

Apolipoproteína A-I determinada por inmunoturbidimetría e inmunodifusión radial, en sueros y en sobrenadantes tras precipitación con fosfotungstato y cloruro de magnesio(II)

J.C. Vella Ramírez^a

Resumen

Comparamos los resultados de analizar las concentraciones de apolipoproteína A-I en sueros y en sobrenadantes obtenidos tras precipitación con fosfotungstato y cloruro de magnesio(II), utilizando inmunoturbidimetría e inmunodifusión radial, respectivamente. La concentración de apolipoproteína A-I sérica se determinó también por inmunodifusión radial, comparándose los resultados con los obtenidos por inmunoturbidimetría. Los resultados sugieren una mayor estabilidad de la apolipoproteína A-I en el suero que en los sobrenadantes; los dos métodos son utilizables. Se discute brevemente la practicabilidad de los dos métodos.

Introducción

La apolipoproteína A-I es el principal componente proteico de las lipoproteínas de elevada densidad (HDL) y su determinación está siendo objeto de un interés creciente, especialmente a partir de diversos trabajos que han puesto de manifiesto la relación inversa existente entre la concentración sérica de apolipoproteína A-I y la cardiopatía coronaria^{1,2}. La intención del presente trabajo ha sido doble: por un lado comparar los métodos de inmunodifusión radial e inmunoturbidimetría aplicados a la determinación de apolipoproteínas A-I en muestras séricas; y por otro lado, comprobar las diferencias que se observan entre la apolipoproteína determinada en un suero fresco y la obtenida al valorar el sobrenadante del mismo suero tras precipitación con fosfotungstato y cloruro de magnesio(II), comparando los resultados con los obtenidos en una investigación previa³.

Summary

We compared measurements of apolipoprotein A-I concentration in serum and in phosphotungstate-magnesium (II) chloride supernates, analyzed by immunoturbidimetric assay and radial immunodiffusion. Furthermore, the concentration of apolipoprotein A-I in serum was determined by radial immunodiffusion, and the results has been compared with the results obtained by immunoturbidimetric assay. The results indicated that apolipoprotein A-I was more stable in serum than in phosphotungstate-magnesium(II) chloride supernates, and that the two different methods used to assay apolipoprotein A-I, were useful. The practicability of the two methods is discussed.

Material y métodos

Las muestras utilizadas fueron sueros de pacientes que acudieron a nuestro servicio para que se les efectuara una exploración analítica rutinaria y no establecimos ningún criterio previo de selección. Las muestras fueron centrifugadas lo antes posible desde su obtención, procediéndose a realizar inmediatamente algunas de las determinaciones y conservando a -20°C alícuotas de cada uno de los sueros para la realización de otras determinaciones. Las determinaciones de apolipoproteína A-I se llevaron a cabo por inmunodifusión radial⁴ y por inmunoturbidimetría⁵. Las medidas sobre suero se realizaron por las dos técnicas mencionadas para cada una de las muestras, siendo sin congelación previa y al poco de haber sido obtenidas en el caso de la inmunodifusión radial, y a partir de alícuotas conservadas a -20°C en el de la inmunoturbidimetría. La medida de apolipoproteína A-I en el sobrenadante resultante de precipitar con fosfotungstato y cloruro de magnesio(II), se realizó partiendo de alícuotas congeladas y su determinación se efectuó por inmunodifusión radial únicamente.

^a Servicio de Análisis Clínicos
Hospital «Fuente Bermeja». C/ Francisco Salinas, s/n
09003-Burgos

Además de apolipoproteína A-I, todas las muestras fueron analizadas para determinar su concentración en colesterol y triglicérido, utilizando para ello en ambos casos técnicas enzimático-colorimétricas que se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Monotest High Performance y Test-Combination, respectivamente); la concentración del colesterol de las HDL se determinó midiendo la concentración de colesterol en el sobrenadante resultante de precipitar con fosfotungstato y cloruro de magnesio(II) y centrifugar; finalmente, se dedujo la concentración del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (colesterol de LDL) aplicando la fórmula de Friedewald⁶.

Los resultados obtenidos se sometieron a diversas comparaciones entre ellos, recurriendo, siempre que fue necesario, a procedimientos estadísticos^{7,8}.

Resultados

En las tablas I y II se exponen los resultados obtenidos con las 32 muestras estudiadas, expresándolos como media y desviación estándar ($\bar{x} \pm s$). Por otra parte, la prueba de Kolmogorov-Smirnov demostró que los valores de las distintas magnitudes se distribuían siguiendo la ley de Gauss. Al comparar las medias de la concentración de apolipoproteína A-I obtenidos por los distintos procedimientos, se encontró que: a) las correspondientes a las determinaciones sobre suero por inmunodifusión radial y por inmunoturbidimetría no son significativamente diferentes entre sí; b) las obtenidas a partir de realizar inmunodifusión radial en el resultante de precipitar y de efectuar una inmunoturbidimetría en suero, no son, tampoco, significativamente diferentes entre sí; c) finalmente, la media obtenida por inmunodifusión radial a partir del sobrenadante, resulta significativamente inferior a la hallada por inmunodifusión radial a partir de suero.

En cuanto a nuestros resultados de concentración de apolipoproteína A-I en suero, en relación a la presencia o ausencia de dislipemia, fueron concordantes con otros publicados previamente⁹.

Discusión

El hecho de encontrar concentraciones inferiores de apolipoproteína A-I en los sobrenadantes que en los sueros correspondientes, es algo no esperado en principio, ya que son las HDL las lipoproteínas que contienen apolipoproteína A-I; sin embargo, en este aspecto nuestros resultados coincidieron con los de un estudio previo³. Aunque se ha encontrado también apolipoproteína A-I en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)¹⁰, su concentración en ellas alcanza como máximo un valor de 0,05 g/L, lo que no explica las diferencias totales y entre cada caso.

Otro aspecto subrayable es que las diferencias obtenidas por los tres procedimientos utilizados no son excesivas si se comparan con los resultados de analizar una misma muestra por distintas técnicas y laboratorios¹¹.

Aunque nosotros no realizamos tratamientos previos de las muestras con urea ni con detergentes, tanto en la inmunoturbidimetría como en la inmunodifusión radial, efectuamos diluciones de las muestras antes de las determinaciones, lo cual hace más accesibles a los anti-

Tabla I
Concentración de los componentes lipídicos determinados en el conjunto considerado

Componente	$\bar{x} \pm s$ (en mmol/L)
• Colesterol	5,75 \pm 1,48
• Triglicéridos	1,21 \pm 0,77
• Colesterol de HDL	1,37 \pm 0,41
• Colesterol de LDL	3,83 \pm 1,09

Tabla II
Concentraciones de apolipoproteína A-I encontradas en los individuos del conjunto considerado

Procedimiento	$\bar{x} \pm s$ (en g/L)
• Inmunodifusión radial en suero	1,45 \pm 0,18
• Inmunoturbidimetría en suero	1,43 \pm 0,17
• Inmunodifusión radial en sobrenadantes	1,37 \pm 0,18

cuerpos los determinantes antigénicos de la apolipoproteína¹². Además, se ha comunicado una variación inferior al 1 % entre la determinación de la apolipoproteína A-I sobre HDL intactas y HDL deslipidizadas¹³.

Un estudio previo⁵, demostró que las concentraciones de apolipoproteína A-I en muestras de plasma conservadas a -20° C, permanecían estables durante 4 semanas como mínimo, razón por la que no añadimos ninguna sustancia conservante a nuestras muestras. Así, la disminución de la concentración de apolipoproteína A-I en los sobrenadantes, no es atribuible a pérdidas o alteración durante el almacenamiento; además, resultados similares fueron obtenidos en un estudio previo en el que el precipitante utilizado fue heparina y cloruro de manganeso(II)³, el cual, sugerían los autores que podría enmascarar los determinantes antigénicos de la apolipoproteína o catalizar una degradación parcial de la misma; en tal caso, podrían ser atribuidas las diferencias de nuestro estudio a los iones magnesio(II) de nuestro precipitante. La tendencia de la apolipoproteína A-I a autoasociarse en medio acuoso¹⁴, podría verse incrementada por la presencia de los elementos constituyentes del precipitante y los cambios de tipo físico-químico que los mismos podrían originar en el sistema. El tratamiento con tetrametil-urea y urea no impide que las concentraciones obtenidas de apolipoproteína A-I en los sobrenadantes sean inferiores³.

La comparación entre las técnicas de inmunodifusión radial e inmunoturbidimetría en nuestro estudio puso de manifiesto que los resultados obtenidos por ambos métodos fue similar a otra descrita con anterioridad¹⁵.

En lo que a muestras hiperlipémicas se refiere, nuestro subgrupo que incluía muestras con una concentración de triglicérido superiores a 2 mmol/L o con una con-

Tabla III
Valores en el subgrupo de muestras hiperlipémicas

Componente	$\bar{x} \pm s$ (mmol/L)
• Colesterol	7,72 ± 1,21
• Triglicérido	2,10 ± 1,18
	$\bar{x} \pm s$ (g/L)
• Apolipoproteína A-I por inmunodifusión radial	1,47 ± 0,19
• Apolipoproteína A-I por inmunturbidimetría	1,48 ± 0,16

centración de colesterol igual o mayor de 7 mmol/L, no estableció diferencias significativas entre la determinación de apolipoproteína A-I por inmunodifusión radial y por inmunturbidimetría, como puede observarse en la tabla III.

Con respecto a la practicabilidad de la inmunodifusión radial y de la inmunturbidimetría aplicados a la determinación de apolipoproteína A-I, ambas técnicas están al alcance de cualquier laboratorio de bioquímica, correspondiendo a la inmunodifusión radial la mayor sencillez de ejecución y el más bajo coste por determinación; la inmunturbidimetría presenta sobre la inmunodifusión radial la ventaja de que requiere mucho menos tiempo antes de conocer los resultados (4 horas frente a las 72 horas necesarias para la inmunodifusión radial), y la desventaja de que requiere efectuar más diluciones y preparar tampones, si bien es posible automatizar las lecturas espectrofotométricas.

Bibliografía

1. Maciejko J, Holmes D, Kottke B, Zinsmeister A, Dinh D, Mao S. Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. *N Engl J Med* 1983; 309: 385-9.
2. Brunzell J, Snidermann A, Albers J, Kwiterowitch P. Apoproteins B and A-I and Coronary Artery Disease in Human. *Arteriosclerosis* 1985; 4: 79-83.
3. Jiang X, Bachorik P. Apoprotein A-I Measured by Radial Immunodiffusion in Heparin-MnCl₂ Supernates. *Clin Chem* 1986; 32: 930-3.
4. Mancini G, Carbonara A, Heremans J. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion in Heparin-MnCl₂ supernates. *Clin Chem* 1965; 2: 235-54.
5. Albers J, Wahl P, Cabana V, et al. Quantitation of apolipoprotein A-I of human plasma high density lipoprotein. *Metabolism* 1976; 25: 633-44.
6. Friedewald W, Levy R, Fredrikson D. Estimation of the concentration of LDL-cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
7. Reed A, Henry R. Exactitud, Precisión, Control de Calidad y Estadísticas diversas. En: Herny R, Cannon D, Winkelman J. *Química Clínica. Bases y Técnicas*. Barcelona: Jims, 1980: 285-338.
8. Ordóñez J, Queraltó J. *Técnicas estadísticas en la comparación de métodos*. Barcelona: Comisión de Educación de la Sociedad Española de Química Clínica, 1979.
9. Alaupovic P. Structure and function of plasma lipoproteins with particular regard to hyperlipoproteinemias and atherosclerosis. *Ann Biol Clin* 1980; 38: 83-93.
10. Menzel H, Kladetzky R, Assmann G. Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1983; 3: 310-5.
11. Cooper G, Smith S, Wiebe D, Kuchmak M, Hannón W. International Survey of Apolipoproteins A₁ and B Measurements (1983-1984). *Clin Chem* 1985; 30: 223-8.
12. Bradley W, Karlin J, Prasad S, Gotto A, Gianturco S. Immunological and biological recognition of apolipoprotein E in Very Low Density Lipoproteins. In: Lippel K. *Proceedings of the Workshop on apolipoprotein quantification*. New York: National Institute of Health, 1983; 200-10.
13. Curry M, Alaupovic P, Suenram C. Determination of Apolipoprotein A and its Constitutive A-I and A-II Polipeptides by Separate Electroimmunoassays. *Clin Chem* 1976; 22: 315-22.
14. Vitello L, Scanu A. Studies on human serum HDL, self-association of apo A-I in aqueous solution. *J Biol Chem* 1976; 251: 1131-6.
15. Rifai N, King M. Inmunturbidimetric Assays of Apolipoproteins A, A-I, A-II and B in Serum. *Clin Chem* 1986; 32: 957-61.