



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO DE UN ARREGLO EN SUSPENSIÓN PARA
CUANTIFICAR ÁCIDO HIALURÓNICO EN SUERO Y PLASMA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SHADANI MISRAIM CRUZ AVENDAÑO



MÉXICO, D.F.

2012



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: **PROFESOR:** M. en C. Omar Noel Medina Campos
VOCAL: **PROFESOR:** Dr. Ignacio Camacho Arroyo
SECRETARIO: **PROFESOR:** Dra. Carolina Guzmán Arriaga
1er. SUPLENTE: **PROFESOR:** Bio. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña
2° SUPLENTE: **PROFESOR:** Med. María Alejandra Morinelli Astorquizaga

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM)

Unidad de Medicina Experimental

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carolina Guzmán Arriaga

SUSTENTANTE :

Shadani Misraim Cruz Avendaño

AGRADECIMIENTOS

Creo que es muy poco espacio el que tengo en esta página y pocas las palabras escritas para demostrar lo agradecido que estoy con todas las personas que me han apoyado durante el transcurso de mi vida y mi carrera.

Quiero agradecer enormemente a mi familia, mis padres y mi hermana que me han apoyado siempre, que soportaron mi mal carácter al llegar de la facultad y quienes fueron mi pañuelo de lágrimas durante la carrera.

También a mis compañeras de la carrera: Guadalupe Patiño, Monserrat Pilotzi, Monserrat Garduño, Rocío Flores, Andrea García y Karina Cuevas por su gran compañía.

A mis compañeras del HIPAM por su gran amistad y las cuales son un gran ejemplo de cómo debe ser un profesional de la salud: Karina Suárez, Lulú Solís, Vanessa López y Mónica Muñoz.

A la Doctora Morinelli, por que gracias a su clase conocí lo que es Medicina.

A mi tutora por su paciencia durante el proyecto.

A la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad por la Beca PROBEI que se me otorgó durante la realización del proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia, mi padre, mi madre y mi hermana son las tres personas que siempre han creído en mí. Mis padres que siempre me han ayudado en las decisiones que he tomado y mi hermana, que ha sido mi mejor amiga desde el momento en que nací. Que siendo el final de una etapa y el comienzo de otra mejor, siempre los tendré a mi lado y sé que contaré con ellos hasta que me convierta en lo que quiero llegar a ser, su apoyo incondicional y su amor.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO.....	10
1. El hígado y la fibrosis hepática.....	10
2. Etiología y epidemiología.....	12
3. La matriz extracelular.....	14
3.1. Los glucosaminoglicanos.....	16
3.2. Los proteoglicanos.....	16
3.3. El ácido hialurónico.....	16
3.3.1. Funciones del ácido hialurónico.....	19
3.3.2. Síntesis del ácido hialurónico.....	20
3.3.3. Metabolismo del ácido hialurónico.....	22
3.3.4. El agregano.....	25
3.3.5. El ácido hialurónico y la fibrosis hepática.....	26
4. Diagnóstico de la fibrosis.....	27
5. Arreglo en suspensión.....	28
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
HIPÓTESIS.....	32
REACTIVOS Y MATERIALES.....	33
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
1. Cuantificación de ácido hialurónico en suero de sujetos sanos y pacientes mediante ELISA	34
a. Recolección de muestras.....	34
b. Realización de ELISAs.....	34
2. Acoplamiento de las esferas a agregano.....	34
3. Validación del acoplamiento.....	36
4. Curvas estándar de ácido hialurónico.....	38
a. Variación en las condiciones de agitación e incubación de la placa	38

b. Variación en las concentraciones de la curva de ácido hialurónico.....	39
c. Comparación entre reactivos para el desarrollo de fluorescencia.....	39
d. Comparación entre lotes diferentes de reactivos de detección....	39
5. Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	40
1. Cuantificación de ácido hialurónico en suero de sujetos sanos y pacientes mediante ELISA.....	40
2. Rendimiento del acoplamiento.....	40
3. Validación de acoplamiento.....	40
4. Curvas estándar de ácido hialurónico.....	43
a. Variaciones realizadas.....	45
DISCUSIÓN.....	47
a. Impedimento estérico provocado por el analito.....	47
b. Probables interacciones agregano-ácido hialurónico.....	49
c. Reacciones carboiimidias secundarias.....	51
d. Formación de agregados.....	52
RESUMEN DE RESULTADOS.....	53
CONCLUSION.....	53
REFERENCIAS.....	54

RESUMEN

Introducción. La fibrosis hepática es una patología de diversas etiologías que se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular. El grado más alto de fibrosis es la cirrosis hepática, la cual se caracteriza por ser una etapa irreversible y cuyas consecuencias son causa de muerte de los pacientes que presentan la enfermedad. El método más usado para la detección y valoración de los grados de fibrosis es la biopsia hepática, la cual presenta varias complicaciones para el paciente al ser un método invasivo. Se han descritos diversos marcadores serológicos para el diagnóstico de la fibrosis, uno de ellos es el ácido hialurónico, cuyos niveles se cuantifican en muestras de suero mediante ELISA. El arreglo en suspensión con tecnología Luminex basado en el principio de ELISA tipo sándwich es un método que reduce el tiempo de obtención de resultados en comparación con la prueba ELISA, usando una cantidad de muestra de menor volumen y genera menos residuos.

Objetivo. Desarrollar un arreglo en suspensión basado en esferas magnéticas carboxiladas fluorescentes acopladas a agrecano para cuantificar el ácido hialurónico en suero y plasma en pacientes con fibrosis hepática.

Material y métodos. Se cuantificó ácido hialurónico en sueros de 20 sujetos sanos y de 20 pacientes con hepatitis C mediante ELISA. Se utilizaron esferas magnéticas carboxiladas a las cuales se le acopló agrecano en dos diferentes concentraciones (2 y 10 g). Se realizó la validación del acoplamiento con un anticuerpo antiagrecano. Para la validación de las curvas de ácido hialurónico se utilizaron concentraciones conocidas de un estándar de ácido hialurónico. Se realizaron variaciones en el tiempo en incubación, estándares y reactivo para el desarrollo de fluorescencia.

Resultados y discusión. Las concentraciones de ácido hialurónico son mayores en los pacientes con hepatitis C en comparación con los sujetos sanos. La validación del acoplamiento resultó exitosa y con un buen rendimiento. Las curvas de calibración con el estándar de ácido hialurónico no fueron exitosas, a pesar de las variaciones realizadas, lo cual se debió al impedimento estérico entre el agrecano y el ácido hialurónico.

Conclusión. La cuantificación de moléculas de gran tamaño mediante el arreglo en suspensión no es efectiva por el impedimento estérico.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis hepática es una patología que se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular en el parénquima hepático. La cirrosis hepática es considerada el último estadio de la fibrosis hepática, es una etapa irreversible cuyas consecuencias, como las várices esofágicas y la encefalopatía hepática, son causa de muerte en los pacientes independientemente de las diversas etiologías de la enfermedad. Dentro de la lista de países con mayor número de muertes causadas por fibrosis y cirrosis hepática México ocupa el décimo tercer lugar.

La matriz extracelular es la estructura responsable del mantenimiento de la organización y estabilidad de los órganos y tejidos, algunos de sus componentes, como el ácido hialurónico (AH), se ven elevados en enfermedades que se relacionan con procesos inflamatorios y condiciones de estrés oxidativo.

El AH es un glucosaminoglicano componente de la matriz extracelular, del líquido sinovial y del humor vítreo del ojo. Al igual que otros glucosaminoglicanos (GAGs) es degradado por la hialuronidasa, por lo que su concentración extracelular depende tanto de su degradación como de su síntesis.

En el hígado, el AH es sintetizado por las células estelares, una línea celular hepática responsable del almacenamiento de retinoides. Alrededor del 90% del AH en circulación es captado por receptores CD44 que se encuentran en las células hepáticas endoteliales del sinusoides para ser degradado. Se ha visto que la elevación del AH en suero es causada por la disminución en su degradación por parte de las células endoteliales sinusoidales hepáticas, por lo que su elevación podría servir como biomarcador de la progresión del proceso fibrogénico en el hígado que conlleva a la cirrosis. El diagnóstico de fibrosis y cirrosis hepática se realiza mediante la biopsia hepática, sin embargo, dado que la elevación en la concentración de ciertas moléculas en el suero se relaciona con el progreso de la fibrosis, esta condición podría aprovecharse para establecer un método de diagnóstico menos agresivo y no invasivo.

El AH se cuantifica mediante ELISA, sin embargo la desventaja de esta técnica es que el tiempo de incubación es largo y únicamente se puede cuantificar un analito a la vez.

El arreglo en suspensión múltiple presenta varias ventajas respecto al ELISA, debido a que se reduce el tiempo de obtención de resultados y tiene la posibilidad de cuantificar simultáneamente múltiples analitos mediante el uso de esferas compatibles, con lo que se abaten la cantidad de muestra necesaria, los tiempos de obtención de resultados, los costos y los residuos generados por el análisis.

MARCO TEÓRICO

1. El hígado y la fibrosis hepática

El hígado es la glándula de mayor tamaño en el cuerpo y después de la piel, el órgano más grande, representa aproximadamente el 2% del peso corporal total, es decir, alrededor de 1.5 Kg en un adulto [1].

Con la excepción de las grasas, los demás nutrimentos que son absorbidos por el tracto gastrointestinal son conducidos inicialmente al hígado por el sistema venoso portal para ser metabolizados. Además de esta función metabólica, el hígado realiza otras funciones como: el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, la secreción de bilis, almacenamiento de vitaminas, depósito de hierro, síntesis de los factores de coagulación y depuración de sustancias como medicamentos y hormonas [2].

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático, el cual se constituye alrededor de una vena central (o centro lobulillar) que desemboca en las venas hepáticas y, al final, en la vena cava. El lobulillo hepático se compone de múltiples placas de hepatocitos, que se alejan de la vena central. Cada placa hepática se compone de dos células adyacentes entre las que se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los conductillos biliares, los cuales circulan por los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos [1].

Los tabiques llevan vénulas portales que reciben la sangre venosa del tubo digestivo a través de la vena porta. A partir de estas vénulas la sangre se dirige hacia los sinusoides hepáticos donde residen las células endoteliales del sinusoides y las células de Kupffer, además de las células estelares hepáticas.

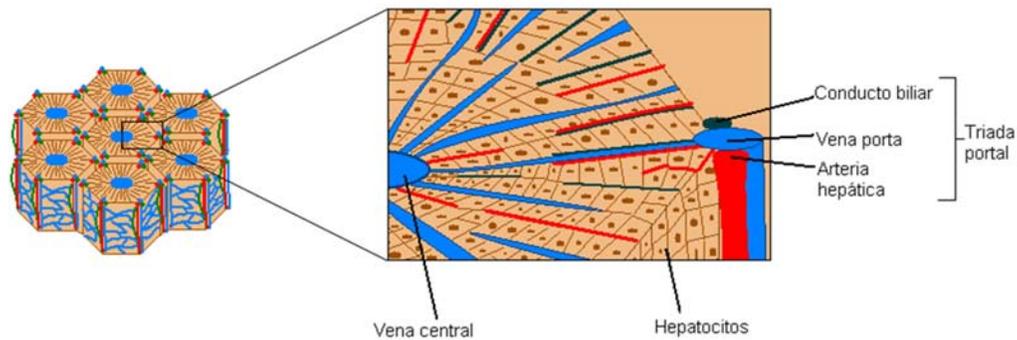


Figura 1. Lobulillo hepático. Esta estructura se compone de placas de hepatocitos, las cuales alejan de una vena central. Las placas hepáticas están compuestas por células adyacentes entre las cuales se encuentran los canaliculos biliares, quienes junto con la vena porta y la arteria hepática forman la triada portal.

Las células de Kupffer, también denominadas células reticuloendoteliales, son macrófagos residentes que revisten los sinusoides y fagocitan bacterias y otros cuerpos extraños de la sangre de los sinusoides. Las células estelares tienen la función de almacenar vitamina A y en condiciones patológicas estas células pierden la vitamina A y adquieren un fenotipo profibrogénico similar al de los fibroblastos.

La capacidad del hígado de metabolizar las sustancias absorbidas por el sistema digestivo, ya sean nutrimentos o sustancias tóxicas, le confiere una vulnerabilidad al daño celular y por consiguiente a la cicatrización, acompañada de nódulos de regeneración. El hígado, a diferencia de los demás órganos del cuerpo, tiene una capacidad regenerativa que le permite su reconstrucción por completo después de lesiones moderadas o agudas, sin embargo, en los daños crónicos no siempre ocurre así y la fibrosis es la mayor y principal complicación.

En un proceso de reparación de heridas, las células muertas son reemplazadas por tejido sano acompañado de regeneración celular y formación de cicatriz. Los procesos de reparación y fibrogénesis en el hígado se asemejan a los procesos cicatrizantes que ocurren en la reparación de las lesiones en otros tejidos, los cuales se asocian a una respuesta inflamatoria que da como resultado necrosis y daño a la matriz extracelular (MEC).

La fibrosis hepática es una acumulación excesiva de MEC en el parénquima después de cualquier daño crónico. La cirrosis es el último estadio de progresión de la fibrosis y es caracterizada por la formación de septos o anillos de cicatriz que rodea áreas de parénquima [3] cuyas consecuencias incluyen la hipertensión portal, es decir, hemorragia por varices esofágicas, esplenomegalia, síndrome hepatorenal, encefalopatía hepática, coagulopatía, hipoxemia, y como evolución final, cáncer hepático.

Tres son los mayores mecanismos que están involucrados en el desarrollo de la cirrosis; la muerte celular, la acumulación excesiva de la MEC (fibrosis) y la reorganización vascular.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la cirrosis como “un proceso difuso caracterizado por fibrosis y la conversión de la arquitectura normal en una estructura nodular anormal, que puede presentarse como la etapa final de diversas enfermedades hepáticas de diferentes causas”. La fibrosis hepática temprana es reversible, mientras que la cirrosis se considera irreversible [4].

Desde el punto de vista histológico, la cirrosis se caracteriza por pérdida de la arquitectura normal del hígado, presencia de necrosis, inflamación y formación de nódulos de regeneración que llevan a la liberación de citocinas, proteasas y prooxidantes que contribuyen al desbalance de fibrogénesis y fibrólisis.

2. Etiología y epidemiología

Los aspectos epidemiológicos de la cirrosis se caracterizan por una diferencia marcada entre géneros, grupos étnicos y regiones geográficas. En países occidentales, el alcoholismo y la hepatitis viral C son las causas principales de enfermedad hepática terminal.

En México, la cirrosis ocupó el cuarto lugar dentro de las diez primeras causas de muerte en el año 2000 y fue la segunda causa en el grupo comprendido entre los 35 y 55 años de edad. Se estima que existen 1.2 millones de personas infectadas por virus de hepatitis C. Existen alrededor de 100,000 a 200,000 pacientes cirróticos y las causas más comunes son el consumo

crónico de alcohol y la infección crónica por el virus de la hepatitis C [5]. Otras causas de cirrosis incluyen trastornos metabólicos, como el hígado graso no alcohólico y obesidad, enfermedades autoinmunes y anomalías congénitas [3].

Las múltiples enfermedades hepáticas que conducen a fibrosis lo hacen a través de vías de señalización que regulan la acumulación de MEC. Estas vías incluyen la activación, por parte de especies reactivas de oxígeno (ERO) y citocinas pro-fibrogénicas, de las células estelares hepáticas y otras células fibrogénicas. Se ha visto que los fibroblastos circundantes presentes en la cápsula de Glisson del hígado y las células musculares vasculares pueden expresar un fenotipo miofibroblástico y estar involucrados en la fibrogénesis. Las citocinas pro-fibrogénicas y las ERO son producidas por las células hepáticas dañadas, principalmente los hepatocitos [6]. Este daño produce un reclutamiento de células inmunes hacia el hígado y la activación de las células de Kupffer locales, las cuales pueden aumentar el desarrollo de la fibrosis vía secreción de citocinas proinflamatorias y pro-fibrogénicas.

Las diversas poblaciones de células fibrogénicas están distribuidas de manera diferente en los lóbulos del hígado; las células estelares hepáticas están localizadas en el sinusoides hepático, en el espacio de Disse entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos, mientras que los fibroblastos portales se encuentran integrados en el tejido conectivo del tracto portal alrededor de las estructuras que componen la tríada portal (canalículos biliares, vena porta y arteria hepática). Las células estelares hepáticas (también conocidas como lipocitos, células de Ito, células almacenadoras de lípidos, células almacenadoras de vitamina A o células perisinoidales) tienen un papel importante en el desarrollo de la fibrosis hepática. Las células estelares representan del 5-8% de las células totales en el hígado, están localizadas en el sinusoides hepático en el espacio de Disse, entre las fenestraciones endoteliales sinusoidales y los hepatocitos, con una alta frecuencia en el área periportal. Durante el daño al hígado estas células son activadas con la consiguiente metaplasia hacia células similares a miofibroblastos, los cuales están ausentes en el hígado sano y tienen la capacidad de sintetizar y

depositar colágena, sobre todo de tipo I [7]. Esta activación se caracteriza por la adquisición de un fenotipo proliferativo, contráctil, migratorio, fibrogénico e inflamatorio [2], en la enfermedad hepática se ha observado que disminuye su actividad almacenadora de vitamina A [8].

La extensión de la fibrosis y la inflamación depende del tipo y duración del daño al hígado. Ambas condiciones tienen un papel en el desarrollo, diferenciación, regeneración, respuesta xenobiótica, inmunoregulación, control del flujo sanguíneo del hígado y reacciones de inflamación [9].

Los componentes de la MEC son depositados en el hígado generando una respuesta de cicatrización para encapsular la lesión. Las células estelares están posicionadas estratégicamente para interactuar íntimamente con los hepatocitos, células endoteliales y las terminaciones nerviosas a través de sus numerosos procesos se extienden a través del espacio de Disse [10].

3. La matriz extracelular

Esta estructura es un tejido que rodea las diversas células de los mamíferos y es la responsable de la organización, propiedades físicas y función de éstas. La MEC no sólo es indispensable para el mantenimiento y soporte estructural de las células, además está implicada en muchos procesos como son: la comunicación, proliferación, migración celular [11], cambios en la expresión de genes, homeostasis en el desarrollo [12] y la morfogénesis [13]. Se pueden distinguir tres membranas componentes de la MEC, cuya clasificación depende de las moléculas presentes:

- Membranas basales: También llamadas láminas basales, son capas delgadas que separan a las células que sintetizan la MEC del tejido conjuntivo vecino. En esta membrana se encuentran presentes proteínas estructurales como la colágena IV, la elastina, el perlecán, la entactina y la fibrilina I.
- Tejido conjuntivo (matriz intersticial o estroma): Es el responsable de la protección física, aporte de resistencia a la compresión y a la distensión. Esta compuesta de ciertas proteínas especializadas, tales

como la fibronectina y la laminina, colágena tipo I y III, elastina, fibrilina, GAGs y proteoglicanos.

- Matriz provisional: Se utiliza este término debido a que en un proceso cicatrizante muchas moléculas como proteínas o componentes extracelulares que son transitorios, como los proteoglicanos, fibrinógeno, fibronectina y vitronectina, se acumulan en el foco de la lesión.

Tanto la MEC como los componentes de ésta (mostrados en la tabla 1) se han relacionado con muchos procesos patológicos. Por ejemplo, la MEC juega un papel muy importante en el desarrollo, en el estado inflamatorio y en la propagación de las células cancerosas. La participación de algunos componentes de la MEC se ha descrito en la artritis reumatoide y osteoartritis.

Tabla 1. Componentes de la matriz extracelular	
Colágenas	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Colágenas formadoras de fibras: tipo I, III, V, XI ○ Colágenas formadoras de redes: tipo IV, VIII, X ○ Colágenas asociadas a fibrillas con triple hélices interrumpidas: IX, XII, XIV, XVI, XIX ○ Filamentos de cuentas y fibrillas de anclaje: tipo VI y VII ○ Colágenas con dominio transmembranal: tipo XIII y XVII ○ Otras Colágenas no fibrilares: tipo XV y XVIII
Proteínas microfibrilares	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Elastina ○ Fibrilina
Glicoproteínas adhesivas	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Fibronectina ○ Vitronectina ○ Laminina y membranas basales
Proteínas matricelulares	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Trombospondina ○ Tenascina
Proteoglicanos	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ácido hialurónico ○ Heparan sulfato

3.1. Los glucosaminoglicanos

Como se mencionó anteriormente, los GAGs son componentes estructurales de la MEC, los GAGs son un grupo de carbohidratos que se encuentran compuestos de unidades repetidas de disacáridos que están dispuestos de manera secuencial [14]. Entre los GAGs se encuentran el AH, condroitín sulfato, queratán sulfato I y II, heparán sulfato y dermatán sulfato. Uno de los componentes del disacárido es un carbohidrato aminado que puede ser D-glucosamina o D-galactosamina. El otro componente del disacárido, con excepción del queratán sulfato, es un ácido urónico, que puede ser L-ácido glucurónico o el L-ácido idurónico. Con la excepción del AH, todos los demás GAGs contienen grupos sulfato y se encuentran unidos a proteínas. El nombre de cada uno depende de la subunidades de disacáridos que tenga cada polímero. Los GAGs median una amplia variedad de eventos en las interacciones célula-célula y en las interacciones célula-MEC, las cuales son cruciales para el desarrollo y función de los organismos, además están relacionados con procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

3.2. Los proteoglicanos

Los proteoglicanos son un grupo de GAGs unidos por enlaces O-glucosídicos a residuos de serina o de treonina que se encuentran presentes en proteínas centrales específicas. Cada uno de los proteoglicanos tiene un tamaño, una proteína central, una combinación de cadenas de GAGs y una distribución diferente en tejidos específicos. Los proteoglicanos participan en la organización de las glucoproteínas de la MEC, en su integridad estructural y en la fijación de las células a la MEC.

3.3. El ácido hialurónico

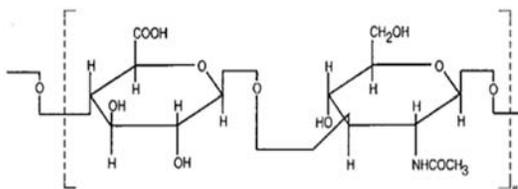


Figura 2. Estructura del ácido hialurónico. El ácido hialurónico está compuesto de unidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico por enlaces (1-4).

El AH (Figura 2) es un GAG componente de la MEC y de fluidos biológicos como son: el cordón umbilical, el líquido sinovial y el humor vítreo del ojo. Las

moléculas del AH están compuestas de 250 a 25,000 unidades de disacáridos con enlaces (1-4) que presentan ácido D-glucurónico y N-acetil-gucosamina.

El AH es el único GAG que no se sintetiza en el Aparato de Golgi, no está sulfatado y no se encuentra unido a una proteína, siendo de los GAG más simples [15]. Su peso molecular puede ser de 8×10^6 Da, 10^7 Da o 10^8 Da, y su tamaño depende de la enzima que cataliza su síntesis [16]. Su peso molecular en circulación depende de las enzimas que intervienen en su síntesis.

La concentración del AH varía en diversos tejidos y fluidos biológicos del ser humano (Tabla 2) [17], además de la presencia de ciertas patologías. En la sangre, por ejemplo, la concentración de AH es baja en comparación con los demás tejidos, cuyas concentraciones se ven elevadas en procesos inflamatorios, respuesta inmune y tumorigénesis [27].

Tabla 2. Concentración del AH en diferentes tejidos y fluidos biológicos.	
Tejido o fluido biológico	Concentración (g/mL)
Cordón umbilical	4100
Líquido sinovial	1400-3600
Dermis	200-500
Humor vítreo	140-340
Epidermis	100
Suero	0.01-0.1
Orina	0.1-0.3
Conducto torácico	0.2-50

La concentración del ácido hialurónico (AH) corresponde a tejidos y fluidos biológicos del ser humano.

El AH puede tener diferentes formas, pesos y configuraciones en sus cadenas, lo que le da una gran variedad de funciones, es poco probable que tenga ramificaciones en su composición o variaciones en la composición de sus monómeros D-glucurónico y N-acetil-gucosamina. El AH participa en muchos procesos fundamentales como el desarrollo embrionario y morfogénesis, cicatrización de heridas, reparación, regeneración e inflamación. Puede encontrarse circulando libremente o asociado a un tejido. Generalmente, las

variantes de alto peso molecular se asocian a tejidos sanos, mientras que la forma fragmentada se encuentra en situaciones de estrés y daño celular y tisular. El AH está unido estrechamente a proteínas específicas llamadas proteínas de unión del AH, cuyo tipo de interacción varía de acuerdo a la proteína a la cual esté unida (Tabla 3). Unas de las proteínas de gran importancia son las hialaderinas, cuya unión modula la interacción del AH con las células, los tejidos y la MEC [18]. Otras proteínas que interactúan con el AH son las proteínas inhibidoras Inter-alfa-tripsina, las cuales son glicoproteínas plasmáticas compuestas de tres polipéptidos: Dos cadenas pesadas (C1 y C2) y una cadena ligera (C3), las cadenas pesadas son las responsables de la interacción con el AH y con la MEC, como sucede en el caso de los óvulos de los mamíferos [19].

La vida media del AH en circulación es de 2 a 5 minutos, en la epidermis de la piel, donde se encuentra la mitad del AH del cuerpo, es de uno a dos días, y en un tejido aparentemente inerte como el cartílago, es de aproximadamente tres semanas [20], en hígado sano y cirrótico este valor no ha sido reportado.

Tabla 3. Proteínas de unión a AH más abundantes.				
Tipo de interacción con el AH	Proteína de unión a AH	Localización	Peso molecular de la proteína core (kDa)	Función
Iónico (PTR dominio)	Agrecano	Cartílago	220	Elasticidad y compresibilidad del cartílago
	Proteína de unión a AH	Cartílago	44-49	Elasticidad y compresibilidad del cartílago
	Versicano	Fibroblastos	265	Adhesión, migración y proliferación celular
	CD44	Ubicuo	80-200	Invasión de células tumorales, adhesión y migración de células
	TSG-6	Líquido sinovial	35	Efecto antiinflamatorio (artritis reumatoide)
	Neurocano	Cerebro	136	Adhesión y motilidad celular durante el desarrollo del cerebro
	Hialuronectina	Cerebro	68	Desarrollo y progresión del tumor
Iónico	RHAMM	Fibroblasto	56	Migración celular y adhesión celular en células Ras transformadas
	cESF	Cúmulo oóforo	126	Maduración de los ovocitos
Covalente	SHAP	Patológico	85	Estabilización de la MEC

dominio PTR (Proteoglicanos Repetidos en Tandem), TSG-6 (proteína del gen 6 estimulada por el factor de necrosis tumoral, TNF), RHAMM (receptor de motilidad mediado por el AH, cESF (factor estabilizante de la matriz extracelular), SHAP (Proteína derivada del suero asociada al ácido hialurónico).

3.3.1. Funciones del ácido hialurónico

Las funciones biológicas de las cadenas del AH varían de acuerdo a la proteína a la cual se encuentre unido, el peso molecular de las cadenas (Tabla 4) y el tejido en el cual este distribuido [21]. En el cartílago, por ejemplo, que en su mayoría contiene cadenas de alto peso molecular ($>10^4$ kDa), el AH provee de una alta capacidad de hidratación, lo cual favorece su función como amortiguador [22]. Otra de las funciones del AH de alto peso molecular consiste en mantener el balance de agua, funciona como un escudo contra otras células, grandes macromoléculas y agentes patógenos, sus funciones son como un tamiz, excluye ciertas moléculas para mejorar el dominio extracelular de la superficie celular, en particular, la superficie luminal de las células endoteliales, llena espacios entre células y tejidos, facilita las interacciones célula-célula en tejidos sanos y en algunos tipos de cáncer como el de seno y próstata [18], regula la presión osmótica y actúa como una resina de intercambio iónico. Además, el AH actúa como una molécula estructural en el humor vítreo del ojo.

El AH también estimula el crecimiento, migración, proliferación, adhesión, forma y renovación de las células y la regeneración de los tejidos [21] así como provee resistencia a fármacos [22]. Estos eventos son de gran importancia para el proceso de cicatrización de las heridas ya que facilitan la respuesta inflamatoria [16,17]. En células cancerosas, el AH actúa como un escudo contra los linfocitos citotóxicos (CD8+) modulando así su actividad inmunológica [23].

En las cadenas de AH de bajo peso molecular (20 kDa) predominan las funciones antigénicas, inmuno-estimuladoras e inflamatorias, contrarias a las de alto peso molecular. Otra función es la inhibición en la apoptosis, lo cual se debe a que la presencia de pequeñas cadenas de AH induce la activación de las proteínas de choque térmico las cuales ejercen un efecto antiapoptótico [24]. Se ha demostrado que una mezcla de tetrasacáridos y hexasacáridos de AH puede inducir la maduración completa de células dendríticas a través de vías mediadas por el receptor tipo Toll 4 (TLR-4).

Estudios recientes indican que el AH también se distribuye o presenta en el interior de las células. Las funciones del AH intracelular están relacionadas con el ciclo celular, ya que se ve aumentado en tal proceso durante la fase G2 [25].

Tabla 4. Funciones de las cadenas de bajo y alto peso molecular del ácido hialurónico	
Ácido hialurónico de alto peso molecular	Ácido hialurónico de bajo peso molecular
Contribuye a la función protectora del glicocalix, actúa como lubricante.	Induce la secreción de quimiocinas y citocinas por células infiltradas, mesoteliales, epiteliales del túbulo renal y endoteliales.
Transporte y distribución de proteínas plasmáticas.	Induce las vías de señalización de fosforilación, por ejemplo, MAPK.
Contribuye al balance de agua y a la regulación de la hidratación de los tejidos.	Induce la migración celular, por ejemplo, en las células tumorales.
Contribuye a la integridad de los tejidos y el mantenimiento del fenotipo de células epiteliales.	Induce la proliferación celular en condrocitos, células endoteliales y fibroblastos.
Protege contra el daño al tejido por la presencia de radicales libres.	Activa a NF B.
Protege contra la apoptosis.	Induce a la óxido nítrico sintasa.
Es antiangiogénico.	Promueve la angiogénesis.
Inhibe la fagocitosis por los monocitos y macrófagos.	Incrementa la síntesis de proteínas de matriz, por ejemplo, la colágena de tipo I.
Antiinflamatorio, puede inhibir la activación de células inflamatorias.	Incrementa la transcripción de metaloproteinasas de matriz.
Promueve la quiescencia celular.	Suprime la muerte celular y apoptosis en cultivo celular.
Inmunosupresivo (previene la unión de ligandos a receptores de superficie).	Induce la expresión de las proteínas de choque térmico.

Ácido hialurónico (AH) de bajo peso molecular de: 4-40 unidades de disacáridos (20 kDa), AH de alto peso molecular de AH: >10⁶ kDa.

MAPK (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos), NFκB (Factor Nuclear kappa B).

3.3.2. Síntesis del ácido hialurónico

La síntesis de AH representa un alto gasto para las células, se requieren aproximadamente 5 mil equivalentes de ATP, 20 mil cofactores NAD⁺, y alrededor de 10 mil moléculas de acetil-CoA, además de componentes monosacáridos como el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina [26]. El AH se sintetiza en la membrana plasmática de los fibroblastos de diversos tejidos [27, 28]. En los vertebrados existen tres isoenzimas de la hialurosintetasa (HAS), tipo 1, 2 y 3 [29], cada una de ellas sintetiza diferentes tamaños de

cadenas de AH, por ejemplo la HAS3 sintetiza cadenas pequeñas de AH (0.12-10⁶ kDa) es más activa que la HAS1 y la HAS2, esta última es la que produce cadenas de AH de mayor tamaño. Los transcritos de HAS1 y HAS3 se encuentran altamente expresados en el hígado, corazón, músculo esquelético, próstata y ovarios, mientras que los transcritos de HAS2 están expresados predominantemente en el músculo liso y el corazón [30].

Las estructuras topológicas de las diferentes HAS incluyen cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares, dos regiones asociadas a la membrana, un bucle central intracelular, un amino primario y un grupo carboxilo terminal que se encuentran en el espacio intracelular [31]. El sitio metabólicamente activo se encuentra localizado en el citoplasma [32]. Las HAS utilizan dos sustratos, uridin difosfato ácido glucurónico (UDP-GlcUA) y uridin difosfoglucosa N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), los cuales se añaden alternadamente al UDP final de la cadena de AH que se vá sintetizando. Simultáneamente a la síntesis, la cadena creciente de AH es traslocada de la membrana al espacio extracelular (Figura 3).

Una vez sintetizado, el AH se une con otras moléculas de la MEC, como el agregano, formando un complejo AH-proteína de unión-agregano [36], proveyendo de soporte y organización a los tejidos, y participando como en el mantenimiento de la estructura.

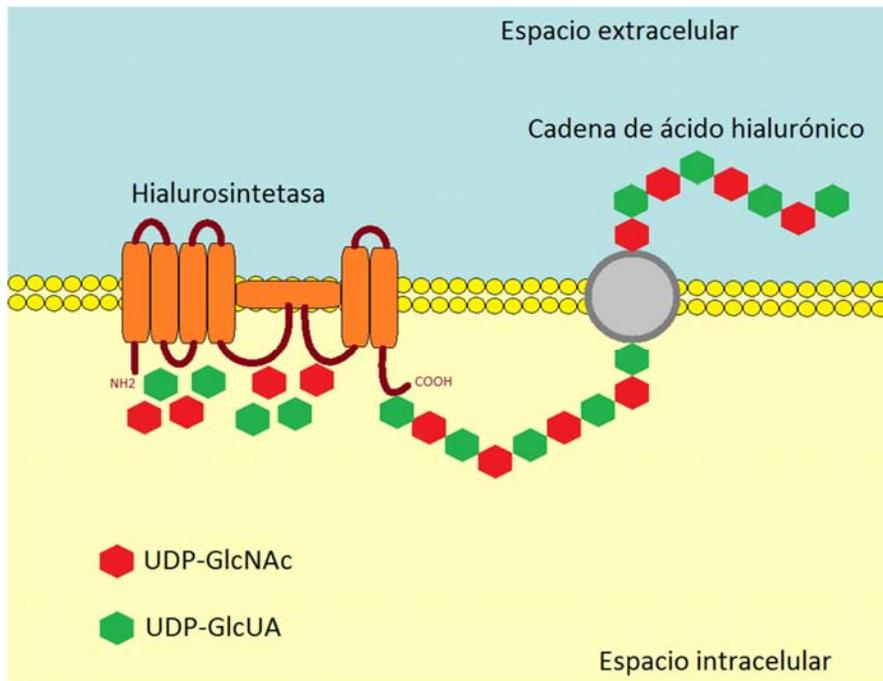


Figura 3. Síntesis del ácido hialurónico. El ácido hialurónico es sintetizado por la hialurosintetasa, a partir de unidades de UDP-GlcNAc y UDP-GlcUA, paralelo a la síntesis, es traslocado al espacio extracelular.

3.3.3. Metabolismo del AH

La principal vía de eliminación del AH es el hígado y en menor medida los riñones. Como resultado final del metabolismo de esta molécula se obtienen sus sustratos específicos ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina que finalmente son metabolizados por los hepatocitos dando como resultado CO₂, H₂O y urea. Las hialuronidasas (HYALs) son las principales enzimas responsables de la degradación. Además de estas tres enzimas, existen otras que contribuyen en menor medida en la degradación del AH, la hialuronidasa 4 (HYAL4), PHYAL1 (un pseudogen transcrito pero no traducido en el humano) y la SPAM1 (molécula de adhesión a espermina 1). Las enzimas HYAL-1, HYAL-2 son las enzimas que contribuyen en mayor medida para la degradación del AH [24].

La primera fase para la vía de la degradación del AH consiste en el paso del AH presente en los tejidos a la sangre circulante, el AH en circulación se transporta al hígado para su degradación en las células endoteliales. El AH circulante es reconocido por sus receptores específicos CD44, los cuales son expresados en las células endoteliales hepáticas. Estos receptores CD44 son

los responsables de la internalización del AH mediada por endocitosis, acompañados con el receptor endotelial de tipo 1 de vasos linfáticos (LYVE-1). La vía de metabolismo del AH incluye al receptor de superficie de la célula (CD44), dos hialuronidasas (HYAL 1, HYAL 2), y dos enzimas lisosomales (β -glucuronidasa, β -N-acetilglucosaminidasa) [37]. La cascada metabólica inicia con invaginaciones de la superficie membranal de las células endoteliales hepáticas cuando las cadenas de AH son reconocidas por los receptores CD44 (Figura 4).

Después de la internalización del AH se forman las caveolas. El AH es degradado en productos de 20 kDa que corresponden a unidades de 50 disacáridos por la HYAL2.

Los fragmentos generados por la HYAL2 son internalizados en el citoplasma, estos fragmentos pasan a los lisosomas, donde la HYAL1 degrada el AH en fragmentos de 800 Da.

Dos β -exoglicosidasas lisosomales, β -glucuronidasa y N-acetilglucosaminidasa, participan en la degradación de los monómeros del AH (ácido glucurónico y N-acetilglucosamina) resultantes de las actividades de las HYAL1 y 2. La N-acetilglucosamina es fosforilada a N-acetilglucosamina-6-P, y a través de la acción de la N-acetilglucosaminasa deacetilasa, una enzima particular de las células de Kupffer y células endoteliales del hígado, se genera glucosamina-6-P. Existen alrededor de 15 g de AH en un individuo sano de 70 kg, de los cuales 5 g son reciclados diariamente a través de esta vía. Los productos de sus monómeros son liberados de los lisosomas al citoplasma, con lo que quedan disponibles para otros ciclos metabólicos.

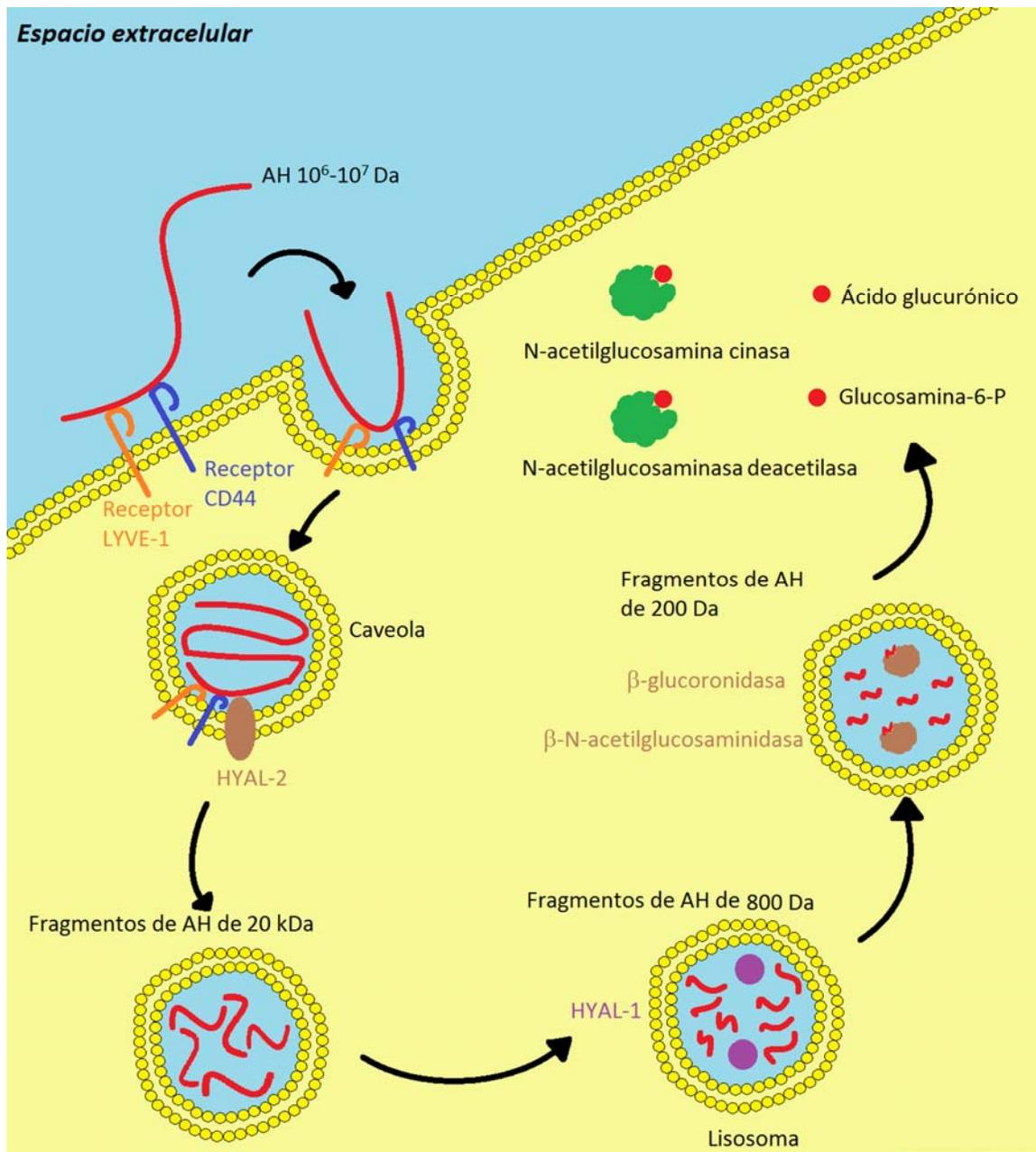


Figura 4. Metabolismo del ácido hialurónico. Receptor LYVE-1 (receptor endotelial de tipo 1 de vasos linfáticos), HYAL-1 (Hialuronidasa 1), HYAL-2 (Hialuronidasa 2). El ácido hialurónico (AH) es reconocido por sus receptores CD44, el receptor LYVE-1 estabiliza tal unión. El AH es internalizado y degradado en la caveola por la HYAL-2 generando fragmentos de 20 kDa. En el lisosoma, el AH es degradado en fragmentos de 800 Da por la HYAL-1. Dentro del lisosoma, la β -glucuronidasa y la β -N-acetilglucosaminidasa generan fragmentos de 200 Da. En el citoplasma, con la actividad de la N-acetilglucosaminasa deacetilasa y la N-acetilglucosamina cinasa se generan el ácido glucurónico y la glucosamina 6P.

3.3.4. Agrecano

El agrecano es un proteoglicano modular con múltiples dominios funcionales. El núcleo de la proteína consiste en tres regiones globulares, llamadas G1, G2, G3 [32]. Las moléculas de agrecano no existen aisladas de la MEC, pero sí como agregados de proteoglicanos. Estos agregados están compuestos de un filamento central de AH con alrededor de 100 moléculas de agrecano alrededor de ella, cuya interacción es muy estable debido a la presencia de proteínas de unión [38]. El dominio A de estas proteínas de unión ha mostrado ser el responsable de la interacción de la región G1 del agrecano, mientras que el dominio B interactúa con el AH. El AH tiene un grupo carboxilo por una unidad de disacárido repetido, y es por lo tanto un polielectrolito con carga negativa en un pH neutro, lo que facilita su unión con el agrecano [39].

En el cartílago, el agrecano se encuentra en forma de agregado unido al AH no covalentemente. Una glicoproteína de unión es la responsable de estabilizar la unión del agrecano y el AH [33] (Figura 5).

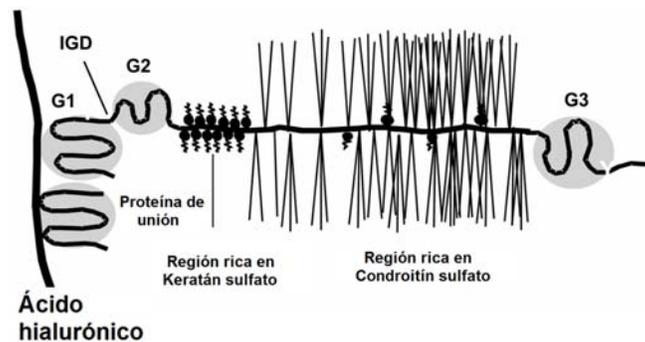


Figura 5. Estructura del agrecano. El agrecano está formado por tres dominios globulares G1, G2, y G3 y un dominio interglobular IGD. El dominio G1 es el responsable de la unión del agrecano con las cadenas de ácido hialurónico. Tomado de Roughle, P.J., 2006; [38].

3.3.5. El ácido hialurónico y la fibrosis

Cuando la eliminación del AH es afectada, como en algunos trastornos hepáticos, o su síntesis es aumentada, como en procesos inflamatorios, existe un incremento en las concentraciones del AH circulante [40]. El AH no sólo se ve aumentado en condiciones patológicas, fisiológicamente su concentración en la sangre aumenta durante la infancia, debido a la baja capacidad del hígado para metabolizar las sustancias absorbidas por el tracto digestivo así como otras moléculas del cuerpo.

Estudios clínicos relacionan la elevación del AH en suero con cambios histopatológicos en la fibrosis y cirrosis hepática. Como se sabe, la concentración del AH no sólo depende del nivel de síntesis por parte del hígado y de su eliminación, sino también de la presencia de enfermedades hepáticas como la fibrosis, cirrosis hepática y sus complicaciones como la hipertensión portal. Se ha visto que el AH se encuentra elevado tanto en la fibrosis causada por alcohol [41], como en la causada por el virus de la hepatitis C [42] y en la de origen biliar, esto en respuesta a diversos agentes químicos, virus y la activación de las células de Kupffer, las cuales secretan diversos mediadores solubles que inducen inflamación y cambios funcionales en las células endoteliales del sinusoides, cambios que provocan la disminución en la actividad metabólica de estas células, lo que conduce a un aumento de los niveles plasmáticos del AH. El hígado es uno de los órganos con mayor actividad de HYAL, por lo que alteraciones en su estructura y función se ven reflejados en las concentraciones de AH.

Muchos estudios en donde se vé alterada la función de las células sinusoidales hepáticas se observan fenómenos de capilarización. Las alteraciones en estas células se deben a cambios continuos entre el parénquima hepático y el flujo sanguíneo, secreción de mediadores biológicos activos como las citocinas, proteínas y oligosacáridos.

La elevación del AH en suero también puede deberse a un alto nivel en su síntesis. Como se sabe, en los procesos que se relacionan con daños agudos al hígado, las células estelares, las cuales son responsables de la síntesis de

AH en el hígado, son activadas por lo que hay un aumento en su actividad de síntesis de AH así como otros componentes de la MEC como la colágena, ya que en el hígado, la síntesis de AH no se lleva a cabo en los fibroblastos, sino en las células estelares. El incremento en las concentraciones en suero de los componentes estructurales de la MEC, como son las glicoproteínas, colágena, etc., se ve acompañado con el incremento de las enzimas responsables de la degradación de sus componentes y sus inhibidores.

La eliminación del AH por parte del hígado depende de diversos factores, entre los que se encuentran la capilarización, el correcto flujo sinusoidal y la presión de la vena portal. Los fenómenos de capilarización en el hígado conllevan a un desvío de la sangre proveniente de la vena hepática lo que eleva en sangre las concentraciones de los componentes de la MEC. La degradación del AH se ve disminuida debido a que al no pasar la sangre al hígado el AH no puede contactar a su receptor CD44 [43]. La degradación del AH debida a los cambios estructurales en la MEC y procesos inflamatorios provocan una pérdida de AH de la MEC, debido a que los primeros roles del AH es el retener agua y controlar el flujo del agua en la MEC disminuye la organización estructural del tejido al disminuir su hidratación.

4. Diagnóstico de la fibrosis

La principal herramienta para el diagnóstico y la detección de cirrosis es la biopsia hepática, la cual presenta complicaciones como dolor y sangrado hepático después de la toma de muestra de tejido [44].

Debido a las complicaciones que la fibrosis hepática presenta en los pacientes, como problemas en la cascada de coagulación, es riesgoso utilizar la biopsia para hacer el seguimiento en el avance de la fibrosis. Por lo que se han buscado nuevos marcadores que puedan relacionar el progreso de la fibrosis y cirrosis. Uno de estos marcadores es el AH, cuyas concentraciones en sangre se ven aumentadas en el proceso fibrogénico.

Por su relación con estos procesos patológicos del hígado, la cuantificación del AH se ha utilizado como un marcador no invasivo de enfermedad hepática.

5. Arreglo en suspensión

El arreglo en suspensión es una técnica que permite la cuantificación simultánea de hasta 100 analitos. La cuantificación del analito se realiza sobre la superficie de esferas carboxiladas a las que se le puede acoplar una serie de analitos como sondas de cDNA, anticuerpos, enzimas y otras proteínas, o moléculas que contengan grupos amino libre. De esta manera es posible llevar a cabo reacciones de hibridación, enzimáticas, de tipo ELISA etc. (Figura 6).

El ensayo para cada analito se realiza en una esfera a la cual se le ha acoplado previamente un reactivo de captura (anticuerpo, antígeno, receptor, ligando, enzima o ácido nucleico) diferente para cada esfera, la cual ha sido marcada para emitir fluorescencia dando lugar a una matriz con 100 regiones espectrales distintas, lo que da la capacidad de utilizar una región para cada analito a cuantificar.

El principio del ensayo que se utilizará para cuantificar AH se basa en el ELISA tipo sándwich, por lo que cada molécula blanco se unirá a su reactivo de captura, la cual podrá ser detectada con el uso de un conjugado fluorescente. Al final de esta reacción la cuantificación se realiza en un equipo con tecnología Luminex® (Bio-Plex, Bio-Rad), el cual toma una muestra de las esferas en suspensión de cada pozo y hace pasar cada esfera por dos láser, uno de estos excita a cada esfera realizando el conteo de éstas e identifica la región en que fluoresce, y por lo tanto el analito que se está evaluando, mientras que el otro excita al fluorocromo (ficoeritrina), lo que permite la cuantificación del analito en estudio. El equipo Bio-Plex proporciona los datos de intensidad de fluorescencia y concentración obtenidos para cada pozo [45].

Las principales ventajas que ofrece el arreglo en suspensión en comparación con la prueba ELISA son las siguientes:

- Se pueden cuantificar 100 analitos al mismo tiempo con una alícuota de la muestra en estudio de 12 L.
- Se reduce el tiempo de incubación.
- Se reduce el número de pasos.

- Los resultados de las reacciones bioquímicas se generan en tiempo real.
- El costo es similar al de la prueba ELISA dividiendo el costo comercial del inmunoensayo y el número de pruebas que se pueden realizar.
- Se pueden realizar variedad de ensayos (Tabla 5).

Tabla 5. Aplicaciones del arreglo en suspensión

Identificación de fármacos/Genómica	Detección de Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) para aplicaciones farmacogenómicas
	Análisis de expresión transcripcional
Descubrimiento de fármacos/Proteómica	Cribado de fármacos por inhibición de cinasas o proteasas
	Cuantificación de analitos en suero de animales y humanos en ensayos clínicos
	Multianálisis de metabolitos de fármacos con fines de estudio en su metabolismo y toxicología
	Validación de dianas de fármacos utilizando un receptor ligando
Diagnóstico	Detección de enfermedades genéticas o hereditarias como la fibrosis quística
	Examen serológico de enfermedades infecciosas como la hepatitis
	Multianálisis de perfiles hormonales
	Tipificación de HLA para trasplante
	Pruebas autoinmunes y de alergias
Investigación básica	Expresión de genes
	Genotipificación
	Análisis de expresión de proteínas
	Análisis de anticuerpos
	Mapeo de epitopos de anticuerpos
	Sustratos de enzimas investigación
	Análisis en interacciones de proteína-proteína

Tomado de Ref. [45]

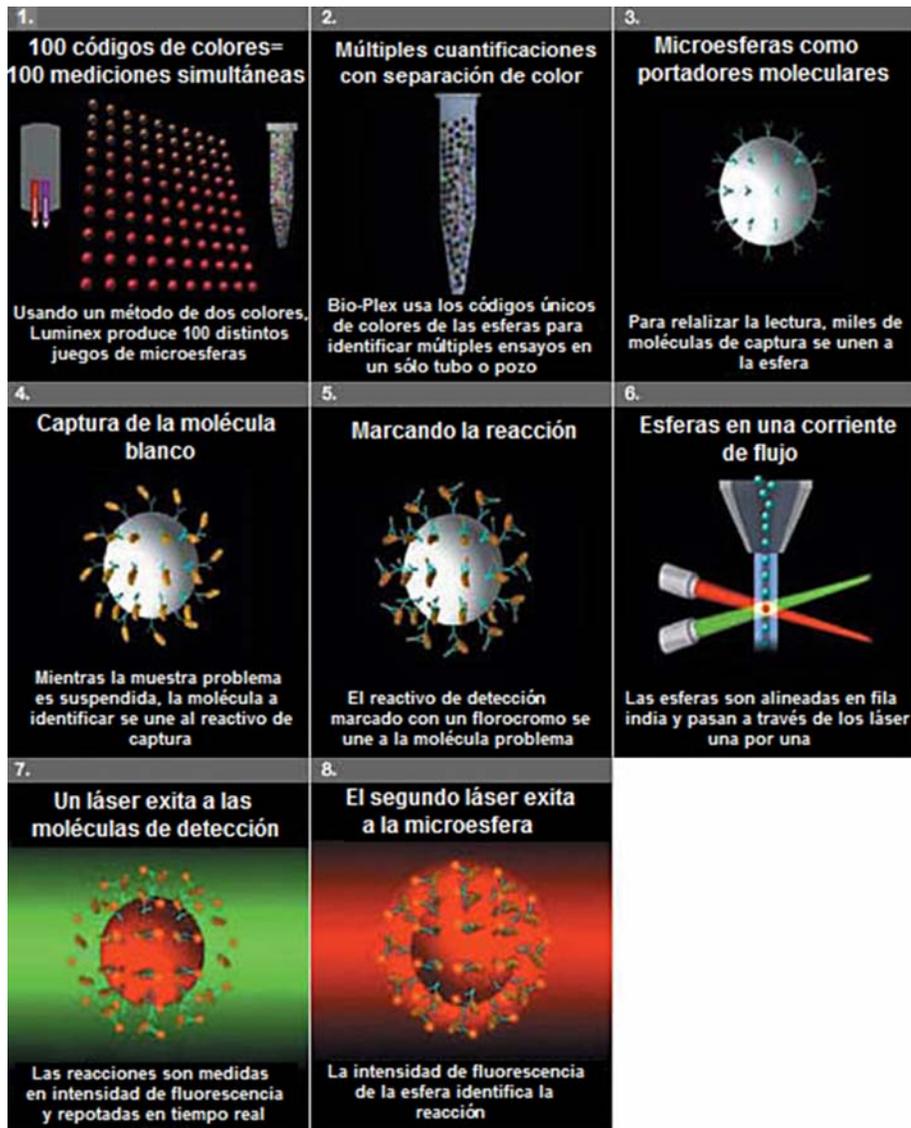


Figura 6. Fundamento del arreglo en suspensión. Tomado de Ref.[45]

JUSTIFICACIÓN

La fibrosis y cirrosis hepática son un problema de salud en México y en el mundo, debido a su alta prevalencia y variedad de etiologías que son causantes de muerte en pacientes con estas enfermedades.

El estándar de oro para el diagnóstico de fibrosis y cirrosis hepática es la biopsia hepática, la cual presenta grandes riesgos por ser un procedimiento invasivo. Sin embargo, recientemente se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico de la fibrosis y la cirrosis que tienen como ventaja el ser menos invasivos. Estos métodos se basan en la relación que existe entre el progreso de la enfermedad y el aumento de ciertas moléculas en suero y plasma, que solas o en conjunto pueden servir como biomarcadores y sustituir el diagnóstico por biopsia.

Entre los biomarcadores que se han propuesto para el diagnóstico de la fibrosis está el AH, cuya cuantificación se realiza mediante un ensayo tipo ELISA. Las desventajas de este método radican en su largo tiempo de realización, que solo se puede cuantificar un analito a la vez, la cantidad de muestra requerida y los residuos generados por lo que el desarrollo de un arreglo en suspensión permitiría eliminar estas desventajas y eventualmente podría formar parte de un ensayo multiplex que evalúe diversas moléculas de manera simultánea.

El arreglo en suspensión múltiple parte del principio del ELISA sándwich. En el caso del AH el anticuerpo de captura será sustituido por el agrecano que actuará como un reactivo de captura. El AH se une específicamente al agrecano y el reactivo de detección consiste en el agrecano biotinilado. A diferencia del ELISA que es un método colorimétrico, el ensayo Bio-Plex usa la ficoeritrina acoplada a estreptavidina, un fluorocromo que emite a 578 nm. La cuantificación se realiza en el equipo con tecnología Luminex®, el cual cuenta con dos rayos láser. Uno de ellos excita a la esfera acoplada y el segundo láser actúa sobre el reactivo de detección marcado con el fluorocromo para cuantificar la reacción (Figura 6).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un arreglo en suspensión basado en esferas magnéticas carboxiladas fluorescentes acopladas a agrecano para cuantificar el ácido hialurónico en suero y plasma en pacientes con fibrosis hepática.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Acoplar las esferas magnéticas a agrecano y validar tal acoplamiento.
- Realizar curvas de calibración con diferentes concentraciones de un estándar de AH.
- Descartar reactividad cruzada entre el ácido hialurónico y otras moléculas elevadas durante esta patología.
- Cuantificar el AH mediante el ensayo Bio-Plex en suero de pacientes con fibrosis hepática y correlacionarlo con el diagnóstico de la biopsia hepática.
- Comparar el arreglo en suspensión con la técnica de ELISA en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad y linealidad.

HIPÓTESIS

EL AH se une específicamente a las moléculas de agrecano, de esta forma, el acoplar agrecano a esferas magnéticas permitiría la cuantificación del AH mediante el uso de un arreglo en suspensión, haciendo más rápido el proceso y favoreciendo que eventualmente se pudiera cuantificar de manera simultánea varios analitos en comparación con la ELISA.

REACTIVOS Y MATERIALES

- MagPlex™ Microesferas REGION 36, Bio-Rad, Catálogo MC10036-01, Lot. B17287.
- Duo Set^R Economic Pack Hialuronano, R&D^R Systems, Lot. 1246792EC, Catálogo DY3614E.
- Anticuerpo monoclonal anti-agrecano, Thermo SCIENTIFIC, Lot. MA91A95, Catálogo MA1-90873.
- Reactivo de detección Hialuronano, R&D^R Systems, Lot. PQO02100, Catálogo DY3614E.
- Estándar Hialuronano, R&D^R Systems, Lot. 1193703, Catálogo DY3614E.
- Reactivo de captura Hialuronano, R&D^R Systems, Lot. GMF0210091, Catálogo DY3614E.
- Estreptavidina-HRP, R&D^R Systems, Lot. AEM7210072, Catálogo DY3614E.
- R&D Estreptavidina-ficoeritrina, CAT#F0040.
- e-Bioscience Estreptavidina-ficoeritrina, Catálogo 12-4317-87, Lot. E01657-1631
- Bio-Plex Calibration Kit #171-203060.
- Bio-Plex 200 Systems.

DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Cuantificación de ácido hialurónico en suero de sujetos sanos y pacientes mediante ELISA

a. Recolección de las muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron de 20 sujetos control y de 20 pacientes con hepatitis C (19 sujetos genotipo 1, 1 sujeto genotipo 2; 11 mujeres, 9 hombres; edad promedio 58 años) de curso crónico, los cuales aceptaron participar en el estudio firmando una carta de consentimiento informado. Cada muestra de sangre obtenida se centrifugó a 2,116 g durante 10 minutos, después de este proceso se realizaron alícuotas de 300 μ L y se almacenaron en un ultracongelador a 70°C hasta su utilización.

b. Realización de ELISAs

Para determinar los valores de AH en el suero de personas sanas y de pacientes se realizaron pruebas ELISA. Para realizar dichas pruebas se sensibilizó la placa colocando 100 μ L del reactivo de captura (agrecano) en cada pozo, la placa se incubó durante una noche a temperatura ambiente. Al final de esta incubación se realizaron lavados con 300 μ L de amortiguador de lavado (Tween 20 al 0.05% en solución amortiguada de sales de fosfato, PBS) y se bloqueó la placa con 300 μ L de amortiguador de bloqueo (Tween 20 al 0.05% en PBS con NaN_3 al 0.05%) durante 2 horas. Al término de esta incubación se realizaron los lavados correspondientes y se prepararon las soluciones de AH con concentraciones de 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 ng/mL, agregando 100 μ L de estas soluciones a los pozos correspondientes. Se agregaron 100 μ L de suero de sujetos sanos (n=20) o de pacientes con hepatitis C de curso crónico (n=20) a los pozos correspondientes. Se incubó durante 2 horas. Terminada esta incubación se realizaron los lavados correspondientes y se agregaron 100 μ L de agrecano biotinilado y se incubó durante 2 horas. Terminada esta incubación se realizaron los lavados correspondientes y se agregaron 100 μ L de estreptavidina-HRP (conjugado de estreptavidina con peroxidasa de rábano) a cada pozo y se incubó durante 20

minutos. Al final de esta incubación se realizaron los lavados correspondientes y se agregaron a cada pozo 100 μ L de la solución sustrato (H_2O_2 -tetrametilbenzidina), se incubó durante 20 minutos y se agregaron a cada pozo 50 μ L de solución de paro (ácido sulfúrico 2 N) y se realizó la lectura correspondiente en un equipo Multiskan Ascent a 450nm.

2. Acoplamiento de las esferas magnéticas a agrecano

El acoplamiento de las esferas magnéticas a agrecano se realizó a temperatura ambiente con esferas en la región 36 (Figura 6). Se tomaron 100 μ L (equivalente a 1.25×10^6 esferas) de una suspensión de esferas magnéticas con concentración de 1.25×10^7 esferas/mL, para dos cantidades de reactivo de captura diferente (2 y 10 μ g de agrecano). Las esferas se colocaron en dos tubos tipo eppendorf de 1.6 ml cubiertos de la luz. Para ambos tubos se realizó el lavado 1, se centrifugaron a 4,504 g durante 5 minutos, después se retiró el sobrenadante colocando los tubos en un imán para minimizar el número de esferas perdidas por el lavado. A cada tubo se le agregaron 100 μ L de amortiguador de lavado y se realizó el lavado 1. A ambos tubos se agregaron 80 μ L de amortiguador de activación (solución 10 mM de fosfato de sodio, pH 6.2). Se agitaron los tubos en vórtex durante 30 segundos. Las esferas de ambos tubos se activaron por separado con 10 μ L de una solución 1:1 de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilamimopropil] carboimida (EDAC) y N-hidroxisulfosuccinimida (S-NHS), los tubos se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Terminado este procedimiento se realizó el lavado 1. Terminado este lavado se agregaron 150 μ L de PBS a cada tubo, se agitaron en vórtex durante 10 segundos y se realizó dos veces el lavado 1 para ambos tubos. Terminado el último lavado se agregó el agrecano (2 y 10 μ g). Ambos tubos se dejaron incubar durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Se realizó dos veces el lavado 1 para ambos tubos y a cada uno de ellos se le agregaron 250 μ L de amortiguador de bloqueo (albúmina de suero bovino al 1% en PBS). Los dos tubos se agitaron en vortex durante 30 segundos y se dejaron incubar durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Terminada la incubación se realizó dos veces el lavado 1 para cada tubo. Las esferas contenidas en los dos tubos se resuspendieron por separado

en 150 L de amortiguador de almacenamiento (albúmina de suero bovino al 1% en PBS). Para conocer el rendimiento de esferas resultantes se contaron en una cámara de Neubauer. Las esferas se almacenaron a 4°C antes de su utilización (solución “Stock”).

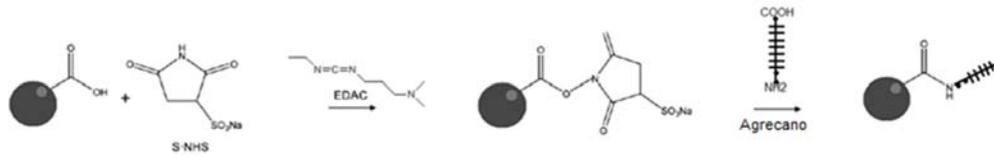


Figura 7. Acoplamiento de las esferas magnéticas a agregcano. Las esferas magnéticas carboxiladas se activaron con el EDAC (1-etil-3-[3-dimetilamimopropil] carboimida hidroclicorido) para formar el intermediario O-acilisourea, el cual se estabilizó con S-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), el éster resultante se hizo reaccionar con el agregcano a dos cantidades diferentes (2 y 10 g).

3. Validación del acoplamiento de las esferas magnéticas

Para realizar la validación del acoplamiento de las esferas magnéticas a agregcano primero se ajustó la concentración de esferas de la solución “Stock” a 100 esferas/ L (suspensión 1). Se prepararon diluciones de anticuerpo anti-agregcano biotinilado diluido en PBS con las siguientes concentraciones: 0.06125, 0.125, 0.25, 0.5, 1 , 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó una placa con filtro Millipore® (Figura 8), la cual fue humedecida previamente con 100 L de PBS. Para retirar la solución se utilizó un lavador de vacío el cual también se empleó para cada lavado de la placa. Posteriormente se agregó a cada pozo de la placa una cantidad equivalente a 2,500 esferas (25 L de la suspensión 1) y 25 L de las diluciones del anticuerpo correspondiente, el blanco se realizó con solución de PBS en sustitución del anticuerpo. Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos evitando el contacto con la luz. Después de la incubación se realizaron tres lavados con amortiguador de lavado y a cada pozo se le agregaron 25 L de estreptavidina-ficoeritrina diluida previamente en una relación 1:10, se dejó incubar en agitación durante 15 minutos protegiéndolo de la luz. Antes de la lectura se agitó a máxima velocidad durante 30 segundos y se analizó en el equipo Bio-Plex, a 635nm para la ficoeritrina-estreptavidina y 532nm para las esferas (Figura 9).

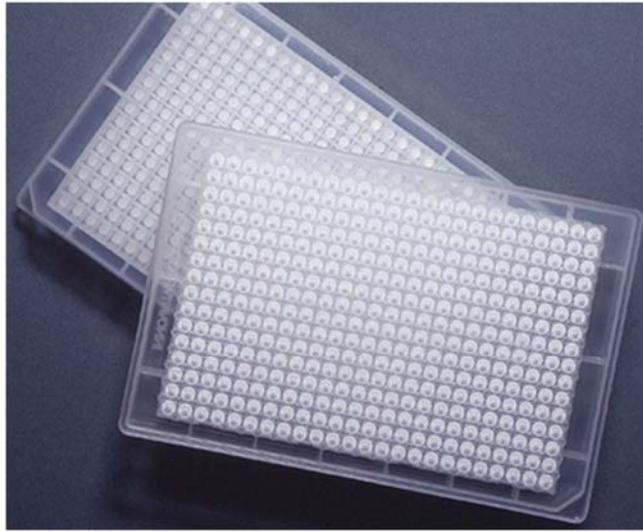


Figura 8. Placa con filtro Millipore®. Placa con 96 pozos. Cada pozo tiene un filtro Millipore® con poro de diámetro de 1.2 μ m, el cual impide el paso de la microesfera. Tomado de <http://www.bioexpress.com/divinity-cart/item/350050/SEAHORSE-LABWARE-Filter-Plates/1.html>

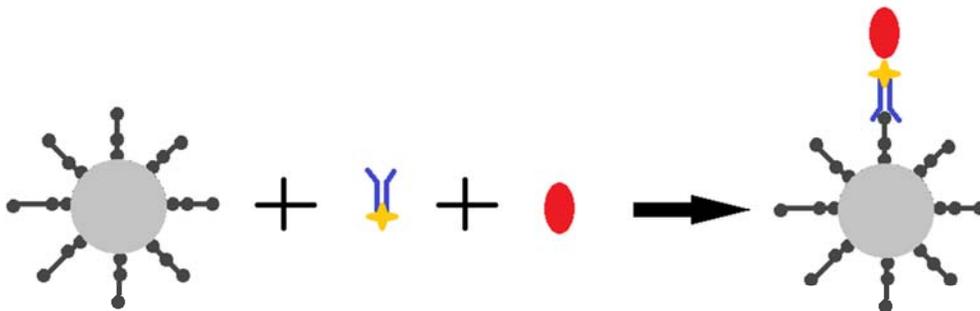


Figura 9. Validación de las esferas acopladas a agrecano. Las esferas acopladas a agrecano fueron validadas con concentraciones diferentes del anticuerpo anti-agrecano biotinilado y con la estreptavidina-ficoeritrina.

-  esferas magnéticas
-  moléculas de agrecano
-  anticuerpo anti-agrecano biotinilado
-  estreptavidina-ficoeritrina

4. Curvas estándar de ácido hialurónico

Para la realización de las curvas estándar se prepararon soluciones del AH con concentraciones de 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 ng/mL. Al igual que en la validación, a cada pozo se le agregaron 25 μ l de la solución 1 y 25 μ l de la dilución del ácido hialurónico correspondiente para cada punto de la curva, el blanco se realizó con 25 μ l del reactivo diluyente (Tween 20 al 5% en PBS). Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora evitando contacto con la luz. Después de la incubación se realizaron tres lavados con amortiguador de lavado y a cada pozo se le agregaron 25 μ l del reactivo de detección (agregado biotinilado), se dejó incubar en agitación durante 1 hora protegiéndolo de la luz. Posteriormente se realizaron tres lavados y se agregaron 25 μ l de ficoeritrina a cada pozo, se dejó incubar en agitación durante 15 minutos protegiéndolo de la luz. Antes de la lectura se agitó a máxima velocidad durante 30 segundos y se analizó en el equipo Bio-Plex , a 635nm y 532nm.

Se realizaron otros ensayos para las curvas estándar de AH con las siguientes variantes:

a. Variación en las condiciones de agitación e incubación de la placa

Para garantizar la correcta suspensión de las esferas y la interacción con el estándar y el reactivo de detección se modificaron las condiciones de agitación e incubación para los siguientes ensayos en los que se cambiaron las concentraciones de AH, el uso de diferentes reactivos para el desarrollo de fluorescencia y el uso de un reactivo de detección diferente.

Se realizaron las curvas de validación con concentraciones de AH con agitación máxima durante las incubaciones y después con agitación máxima aumentando el tiempo de incubación del estándar y reactivo de detección a 2 h cada uno (en contraste con 1 h probada previamente).

b. Variación en las concentraciones de la curva de ácido hialurónico

Se realizaron las curvas de validación aumentando la concentración de AH a 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL.

c. Comparación entre reactivos para el desarrollo de fluorescencia

Se usaron dos marcas de conjugados de ficoeritrina-estreptavidina (R&D systems catálogo F0040; y eBioscience catalogo 12-4317-87) a una concentración de 1.33 g/mL.

Se realizaron las curvas de validación con concentraciones de AH de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 100, 200 y 400 ng/mL, utilizando los conjugados antes mencionados.

d. Comparación entre lotes diferentes de reactivos de detección

Se probaron diferentes reactivos de detección del mismo lote (PQO0210091).

Se realizaron las curvas de validación con concentraciones de AH de 3.125, 6.25, 12.5, 25, 100, 200 y 400 ng/mL.

5. Análisis estadístico

Se utilizó una prueba de t de student para comparar las concentraciones en suero de AH entre el grupo control y el grupo de los pacientes. Se utilizó el programa Sigmastat 3.5 (Point Richmond, EE. UU). Los datos se expresan comocore $\bar{x} \pm DE$.

RESULTADOS

1. Cuantificación de ácido hialurónico en suero de personas sanas y pacientes mediante ELISA

La cuantificación de AH mostró una diferencia entre los dos grupos (controles y pacientes). En el grupo control se obtuvo una media de 28.9 ng/mL con un mínimo de 2 ng/mL y un máximo de 41 ng/mL, los cuales coinciden con los mostrados en la tabla 1 (10-100 ng/mL) en personas sanas. El grupo de pacientes mostró una media de 715.2 ng/mL con un mínimo de 5.6 ng/mL y un máximo de 845.2 ng/mL. Los resultados muestran que la concentración de AH es mayor en pacientes con hepatopatía que en los sujetos sanos, lo cual sustenta que el AH sirve como marcador del daño hepático (Figura 9).

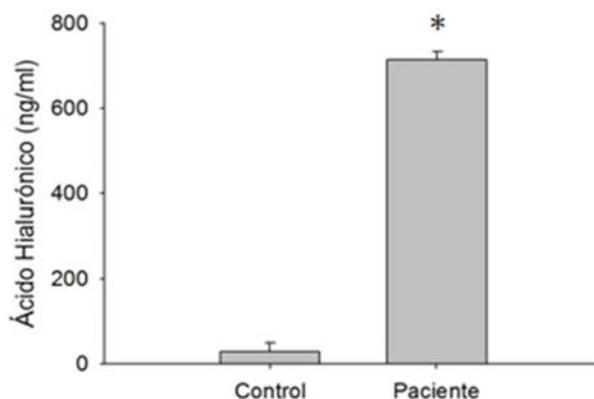


Figura 9. Cuantificación del AH en personas sanas y pacientes con hepatopatía. Se realizó una cuantificación de AH en el suero de personas sanas y pacientes con enfermedad hepática. n=20

2. Rendimiento del acoplamiento

En la Tabla 6 se muestra el rendimiento de las esferas acopladas. Como se observa, el rendimiento fué bueno, aún cuando hubo pérdida de esferas durante los lavados.

Tabla 6. Rendimiento de las esferas acopladas.		
Esferas	No. de esferas/mL	Rendimiento
2 g	1.695×10^5	84.04%
10 g	1.995×10^5	86.44%

Rendimiento de las esferas acopladas. Se observa el rendimiento de las esferas acopladas obtenidas para una cantidad de agregano de 2 y 10 g. El conteo se realizó en cámara de Neubauer en 4 cuadrantes. Para el cálculo del rendimiento se realizó tomando en cuenta las 1.25×10^6 tomadas para realizar el acoplamiento.

3. Validación del acoplamiento

En la Tabla 7 se observan los resultados obtenidos en la primera validación de las esferas acopladas. Para ambas concentraciones de agregano (2 y 10 g/mL) se observa una relación lineal entre las concentraciones de anticuerpo utilizado y la intensidad de fluorescencia obtenida.

Tabla 7. Resultados de la primera validación de las esferas acopladas a agregano.

Primera validación de esferas acopladas con 2 g/mL

Concentración del Ac (g/mL)	Intensidad de fluorescencia	Concentración del Ac (g/mL)	Intensidad de fluorescencia
4	17058.0	4	14408.5 ± 0.73
2	14398.6	1	10097.0 ± 0.85
1	10521.0	0,25	5310.8 ± 7.39
0,5	7300.3	0,0625	5502.3 ± 4.8
0,25	3379.5		
0,125	2236.5		
0,0625	1226.0		

Primera validación de esferas acopladas con 10 g/mL

Concentración del Ac (g/mL)	Intensidad de Fluorescencia	Concentración del Ac (g/mL)	Intensidad de Fluorescencia
4	15778.8 ± 4.77	4	16350.5 ± 0.42
2	14813.3 ± 10.13	1	11031.8 ± 0.76
1	12010.0 ± 0.39	0,25	5814.0 ± 5.57
0,5	6837.5 ± 17.04	0,0625	5816.5 ± 2.79
0,25	5468.5 ± 5.47		
0,125	2286.0 ± 21.34		
0,0625	1736.3 ± 1.92		

Resultados de la primera validación de las esferas acopladas con las dos concentraciones diferentes de agregano (2 y 10 g). Ac (anticuerpo).

Se realizaron 2 ensayos de acoplamiento de esferas, en la figura 11 se observan las gráficas de la validación del primer ensayo de las esferas acopladas. La validación resultó con una mejor regresión lineal, con una r^2 de 0.967 y 0.963 para los dos acoplamientos de 2 y 10 g de agrecano respectivamente. En el caso del segundo ensayo se obtuvo una menor regresión con una r^2 de 0.83 y 0.889 para las concentraciones de agrecano de 2 y 10 g respectivamente. Las curvas de la validación del acoplamiento de las esferas a agrecano se observan en la Figura 12. Entre las dos concentraciones de agrecano utilizado no existe diferencia significativa.

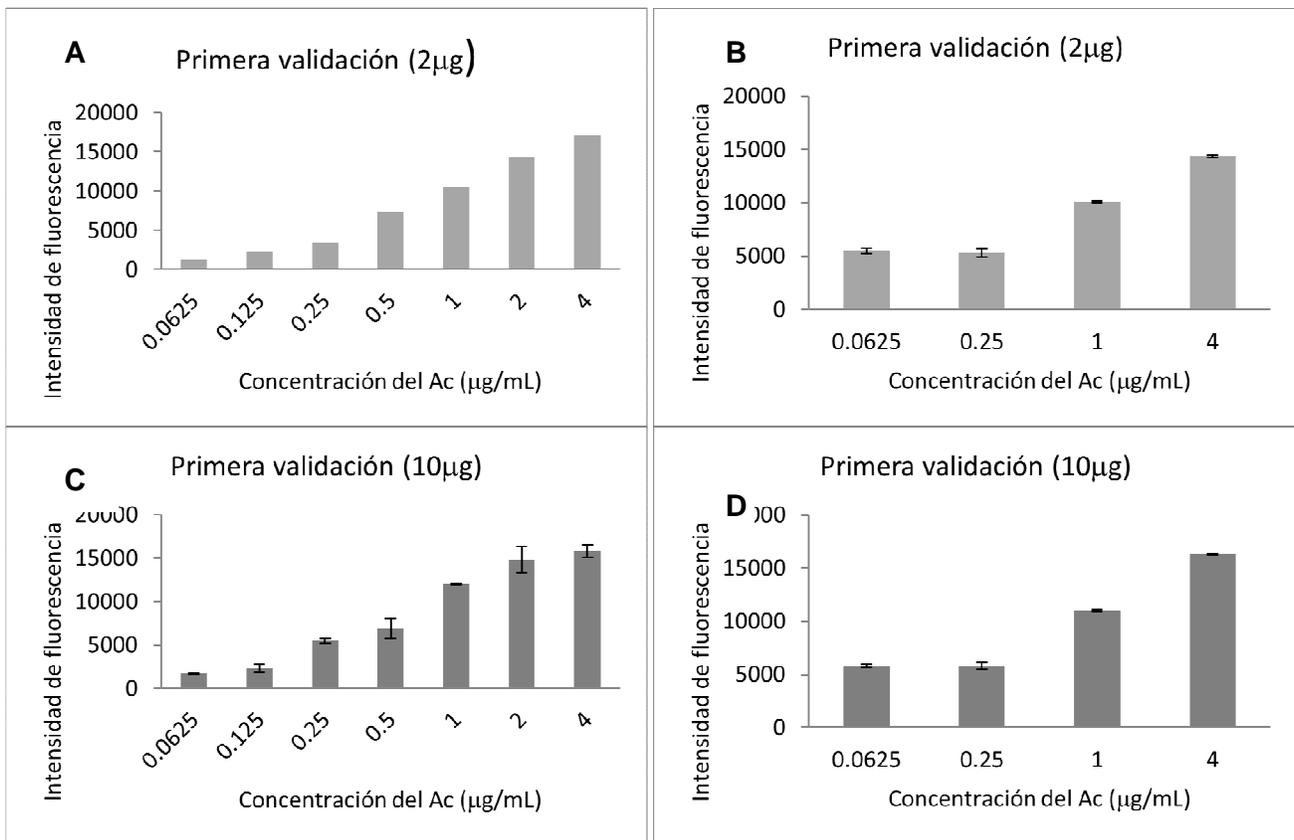


Figura 11. Gráficas de las validaciones de las esferas acopladas a agrecano. Se observan las diferentes gráficas de las validaciones de las esferas acopladas a agrecano. La primera validación resultó con una mejor regresión lineal, con una r^2 de 0.967 y 0.963 para las dos acoplamientos de 2 y 10 g de agrecano respectivamente (gráfica A y C). En el caso de la segunda validación se obtuvo una menor regresión con una r^2 de 0.83 y 0.889 para las concentraciones de agrecano de 2 y 10 g respectivamente (gráfica B y D).

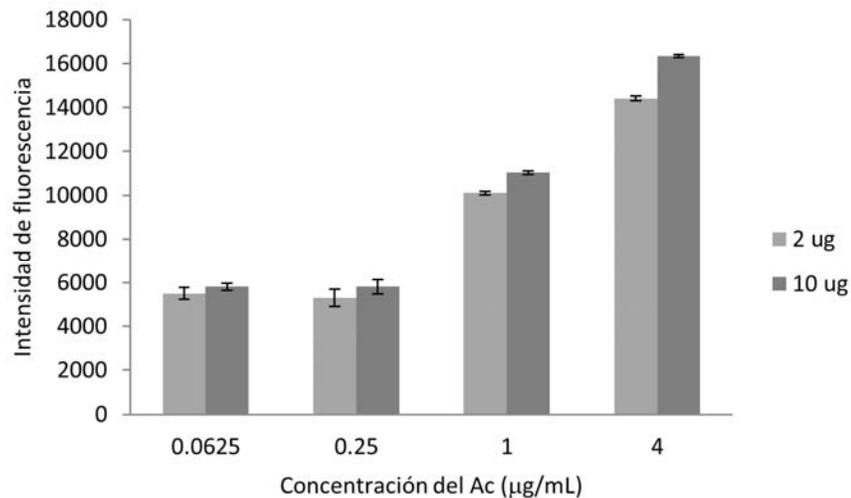


Figura 12. Comparación entre las validaciones de las esferas acopladas con 2 y 10 g. Se observan las validaciones de las esferas acopladas para 2 y 10 g. No existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0.8$).

4. Curvas estándar de ácido hialurónico

En la Figura 12 se observan los resultados obtenidos para las curvas de AH. Los resultados muestran que la interacción entre las cadenas de AH y el agregado son bajas o nulas, debido a que en la representación gráfica de la concentración de AH y fluorescencia no se observan comportamientos lineales.

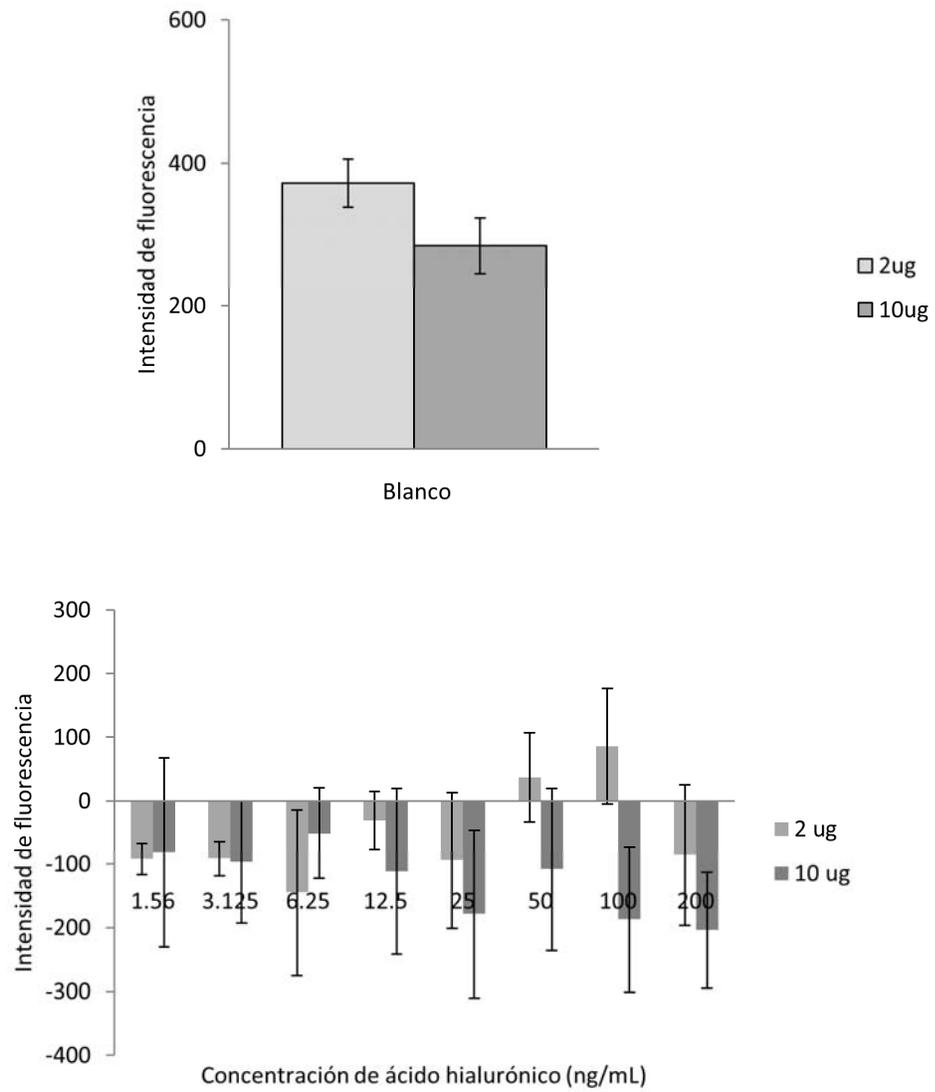
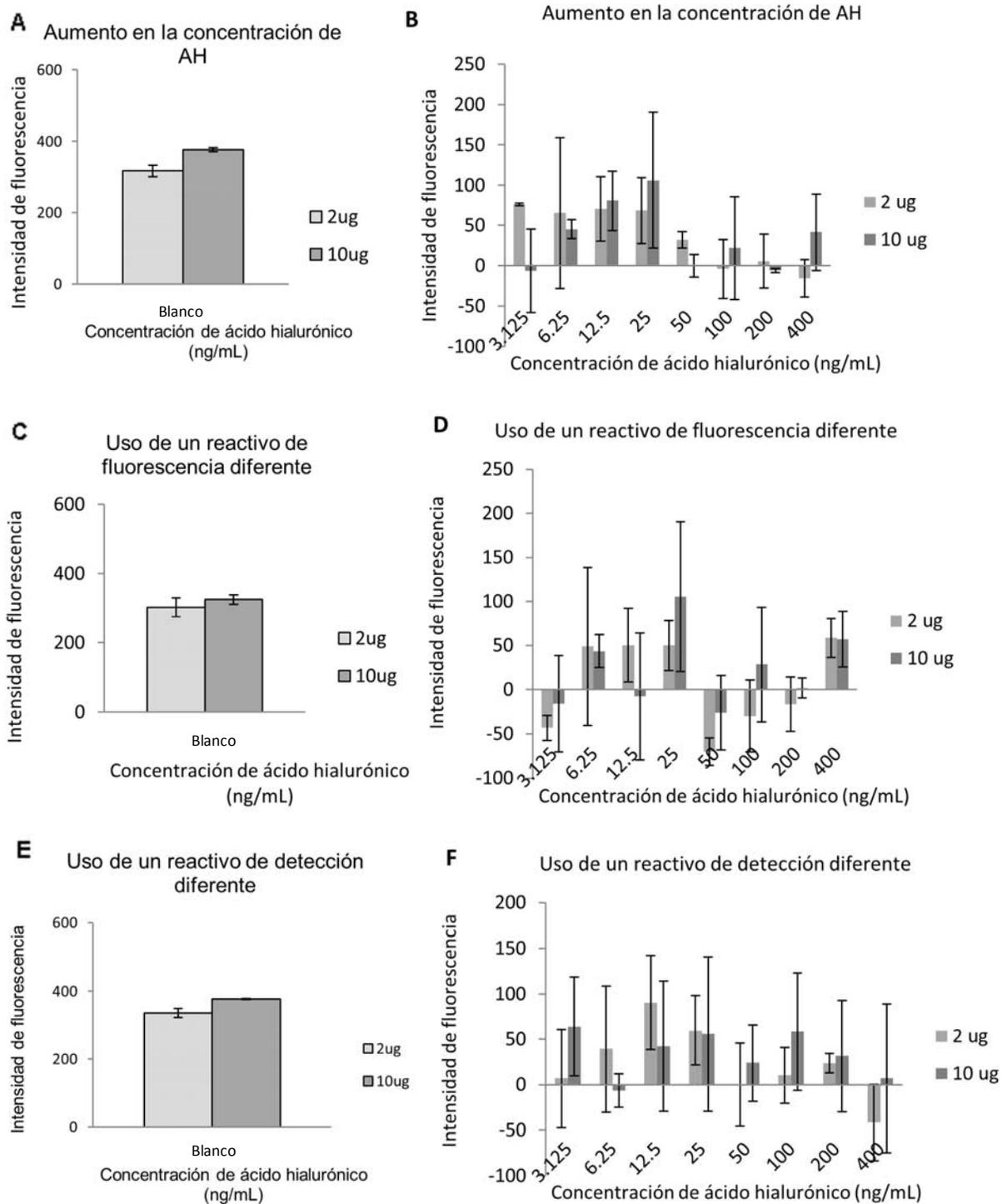


Figura 13. Curvas estándar de ácido hialurónico. Se observan las curvas estándar para diferentes concentraciones de ácido hialurónico para los dos grupos de esferas (2 y 10 g).

a. Variaciones realizadas

En la figura 14 se observan los datos obtenidos para las esferas de 2 g y 10 g con las variaciones realizadas (aumento en la concentración de AH, uso de un reactivo de detección diferente y uso de un reactivo de fluorescencia diferente) en los reactivos y concentraciones utilizadas, así como en las condiciones de incubación. En ningún caso se observa una relación lineal entre las concentraciones de AH utilizadas y la intensidad de fluorescencia obtenida.

Figura 13. Gráficas de las variaciones realizadas para las curvas estándar de ácido hialurónico



Gráficas de las variaciones realizadas para las curvas estándar de ácido hialurónico. Se observan las gráficas para las distintas variaciones realizadas. Figura A y B-Variación en las concentraciones de la curva de ácido hialurónico con aumento en la incubación, Figura C y D-Comparación entre reactivos de para el desarrollo de fluorescencia con aumento en la incubación, Figura E y F-Comparación entre lotes diferentes de estándares y reactivos de detección con aumento en la incubación.

DISCUSIÓN

Los datos de ensayos de ELISA muestran que las concentraciones séricas de AH en los pacientes con hepatitis C crónica fueron significativamente más altas en comparación con el grupo control (Figura 9), lo cual comprueba que la medición del AH es un indicador no invasivo del daño hepático. Las pruebas ELISAs indican que los reactivos utilizados para el acoplamiento funcionan adecuadamente.

De acuerdo a los datos obtenidos en la validación del acoplamiento, la unión de las moléculas de agregano a las esferas magnéticas fue exitosa (Figura 12), observándose una tendencia lineal para las dos cantidades de agregano utilizadas. Como se puede observar, el uso de concentraciones de 2 y 10 μ g de agregano no existe diferencia significativa, por lo que se puede suponer que con el empleo de 2 μ g de agregano utilizado se llegó al nivel de saturación o incluso a cantidades menores a los 2 μ g, podrían causar este efecto.

Como se puede ver en la Figura 14, las curvas estándar de AH obtenidas del arreglo en suspensión no muestran una relación lineal entre la cantidad de AH utilizada y la intensidad de fluorescencia obtenida y las pruebas de validación con las curvas estándar de AH indican que la interacción de las cadenas de AH a las moléculas de agregano presentes en las esferas es muy baja o nula, lo cual puede ocurrir por alguna de las siguientes causas:

a. Impedimento estérico provocado por el reactivo de captura y el analito

Las esferas magnéticas carboxiladas se utilizan para acoplar moléculas que presenten un grupo amino primario disponible como proteínas, ácidos nucleicos y, en nuestro caso, proteoglicanos. Hasta donde sabemos somos los primeros en acoplar una molécula de este tipo. Entre las condiciones óptimas requeridas para realizar tal acoplamiento se encuentra el peso de la molécula a acoplar, el cual debe de estar en un rango de 6 a 150 kDa [46].

En el caso del agrecano, éste tiene un grupo amino disponible pero no se encuentra dentro del peso ideal para un óptimo acoplamiento, ya que su peso es mayor a los 2,500 kDa, sin embargo, los aspectos técnicos no consideran una restricción del tamaño del agrecano. Nuestros resultados muestran que esta condición podría ser de suma importancia para acoplar un gran número de moléculas y obtener así una mayor probabilidad de interacción y de esta forma aumentar la capacidad de detectar un rango amplio de concentraciones de nuestro analito (AH), condición que no se ve favorecida al utilizar moléculas de gran peso. Esta capacidad se ve además limitada por el tamaño de la esfera, el cual es de 6.5 μ m.

Comparando el peso de la molécula de agrecano con el peso de un anticuerpo que cumple con los requerimientos óptimos para el acoplamiento (como el caso de la IgG que tiene un peso de 150 kDa y cuenta con un tamaño aproximado de 28 nm) la molécula de agrecano supera el peso del anticuerpo 20 veces, y en el tamaño 10 veces, lo cual limita la unión de varias moléculas a la esfera por el tamaño de ésta. Esta condición disminuye el número de moléculas de agrecano que se pueden unir a las esferas y por lo tanto también disminuye la cantidad de analito que puede cuantificarse (Figura 15).

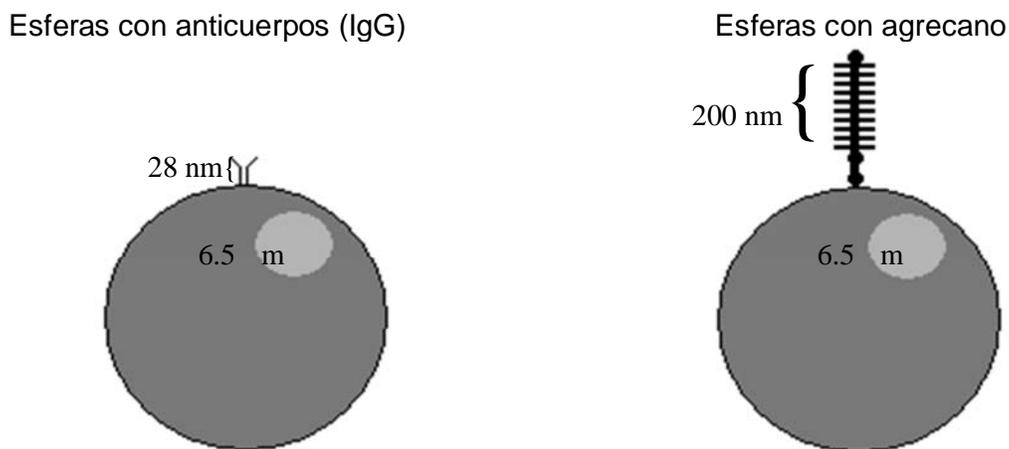


Figura 15. Comparación entre una esfera magnética acoplada a un anticuerpo y una acoplada a agrecano. Se observa que la cantidad de moléculas que se pueden unir a las esferas son menores al utilizar una molécula de gran tamaño como el agrecano en comparación al utilizar un anticuerpo.

Además de la poca capacidad para la cuantificación del AH por la poca cantidad de moléculas de agrecano unidas a las esferas, esta cuantificación también se ve delimitada por el tamaño del analito (AH). El AH es un glucosaminoglicano que puede llegar a pesar hasta 10^8 kDa, al cual se le pueden unir de 100 a 300 moléculas de agrecano dependiendo del tamaño de la cadena de AH. De esta forma, debido al tamaño de la esfera, la unión de una sola molécula de AH a agrecano impide que otras moléculas de AH se puedan unir a la superficie. En comparación con las esferas, en el ELISA que se utiliza para cuantificar el AH la superficie para la unión al agrecano es de un radio de 0.5 cm, por lo cual el impedimento estérico es menor en comparación con las esferas magnéticas (Figura 16).

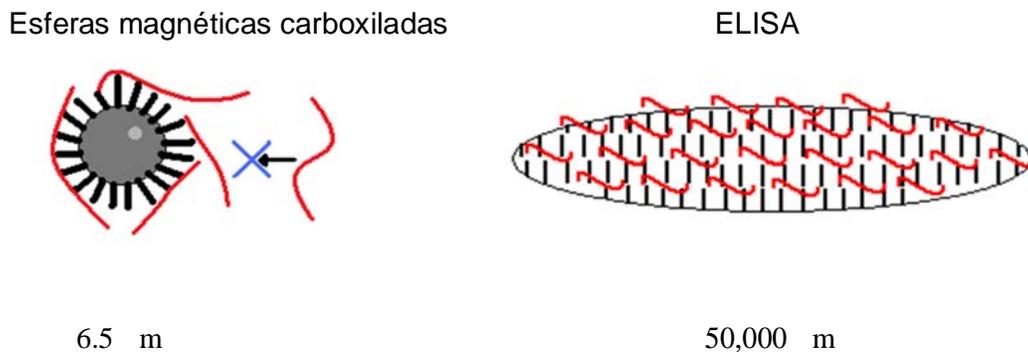


Figura 16. Comparación entre una esfera magnética acoplada a un anticuerpo y una acoplada a agrecano. Se observa que, debido al radio de la esfera magnética, la superficie de contacto para la unión del AH es menor que en la prueba ELISA, debido a que la unión de pocas moléculas de AH provocan un impedimento estérico responsable de los datos obtenidos en la validación con el estándar de AH.

b. Probables interacciones agrecano-ácido hialurónico

El impedimento estérico no sólo se ve delimitado por el reactivo de captura (agrecano) y el tamaño del analito (AH), también está dado por el sitio de unión del AH al agrecano. La unión que ocurre entre el agrecano y las esferas magnéticas está dada por los grupos funcionales carboxilo que se exponen en la superficie de la esfera y el grupo amino terminal primario del agrecano. Para

que el acoplamiento ocurra se necesitan dos reacciones carboimidadas, la primera se lleva a cabo para activar y formar un intermediario estable que pueda ser capaz de unirse a nuestra molécula de interés, el EDAC reacciona con los grupos carboxilos en la superficie de las esferas formando un intermediario inestable O-acilisourea, cuya estabilidad se ve aumentada agregando S-NHS (N-hidroxisulfosucanamiida). Este intermediario reacciona con el grupo amino terminal primario de las moléculas de agrecano (Figura 7).

El agrecano tiene 3 dominios globulares (G1, G2 y G3) y tres dominios interglobulares (KS, CS, e IGD), el amino terminal primario está comprendido dentro del dominio globular G1 y es el único responsable de la unión al AH y una proteína de unión que estabiliza tal interacción. Como se explicó anteriormente, el agrecano se une a las esferas en su grupo amino, por lo que existe impedimento de la unión del HA al dominio G1 por las demás moléculas de agrecano vecinas (Figura 5).

Sin embargo, los resultados de la validación del acoplamiento nos permite suponer que se da la unión del anticuerpo anti-agrecano a los dominios G1-IGD-G2, cuyo dominio G1 es compartido con el AH. Esto tal vez se deba al tamaño de los anticuerpos, ya que como se había mencionado anteriormente, son más pequeños que la molécula de AH, por lo que puede que no exista el impedimento visto en el AH por las moléculas de agrecano vecinas y por lo tanto puedan obtenerse datos de intensidad de fluorescencia. La validación del acoplamiento resultante también nos supone que las moléculas de agrecano unidas a la superficie de la esfera son muy escasas para permitir que exista un espacio entre ellas por el cual puedan pasar los anticuerpos anti-agrecano (Figura 16). La cantidad de moléculas de agrecano unidas se puede suponer que es pequeña comparando los resultados obtenidos para 2 g y 10 g, ya que para ambas concentraciones de reactivo de captura se obtuvieron intensidades de fluorescencia similares para las mismas concentraciones de anticuerpo, lo que indica que la cantidad de las moléculas presentes en los 2 g es suficiente para llegar al nivel de saturación en la superficie de la esfera.

Unión con el ácido hialurónico
antiagrecano

Validación con anticuerpos



Figura 17. Impedimento de unión de la molécula de AH al dominio G1 del agrecano. Se observa que el AH tiene impedimento para la unión al dominio G1 del agrecano debido a el tamaño de su cadena, sin embargo los anticuerpos pueden llegar a unirse a tal dominio por su tamaño.

Como se observa en la figura 17, es poco probable que se unan moléculas de AH a la esfera, y en caso de ser posible, existiría impedimento para la unión del reactivo de detección (agrecano biotinilado).

c. Reacciones carboiimidias secundarias

A pesar del impedimento estérico por las moléculas de agrecano, se esperaría que la lectura del blanco fuera muy pequeña y similar a la obtenida en la validación, sin embargo, la lectura es muy alta. Una de las posibilidades que pueden explicar tal comportamiento y que tal vez puede dar otra respuesta al porqué no puede unirse el AH es por las reacciones de acoplamiento carboiimidias. Como se mencionó anteriormente, las reacciones de las carboiimidias que se necesitan para el acoplamiento se dan entre el carboxilo de una molécula (en este caso los grupos presentes en la superficie de la esfera) y el amino terminal de otra (en este caso el agrecano), sin embargo, en la molécula de agrecano están presentes los dos grupos, por lo que al unirse la primera molécula de agrecano a la esfera, se libera el S-NHS, el cual queda disponible para reaccionar con el carboxilo de otra molécula de agrecano

generando de esta forma un dímero o polímero de agrecano limitado por la cantidad de moléculas presentes, lo cual facilita la unión del anticuerpo a agrecano, ya que el espacio disponible sería mayor (Figura 18).

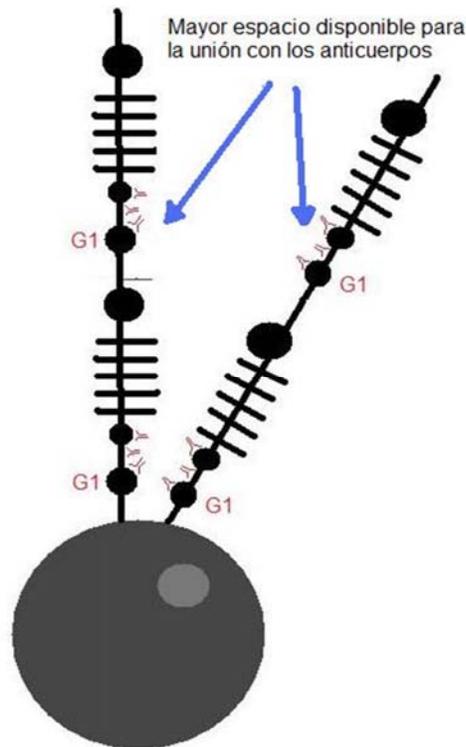


Figura 18. Reacciones carboimidadas secundarias. Se observa que pueden existir reacciones con las mismas moléculas de agrecano y lo cual puede aumentar la posibilidad del contacto del anticuerpo antiagrecano al dominio G1, IGD ó G2.

Una posible solución para eliminar el impedimento estérico provocado por el agrecano unido a la esfera, sería realizar acoplamientos con cantidades menores a 2 g de agrecano (0.1, 0.25, 0.5 y 1 g) para permitir una mejor interacción con el AH, ya que la cantidad de agrecano unida a cada esfera sería menor. Sin embargo, esto representaría una limitación técnica en la cuantificación, debido a que se requiere una cantidad de 2,500 esferas por pozo. Al disminuir la cantidad de agrecano acoplado a las esferas se requeriría mayor número de éstas para realizar el ensayo y medir cantidades altas de AH, lo cual no sería compatible para la cuantificación debido a que el equipo utilizado está calibrado para cuantificar 2,500 esferas.

RESUMEN DE RESULTADOS

- El ácido hialurónico es un buen marcador del daño hepático, ya que su concentración se ve aumentada en esta condición.
- El acoplamiento de las esferas carboxiladas fue exitoso, incluso para moléculas de gran tamaño como el agregano.
- La cuantificación de moléculas de gran tamaño mediante el arreglo en suspensión puede no ser efectiva, entre otras causas, por el impedimento estérico.
- La disminución en la cantidad de agregano acoplado a las esferas para eliminar el impedimento alostérico no sería una solución para cuantificar el ácido hialurónico debido a que se necesitaría mayor número de esferas para medir concentraciones altas de ácido hialurónico, lo cual está delimitado por la calibración del equipo utilizado.

CONCLUSIÓN

- El ácido hialurónico no puede cuantificarse mediante el arreglo en suspensión con el uso de agregano como reactivo de captura.

REFERENCIAS

1. Si-Tayeb, K., F.P. Lemaigre, and S.A. Duncan, *Organogenesis and development of the liver*. Dev Cell, 2010. **18**(2): p. 175-89.
2. C.Guyton., A. and J.E. Hall., *Tratado de Fisiología médica*. Decimoprimera ed 2006, Madrid, España: ELSEVIER.
3. Friedman, S.L., *Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004. **1**(2): p. 98-105.
4. Benyon, R.C. and J.P. Iredale, *Is liver fibrosis reversible?* Gut, 2000. **46**(4): p. 443-46.
5. Mendez-Sanchez, N., et al., *Etiology of liver cirrhosis in Mexico*. Ann Hepatol, 2004. **3**(1): p. 30-3.
6. Guyot, C., et al., *Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(2): p. 135-151.
7. Friedman, S.L., *Liver fibrosis -- from bench to bedside*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S38-53.
8. Marra, F., *Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation*. J Hepatol, 1999. **31**(6): p. 1120-30.
9. Atzori, L., G. Poli, and A. Perra, *Hepatic stellate cell: a star cell in the liver*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(8-9): p. 1639-42.
10. Ueno, T., et al., *Hepatic stellate cells and intralobular innervation in human liver cirrhosis*. Hum Pathol, 1997. **28**(8): p. 953-9.
11. Vorotnikova, E., et al., *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo*. Matrix Biol, 2010. **29**(8): p. 690-700.
12. Bowers, S.L., I. Banerjee, and T.A. Baudino, *The extracellular matrix: at the center of it all*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 474-82.
13. Kleinman, H.K., D. Philp, and M.P. Hoffman, *Role of the extracellular matrix in morphogenesis*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(5): p. 526-32.
14. Gandhi, N.S. and R.L. Mancera, *The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins*. Chem Biol Drug Des, 2008. **72**(6): p. 455-82.
15. Kogan, G., et al., *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. Biotechnol Lett, 2007. **29**(1): p. 17-25.
16. Schante, C.E., et al., *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*. Carbohydrate Polymers, 2011. **85**(3): p. 469-89.
17. Chichibu, K., et al., *Assay of serum hyaluronic acid in clinical application*. Clin Chim Acta, 1989. **181**(3): p. 317-23.
18. Toole, B.P., *Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins*. Cnt Opin in Cell Biol, 1990. **2**(5): p. 839-44.
19. Bost, F., M. Diarra-Mehrpour, and J.P. Martin, *Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family--a group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix*. Eur J Biochem, 1998. **252**(3): p. 339-46.
20. Stern, R., *Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?* Glycobiology, 2003. **13**(12): p. 105r-15r.

21. Yung, S. and T.M. Chan, *Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 180594.
22. Asari, A., et al., *Localization of hyaluronic acid in human articular cartilage*. J Histochem Cytochem, 1994. **42**(4): p. 513-22.
23. Day, A.J. and C.A. de la Motte, *Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation?* Trends Immunol, 2005. **26**(12): p. 637-43.
24. Stern, R., et al., *The many ways to cleave hyaluronan*. Biotechnol Adv, 2007. **25**(6): p. 537-57.
25. Hascall, V.C., et al., *Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation?* Biochim Biophys Acta, 2004. **1673**(1-2): p. 3-12.
26. Lee, J.Y. and A.P. Spicer, *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 581-6.
27. Price, R.D., M.G. Berry, and H.A. Navsaria, *Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence*. J Plast Reconstr AES, 2007. **60**(10): p. 1110-119.
28. Price, R.D., M.G. Berry, and H.A. Navsaria, *Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007. **60**(10): p. 1110-9.
29. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
30. Spicer, A.P., et al., *Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes*. Genomics, 1997. **41**(3): p. 493-7.
31. Adamia, S., C.A. Maxwell, and L.M. Pilarski, *Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer*. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2005. **5**(1): p. 3-14.
32. Heldermon, C., P.L. DeAngelis, and P.H. Weigel, *Topological organization of the hyaluronan synthase from Streptococcus pyogenes*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2037-46.
33. Karvinen, S., et al., *Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 49495-504.
34. Pasonen-Seppanen, S., et al., *EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(6): p. 1038-44.
35. Kultti, A., et al., *4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1914-23.
36. Kakehi, K., M. Kinoshita, and S. Yasueda, *Hyaluronic acid: separation and biological implications*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **797**(1-2): p. 347-55.
37. Stern, R., *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(7): p. 317-25.
38. Roughley, P.J., *The structure and function of cartilage proteoglycans*. Eur Cells Mater, 2006. **12**: p. 92-101.
39. Grigoreas, G.H., S.T. Anagnostides, and D.H. Vynios, *A solid-phase assay for the quantitative analysis of hyaluronic acid at the nanogram level*. Anal Biochem, 2003. **320**(2): p. 179-84.
40. Trivedi, P., P. Cheeseman, and A.P. Mowat, *Serum hyaluronic acid in healthy infants and children and its value as a marker of progressive hepatobiliary disease starting in infancy*. Clin Chim Acta, 1993. **215**(1): p. 29-39.

41. Lee, H.H., et al., *Usefulness of non-invasive markers for predicting significant fibrosis in patients with chronic liver disease*. J Korean Med Sci, 2010. **25**(1): p. 67-74.
42. Avila, R.E., et al., *Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis in patients with hepatitis C on haemodialysis*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(4): p. 335-41.
43. Kopke-Aguiar, L.A., et al., *Serum hyaluronic acid as a comprehensive marker to assess severity of liver disease in schistosomiasis*. Acta Trop, 2002. **84**(2): p. 117-26.
44. Afdhal, N.H., *Biopsy or biomarkers: is there a gold standard for diagnosis of liver fibrosis?* Clin Chem, 2004. **50**(8): p. 1299-300.
45. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2904.pdf
46. *Bio-Plex Pro™ Magnetic COOH Beads Bio-Plex® COOH Beads Amine Coupling Kit. Instruction Manual*. BIO-RAD Laboratories.