 µg por pozo a partir de la concentración esperada de CETP en plasma humano.



Se deduce que la repetibilidad y reproducibilidad del método es adecuada. Los %CV obtenidos para el estándar de Péptido sintético oscilaron entre 5.0 y 10.7% para la primera prueba y entre 1.9 y 11.7% para la segunda, en ningún caso superó el 15% (Tabla 4 y 5).

**Tabla 4.** Precisión Repetibilidad

<b>_g Péptido</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>CV</b>	<b>%CV</b>
0,188	0,454	0,034	0,050	5,021
0,375	0,697	0,098	0,107	10,664
0,75	0,938	0,121	0,105	10,502
1,5	1,125	0,070	0,052	5,207
3	1,349	0,107	0,069	6,857
6	1,583	0,106	0,059	5,906

**Tabla 5.** Precisión Reproducibilidad

<b>_g Péptido</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>	<b>CV</b>	<b>%CV</b>
0,188	0,462	0,054	0,117	11,689
0,375	0,689	0,078	0,113	11,330
0,75	0,837	0,032	0,039	3,876
1,5	1,002	0,028	0,028	2,826
3	1,205	0,097	0,080	8,050
6	1,464	0,032	0,022	2,210



### 5.3.5 Robustez

Los resultados encontrados representan las variables: tiempo y temperatura de acoplamiento para el péptido sintético (12h a 4 °C) y (2h a 20 °C), respectivamente. Agente bloqueante: BSA en concentración de 0.5% y 1%. Tiempo de incubación del anticuerpo primario (30 min y 1 h), dos temperaturas de trabajo para esta misma reacción (20°C y 37 °C). Concentración del anticuerpo secundario: 1:10,000 y 1:20,000.

Se comprobó la capacidad del sistema a no sufrir alteraciones por pequeñas alteraciones en los parámetros de análisis, como lo fue: la modificación del tiempo de incubación de anticuerpo anti-CETP IgY (30 min - 1h) manteniéndose constantes los valores de absorbancia, sin embargo existe diferencia significativa si la temperatura de incubación para 30 min o 1h disminuye por debajo de 37 °C. Las distintas condiciones para el acoplamiento demostró el mayor rango de variabilidad. En las siguientes variables analizadas también se encontró diferencia, por lo que el protocolo para llevar a cabo el método de ELISA para la cuantificación de CETP, se elaboró mediante los parámetros favorecidos como la concentración de agente bloqueante (BSA) al 0.5%, la concentración del anticuerpo secundario 1:10,000 y 37°C para las temperaturas de incubación.

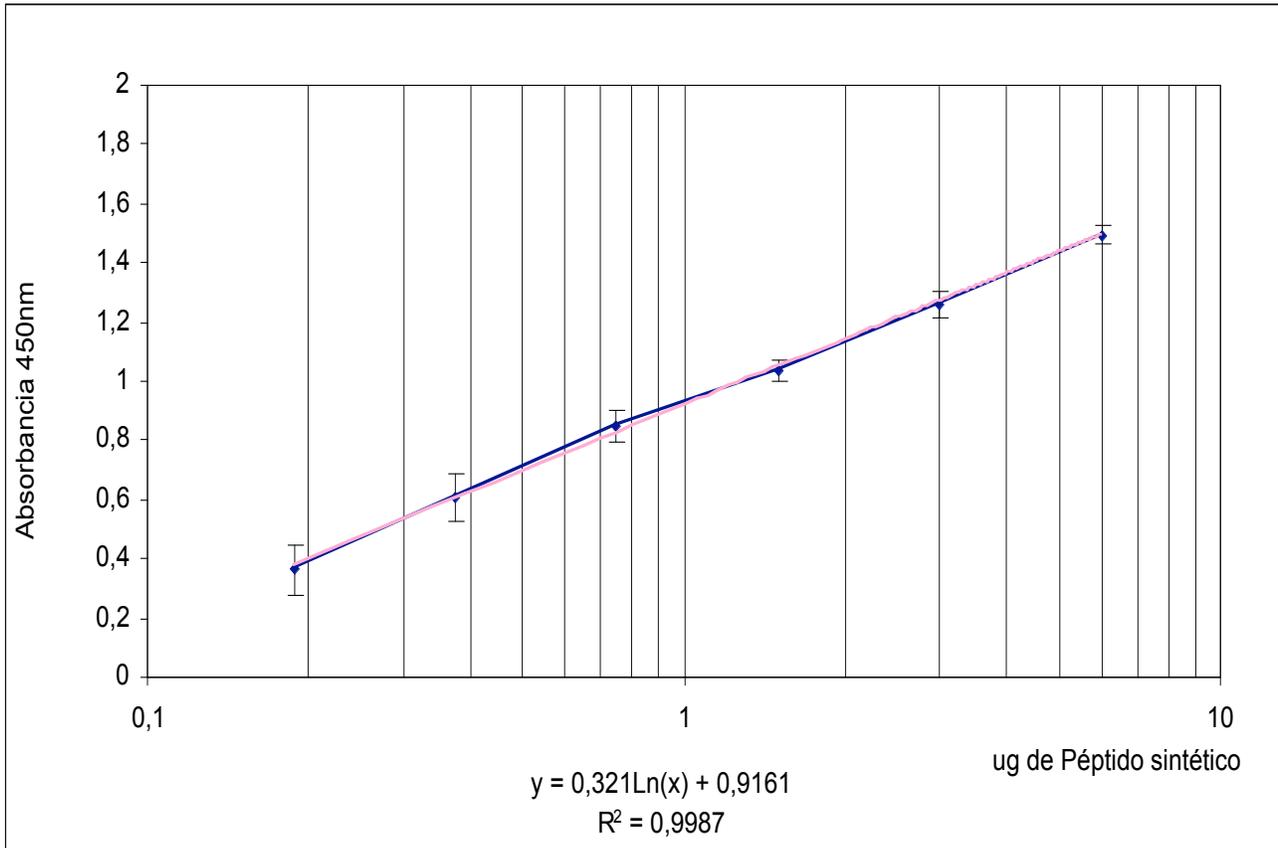
### 5.3.6 Linealidad

En la figura 11 se muestra el resultado de la relación resultante entre la concentración del péptido sintético en µg/ml contra la absorbancia, esta relación no es lineal, sin embargo los datos de la concentración se manejaron mediante su logaritmo base 10, para conseguir la alineación de la curva. Los datos pueden describirse mediante la ecuación:

$$y = b \ln x + a$$



La concentración de CETP en muestras plasmáticas se calcula en relación a la curva estándar.



**Figura 12.** Linealidad de la curva estándar con concentraciones del péptido sintético CETP H486-S496 de 0.188 a 6.0 µg por pozo a partir de la concentración esperada de CETP en plasma humano.



Desde el punto de vista fisiológico resulta interesante resolver las incógnitas en la que se encuentra involucrado CETP, sin embargo, es de vital importancia el papel que representa en el intercambio de triglicéridos y de ésteres de colesterol ya que debido a esto, se encuentra estrechamente relacionada con el incremento de los niveles de colesterol total y LDL, favoreciendo el desarrollo de enfermedad coronaria arterial. Por lo tanto, es necesario proponer soluciones eficaces que resuelvan una de sus principales y preocupantes consecuencias como lo es el desarrollo de la aterosclerosis.

Con este trabajo hemos presentado una nueva herramienta para identificar oportunamente a sujetos asintomáticos de enfermedades coronarias, en el estudio de rutina clínica, y que asociándola a factores etiológicos y de riesgo darían un claro diagnóstico para su prevención y tratamiento.

Para llevar a cabo el manejo, estandarización y las primeras pruebas de validación del sistema fue necesaria la colaboración de los Laboratorios Silanes con nuestro laboratorio ya que cuenta con el equipo indispensable para estandarizar y reproducir los ensayos de ELISA.

Como primer paso ineludible fue la obtención del estándar de oro o purificación de CETP de plasma humano. La proteína purificada sirvió de referencia para probar la eficiencia y especificidad del anticuerpo IgY anti-CETP; además, para indicar la relación que existe entre la CETP que circula en el plasma y el péptido sintético CETP H486-S496 diseñado exclusivamente para el funcionamiento del sistema.

El método para la purificación (Pattnaik *et al*, 1978) fue reproducido en el laboratorio. Se rastreó la obtención de la proteína de acuerdo a las señales producidas en la gráfica de la figura 7. Se adsorbieron 100  $\mu$ l de cada una de las 96 fracciones que tienen el valor más alto de absorbancia en una membrana de nitrocelulosa y se detectó la proteína con el anticuerpo IgY anti-CETP. La intensidad de la señal de cada fracción se correlaciona con la cantidad de proteína al ser comparados.



La purificación de CETP mostró alta eficiencia pero bajo rendimiento. El volumen inicial de plasma humano para la extracción fue de 320 ml y al término de la purificación se obtuvo un volumen final de 3.2 ml a una concentración de 0.730 mg/ml. Para la detección de la CETP y la estandarización de las condiciones de los anticuerpos en los inmunoensayos Western blot se utilizaron aproximadamente 100  $\mu$ g para cada gel.

Los ensayos de especificidad de los anticuerpos en Western blot (Figura 10) resultaron satisfactorios al reconocer únicamente a CETP purificada, y la estandarización de este inmunoensayo nos dio la pauta para utilizar esta molécula como referencia en el sistema de ELISA.

La prueba para cuantificar los niveles de CETP en plasma basada en un inmunoensayo (ELISA) le confiere al diagnóstico alta especificidad y sensibilidad, hecho que puede comprobarse en las pruebas de validación. Este sistema muestra grandes ventajas frente a otros sistemas de cuantificación que hasta ahora se han diseñado. La primera de ellas es que el anticuerpo IgY anti-CETP reconoce al extremo carboxilo terminal de la proteína, región que se encuentra directamente involucrada con la transferencia de ésteres de colesterol. En uno de los sistemas diseñados, se necesita el empleo de dos anticuerpos monoclonales, pero ambos están dirigidos contra algunos residuos que componen a la CETP humana pero que no incluyen el extremo carboxilo.

Otros sistemas presentan limitantes debido a las dificultades técnicas y a la naturaleza de los reactivos, mismos que requieren de equipos especiales para ser utilizados, además de que estos sistemas son de uso restringido y no se han podido aplicar en clínica. En otros de ellos no se ha permitido el empleo de CETP purificada de plasma debido a que el procedimiento para obtenerla es muy laborioso y costoso; sin embargo, aunque es este sistema ha sido diseñado para poder utilizar también proteína purificada como antígeno, se pretende encontrar la relación exacta entre ambos estándares que permita utilizar solamente el péptido sintético definitivamente.



Los datos experimentales de las pruebas de validación (Figura 11), no presentan ningún sesgo o tendencia que demuestre alteraciones en la cuantificación del estándar sintético, como tampoco se evidencian posibles errores sistemáticos en el proceso de esta determinación. Para evaluar estadísticamente la linealidad del sistema de ELISA, se trabajó con seis puntos de la curva de cuantificación y basándonos en que se trata de un método clínico para diagnóstico no se consideraron valores cercanos a cero, por lo que el primer punto de la curva podría ser el mismo que señala el límite bajo de cuantificación. Para un dato definitivo de validación será recomendable trabajar con más puntos dentro de este rango de concentración propuesto, lo que probablemente aumente el coeficiente de correlación y con ello resultados satisfactorios en otras pruebas de validación como la precisión y la exactitud.

En la prueba se obtuvieron coeficientes de correlación  $r$  y  $r^2$  que demuestran que existe relación entre las concentraciones variables y las respuestas medidas. Esta relación no demuestra un comportamiento lineal, sin embargo, se trabajó con el logaritmo base 10 de los valores de la concentración ( $x$ ) y así se pudieron manejar los datos para analizar su linealidad por el método de mínimos cuadrados. Fue necesario realizar un análisis de varianza, comprobándose de igual manera que la condición de proporcionalidad y el error sistemático resultan despreciables, además, este resultado lineal pudo compararse con otros resultados obtenidos por otros métodos y el de mínimos cuadrados reporta al coeficiente de correlación más alto.

Al evaluar la exactitud, se hizo únicamente una aproximación entre el rango de concentración del estándar sintético y el estándar de oro (CETP purificada) en relación a la cantidad de CETP esperada en cualquier muestra plasmática. En cuanto a esta apreciación las gráficas muestran el mismo comportamiento pero si existe diferencia significativa al comparar sus valores.

El estudio de precisión mostró una aceptable repetibilidad y reproducibilidad de los resultados de acuerdo a los criterios de aceptación: el %CV más alto fue de 11.69%,



aceptable porque se encuentra por debajo del límite de 15%, por lo cual se puede considerar que el método para cuantificar CETP en muestras plasmáticas es preciso. Paralelamente, los factores estudiados en el ensayo de robustez que influyeron significativamente en los resultados, nos orientaron para elaborar el protocolo del sistema. También se mostraron claramente los parámetros que no influyen para obtener resultados satisfactorios. Debe recordarse que para conseguir esta validación preliminar, se consultó la guía de la FDA “Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation” y será indispensable consultar otras guías como las de la Secretaría de Salud (SSA), ya que este tipo de guías se inclinan más a los requerimientos de control de calidad en México.

Para mejorar la exactitud de los métodos analizados se utilizaron reactivos de alto grado analítico para la preparación de las soluciones patrón, limitando al mínimo el error y la incertidumbre de medición. Se siguieron los procedimientos normales de operación y las buenas prácticas de laboratorio para lograr resultados satisfactorios en la manipulación de los elementos de ensayo y los equipos de medición.



- El sistema de ELISA descrito en el presente trabajo constituye la base para el diseño de un kit de diagnóstico para la determinación de los niveles de CETP en un gran número de muestras de manera rápida y sencilla. Permitiría la detección temprana del riesgo de padecer aterosclerosis y además continuar con el seguimiento de individuos que ya se encuentren en tratamiento.
- El kit se diseñó para su uso en clínica utilizando muestras de plasma o suero, sin embargo puede adaptarse a muestras de origen sintético.
- Presenta grandes ventajas frente a otros sistemas diseñados como el reconocimiento específico del carboxilo terminal, región involucrada en la transferencia de lípidos. La naturaleza de los reactivos no es costosa ni necesita de equipo especial para su manejo. Podrá utilizarse el péptido sintético como estándar sin necesidad de purificar CETP de plasma para cada detección.
- El sistema es lineal, preciso, sensible, específico y muestra una definida robustez, sin embargo se necesita realizar otro control estadístico para marcar una buena exactitud.
- Niveles de CT, LDL, IA y CETP por arriba de los normales constituyen problemas asociados con aterosclerosis.
- El nivel de CETP en un grupo de individuos mexicanos no es el mismo al reportado en poblaciones estadounidenses, europeas o asiáticas. Observación que deberá tomarse en cuenta si se desea utilizar el parámetro en otro tipo de población diferente a la mexicana.
- Ampliando el alcance de los métodos validados mediante la planeación y ejecución de los ensayos se podrá demostrar que el método tiene niveles altos de rendimiento y sensibilidad para su aplicación en los laboratorios clínicos.



# APÉNDICE



## Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

### Soluciones madre y amortiguadores

#### 1) Gel concentrador 5%

- Tris – HCl pH 6.8, 0.5M

Disolver 6 g de trizma base en 60 ml agua desionizada. Ajustar a pH 6.8 con 6 M HCl, aforar a 100 ml con agua desionizada y almacenar a 4°C.

- Acrilamida 30%

Disolver 146 g de acrilamida y 4 g de N' N'–bis–metilenacrilamida (0.8%) en agua desionizada y aforar a 500 ml. Filtrar y almacenar en frasco de vidrio ámbar a 4°C.

- SDS 10% pH 7.4

Disolver 10 g de dodecilsulfato de sodio en 90 ml agua y aforar a 100 ml con agua destilada. Ajustar a pH 7.4 con HCl 3M y almacenar a 20°C para evitar su cristalización.

- Persulfato de Amonio (PA) 10%

Disolver 1g de persulfato de amonio en 9 ml agua destilada y aforar a 10 ml, preparar alícuotas de 1 ml y congelar a 20°C para almacenarlo.

Preparación del gel empacador al 5% de acuerdo a la tabla siguiente:

Soluciones	Cantidad
Tris – HCl pH 6.8, 0.5M	1.25 mL
Acrilamida 30%	800 µL
SDS 10%	50 µL
PA 10%	50 µL
Agua	2.8 mL
TEMED	5 µL

#### 2) Gel separador 12.5%

- Tris–HCl pH 8.8, 1.5 M



Disolver 18.15 g de trizma base en 80 ml agua desionizada, ajustar a pH 8.8 con una solución de HCl 6 M y aforar a 100 ml con agua desionizada. Almacenar a 4 °C.

Soluciones	Cantidad
Tris – HCl pH 8.8, 1.5M	2.5 mL
Acrilamida 30%	4.1 mL
SDS 10%	100 µL
PA 10%	100 µL
Agua	3.1 mL
TEMED	7.5 µL

### 2.1) Gel separador 7.5%

Soluciones	Cantidad
Tris – HCl pH 8.8, 1.5M	2.5 mL
Acrilamida 30%	4.1 mL
SDS 10%	100 µL
PA 10%	100 µL
Agua	3.1 mL
TEMED	7.5 µL

### 3) Corrida.

Calcular la cantidad de proteína para cada control y muestras. Cargar cada pozo con el volumen calculado para cada muestra y correr el gel en amortiguador 1x durante 2 h a 100 voltios.

Amortiguador base	10x	
Trizma Base	250 mM	30.3 g
Glicina	1.94 M	144.15 g
Aforar a 1 litro con agua destilada		



Amortiguador de corrida	1x		
Trizma Base	25 mM	Amortiguador base 10x	100ml
Glicina	194 mM		
SDS	0.1%	SDS	1g
Aforar con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.			

#### 4) *Transferencia*

Al final de la corrida el gel es electrotransferido en una membrana de nitrocelulosa 0.45 $\mu$ m (*Trans-Blot Transfer médium BIO-RAD, Hercules, CA, USA*), empacado en una cámara con amortiguador de transferencia pH 8.3 a 300 mA durante 2 h a 4°C

Para obtener un amortiguador 1X partiendo de una solución madre 10X es necesario tomar 100 ml de esta solución y con agitación constante adicionar 200 ml de metanol, aforar a 1 litro con agua.

Amortiguador de transferencia	1x		
Trizma Base	25 mM	Amortiguador base 10x	100ml
Glicina	194 mM	H <sub>2</sub> O	700ml
Metanol	20%	Metanol absoluto	200ml
Volumen final			1 litro

Retirar la cámara del electrodo y separar el gel con la membrana transferida.

#### 5) *Western blot y Dot blot*

TBS 10x

Trizma base	200 mM	24.2 g
NaCl	150 m	87.75 g
HCl	200 mM	17 ml

Volumen final 1 litro. Ajustar a pH 7.6

TBS-tween 1x

TBS 10x	1x	100 ml
Tween-20	0.1%	1ml

Aforar con agua destilada a un volumen final de 1 l.

Leche 2.5%: Disolver 0.5 g de leche en polvo descremada (Svelty) en 20 ml de TBS-tween. Agitar por inversión hasta disolver completamente.



- Alonso, A.; Zentella, A.; Mas, J. Characterization of a naturally occurring new version of the cholesterol ester transfer protein (CETP) from small intestine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 24525-24529: 173–182, 2003.
- Alonso, G. LA. Identificación de una nueva isoforma de la Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol y evaluación de los niveles de CETP plasmática en población mexicana, Tesis de Doctorado en Biotecnología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2003.
- Au-Young J, Fielding CJ. Synthesis and secretion of wild-type and mutant human plasma cholesteryl ester transfer protein in baculovirus-transfected insect cells: the carboxyl-terminal region is required for both lipoprotein binding and catalysis of transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1; 89 (9):4094-4098, 1992.
- Baynes, J. Dominiczak, M.; *Medical Biochemistry*. Mosby International Limited. 201-216, 1999.
- Bolaños, V. M.; Soriano, M.; Mas, J. Stability of the C-terminal peptide of CETP mediated through an (*i, i + 4*) array. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1384: 7–15, 1998.
- Brocia; Robert W. Heart disease test kit and method of determining a heart disease risk factor and efficacy of a treatment for heart disease; Appl. No.: 08/490,610; Bronxville, NY 1998.
- Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342(6248): 448-451, 1989.
- Clark, R. W.; Chang, G.; Didiuk, M. T. Agents for the Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) and Prospects for the Future Treatment of Atherosclerosis. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, Volume 5, Number 4, pp. 339-360(22), 2005.



- Clark, R. W.; Moberly, J. B.; Bamberger M. J. Low level quantification of cholesteryl ester transfer protein in plasma subfractions and cell culture media by monoclonal antibody-based immunoassay. *J Lipid Res* 36(4):876-889, 1995.
- Díaz de A., Hernández O., Martínez de S., Licea T., Gómez B., Louro G., Morera F. y González H. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Rev Cubana Farm* v.32 n.2 Ciudad de la Habana, 1998.
- Fielding, P.E. Fueling C.J. Dynamics of lipoproteins transport in the circulatory system. En *Biochemistry of Lipid, Lipoproteins and Membranes*. Vance, D.E. Vance, J. 427-458, 1996.
- Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal.*; 21(6):1249-1273, 2000.
- Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Veterinary Medicine. Rockville, MD, 2001.
- Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gambert P, Lallemand C. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay of the human cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin Chim Acta.* 16; 231(2):147-160, 1994.
- Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW. Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem.* 15; 263 (11):5020-5023, 1988.



- Inazu A, Quinet EM, Wang S, Brown ML, Stevenson S, Barr ML, Moulin P, Tall AR. Alternative splicing of the mRNA encoding the human cholesteryl ester transfer protein. *Biochemistry* 31(8): 2352-2358, 1992.
- Kiyohara, T.; Kiriyaama, R.; Zamma, S.; Inazu, A.; Koizumi, J.; Mabuchi, H.; Chichibu, K. Enzyme immunoassay for cholesteryl ester transfer protein in human serum. *Clinica Chimica Acta* 271: 109–118, 1998.
- Lafita, M; Sáez de Lafuente, J.; Narváez, I.; Baztán, E.; Magro, A.; Lafuente P.; Molinero E.; Sagastagoitia, J.; Iriarte, J. Determinación de apolipoproteínas B y A- I en sangre desecada en tarjeta: estudio preliminar. *Clin Invest Arterioscl* 15 (4): 133–139, 2003.
- Lagrost L. Regulation of cholesterol ester transfer protein (CETP) activity, review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1215(3): 209–236, 1994.
- Lerman, I. Atención Integral del Paciente Diabético. Interamericana McGraw-Hill, México, D. F., XVI: 223–240, 1994.
- Marotti, K.R. Castle, C.K. Boyle, T.P. Lin, A.H. Murray, R.W. Melchior, G.W. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 364(6432): 73-75, 1993.
- Nagashima M, McLean J, Lawn RJ. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesterol ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 29: 1643–1649, 1988.
- Nelson, D.L.; Cox, M. M. Lehninger–Principles of Biochemistry; fourth edition. Worth publishers, New York, 2005.
- Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.



- Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005; 98(12):845-856. Epub, 2005.
- Oliveira HC, Chouinard RA, Agellon LB, Bruce C, Ma L, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Human cholesteryl ester transfer protein gene proximal promoter contains dietary cholesterol positive responsive elements and mediates expression in small intestine and periphery while predominant liver and spleen expression is controlled by 5'-distal sequences. Cis-acting sequences mapped in transgenic mice. *J Biol Chem* 13; 271(50):31831-31838, 1996.
- Pattnaik, N. M.; Montes, A.; Hughes, L. B.; Zilversmit, D. B. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 530: 428–438, 1978.
- Quinet E, Yang TP, Marinos C, Tall A. Inhibition of the cellular secretion of cholesteryl ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem*; 268(23):16891-16894, 1993.
- Rioux, V.; Landry, R. Y.; Bensadoun, A. Sandwich immunoassay for the measurement of murine syndecan-4. *Journal of Lipid Research* 167–173, 2002.
- Ritsch, A.; Auer B.; Föger B. Schwarz S.; Patsch J. R. Polyclonal antibody-based immunoradiometric assay for quantification of cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid Research*. 34 (4):673-679,1993.
- Rubiés-Prat, J. Interés clínico de la determinación de la concentración de Apolipoproteínas A– y B en el plasma. *Clin Invest Arterioscl* 15 (4): 153–155, 2003.
- Ruiz-Noriega M, Silva-Cardenas I, Delgado-Coello B, Zentella-Dehesa A, Mas-Oliva J. Membrane bound CETP mediates the transfer of free cholesterol between lipoproteins and membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 202(3):1322-1328. 1994



- Rye, K.A., Hime, N.J. Barter, P.J. The influence of cholesteryl ester transfer protein on the composition, size, and structure of spherical, reconstituted high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 270(1): 189-196, 1995.
- Stevenson SC. Wang S, Deng L, and Tall A. Human plasma cholesterol ester transfer protein consists of a mixture of two forms reflecting variable glycosilation at Asparagine 341. *Biochemistry* 32(19): 5121–5126, 1993.
- Tall, A. Plasma Lipid Transfer Proteins. *Annu Rev Biochem* 64: 235 –257, 1995.
- Thomas, A.P., Smith AM, Cumming RI, Jones C, Thomas RC, Pleasants KT, Barakat H. Mouse monoclonal antipeptide antibodies specific for cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Hybridoma.* 15(5):359-364, 1996.
- United States Pharmacopeial Convention USP XXII: United States Pharmacopeia. 22ed. Easton: Mack Printing: 1225, 1710, 1990.
- Wang S, Wang X, Deng L, Rassart E, Milne RW, Tall AR. Point mutagenesis of carboxyl-terminal amino acids of cholesteryl ester transfer protein. Opposite faces of an amphipathic helix important for cholesteryl ester transfer or for binding neutralizing antibody. *J Biol Chem.* 25; 268 (3):1955-1959, 1993.