



**Facultad de Biología de la Universidad de La Habana  
Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay"**

**Relaciones antigénicas de las mioglobinas.  
Su utilidad en el desarrollo de un inmunoensayo de látex-aglutinación  
para el diagnóstico del infarto agudo del miocardio**

**Defensa de tesis en opción al grado científico Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autora: María Cristina Pico Beltrán  
Licenciada en Bioquímica, UH, 1972  
Profesora Auxiliar, UH, 1985  
Máster en Bioquímica de las Proteínas, UH, 1994**

**Tutor: DrC. Mario Álvarez Marcer**

**Asesora: MSc. Isabel Gertrudis Giralдино Falero**



**Ciudad de La Habana  
Febrero 2009**

A mis hijos:  
Yamilé, Natacha y Pedro Pablo,  
Julio César, Déborah y Ariel

A Julio

A la memoria de Gertrudis, Loloíta y Gladys

## SÍNTESIS

El diagnóstico precoz del infarto agudo del miocardio (IAM), patología que constituye una de las causas principales de muerte a nivel mundial, es fundamental para la aplicación temprana de una terapia que puede salvar la vida del paciente. En las primeras 0.5-2 horas de aparición de los síntomas clínicos, y antes de que sean detectables otros indicadores séricos, los niveles de mioglobina (Mb) se elevan, constituyendo uno de los indicadores más precoces de la necrosis miocárdica. Dada la carencia en Cuba de un diagnosticador de este tipo, los Laboratorios de Investigación de la EPB "Carlos J. Finlay" y de Inmunología de la Facultad de Biología se dieron a la tarea de desarrollar un reactivo de látex-aglutinación en lámina para mioglobina, que brindara una respuesta rápida (2-3 minutos) y de fácil ejecución, para ser aplicado en el nivel primario de salud. Los problemas principales a enfrentar fueron: el trabajo con el músculo humano, la baja inmunogenicidad de la mioglobina y sus posibles relaciones o asociaciones con la hemoglobina (Hb). Estos inconvenientes fueron resueltos en buena medida con el empleo de la Mb equina, en base a sus similitudes antigénicas con la Mb humana. El trabajo se desarrolló en dos etapas. La primera, de investigación básica, incluyó la purificación y caracterización de la Mb humana y sus anticuerpos específicos, y la segunda etapa, la adecuación a la práctica productiva de los resultados obtenidos a escala de laboratorio, así como la evaluación de la efectividad del reactivo en el terreno. Los resultados más importantes de la primera etapa fueron: (1) El desarrollo de un método de purificación de Mb humana consistente en cromatografía de exclusión molecular en Superose 12 e intercambio aniónico en Mono Q con empleo del sistema FPLC, el cual rindió Mb de pureza elevada. (2) Un método para la obtención de anticuerpos policlonales anti-Mb humana en carnero con empleo de un conjugado Mb humana-hemocianina que alcanzó títulos 1/6,400 por ELISA. (3) Un método de inmuoabsorción simple para la purificación de los anticuerpos, con Mb equina polimerizada con glutaraldehído, que permitió la recuperación de unos 300 µg de anticuerpos por mL de antisuero y eliminó su reactividad frente a la hemoglobina (Hb) humana, además de facilitar la reacción de aglutinación. Los resultados más sobresalientes de la segunda etapa fueron: (1) La propuesta de un flujo tecnológico, a partir del ajuste de los resultados obtenidos en la primera etapa, que rinde por mL de antisuero hasta 500 µg de anticuerpos purificados para el recubrimiento de las partículas, y la preparación del juego de reactivos de látex-aglutinación, nombrado MIOLÁTEX. (2) La evaluación del reactivo en el terreno con muestras de suero de 85 pacientes que acudieron al centro hospitalario con síntomas de IAM, la cual evidenció buena correspondencia entre los resultados del MIOLÁTEX y el diagnóstico final. El reactivo demostró contar con la sensibilidad, especificidad y valores predictivos requeridos para este tipo de diagnosticador y resultó útil para descartar el infarto de miocardio a las 6 horas de la admisión, además de contribuir a su diagnóstico, al monitoreo de la reperfusión y a la detección de reinfarto.

# ÍNDICE

INTRODUCCION .....	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1 Mioglobina. Generalidades .....	6
1.2 Organización estructural y genómica de la mioglobina .....	6
1.3 Mioglobina y hemoglobina.....	8
1.4 Funciones de la mioglobina.....	9
1.5 Aislamiento y purificación de la mioglobina .....	12
1.6 Antigenicidad e inmunogenicidad de la Mb.....	13
Técnicas bioinformáticas para estudios de antigenicidad .....	18
1.7 La mioglobina como marcador clínico.....	22
1.8 Detección y cuantificación de mioglobina.....	25
1.9 Inmunoensayo de látex-aglutinación .....	27
Adsorción física .....	28
Adsorción de inmunoglobulinas.....	29
Detección de la inmunoaglutinación. Observación visual.....	30
El problema de la estabilidad coloidal.....	30
Validación .....	31
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 Corazones y sueros de pacientes .....	34
2.2 Animales para las inmunizaciones.....	34
2.3 Columnas, equipos y reactivos .....	35
2.4 Métodos .....	35
2.4.1 Estudios bioinformáticos.....	35
2.4.2 Purificación de Mb humana .....	36
2.4.3 Caracterización de la fracción obtenida en la recromatografía en Superose .....	38
2.4.4 Preparación de anticuerpos anti-mioglobina humana.....	39
2.4.5 Purificación de los anticuerpos .....	43

2.4.6 Preparación del reactivo de látex-aglutinación en lámina para mioglobina.....	45
2.4.7 Evaluación del desempeño del reactivo MIOLÁTEX en el diagnóstico de IAM .....	47
2.4.8 Tratamiento trombolítico.....	48
2.4.9 Determinación de TGO.....	48
2.4.10 Procesamiento de los datos .....	49
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
Primera parte. ....	51
3.1 El estudio de las similitudes estructurales entre las mioglobinas sugirió que el carnero podía ser mejor respondedor a la Mb humana y que la Mb equina podía utilizarse en la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana.....	51
3.1.2 La combinación de las cromatografías de exclusión molecular en Superose 12 e intercambio aniónico en Mono Q rindió una Mb humana de pureza elevada (RZ = 3.6) .....	56
3.1.3 El método de purificación rindió la forma oxi de la mioglobina humana y la focalización isoelectrica sugiere la presencia de dos variantes isoelectricas de esta proteína.....	60
3.1.4 Se obtuvieron títulos aceptables de anticuerpos anti-Mb humana en carnero con el conjugado Mb humana-hemocianina. Estos anticuerpos tuvieron una reactividad cruzada elevada con la Mb equina.....	62
3.1.5 Los antisueros anti-Mb humana fueron reactivos con la hemoglobina humana. Esta reactividad fue eliminada cuando los anticuerpos se purificaron con Mb equina .....	65
3.1.6 Los anticuerpos anti-Mb humana purificados frente a la mioglobina equina funcionaron satisfactoriamente en el ensayo de látex aglutinación.....	68
3.2 Segunda parte. ....	70
3.2.1 La cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow permitió obtener, en una sola etapa, una Mb humana de pureza aceptable (RZ = 3.2) para la inmunización de los animales .....	70
3.2.2 Resultaron factibles el escalado del programa de inmunización en carneros con empleo del conjugado Mb-KLH y la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana con el inmunoabsorbente de Mb equina .....	72
3.2.3 Se desarrolló un método que permite evaluar el grado de sensibilización óptimo de las partículas de látex .....	74
3.2.4 Se diseñó un flujo tecnológico para la elaboración del reactivo MIOLÁTEX factible para la industria.....	79
3.2.5 El reactivo MIOLÁTEX tuvo un desempeño satisfactorio, que lo hace útil para diagnosticar y, en particular, descartar el IAM a las seis horas de la admisión del paciente .....	81
3.2.6 El reactivo MIOLÁTEX permitió monitorear el tratamiento trombolítico y detectar reinfarto .	89
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL.....	90

4.1 Sobre la utilidad del conocimiento de las similitudes antigénicas entre las mioglobinas .....	90
4.2 Sobre la utilidad de la mioglobina en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio.....	93
CONCLUSIONES .....	99
RECOMENDACIONES .....	100
LISTADO DE REFERENCIAS .....	101
A N E X O S .....	116
ANEXO 1: CUESTIONARIO LLENADO A LOS PACIENTES.....	117
ANEXO 2: CURVA PARA DETERMINAR MASA MOLECULAR .....	118
ANEXO 3: CURVA PARA DETERMINAR MASA MOLECULAR .....	119
ANEXO 4: VALOR DE DISCRIMINACIÓN Y ZONA GRIS .....	120
ANEXO 5: PROSPECTO DEL MIOLÁTEX .....	121
ANEXO 6: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MIOLÁTEX.....	122
ANEXO 7: ESTIMACIÓN ECONÓMICA PRELIMINAR DEL MIOLÁTEX.....	123
ANEXO 8: AUTOBIBLIOGRAFÍA .....	124
ANEXO 9: TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS.....	125

## INTRODUCCION

La mioglobina (Mb) es una proteína hémica de baja masa molecular, que es sintetizada y ejerce sus funciones principalmente en los músculos esquelético y cardíaco (Ordway y Garry 2004). Se encuentra, además, en el suero sanguíneo y la orina a muy bajas concentraciones (Powell y col 1984). Esta globina ha sido durante muchos años un prototipo para el estudio de los conceptos y leyes que gobiernan a las biomoléculas (Frauenfelder y McMahon 2001). Fue la primera proteína a la que se le intentó determinar su estructura antigénica completa (Atassi 1975) y, por integrar una familia de proteínas, la Mb de cachalote se constituyó en modelo para el estudio de la antigenicidad de las Mbs a través de los ensayos de reactividad cruzada, que se convirtieron a su vez en una metodología para el estudio antigénico de proteínas relacionadas (Hurrell y col 1977, White y col 1978). La reactividad cruzada de los antígenos ha sido de utilidad en diversas situaciones y un ejemplo de ello es el diagnóstico de la sífilis que utiliza antígenos de origen bovino por su identidad inmunoquímica con antígenos del *Treponema pallidum* (Larsen y col 1995). También las identidades inmunoquímicas de las proteínas de especies diferentes pueden resultar desventajosas como sucede con la inmunogenicidad, es decir, la capacidad de una entidad molecular de inducir una respuesta inmunitaria efectiva en animales de experimentación. Este es el caso de las mioglobinas que no resultan buenos inmunógenos en la inmunización convencional (Atassi 1975).

La Mb se libera del músculo a la sangre en diversas situaciones, por lo que constituye un marcador bioquímico de diferentes patologías y, en particular, del infarto agudo del miocardio (IAM). La detección de la Mb se realiza por métodos inmunoquímicos (Stone y col 1975, Lestin y col 2002, Le Moigne y col 2002), para lo cual es necesario la obtención de anticuerpos capaces de reconocerla selectivamente. En el suero sanguíneo como objeto diagnóstico una de las interferencias principales es la presencia de hemoglobina (Hb), la cual a su vez es uno de los contaminantes de las preparaciones de mioglobina. Trazas pequeñas de Hb en la Mb utilizada en la inmunización experimental podrían inducir una respuesta de anticuerpos, incluso mayor que la mioglobina (Dresser 1986), dado que la Hb cuadruplica su masa molecular. Estos anticuerpos podrían crear interferencias en las determinaciones inmunoquímicas de Mb en los sueros hemolizados.

Debido a la carencia, en el sistema de salud cubano, de un diagnosticador de respuesta rápida para la detección de isquemia miocárdica, la EPB “Carlos J. Finlay” y la Facultad de Biología se dieron a la tarea de desarrollar un inmunoensayo de látex-aglutinación en lámina para determinar niveles patológicos de Mb sérica. La determinación de los niveles de Mb en el suero sanguíneo resulta un ensayo valioso para descartar o confirmar el IAM, sobre todo, si puede ser ejecutado en breve tiempo (Konings y col 1989) y así lo recomiendan las guías de la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) y la National Academy of Clinical Biochemistry de EUA, en particular, en combinación con otro marcador específico del miocardio (Stork y col 2000, Fesmire y col 2004, Sallach y col 2004).

Se debían enfrentar tres problemas fundamentales al desarrollar el inmunoensayo para Mb sérica: En primer lugar, el trabajo con el músculo humano que presenta inconvenientes de tipo ético y el peligro de transmisión de virus entre otros despropósitos. En segundo lugar, la baja inmunogenicidad de las mioglobinas, que atenta contra la obtención de cantidades aceptables de anticuerpos. Y, en tercer lugar, el requerimiento de alta selectividad de los anticuerpos anti-Mb que no deben reaccionar con la hemoglobina humana. Ante esta realidad, con vistas a disminuir el trabajo con el músculo humano y lograr niveles aceptables de anticuerpos altamente selectivos para la Mb humana, teniendo en cuenta las similitudes antigénicas de las Mbs de mamíferos y la disponibilidad de Mb equina comercial, se planteó esta **hipótesis de trabajo**:

**Las relaciones antigénicas entre las mioglobinas humana y equina permiten la utilización de la mioglobina equina para purificar los anticuerpos policlonales anti-mioglobina humana y eliminar su reactividad con la hemoglobina humana, siendo capaces de funcionar estos anticuerpos en un ensayo de látex-aglutinación con vistas al diagnóstico temprano del infarto agudo del miocardio.**

A partir de esta hipótesis el **objetivo general** del trabajo fue:

**Demostrar la utilidad de las relaciones antigénicas entre las mioglobinas humana y equina en la purificación de anticuerpos policlonales anti-mioglobina humana con mioglobina equina, para la preparación de un reactivo de látex-aglutinación con vistas al diagnóstico temprano del infarto agudo del miocardio.**



Para cumplimentar este objetivo se requirieron dos etapas de trabajo. La **primera etapa**, de investigación básica en el laboratorio de investigación y desarrollo, la cual fue precedida por un estudio sobre las similitudes estructurales entre las mioglobinas humana, equina, de carnero y conejo, y que incluyó la obtención y caracterización de la mioglobina humana y sus anticuerpos específicos. La **segunda etapa**, de adecuación de los resultados obtenidos en la primera etapa a nivel de planta piloto para la producción del reactivo de látex-aglutinación, y la evaluación del reactivo en el diagnóstico temprano del infarto agudo del miocardio.

## **PRIMERA ETAPA**

**Objetivo parcial 1:** Estudiar las similitudes estructurales entre las mioglobinas humana, equina, de carnero y conejo.

### **Tareas para dar cumplimiento a este objetivo parcial 1:**

- Estudios informáticos de alineamiento, anfipaticidad, protuberancia y superposición.

**Objetivo parcial 2:** Aislar, purificar y caracterizar la mioglobina humana.

### **Tareas para dar cumplimiento a este objetivo parcial 2:**

- Desarrollo de un método de purificación de Mb humana para obtener la proteína con un grado alto de pureza.
- Caracterización de la Mb humana a través de métodos bioquímicos, espectrofotométricos e inmunoquímicos.

**Objetivo parcial 3:** Obtener y purificar anticuerpos anti-Mb, y evaluar su desempeño en el ensayo de látex-aglutinación.

### **Tareas para dar cumplimiento a este objetivo parcial 3:**

- Desarrollo de un método para la producción de anticuerpos policlonales anti-Mb humana con rendimiento satisfactorio de anticuerpos.
- Desarrollo de un procedimiento de purificación de los anticuerpos anti-Mb humana con el empleo de la Mb equina, para eliminar la reactividad de los sueros con la Hb humana.

- Estudio de la capacidad de los anticuerpos anti-Mb humana purificados para unirse a partículas de látex de poliestireno y reconocer la Mb humana en el suero sanguíneo.

## **SEGUNDA ETAPA**

**Objetivo parcial 4:** Adecuar a la práctica productiva los resultados obtenidos en la primera etapa, con vistas al desarrollo del reactivo de látex-aglutinación para Mb humana.

### **Tareas para dar cumplimiento a este objetivo parcial 4:**

- Desarrollo de un método de purificación de Mb humana de un solo paso para obtener Mb de pureza aceptable para la inmunización.
- Adecuación de los métodos de producción y purificación de anticuerpos anti-Mb humana a la práctica productiva.
- Determinación del grado de sensibilización óptimo de las partículas de látex.
- Conformación del juego de reactivo látex-aglutinación para Mb MIOLATEX.

**Objetivo parcial 5:** Evaluar la utilidad del reactivo en el diagnóstico del IAM.

### **Tareas para dar cumplimiento a este objetivo parcial 5:**

- Evaluación de la efectividad del reactivo de látex-aglutinación para Mb en el diagnóstico del IAM.
- Evaluación preliminar del reactivo de látex-aglutinación para Mb humana en el seguimiento de pacientes infartados con tratamiento trombolítico.

Este documento consta de síntesis, introducción, 4 capítulos (revisión bibliográfica, materiales y métodos, resultados y discusión, discusión general), conclusiones y recomendaciones, el listado de bibliografías consultadas y siete anexos. El primer capítulo describe la estructura y función de la Mb, las relaciones estructurales y funcionales entre la mioglobina y la hemoglobina, los métodos que se han propuesto para el aislamiento y purificación de la Mb, los aspectos básicos de su antigenicidad e inmunogenicidad y la utilidad de las herramientas bioinformáticas en este campo, la importancia clínica de su determinación y los métodos que se han empleado con este fin, haciendo énfasis en los ensayos de látex-aglutinación. El segundo capítulo describe los

materiales y métodos que se emplearon en el trabajo experimental. Los resultados obtenidos se presentan y discuten en el tercer capítulo, organizados en 2 bloques correspondientes a la primera y la segunda etapas del trabajo. En el capítulo 5 se discuten la utilidad de las similitudes antigénicas entre las mioglobinas y el valor diagnóstico de la Mb humana. Finalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones. El documento contiene 19 tablas, 22 figuras y 369 referencias bibliográficas.

La **importancia teórica** de este trabajo es de carácter metodológico y está dada por el desarrollo de una metodología para la preparación de un inmunodiagnosticador de látex-aglutinación, que permitió resolver total o parcialmente dificultades en cuanto a: la inmunogenicidad de la Mb humana, el empleo de músculo humano y la reactividad del antisuero frente a la hemoglobina, un contaminante principal de las preparaciones de Mb. La **importancia práctica** está dada por el desarrollo de un reactivo de látex-aglutinación nacional para determinar niveles patológicos de Mb, capaz de excluir del diagnóstico de IAM a pacientes sospechosos a las 6 horas de la admisión. Las **novedades** de este trabajo son: (1) El método de purificación de la Mb humana consistente en filtración molecular en columna Superose 12 e intercambio aniónico en columna Mono Q. El método fue reproducible y permitió obtener una Mb de pureza elevada y detectar dos variantes isoeléctricas de la Mb humana. (2) El método de purificación de Mb humana en un solo paso cromatográfico en DEAE-Sepharosa Fast Flow, el cual rindió una Mb de pureza aceptable para la inmunización de animales de experimentación. (3) El método de purificación de los anticuerpos anti-Mb humana con Mb equina polimerizada con glutaraldehído. Este procedimiento tiene ventajas sobre los métodos tradicionales, pues sustituye las matrices de importación que se emplean habitualmente con este fin, es más sencillo en su ejecución y utiliza la Mb equina, más asequible, con la que se elimina la reactividad original de los antisueros con la hemoglobina humana, y se facilita la reacción de aglutinación (tiempos más cortos). (4) El diseño de un flujo productivo, de poca complejidad y factible de introducir en la industria, con vistas a la obtención de un reactivo de látex-aglutinación para determinar niveles patológicos de Mb sérica.

Los resultados parciales han sido publicados en cuatro artículos científicos en las Revistas Cubanas de Farmacia y Biología. Se publicó además un quinto artículo de revisión para la Revista Biología. Los resultados han sido presentados en 10 eventos científicos, seis de ellos internacionales. De este trabajo se derivaron diez tesis de diploma y dos tesis de maestría.

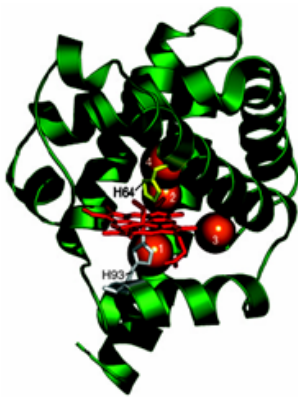
# CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Mioglobina. Generalidades

Hace unos doscientos años que los investigadores propusieron que el color rojo del tejido muscular en los vertebrados era debido a un pigmento distinto de la hemoglobina (revisado en Wittenberg y Wittenberg 1989). Estas hemoglobinas “de los tejidos” están distribuidas ampliamente entre diversos organismos que incluyen plantas, moluscos y mamíferos (Garry y col 2003). En vertebrados, la Mb está restringida principalmente al miocardio y a las fibras oxidativas del músculo esquelético. Durante la cardiogénesis ella aparece tempranamente y aumenta su expresión durante el período postnatal y en la adultez (Garry y col 1996, 2003), lo que coincide con el incremento de las demandas metabólicas del corazón relacionadas con el crecimiento y el desarrollo. La expresión de Mb ha sido evidenciada en peces en tejidos no musculares, como el hígado y el cerebro (Fraser y col 2006). Aunque la Mb fue la primera hemoglobina de tejido identificada en los vertebrados, otras dos globinas -neuroglobina y citoglobina- han sido identificadas en tejidos adultos de vertebrados (Burmester y col 2000 y 2002, Kawada y col 2001, Mammen y col 2002, Wystub y col 2004, Xi y col 2007). Fraser y col (2006) informaron de una isoforma de la Mb, distinta de la neuroglobina, la cual es expresada exclusivamente en el tejido neural de peces.

## 1.2 Organización estructural y genómica de la mioglobina

La Mb es una proteína hémica de baja masa molecular (17 500 Da) constituida por una sola cadena de aminoácidos (Figura 1). Es una molécula extremadamente compacta y sus dimensiones totales son de unos 45 x 35 x 25 Å (Stryer 1995). Las llamadas holo y apomioglobina corresponden a la molécula con y sin el grupo hemo, respectivamente.



**Figura 1. Estructura de la molécula de Mb.** Consiste de ocho  $\alpha$ -hélices que encierran un residuo hemo (rojo). Los estudios de unión de xenón con difracción de rayos-x identificaron cuatro cavidades designadas Xe1-Xe4, las cuales pueden servir para concentrar ligandos o como rutas de escape para los ligandos. Los residuos de histidina, conservados durante la evolución, sirven para estabilizar el grupo hemo (His<sup>93</sup>) o como una puerta (His<sup>64</sup>, amarillo) que regula la entrada o salida de los ligandos. Tomado de Garry y col 2003.

La Mb fue la primera proteína que se sometió a un análisis estructural completo. Este análisis fue conducido por John Kendrew y sus colaboradores, quienes emplearon las técnicas de difracción de rayos-x (Kendrew y col 1958 y 1960). Subsecuentemente, un número de

estudios estructurales confirmó los hallazgos iniciales de Kendrew y facilitó el conocimiento de la estructura física de la Mb (Shoenborn y col 1965, Tilton y col 1984, Frauenfelder y col 2001, Brunori y col 2008). Colectivamente, estos estudios establecieron que el esqueleto de la Mb consiste de 8 segmentos  $\alpha$ -helicoidales (designados A-H), todos ellos dextrogiros, situados alrededor de una cavidad que contiene un grupo prostético protohemo. El primer residuo en la hélice A se designa A1, el segundo A2 y así sucesivamente. Existen cinco segmentos no helicoidales entre las regiones helicoidales (llamados CD, por ejemplo, si están localizados entre las hélices C y D). Hay otras dos regiones no helicoidales: los dos residuos en el extremo amino-terminal (llamados NA1 y NA2) y los cinco residuos en el extremo carboxilo-terminal (denominados HC1-HC5). En el interior hay muy poco espacio vacío y contiene casi enteramente residuos no polares. Los únicos residuos polares son dos histidinas que tienen una función crítica en el centro activo. El exterior contiene a la vez residuos polares y apolares. El grupo hemo queda localizado en una oquedad de la molécula, soportado a su vez por los dos residuos de histidina (Stryer 1995). La His<sup>64</sup> (E7) está situada sobre el residuo hémico y la His<sup>93</sup> (F8), por debajo de éste (Figura 1). El grupo protohemo prostético es un compuesto estable de hierro con protoporfirina IX. De los seis sitios de coordinación del átomo de hierro, cuatro están involucrados en uniones a la porfirina (Kendrew 1963, Wittenberg y Wittenberg 1989). La unión del quinto sitio de coordinación del átomo de hierro a la parte histidínica de la Mb (referida como la histidina proximal o His<sup>93</sup>) estabiliza al grupo hemo, y el último sitio (sexto) de coordinación del hierro está disponible para unir ligandos (ejemplos: dioxígeno, óxido nítrico y monóxido de carbono) (Wittenberg y Wittenberg 1989, Frauenfelder y McMahon 2001). Con el empleo de la difracción de rayos-x y estudios de unión con xenón, se identificaron cuatro cavidades dentro de la proteína (Xe1, Xe2, Xe3 y Xe4) (Shoenborn y col 1965, Tilton y col 1984, Frauenfelder y col 2001) (Figura 1). Los estudios de Chu y col (2000), Ostermann y col (2000), Frauenfelder y col (2001) y Scott y col (2001) sugieren que estas cavidades podrían funcionar como rutas de escape para ligandos o como cavidades capaces de concentrar ligandos y promover su unión al residuo hemo. Brunori y col (2004 y 2008) revisaron este fascinante tema en su estudio sobre la dinámica estructural de la Mb y sugirieron el papel esencial de estas cavidades en el control de la función de la proteína (Nienhaus y Nienhaus 2004, Agmon 2004, Teeter 2004, Cohen y col 2006, Olson 2007, Ruscio y col 2008).

Las conformaciones de las tres formas fisiológicamente importantes de la Mb: la desoximioglobina, la oximioglobina/ferromioglobina y la ferrimioglobina/metamioglobina, son muy semejantes, excepto en la sexta posición de coordinación (Tabla 1). En la ferrimioglobina, este centro está ocupado por agua; en la desoximioglobina, está vacío; en la oximioglobina, lo ocupa el O<sub>2</sub>. El lugar de enlace con el oxígeno involucra una pequeña fracción de la molécula, quedando ligado el oxígeno directamente al átomo de hierro del hemo (Stryer 1995, Chen y col 2008)

**Tabla 1. Variantes principales de la mioglobina. Tomado de Stryer 1995.**

Forma	Estado de oxidación del hierro	Ocupante	
		5ta posición de coordinación	6ta posición de coordinación
Desoximioglobina	+2	His F8	Vacía
Oximioglobina	+2	His F8	O <sub>2</sub>
Ferrimioglobina	+3	His F8	H <sub>2</sub> O

La mioglobina y la hemoglobina evolucionaron de un gen ancestral común hace aproximadamente 700 millones de años (Stryer 1995, Garry y col 2003). La organización genómica para el gen de la Mb ha sido definida en numerosas especies, que incluyen la foca gris, el cachalote, el ratón y el humano (Weller y col 1984, Blanchetot y col 1986, Wittenberg y Wittenberg 1989). Hay una gran homología entre las diferentes especies, y la estructura genómica es relativamente simple, ya que el gen de la Mb consiste de tres exones y dos intrones. En el ratón, uno de ellos codifica los residuos 1-30 (NA1 a B11), un segundo exón codifica la región central formada por los residuos 31 a 105 (B12 a G6) y un tercer exón codifica los residuos 106 a 153 (G7 a HC5). El centro de unión para el hemo está prácticamente codificado por el exón central (Blanchetot y col 1986), cuya secuencia se utiliza en la síntesis de la microglobulina recombinante (Ji y col 2008).

### 1.3 Mioglobina y hemoglobina

La Mb y la Hb son dos proteínas hémicas relacionadas, vitales para el transporte de oxígeno en los vertebrados. La Hb presente en la sangre une el O<sub>2</sub> en los pulmones y lo conduce a los músculos donde es liberado para ser usado de inmediato en las vías metabólicas oxidativas o transferido a la Mb, que lo almacena para un uso posterior (Stryer 1995).

El establecimiento de la estructura tridimensional de la hemoglobina fue una hazaña científica que tuvo su comienzo en 1936 y duró un cuarto de siglo con la obtención por Perutz en 1959 de una imagen de densidad electrónica a baja resolución de la oxihemoglobina de caballo (Perutz 1978). Desde entonces, se han conseguido mapas de alta resolución tanto para las oxihemoglobinas como las desoxihemoglobinas de caballo y humana (Stryer 1995).

La molécula de Hb es casi esférica, con un diámetro de 55 Å, y una masa molecular de 68 kDa. Las cuatro cadenas que la forman están empaquetadas en disposición tetraédrica. Los grupos hemo están localizados en oquedades cercanas al exterior de la molécula, uno en cada subunidad. La hemoglobina A, la Hb principal en los adultos, consta de dos tipos de cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , cada una representada dos veces en la molécula. Las ocho hélices de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la Hb se pueden superponer virtualmente con las de la Mb, a pesar de que existen muchas diferencias entre las secuencias de aminoácidos de ambas hemoproteínas (Mathews y van Holde 1990). En realidad, las secuencias de las tres cadenas sólo coinciden en 24 de las 141 posiciones, lo que demuestra que secuencias muy diferentes de aminoácidos pueden determinar estructuras tridimensionales similares. Esta estructura, denominada el “pliegue de la globina”, parece ser común a todas las mioglobinas y hemoglobinas de los vertebrados. Un estudio de Perutz y Lehmann (1968) sobre la estructura primaria de Mbs y Hbs evidenció que 7 residuos de aminoácidos (7 de ~ 153) eran invariantes y aparecían en posiciones idénticas en todas las Mbs que funcionan normalmente. Las mutaciones en esas posiciones críticas destruyeron la función de la proteína. La mayoría de estos siete residuos críticos están localizados alrededor del grupo hemo. Por otra parte, los residuos situados sobre la superficie de la molécula son altamente variables, incluso las prolinas, y sólo unos pocos están cargados positiva o negativamente (Stryer 1995). Estas diferencias hacen que la hemoglobina y la mioglobina de una misma especie puedan distinguirse en base a ligeras diferencias en el espectro de absorción, después que han sido derivatizadas, o por técnicas inmunológicas (Kranen y col 1999).

#### **1.4 Funciones de la mioglobina**

Las llamadas funciones clásicas de la Mb han estado relacionadas con el suplemento de O<sub>2</sub>. Esta globina actúa como una proteína almacenadora de O<sub>2</sub> en el músculo, liberando el oxígeno durante períodos de hipoxia o anoxia (Wittenberg 1959). Esto ha sido sustentado por la observación que los mamíferos adaptados, tanto para bucear (ejemplo, la foca elefante del Norte o el cachalote) como los que viven a elevadas alturas, tienen 10 veces más concentración de Mb

en el músculo esquelético (<0.5 mmol/L en mamíferos a nivel del mar contra 4-5 mmol/L en mamíferos marinos tales como la foca) (Tabla 2; Hochachka 1999).

**Tabla 2. Concentraciones de la Mb en especies animales diferentes.  
Tomado de Garry y col 2003.**

Organismo	mg/g de peso	Tejido	Referencia
Foca elefante del Norte	64	Músculo dorsal	Noren y col 2001
Cachalote	57	Músculo esquelético	Dolar y col 1999
Delfín de nariz de botella	26	Músculo dorsal	Noren y Williams 2000
Conejo blanco de Nueva Zelanda	8	Músculo esquelético	Noren y Williams 2000
Ratón	1.9	Músculo esquelético	Perkoff y Tyler 1958
<b>Humano</b>	<b>2.4</b>	<b>Corazón</b>	<b>Swaanenburg y col 2001</b>
Chimpancé	2.1	Músculo psoas	Perkoff y Tyler 1958

Aunque en mamíferos marinos las funciones de la mioglobina parecen bien sustentadas, en los animales terrestres que viven en un ambiente de oxígeno continúan siendo un tema de estudio y debate. Desde 1970, Wittenberg refirió que la Mb también facilita la difusión del oxígeno desde el sarcolema a la mitocondria en mamíferos terrestres. Numerosos han sido desde entonces los trabajos realizados para investigarlo (Wittenberg 1959, Jones y Kennedy 1982, Wittenberg y Wittenberg 1985 y 1989, Taylor y col 1986, Gajesky y Honig 1991, Takahasi y col 1998, Chen y col 1997). A favor de esta idea está la demostración de la desaturación de O<sub>2</sub> de la Mb mediante análisis espectroscópico de miocitos cardíacos o corazones aislados (Wittenberg y Wittenberg 1985, Gayeski y Honig 1991, Takahasi y col 1998). Las técnicas genéticas han constituido una alternativa importante (Garry y col 1998, Gödecke y col 1999, Grange y col 2001, Meeson y col 2001, Flögel y col 2005, Merx y col 2005) y han evidenciado que en ausencia de Mb se activan múltiples mecanismos compensatorios que elevan el gradiente de pO<sub>2</sub> y reducen la distancia que debe difundir el O<sub>2</sub> entre los capilares y la mitocondria. Se ha demostrado que la Mb funciona facilitando la difusión del oxígeno en el cardiomiocito y típicamente permanece saturada al 40-70 % con O<sub>2</sub> (Mb + O<sub>2</sub> ↔ MbO<sub>2</sub>). Estudios muy recientes apoyan este criterio (Wittenberg y Wittenberg 2007, Lin y col 2007, Wittenberg 2007).

La actividad peroxidasa de esta proteína fue informada por primera vez por George e Irving, en 1955. Aunque esta actividad es menor que la de otras peroxidases endógenas, algunos estudios (Cadenas 1989, Khan y col 1998) sugirieron la potencialidad de la Mb para oxidar catalíticamente sustratos en presencia del peróxido de hidrógeno, contribuyendo así a la



eliminación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Los estudios del laboratorio de Schrader (Flögel y col 2001a, 2001b) sustentan un papel para la Mb como depurador de ERO con vistas a limitar sus efectos tóxicos en el cardiomiocito. Los estudios cinéticos de la Mb con mutaciones en la His<sup>64</sup>, la Tyr<sup>103</sup> y la Cis<sup>110</sup> han identificado a esos sitios como esenciales para su actividad peroxidasa (Khan y col 1998, Witting y col 2000 y 2002). De hecho, la Mb (y la hemoglobina) “protege” a las células en cultivo expuestas a niveles citotóxicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yang y Bono 1993, D’Agnillo y Alayash 2000). La actividad peroxidasa de esta proteína ha tenido aplicación en biosensores (Kumar y Chen 2007) para determinar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en soluciones antisépticas comerciales.

Con el empleo de las nuevas técnicas genéticas y de biología molecular se han revelado nuevas funciones de la Mb, en particular, la depuración de óxido nítrico (NO). El NO, también conocido como factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Ignarro y col 1987, Moncada y col 1991), compite con el O<sub>2</sub> para unirse reversiblemente a la citocromo *c* oxidasa e inhibir la respiración mitocondrial (Poderoso y col 1998, Shiva y col 2001, Blomberg y col 2004). Los trabajos de Brunori (2001) y Flögel y col (2001b) han establecido que el NO es un regulador importante de la fosforilación oxidativa mitocondrial. A pesar de los numerosos estudios que describen la actividad biológica de NO/EDRF, no hay consenso con relación a su vida media biológica (Lancaster 1994, Kelm y Schrader 1990) o su posible estabilización *in vivo* por reacción con molécula(s) transportadora(s) (Wink y col 1994, Gross y Lane 1999). La molécula de Mb, por contener un grupo hemo, es susceptible de ser nitrosada, dando lugar a complejos hemo-nitrosil. Los estudios con ratones Mb<sup>-/-</sup> expuestos a hipoxia crónica evidenciaron que la Mb funciona como reguladora de la biodisponibilidad del NO en el corazón (Flögel y col 2001b, Mammem y col 2001), actuando como una NO oxidasa (Flögel y col 2004), Kreutzer y Jue 2006).

Flögel y col (2001a) también exploraron el papel de la Mb en la homeostasis del NO cardíaco con el empleo de ratones salvajes y *knockout* para Mb. Los autores encontraron que la infusión de soluciones de NO incrementó, en dependencia de la dosis, la formación de metaMb en corazones salvajes, la cual fue rápidamente revertida con el cese de la infusión de NO. Los corazones carentes de Mb reaccionaron con más sensibilidad al NO infundido dado que la vasodilatación y las acciones cardiodepresivas fueron más pronunciadas. La menor sensibilidad de los corazones salvajes a cambios en la concentración de NO se ajusta bien a la hipótesis que en presencia de Mb una degradación continua del NO tiene lugar por reacción de oxiMb + NO para dar metaMb + nitrato, lo que reduce efectivamente la concentración de NO citosólico. La

regeneración de metaMb por la metaMb reductasa y la subsecuente asociación con oxígeno conduce a la reformación de MbO<sub>2</sub> disponible para otro ciclo de degradación de NO. En el caso particular de la Mb humana es posible además la formación de un S-nitrosotiol, ya que ella posee un residuo de cisteína, Cys<sup>110</sup> (Hubbard y col 1990). Si la Mb humana salvaje S-nitrosada fuera capaz de liberar NO biológicamente activo, la Mb participaría en la homeostasis del NO por tres mecanismos distintos: oxidación del NO y formación de nitrosil-Mb, para su eliminación, y formación de S-nitroso-Mb, para el almacenamiento del NO biológicamente activo (Andriambelison y Witting 2002). A esto se sumaría su actividad nitrito reductasa que genera NO, recientemente sugerida por Hendgen-Cotta y col (2008).

### **1.5 Aislamiento y purificación de la mioglobina**

En 1932, Hugo Theorell cristalizó la Mb por primera vez a partir de corazón equino y Drabkin, 13 años más tarde, precipitó la humana. Estos dos investigadores, a partir de extractos acuosos de músculo, precipitaron el contaminante mayoritario, la Hb, con fosfato, acetato o sulfato de amonio. En 1947, Theorell y De Duve prepararon Mb humana de músculo cardíaco y de orina. Ellos se basaron en el hecho de que en todas las especies estudiadas la Hb precipita siempre a una concentración salina menor que la Mb. Entre 1950 y 1960 se mantuvieron en esencia los métodos descritos anteriormente, los cuales eran engorrosos y poco confiables en cuanto a la pureza de las preparaciones obtenidas. En 1960, William Luginbuhl aisló la Mb humana de músculo esquelético. Su método, que alcanzó gran popularidad, tiene por fundamento la precipitación de la Hb en extractos acuosos de músculo a pH 8 por saturación ascendente con sulfato de amonio, para en un paso final ajustar el pH a 7 y cristalizar la Mb. Ese año marca, además, el inicio del empleo de los métodos cromatográficos en la purificación de Mb con los trabajos de Akeson y col y Akeson y Theorell, quienes emplearon columnas de CM-celulosa para la preparación de Mb de músculos de rata y equino. En 1961, Brown utilizó DEAE-celulosa para obtener Mb de músculo esquelético de mamíferos buceadores y de corazón bovino. Un año después, Perkoff y col combinaron los métodos de extracción de Luginbuhl y de purificación de Brown. Sus resultados arrojaron que la Mb cristalizada a partir de músculo esquelético presentaba un patrón de elución de 5 fracciones cromatográficas, haciendo en su trabajo referencia a los estudios de Antonini y Fanelli, quienes en 1956 informaron por primera vez la heterogeneidad de la Mb.

En 1963, se informaron los resultados del trabajo de Awad, quien utilizó la filtración en gel para separar Hb y Mb. Empleó una preparación comercial de metaMb de ballena y como soportes para la cromatografía, los Sephadex G-75 y G-50. Un año después, Berman y Kench informaron la separación incompleta de Mb y Hb sobre Sephadex G-75. En 1968, se destacaron los experimentos de Hapner y col para estudiar y caracterizar la Mb de tres mamíferos buceadores. El mérito de este grupo fue desarrollar un método mediante el cual, en un solo paso, se elimina gran cantidad de Hb al disminuir los sucesivos fraccionamientos de los métodos precedentes y utilizar para la extracción una solución de sulfato de amonio al 70 % y tampón fosfato pH 6.5 EDTA 1 mmol/L.

En la década de los años setenta hasta nuestros días se han empleado con frecuencia los métodos descritos, fundamentalmente, los de Luginbuhl y Hapner, con algunas modificaciones, según los recursos y propósitos de los investigadores. Así, Dombroski y Povorenni (1981) modificaron el método de Luginbuhl y obtuvieron Mb humana sustituyendo el largo proceso de cristalización por filtración molecular en Sephadex G-75 y después un intercambio iónico sobre DEAE-celulosa.

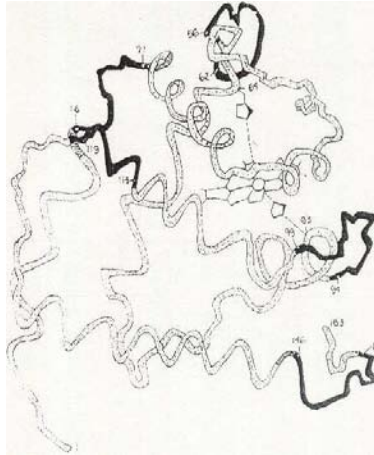
Varios métodos se han descrito para la purificación de la Mb desde que Theorell en 1932 la aislara por primera vez y, en particular, para su separación de la Hb. En la actualidad, estos métodos se basan, fundamentalmente, en la precipitación diferencial de la hemoglobina con sulfato de amonio y/o en la separación mediante cromatografías de exclusión molecular, de intercambio iónico o de inmunoafinidad (Stewart y col 2004). Aunque el proceso de purificación de una proteína suele ser difícil, en el caso de la Mb este se ve facilitado por sus concentraciones elevadas en el músculo, de donde es extraída. La Mb es utilizada además como proteína modelo para evaluar nuevas técnicas de separación de proteínas, como el sistema micelar-gel acuoso (AMGS) (van Roosmalen y col 2004), la ultrafiltración (Ebersold y Zydney 2004, Feins y Sirkar 2004) y la cromatografía de exclusión con surfactante (SASEC) (Horneman y col 2004), entre otras.

## **1.6 Antigenicidad e inmunogenicidad de la Mb**

Los primeros anticuerpos contra la Mb fueron producidos por Hektoen y col, en 1927 con empleo de la hemoproteína canina. En 1939, Maeda obtuvo anticuerpos contra la Mb humana y después Ono, en 1953, quien los utilizó para determinar Mb en orina. A partir de entonces se han publicado un gran número de trabajos que describen la producción de inmunoglobulinas

contra Mb de diferentes especies animales (Luginbuhl 1962, Yakulis y Heller 1962, Perkoff y col 1962, Rozman y col 1964, Strausser y col 1966, Kagen y Christian, 1966).

La molécula de Mb fue la primera proteína a la que se le determinó la estructura antigénica. Ese primer estudio, realizado por Atassi y su grupo (1975) durante más de 10 años, utilizó como modelo la Mb de cachalote. Para la evaluación de la



**Figura 2. Estructura antigénica de la mioglobina de cachalote.** Los segmentos negros son los determinantes de Atassi. (i) La secuencia 16-21, situada en la curva entre los segmentos A y B. (ii) La secuencia 56-62 sobre la curva entre las hélices D y E. (iii) La secuencia 94-99 sobre la curva entre las hélices F y G. (iv) La secuencia 113-119 al final de la hélice G y parte de la curva GH. (v) La secuencia 145-151 al final de la hélice H y parte del pentapéptido C-terminal. Tomada de Atassi (1975).

reactividad antigénica utilizaron la técnica de inhibición de la precipitación con empleo de fragmentos peptídicos provenientes de la Mb nativa, derivados químicos de esos fragmentos y péptidos sintéticos. Los estudios de Atassi y sus colaboradores los condujeron a proponer que la estructura antigénica de la Mb de cachalote contenía cinco sitios antigénicos independientes bien definidos, cada uno constituido de porciones continuas de su estructura (Figura 2). El resultado más relevante de los trabajos de Atassi y sus colegas fue el establecimiento de una metodología para el estudio de la estructura antigénica de las proteínas, lo que permitió adentrarse en el conocimiento de las bases de la antigenicidad y la inmunogenicidad de estas moléculas, aunque con limitaciones. El hecho de pertenecer la Mb de cachalote a una familia de proteínas la convirtió en modelo para el estudio de reactividades cruzadas entre proteínas, en el que se evidenciaron no pocas contradicciones.

Dos años después de la publicación de Atassi, Hurrell y col (1977) compararon a través de un RIA de competición las Mbs de cachalote, caballo, cerdo y bovina. El RIA confirmó los resultados obtenidos por Atassi siete años antes, y es que -a pesar de las similitudes de la estructura primaria y tridimensional de las Mbs- los anticuerpos anti-Mb de cachalote no reaccionaban con la Mb bovina. La no reactividad antigénica observada entre estas dos Mbs, con una técnica tan sensible como el RIA, fue inesperada para Hurrell y sus colegas. Estos y otros resultados no pudieron ser explicados por Hurrell y sus colegas en términos puros de las secuencias antigénicas, como lo confirmaron East y col (1980), quienes estudiaron, también mediante RIA, las reactividades de las Mbs de otras especies de mamíferos. Ellos enfocaron su

atención sobre el determinante 1 (16-21) situado en el fragmento 1-55, uno de los tres que se obtiene por degradación de la Mb con bromuro de cianógeno (1-55, 56-131, 132-153). Ya que las secuencias 16-21 de las Mbs de carnero, bovina y de cerdo son idénticas (G-H-V-E-H-D-V-A), la habilidad de los anticuerpos anti-Mb bovina, tanto producidos en carnero como en conejo, para distinguir inmunoquímicamente entre las tres Mbs, implicaba un papel de aminoácidos externos a esa secuencia en la antigenicidad. Así, los anticuerpos mostrarían afinidades distintas para las Mbs heterólogas, aún cuando éstas tuvieran la misma secuencia lineal del determinante, debido a diferencias en la topografía entre las globinas.

En 1980, el grupo de Berzofsky realizó el primer estudio con anticuerpos monoclonales de ratón para tratar de definir esos sitios en la Mb de cachalote, ensayando la reactividad de estos anticuerpos con fragmentos del inmunógeno y Mbs de otras especies. Ninguno de los doce anticuerpos monoclonales reaccionaron con los fragmentos 1-55, 56-131 y 132-153 de la Mb de cachalote. Estos resultados, combinados con otros preliminares usando otras Mbs, sugirieron que varios de los anticuerpos monoclonales reaccionaban con determinantes diferentes a los informados por Atassi (1975). En 1982, el grupo de Berzofski publica un segundo estudio con seis de sus anticuerpos monoclonales frente a catorce Mbs de mamíferos confirmaron que los residuos críticos no estaban contenidos en ninguno de los sitios informados por Atassi. En ese mismo año, East y col, ahora con el empleo de anticuerpos monoclonales contra la Mb humana, reconocieron en ella dos dominios antigénicos que incluyen residuos aminoacídicos que hasta ese momento no se consideraban involucrados en la estructura antigénica de las Mbs.

En 1986, Rodda y sus colegas, como lo hizo primero Atassi (1975), intentaron dilucidar la estructura antigénica completa de la Mb de cachalote, para buscar determinantes secuenciales, aunque emplearon un procedimiento bastante diferente. Ellos sintetizaron todos los hepta, octa, nona y decapéptidos posibles de la proteína e hicieron sustituciones de cada uno de sus aminoácidos sobre un soporte de poliestireno utilizado además como fase sólida en un ELISA para evaluar la actividad de anticuerpos policlonales obtenidos en ratón, rata y conejo. Los resultados de Rodda y sus colegas con anticuerpos de conejo arrojaron, en cuatro de los cinco animales, la existencia de un único hexapéptido principal de secuencia L-K-T-E-A-E (residuos 49-54), que no se corresponde con ninguno de los sitios de Atassi. Los anticuerpos de rata reconocieron una región dentro de la secuencia 118-134, la que sobrelapa con el sitio 5 de Atassi en dos residuos, el 118 y el 119. Ese heptapéptido reconocido por todos los sueros de rata

sobrelapa con seis residuos del heptapéptido reconocido como no antigénico por Twining y Atassi (1979). A partir de estas consideraciones, Rodda y col plantearon que los determinantes definidos por Atassi podían ser incorrectos y se manifestaron a favor del papel más relevante de los determinantes antigénicos topográficos en la respuesta a la Mb de cachalote. En consecuencia con sus resultados (y los de otros autores), los anticuerpos que se producen contra un antígeno proteico estarían dirigidos hacia estructuras presentes en la molécula nativa, tal como fue planteado por Benjamín y col (1984). Un buen ejemplo lo constituye el resultado de Crumpton (1974) con anticuerpos levantados contra la Mb nativa y contra la apomioglobina. Los anticuerpos contra la globina nativa produjeron un precipitado coloreado con la holoMb, y no se unieron bien a la apoMb, la cual -sin el hemo- tiene una conformación ligeramente afectada. No obstante todo lo anteriormente expuesto, se ha mantenido hasta nuestros días el criterio de que la Mb constituye un modelo de antígeno proteico para estudiar determinantes antigénicos continuos y, en particular, el determinante antigénico constituido por los residuos 15-22 en la porción amino terminal de la molécula, por haber sido confirmado por varios grupos de investigadores (Crumpton y Wilkinson 1965, Koketsu y Atassi 1974, Smith y col 1977).

La Mb también constituye un buen modelo para estudiar epítomos discontinuos dependientes de la conformación. En los trabajos del grupo de Berzofsky (1980, 1982) con anticuerpos monoclonales contra la Mb de cachalote, ellos definieron dos determinantes topográficos. Un anticuerpo reconoció un epítomo que incluye la glutamina en la posición 4 y la lisina en la 79, los cuales están sobre el segmento A y la curva E-F, respectivamente, de la molécula, a una distancia de 2 Å que permite la formación de un puente salino en la molécula nativa. El otro anticuerpo monoclonal reconoció un determinante que involucra la glutamina 83 en la vuelta E-F, y la alanina 144 y la lisina 145 sobre el segmento H. De nuevo, estos residuos separados en la secuencia primaria han sido llevados a una distancia de 12 Å por el plegamiento de la molécula en su conformación nativa (Figura 1). East y col (1982) al trabajar con dos anticuerpos monoclonales contra la Mb humana sugirieron la existencia de dos sitios antigénicos diferentes. Uno de ellos incluye los residuos 34 y 113, y el otro, los residuos 74, 87 y 142. Con excepción del residuo 11, ninguno de estos residuos fue implicado por Atassi como parte de un determinante secuencial. ¿Con qué frecuencia aparecen en un antisuero convencional los dos tipos de determinantes antigénicos? Esta cuestión fue estudiada por Lando y col (1982) quienes cromatografiaron antisueros de cabra, carnero y conejo anti-Mb de cachalote en columnas de Sepharose acopladas con los fragmentos de la Mb obtenidos con bromuro de cianógeno. Cada

antisuero fue pasado secuencial y repetidamente hasta que no se pudieron eliminar más anticuerpos. No obstante, el 30-40 % de las inmunoglobulinas originalmente presentes en cada uno de los sueros permanecieron después de este tratamiento. Esos anticuerpos aún se unían a la molécula de Mb nativa con afinidad alta y no se unieron a ninguno de los fragmentos en RIAs de competición. Así, en los tres sueros estudiados, el 60-70 % de los anticuerpos pudieron unir péptidos y el 30-40 % restante sólo pudieron hacerlo con la proteína intacta.

Hasta aquí se ha tratado de los sitios de la Mb reconocidos por los anticuerpos. Existen también aquéllos reconocidos por los linfocitos T que pueden estimular su proliferación en cultivo (Atassi y col 1981, Kohno y Berzofsky 1982). En contraste con que cualquier superficie expuesta puede ser reconocida por los anticuerpos, los epítomos para células T son unos pocos sitios inmunodominantes (Berzofsky y Berkower 2003) y corresponden a fragmentos peptídicos derivados de la proteína completa. Berkower y col (1986) identificaron dos sitios inmunodominantes para células T en la Mb de cachalote, que comprenden los residuos 102-118 y 132-145 (De Lisi y Berzofsky 1985). Parece improbable que las células T puedan reconocer los mismos sitios que los anticuerpos, ya que la mayoría de estos son destruidos durante el procesamiento que tiene lugar en la célula presentadora de antígeno.

La respuesta de células T contra la Mb de cachalote fue analizada en ratones altamente respondedores H-2<sup>s</sup> y H-2<sup>d</sup> (Berkower y col 1982). Cuando los primeros fueron inmunizados con la Mb, las células T respondieron en cultivo a esa proteína y a la mitad aproximadamente de otras doce Mbs de mamíferos. Sin embargo, ellas no respondieron a las Mbs de ballena y equina. Inversamente, cuando los ratones fueron inmunizados con Mb equina, sus linfocitos T inmunes respondieron en cultivo a la Mb de caballo, y el patrón de reactividad cruzada de las Mbs fue el recíproco del observado para las células T de animales inmunizados con Mb de cachalote. La respuesta a las Mbs estimuladoras heterólogas fue tan fuerte como la de la proteína usada para inmunizar los ratones. Esto sugirió que unos pocos residuos de aminoácidos compartidos formaban un epítomo inmunodominante que era esencial para la activación de las células T, y que la mayoría de las sustituciones no habían afectado ese epítomo. Comparando los residuos de aminoácidos que estaban conservados en las Mbs estimuladoras con los sustitutos correspondientes en las Mbs no estimuladoras, se reveló que cambios en un simple residuo podían explicar el patrón observado. Todas las Mbs que estimularon cruzadamente las células T específicas a la proteína de cachalote tenían glutamina en la posición

109, mientras que todas aquellas que estimularon a las células T inmunes para la Mb equina tenían una asparagina en esa misma posición. Ningún miembro de un grupo pudo estimular linfocitos T de donantes inmunizados con una Mb del otro grupo. Esto sugirió que un epítipo inmunodominante reconocido por células T estaba centrado sobre la posición 109, independientemente de cuáles aminoácidos fueron sustituidos. Las células T inducidas por una Mb de un grupo podían rápidamente distinguir entre glutamina o asparagina en esa posición. La respuesta policlonal de células T fue localizada contra un solo sitio predominante. Estos resultados fueron consistentes con la idea de que cada antígeno proteico tiene un número limitado de sitios inmunodominantes (posiblemente uno) para células T, que se asocian con moléculas MHC del animal respondedor. Si ninguno de los fragmentos de la proteína puede asociarse con moléculas MHC del hospedero, la proteína es incapaz de estimular células T auxiliaadoras y resultará poco o no inmunogénica. Los sitios antigénicamente dominantes para linfocitos T parecen ser cualitativamente diferentes de otros sitios. Por ejemplo, en el caso de la Mb de cachalote, cuando el número de clones que respondieron a epítopos diferentes después de la inmunización con la proteína nativa fue cuantificado por dilución limitante, se observó que el grueso de la respuesta estaba dirigido sobre un sitio dentro de los residuos 102-118 (Kojima y col 1988). La frecuencia mayor de células T específicas para el sitio inmunodominante puede en parte atribuirse al gran número de formas en que este sitio puede ser reconocido por clones diferentes de linfocitos (Berzofsky 1988).

### **Técnicas bioinformáticas para estudios de antigenicidad**

Las técnicas bioinformáticas constituyen en la actualidad una herramienta de gran utilidad en los estudios de antigenicidad de las proteínas y, por ende, de su inmunogenicidad. En este acápite se tratará sobre dos de estos instrumentos: el alineamiento de secuencias y la predicción de epítopos. El alineamiento de secuencias y los cálculos de identidad de las proteínas, en un tiempo realizados manualmente (Atassi 1975), cuentan con programas computarizados de fácil acceso que se alimentan de las bases de datos disponibles (Pearson 1988 y 1990, Hall 1999). La predicción teórica de los epítopos de un antígeno a partir de su información estructural ha constituido una tarea mucho más compleja para los bioinformáticos y la inmunología. En general, los cálculos de predicción se basan en escalas de propensión para cada uno de los 20 residuos de aminoácidos sobre la base de su tendencia relativa a poseer la propiedad descrita por la escala (Lomonte 1999).



En el caso de los epítomos reconocidos por los linfocitos B, y los anticuerpos, tienden a ser regiones altamente expuestas de los antígenos, de naturaleza hidrofílica, relativamente móviles, y frecuentemente conformacionales. Según Sweredoski y Baldi (2008), más del 90 % de los epítomos de células B son discontinuos, sin embargo, la mayoría de los algoritmos predictivos identifican epítomos lineales. El primer algoritmo predictivo para epítomos B, de la autoría de Hopp y Woods (1981), se basó en la hidrofiliidad y partía del conocimiento de la estructura primaria de la proteína. El método se desarrolló a partir de 12 proteínas a las cuales se les había realizado un análisis inmunoquímico riguroso, una de ellas, la mioglobina de cachalote, y subsecuentemente se usó para predecir sitios antigénicos de otras 10 proteínas. Un segundo procedimiento para predecir antigenicidad consideró la accesibilidad superficial como el factor determinante. Se obtienen las regiones más expuestas de la proteína, siendo más acertados los algoritmos cuando se conoce su estructura tridimensional. En el trabajo de Thornton y col (1986) ellos demostraron para la lisozima, la mioglobina y la miohemeretrina que los sitios antigénicos identificados experimentalmente corresponden a esas partes de la estructura que sobresalen, lo que fue definido generando un elipsoide que contiene la proteína y calculando los segmentos que sobresalen. Esa correlación fue superior a la obtenida usando hidrofiliidad. También se han desarrollado métodos para pronosticar la accesibilidad superficial directamente de algoritmos que predican la estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos. Es conocido el algoritmo de Chou y Fasman (1978) el cual predice lazos beta en la estructura secundaria, asumiendo que los lazos y las vueltas tienden a encontrarse más frecuentemente en la superficie de las proteínas. Estas regiones tienden también a ser más móviles. La posibilidad de predecir movilidad del residuo empleando sólo la secuencia fue propuesta por Karplus y Schultz (1985), quienes tomaron los llamados valores B para 31 proteínas seleccionadas y determinaron valores normalizados para cada uno de los 20 residuos de aminoácidos. Ellos encontraron que su predicción de flexibilidad dio información significativa, diferente a la obtenida cuando se emplean los algoritmos para estructura secundaria o hidrofiliidad. Parker y col (1986) adoptaron varios parámetros y lograron mejorar el pronóstico. Ellos combinaron tres condiciones: hidrofiliidad basada en los tiempos de retención en HPLC, accesibilidad y flexibilidad. En 1990, Kolaskar y Tongaonkar desarrollaron un método semi-empírico para predecir sitios antigénicos sobre proteínas, estableciendo una escala de antigenicidad, basado en varias propiedades fisicoquímicas de residuos de aminoácidos y sus frecuencias de aparición en epítomos continuos identificados experimentalmente. La aplicación de este método a un gran

número de proteínas ha demostrado que puede predecir determinantes antigénicos con aproximadamente 75 % de seguridad, superior a la de la mayoría de los métodos conocidos. Más recientemente, Larsen y col (2006) propusieron el algoritmo BEPIPRED para identificar epítomos lineales de células B, el cual combina un modelo de Markov y la escala de propensión de Parker y col (1986). El programa PEPITO, que proponen Sweredoski y Baldi (2008), es un estado del arte de los predictores de epítomos B, el cual combina los “scores” de propensión descritos por Andersen y col (2006) y los valores de exposición al solvente determinados por Hamelryck (2005). La mayoría de los algoritmos predictivos, al menos, los que ofrecen más seguridad, identifican epítomos lineales. Aún cuando esté disponible la estructura terciaria del antígeno, la predicción exacta de epítomos conformacionales de células B continúa siendo un reto, y es por ello que la comunidad científica ha trazado sus estrategias en este sentido (Greenbaum y col 2007).

Con relación a los epítomos reconocidos por las células T, la primera característica estructural que se asoció y que permanece en uso hoy día es la anfipaticidad helicoidal (Margalit y col 1987, Berzofsky y Berkower 2003). La anfipaticidad es la propiedad de tener regiones hidrofóbicas e hidrofílicas separadas en el espacio y la característica helicoidal se refiere a la estructura secundaria que adopta el péptido. Con relación a esta última condición, los estudios de cristalografía de rayos-x de las moléculas MHC clases I y II mostraron que los péptidos están contenidos en el surco en forma extendida (Stern y col 1994, Ghosh y col 1995). Esto condujo a que se abandonara la helicidad como característica asociada a epítomos de células T. Sin embargo, los epítomos dominantes de células T de la mioglobina de cachalote (residuos 102-118 y 132-145) y de la citocromo *c* corresponden a hélices antipáticas (Berkower y col 1986, Cease y col 1986, Carbone y col 1987). Para conocer si esta propiedad era determinante o no, DeLisi y Berzofsky (1985) desarrollaron un algoritmo computarizado (Sette y col 1986), optimizado por Margalit y col (1987), el cual permitió identificar correctamente 18 de los 23 epítomos T inmunodominantes conocidos, correspondientes a 12 proteínas ( $p < 0.001$ ). Cuando la base de datos se extendió al doble y después se cuadruplicó, la correlación permaneció altamente significativa y la fracción de sitios predichos, estable (34 de 48 sitios = 71 %,  $p < 0.003$ ; 61 de 92 = 66 %,  $p < 0.001$ ) (Cornette y col 1989). Una correlación similar se encontró (65 %) para péptidos presentados por moléculas MHC clase I (Cornette y col 1993). Otros procedimientos para predecir epítomos T se basan en las secuencias que unen moléculas MHC específicas (DeGroot y col 1997, 1998). El método más simple es aplicar algoritmos para identificar motivos que unen

un MHC particular, empleando los datos informados en la literatura (Rammensee y col 1995). Para ello, Meister y col (1995) desarrollaron el algoritmo EPIMER cuyos resultados sorprendieron a los científicos al mostrar que los motivos no estaban uniformemente distribuidos sino agrupados. Otros procedimientos más sofisticados emplean las llamadas matrices cuantitativas (QM), las redes neurales artificiales (ANN) y las máquinas sostenidas con vectores (SVM) que definen la contribución negativa o positiva de cada residuo de aminoácido en una determinada posición (Bhasin y Raghava 2004a, Tsurui y Takahashi 2007). Aunque la mayoría de las predicciones computacionales se basan en la unión MHC-péptido, actualmente se están enfocando sobre otros componentes celulares, tales como el proteasoma (Bhasin y Raghava 2005) y la bomba de péptidos TAP (Bhasin y Raghava 2004b). La predicción de péptidos presentables por moléculas MHC clase II constituye una tarea más difícil con relación a los que se unen a moléculas clase I, no tanto por su longitud mucho más variable, como por el mayor grado de degeneración de los motivos para el anclaje y que algunas veces no son todos utilizados (Rammensee y col 1999). No obstante, varios trabajos han estado encaminados con algún éxito a identificar epítomos para células T auxiliaadoras, por ejemplo, para HLA-DRB1\*0401 con empleo de las neuronas artificiales (Zarour y col 2000). Muy recientemente, Pupo (2008) desarrolló un algoritmo para la predicción de epítomos T presentados por moléculas MHC II, con un enfoque estructural y la aplicación de métodos de inteligencia artificial (Pupo y Moreno 2008). El valor de 0.885 (área bajo la curva ROC; del inglés “receiver operating characteristic”) fue superior al informado en el 2006 por Salomón y Flower (0.870), constituyendo los mejores resultados obtenidos hasta el momento para este tipo de algoritmo.

La complejidad de los sistemas biológicos de reconocimiento y respuesta no ha podido reducirse todavía a reglas estructurales sencillas; en particular, las teorías de la presentación de antígeno y de la regulación celular son muy dinámicas. A esto se debe en buena medida que los resultados de los mejores algoritmos desarrollados para la identificación de epítomos no alcancen aún el grado de confiabilidad deseable. No obstante, a favor del empleo de estas herramientas bioinformáticas está el hecho de que muchos de los programas de predicción de epítomos se encuentran en sitios *web* con libre acceso, lo que facilita su utilización e incrementa, cuando son exitosos, las bases de datos de sitios antigénicos y no antigénicos, tan necesarias para el desarrollo de programas bioinformáticos más certeros. Lo recomendado es la combinación de varios algoritmos para identificar con mayor seguridad los posibles sitios antigénicos, los cuales deberán ser subsecuentemente verificados “in vivo” mediante procedimientos experimentales.

## 1.7 La mioglobina como marcador clínico

La Mb es sintetizada y ejerce sus funciones principalmente en los músculos esquelético y cardíaco, y está prácticamente ausente en el músculo liso. Se encuentra además en el suero sanguíneo y la orina a muy bajas concentraciones (Powell y col 1984). Kitao y col (1995) determinaron el contenido de Mb en músculos humanos (Tabla 3) y encontraron que el contenido fue menor en el músculo cardíaco que en el esquelético.

Los niveles normales de Mb en el suero determinados por radioinmunoensayo oscilan entre 6 y 85 ng/mL (Stone y col 1977). Se han evidenciado diferencias entre ambos sexos y se informaron como valores normales para las mujeres 3-76 ng/mL y para los hombres, 12-78 ng/mL. Los niveles normales en la orina se encuentran por debajo de 50 ng/mL (Rumpf y col 1985). Anesi y col (2000) encontraron diferencias en los niveles séricos de Mb, no sólo relacionadas con el sexo, sino además con la edad. Swaanenburg y col (2001) estudiaron la distribución de diferentes marcadores en el corazón humano, entre ellos, la Mb. Los tejidos fueron obtenidos de los ventrículos derecho e izquierdo, del tabique interventricular y del atrium derecho e izquierdo.

Al producirse daño muscular la Mb se libera a la sangre junto con enzimas y electrolitos y se incrementa significativamente su concentración sérica. Por el bajo umbral renal que presenta, la Mb pasa rápidamente a la orina donde sus niveles pueden elevarse notable y peligrosamente causando daño renal agudo. Existen evidencias de que el grupo hemo es el componente tóxico de la Mb, al provocar la peroxidación lipídica y la muerte de las células tubulares (Knochel 1981, Holt y Moore 2000, Grunwald y Richards 2006). Esto puede ocurrir en la rabdomiolisis, afectación que está frecuentemente acompañada de mioglobinuria (Olivero y Ayus 1978, Thomas e Ibels 1985, Malik 1998). La rabdomiolisis es extremadamente común y ha sido reconocida como una de las causas más frecuentes de daño renal agudo. Por esta razón es

**Tabla 3. Contenido de Mb de varios músculos esqueléticos humanos. Tomado de Kitao y col 1995.**

Músculo	Contenido de Mb (mg/g de peso neto)
Músculo temporal	18.5
Músculo lingual	15.3
Músculo pectoral mayor	33.1
Rectus abdominis	54.1
Diafragma	29.4
Músculo iliopsoas	33.0
Latissimus dorsi	27.9
Bíceps brachii	31.5
Músculo Thenar	11.2
Quadriceps	32.5
Gastrocnemius	25.1

importante detectar y cuantificar mioglobina en el suero y la orina para prevenir tal daño (Naka y col 2005).

La determinación de Mb sérica ha sido empleada en la evaluación de enfermedades neuromusculares como distrofia y atrofia muscular y poliomiositis (Asmark y col 1981, Nishikai y Reichli 1984) y en la distrofia muscular de Duchenne y el fallo renal agudo (Nishida y col 1985). En un estudio inmunohistoquímico y por hibridización *in situ* de seis pacientes con encefalomiopatía mitocondrial, se detectó un mayor contenido de la hemoproteína y su RNA, aparentemente, para compensar la disfunción mitocondrial y suplir suficiente oxígeno a la mitocondria (Kunishige y col (1996). También se han investigado los niveles de Mb en el embarazo ectópico donde no parece constituir un marcador útil (Birkhahn y col 2001). Los niveles séricos de Mb y enzimas musculares se elevan durante la realización de ejercicio físico fuerte (Peake y col 2005, Masuda y col 2008)) y esto es debido al derrame a través de las paredes celulares dañadas, causado por un agotamiento del ATP responsable de su integridad. El entrenamiento puede incrementar el tamaño y el número de mitocondrias que proporcionan ATP al músculo esquelético, haciendo las paredes más estables y previniendo el flujo de proteínas. Por dicha razón se ha propuesto la determinación de Mb como un indicador para el establecimiento del régimen de entrenamiento de los deportistas en la medicina deportiva (Maxwell y Bloor 1981). Más recientemente, se ha propuesto la relación nivel plasmático de Mb/masa muscular como un marcador clínico del desgaste muscular progresivo, característico de caquexia relacionada con el cáncer (Weber y col 2007).

Se conoce que la Mb exuda a la sangre después de la muerte, por lo que se han desarrollado métodos para estimar la muerte aguda o prolongada, intervalo *postmortem*, causa de muerte y otros problemas patológicos forenses con empleo de los niveles de Mb en sangre *postmortem* ( Suzuki y col 1983, Urban y col 1988, Pankratz y Liebhardt 1990, Miyaishi 1991). También se han informado estudios inmunohistoquímicos para la detección de Mb procedente del músculo cardíaco en detención aguda del corazón y del músculo esquelético en daño traumático directo (Ishiyama y col 1982, Keil y col 1984, Leadbeatter y col 1989, Fechner y col 1991) y en el riñón en casos de autopsia médico-legales (Ishikawa y col 2007). Estos estudios estuvieron dirigidos a detectar cambios en la localización de la Mb, mientras que Kitao y col (1995) desarrollaron un método ELISA doble “sandwich” para identificar fragmentos de tejido como músculo esquelético humano. También se ha empleado su cuantificación en orina para investigar causas

de muerte (Zhu y col 2001). Así, la Mb constituye un marcador útil en medicina forense y criminalística (Anesi y col 2000). También lo es en la antropología. En el 2000, la detección de Mb humana en coprolitos de los indios anasazi (sudoeste de Colorado, EU) ha servido para demostrar que ingerían carne humana (Marlar y col 2000), y que, por tanto, las marcas observadas en los esqueletos no correspondían a enterramientos secundarios ni a otras prácticas funerarias no dietarias, tal como habían afirmado algunos.

Como se puede apreciar, existen causas diversas que pueden afectar al músculo esquelético con la consecuente liberación de su contenido. Sin embargo, según Kaplan (1987), el tejido muscular afectado más frecuentemente en el mundo contemporáneo es el corazón. La enfermedad isquémica, término propuesto por la Organización Mundial de la Salud para designar todos los estados que van acompañados de suministro insuficiente de sangre al músculo cardíaco, es una de las primeras causas de muerte en muchos países, incluida Cuba.

En el infarto agudo de miocardio, debido a la obstrucción de las arterias coronarias, la función de la membrana de las células musculares cardíacas se altera y vierte su contenido por vía linfática al torrente sanguíneo. Debido a ello, se eleva notablemente la concentración de Mb sérica. Esto fue informado por primera vez por Kagen y sus colaboradores en 1975 quienes utilizaron un ensayo de fijación de complemento. Como esta proteína tiene una masa molecular (17 500 D) más pequeña que la glutámico oxalacético transaminasa (TGO, 90 000 Da), la creatín quinasa (CK, 80 000 Da), la lactato deshidrogenasa (LD, 130 000 Da) y las troponinas cardíacas T (37 000 Da) e I (24 000 Da), es liberada mucho antes al torrente sanguíneo y alcanza concentraciones superiores que las enzimas antes mencionadas (Askmar y col 1981, Grenadier y col 1983, Roxin y col 1984, Moscoso y col 1993, Melanson y col 2004). Diferentes autores coinciden en que la Mb eleva sus valores por encima de la normalidad entre una y tres horas después del inicio del dolor precordial y alcanza niveles máximos hacia las doce horas (Wong 1996). Otro marcador de baja masa molecular es la proteína que une ácido graso de tipo cardíaco (H-FABP; 14 500 Da), la cual constituye un nuevo marcador temprano de isquemia cardíaca (Dati y Metsmann 2005) cuya utilidad es actualmente valorada (Ozdemir y col 2007). Existe consenso que la Mb constituye un marcador precoz de lesiones de bajo, mediano y alto riesgo en el tejido muscular, fundamentalmente, el cardíaco (Stone y col 1978, Guest y Jaffe 1995). De acuerdo a las guías de la IFCC y la NACB, la Mb es el marcador de elección para el infarto de miocardio, en particular, en combinación con la CK-MB, cuatro horas después de la

admisión, en pacientes con sospecha de síndrome coronario (Stork y col 2000, Fesmire y col 2004, Sallach y col 2004). La determinación de los niveles de Mb en el suero sanguíneo resulta un ensayo valioso para descartar o confirmar el IAM, sobre todo si puede ser ejecutado en breve tiempo (Konings y col 1989, Hasic y col 2006). En un estudio realizado por Vatansever y col (2003) con 33 pacientes y 27 controles sanos los niveles de Mb en la admisión tuvieron el mayor valor diagnóstico. Esta determinación tiene importancia además en pacientes con angina inestable de alto riesgo, la valoración post-terapéutica de la reperfusión miocárdica (Tanasijevic 2007), para detectar reinfarto (Hasic y col 2006), como indicador pronóstico (Miyata y col 1994, Srinivas y col, 2001, Iqbal y col 2004, Kontos y col 2007, Hofmann y col 2007, Jaffery y col 2008) y para el estimado del daño por drogas cardiotoxicas (Katus y col 1988, Nistico y col 2007).

Los métodos que se emplean para detectar y cuantificar la mioglobina en los fluidos y tejidos biológicos son inmunoquímicos, por lo que requieren la producción de anticuerpos de especificidad y afinidad elevadas (Grachev y col 1982, Konings y col 1989, Borque y col 1991, Mair y col 1995).

### **1.8 Detección y cuantificación de mioglobina**

Las técnicas físicoquímicas, tales como espectrofotometría, electroforesis, cromatografía y ultracentrifugación, no tienen la sensibilidad que se requiere para detectar los nanogramos de Mb que circulan en la sangre, por lo que no pueden aplicarse al diagnóstico. Las más empleadas han sido y son en la actualidad las técnicas inmunoquímicas, algunas de las cuales resultan más ventajosas que otras. La inmunodifusión simple y doble, así como la inmunolectroforesis (Yakulis y Heller 1962, Rozman y col 1964, Kagen 1967, Kagen y col 1975), la fijación de complemento (Kagen y col 1975), la contrainmunolectroforesis (Hibrawi y col 1976) y la inhibición de la hemaglutinación (Cloonan y col 1976), fueron empleadas para detectar la presencia de Mb en muestras de suero, orina y músculos cardíaco, esquelético y uterino, pero resultaron inadecuadas para el diagnóstico. El primer RIA para determinar Mb en suero fue de la autoría de Stone y col en 1975. Esta técnica es capaz de detectar los niveles de Mb que circulan en los sujetos sanos. Otros RIAs fueron desarrollados por Stuart y col (1975), Roberts (1977), Retchlin y col (1978), Oxley y col (1979), Oxley (1984), Honda y Katayama (1984) e Isakov y col (1988). En 1985, Sawhney y col propusieron un RIA heterólogo para determinar los niveles de Mb en plasma humano. El radioinmunoensayo fue durante años la técnica más utilizada por su gran sensibilidad y especificidad, aunque presenta algunos inconvenientes, entre ellos, la

necesidad de laboratorios equipados y certificados y el riesgo de contaminación con sustancias radioactivas. La inmunofluorescencia ha sido empleada para detectar la presencia y distribución de la Mb en el tejido miocárdico normal e isquémico, fijado en formaldehído y embebido en parafina (Moran y col 1985, Sunni y col 1984), mientras que Silva y col (1991) desarrollaron un inmunoensayo de concentración de partículas fluorescentes (PCFIA) rápido y específico que brinda resultados comparables a los del RIA. Los inmunoensayos luminiscentes (LIA) han sido también utilizados para la determinación de Mb en el diagnóstico del IAM (Olsson y col en 1984, Lestin y col 2002). Los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) y, en particular, los ELISAs, constituyen una alternativa con numerosas variantes para la detección y cuantificación de Mb. En 1985, Yoshihiko y col desarrollaron una variante "sandwich" sobre partículas de poliestireno. Con vistas a lograr una mejor orientación de la Mb para que fuera atrapada por el anticuerpo de recubrimiento, Juronen y col (1988) estudiaron una variante captura con anticuerpos monoclonales y policlonales. Muchos otros ensayos inmunoenzimáticos para detección y cuantificación de Mb han sido desarrollados para el diagnóstico del IAM y otros fines (Radu y col 1985, Yoshihiko y col 1985, Hodson y col 1992, Kitao y col 1995, McCarthy y col 1998, Nikulina y col 1999), con resultados tan convincentes como los del RIA con la ventaja de ser una técnica más económica y factible de ejecutar.

Un ensayo de gran utilidad es la aglutinación con partículas de látex. Werner y col, en 1982, lo introdujeron para detectar niveles patológicos de Mb en suero, resultando de alto valor predictivo en la admisión de pacientes con sospecha de IAM. Con esta prueba se han podido detectar aumentos en las concentraciones de la Mb sérica 2-3 horas después del comienzo de los síntomas de la isquemia así como los incrementos posteriores en muestreos sucesivos, lo que permite la confirmación del IAM (Bachem y col 1983, Norregaard 1984, Chapelle y Heusghem 1985, Fiet y col 1985, Mainard y col 1985, Ducobu y col 1986, Schultz y col 1986, Wen 1987). También se ha podido determinar que los resultados negativos 2-12 horas más tarde descartan la isquemia con un 100 % de especificidad (Werner y col 1982, Bachem y col 1983, Konings y col 1989). En los años 90 del siglo pasado, varios grupos desarrollaron y emplearon este ensayo en forma automatizada (Naka y col 1991, Borque y col 1991, Abe y col 1991, Katayama y col 1991, Delanghe y col 1991, Cliquet y col 1992, Mair y col 1992, Bakker y col 1993, Abe y col 1993, Miyata y col 1994) hasta nuestros días (Le Moigne y col 2002, Higuchi y col 2003, Sallach y col 2004). Los ensayos de látex-aglutinación constituyen un ensayo útil para descartar o

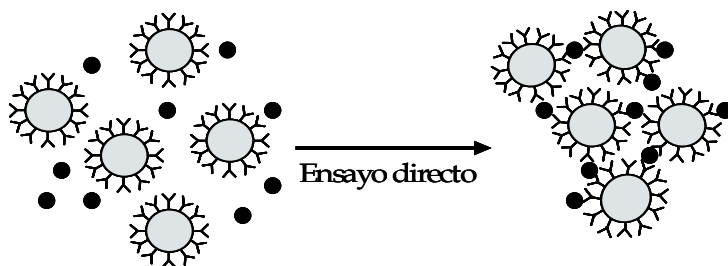


diagnosticar el IAM en los cuerpos de emergencia y otros niveles primarios de salud (Menéndez-Fernández y col 1992, Molina y Galisteo 2005).

### 1.9 Inmunoensayo de látex-aglutinación

Los inmunoensayos basados en la aglutinación de partículas de látex son muy utilizados en biología y medicina para la detección de cantidades pequeñas de anticuerpo o antígeno en una muestra líquida. Estas técnicas tienen, entre sus ventajas principales, que son simples y rápidas en su ejecución, no requieren equipamiento, no son riesgosas, y tienen una aplicación amplia. La reacción de aglutinación involucra la agregación “in vitro” de partículas transportadoras, usualmente de naturaleza polimérica y de orígenes diferentes, conocidas como látex. Esta agregación es mediada por la reacción específica entre anticuerpos y antígenos, uno de los cuales es inmovilizado sobre la superficie de las partículas de látex, lo que hace la reacción visible. Cuando se grafica el grado de aglutinación en función de la concentración del aglutinante, se obtiene una curva con forma de campana, similar a ésta de precipitina, con una zona de equivalencia más extendida (Molina y Galisteo 2005).

La reacción de aglutinación puede ser utilizada para detectar un antígeno o un anticuerpo. En este trabajo se hace referencia a la variante denominada *ensayo directo de aglutinación de látex* para la detección de un antígeno en una muestra biológica, la cual se mezcla con una suspensión que contiene anticuerpos específicos unidos a las partículas de látex (Figura 3). Si el antígeno está presente en la muestra, reaccionará con los anticuerpos para formar un agregado. Si el antígeno no está presente en la muestra, la mezcla mantendrá su apariencia homogénea. Este método es aplicable a la detección de antígenos polivalentes, como proteínas y microorganismos (Norde 1986, Molina y Galisteo 2005).



**Figura 3. Inmunoensayo directo de aglutinación de látex.** Las partículas recubiertas con anticuerpo son aglutinadas por las moléculas de antígeno.

El ensayo de inmunoaglutinación de látex fue descrito por vez primera por Singer y Plotz (1956), quienes lo aplicaron a la detección de factores reumatoides. La importancia de este tipo de ensayos se hace evidente cuando se consulta

la literatura especializada. Sólo en la última década más de 400 publicaciones en revistas de medicina y veterinaria informaron el empleo de inmunoensayos de aglutinación de látex en el

análisis y la investigación. La popularidad de esta tecnología diagnóstica puede ser ilustrada por el hecho que en 1992 había unos 200 reactivos comerciales disponibles de este tipo para detectar enfermedades infecciosas en el SIDA (Bangs 1988). Estos ensayos también son útiles para la detección de cáncer y para la identificación de muchas otras sustancias (hormonas, drogas, proteínas del suero, etc). La aplicación más popular de los inmunoensayos de látex es la determinación de embarazo, pero nuevas aplicaciones y tecnologías del látex están todavía por ser desarrolladas (Molina y Galisteo 2005).

En la mayoría de los ensayos de inmunoaglutinación, los materiales utilizados como soporte del anticuerpo o del antígeno son partículas de látex. Esto es debido a: (1) La posibilidad de síntesis de partículas de tamaño uniforme con diámetro en el rango 50-10,000 nm. (2) La fuerte capacidad de adsorción que tiene para las moléculas biológicas la superficie hidrofóbica de estas partículas. (3) La posibilidad de incorporación de grupos funcionales a la superficie del látex para unir proteínas covalentemente (Molina y Galisteo 2005).

### **Adsorción física**

La unión de las moléculas a las partículas de látex puede realizarse mediante adsorción física o acople covalente. La adsorción física es siempre el primer método de elección por su fácil ejecución. Sólo en aquellos sistemas que no funcionan aplicando esta variante es que se recurre a la unión covalente. Las proteínas globulares, como las inmunoglobulinas, muestran una tendencia a adsorberse en las interfases, bajo la mayoría de las condiciones. Este comportamiento de las proteínas ha resultado útil en varias aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. En muchas de ellas, el material adsorbente es una dispersión, lo que permite disponer de amplias áreas de superficie para acomodar cantidades suficientemente elevadas de la proteína adsorbida en un volumen dado. Ejemplo de esto es la inmovilización de enzimas sobre matrices sólidas en biocatálisis y de las inmunoglobulinas en el diagnóstico clínico. Entre las ventajas de la inmovilización están la estabilización aparente de la proteína y, en el caso de los inmunoensayos diagnósticos, la amplificación visual de la reacción antígeno-anticuerpo (Molina y Galisteo 2005).

El proceso de adsorción es complejo. Los datos más confiables e importantes sobre este proceso los han aportado las investigaciones sobre sistemas "modelos" simples, que consisten de una proteína bien caracterizada, un adsorbente bien caracterizado y un solvente acuoso que contenga solamente iones no amortiguadores (Haynes y Norde 1995, Norde y col 1995, Arai y

Norde 1990, Andrade 1985). Según Norde y Lyklema (1979), cuatro son los factores que hacen las contribuciones principales a la adsorción: los reordenamientos estructurales en la molécula proteica, la deshidratación de la superficie del adsorbente, la redistribución de grupos cargados en la capa interfacial y la polaridad superficial de la proteína.

### Adsorción de inmunoglobulinas

La historia sobre el estudio de la adsorción de inmunoglobulina G en interfase sólido-líquido es larga y controvertida. Uno de los factores a tener en cuenta es la flexibilidad molecular de las inmunoglobulinas, la cual está relacionada con la facilitación de la formación de los complejos antígeno-anticuerpo (Roitt y Delves 2001). Los fragmentos Fab y Fc son relativamente compactos, sin embargo, la molécula de IgG como un todo no es compacta. Esta flexibilidad de los segmentos podría explicar por qué las dimensiones de la IgG varían y por qué la distancia entre los sitios de unión de un anticuerpo en la molécula es 12 nm en el estado cristalino, mientras que la molécula expandida en solución puede alcanzar 25 nm (de extremo a extremo) (Silverton y col 1977). La flexibilidad podría ser diferente además entre los isotipos de las moléculas IgG (moléculas en forma de Y o de T). También el área por molécula depende de la configuración de la IgG en la interfase sólido-líquido: el área proyectada en una configuración *end-on* es 20 nm<sup>2</sup> mientras que en *side-on* es 103 nm<sup>2</sup> (Brash y Lyman (1969).

La adsorción de la IgG es usualmente un proceso irreversible, de manera que, aunque las isothermas de adsorción parecen ser del tipo Langmuir, no es posible determinar las constantes de unión termodinámicas en el equilibrio. Las isothermas de adsorción de IgG sobre soportes poliméricos usualmente desarrollan platos bien definidos en los rangos calculados para una capa compacta de moléculas IgG (Galisteo y col 1994). La adsorción máxima de proteína ha sido informada para la IgG alrededor del punto isoeléctrico. No obstante, algunos autores han demostrado que el máximo aparece en el punto isoeléctrico del complejo inmunoglobulina-transportador (Elgersma y col 1991).

Los tipos principales de interacciones que son relevantes en la adsorción de inmunoglobulinas a partir de soluciones acuosas son: (1) la interacción hidrofóbica, (2) la interacción de Coulomb y (3) el puente de hidrógeno. Otros factores que pueden influir sobre la adsorción son las fuerzas intermoleculares entre las moléculas adsorbidas, las interacciones solvente-solvente, la fortaleza de las uniones de grupos funcionales, así como la química, topología y morfología de la superficie sólida. La adsorción irreversible de la IgG sobre superficies hidrofóbicas ocurre muy

rápidamente. Debe apuntarse que las características de la adsorción de  $F(ab')_2$  e IgG son muy similares (Ortega e Hidalgo-Alvarez 1994).

### **Detección de la inmunoaglutinación. Observación visual**

La luz dispersada a partir de una suspensión monodispersa de partículas le da al látex una apariencia lechosa. Cuando las partículas se agregan por algún proceso producen una suspensión de aspecto granular que recuerda la leche cortada. Muchos de los ensayos de aglutinación de látex se desarrollan en forma manual y la aglutinación se detecta por observación visual. En estos ensayos se han utilizado partículas grandes de varios centenares de nanómetros pero las más comunes son las de  $0.8 \mu\text{m}$ . Se ha establecido que para determinar la aglutinación se deben ver aproximadamente 100 grumos y que estos grumos deben ser de aproximadamente  $50 \mu\text{m}$  para que el ojo humano pueda verlos (Bangs 1990a). Para un tamaño de partícula de  $0.8 \mu\text{m}$ , aproximadamente,  $10^5$  partículas de látex son requeridas para hacer un agregado visible, y aproximadamente  $10^7$  partículas se necesitan para determinar aglutinación en un ensayo dado. Basado en estos cálculos y asumiendo que aproximadamente 10 enlaces se requieren por partícula para mantenerlas juntas, Bangs (1990) ha evaluado que la sensibilidad de tal ensayo manual está en el orden de los picogramos. La observación visual es muy útil en el laboratorio y económica, debido a que no requiere equipamiento. La cuantificación del analito puede realizarse preparando diluciones seriadas de la muestra hasta ver la desaparición del inmunoaglutinado (dilución límite) (Molina y Galisteo 2005). Además del método visual para la detección cualitativa de la aglutinación de partículas sensibilizadas, existen técnicas ópticas para cuantificar la aglutinación. Las más importantes son la turbidimetría, la nefelometría, la anisotropía angular y la espectroscopía de fotones, basadas todas en la medición de la luz dispersada. En los métodos cuantitativos se utilizan partículas de menor tamaño ( $0.01\text{-}0.3 \mu\text{m}$ ) (Molina y Galisteo 2005).

### **El problema de la estabilidad coloidal**

Uno de los requerimientos básicos para que un complejo látex-proteína sea aplicable al diagnóstico clínico es su estabilidad coloidal, y es la causa por la que una buena parte de ellos fracasan. El problema más serio de los ensayos de inmunoaglutinación de partículas de látex es que el sistema pierde su estabilidad coloidal después que se adsorbe el anticuerpo. Esto puede provocar la agregación no específica de las partículas. El punto isoeléctrico de la mayoría de las moléculas IgG policlonales empleadas en los inmunoensayos de látex está en el rango 6.5-8.5, además de que ellas presentan una baja densidad de carga. Por tanto, cuando las partículas se

recubren de IgG el proceso de aglutinación no específica tiene lugar bajo condiciones fisiológicas (pH 7.4 y fuerza iónica 150 mmol/L), donde no hay casi repulsión electrostática entre ellas (Molina y Galisteo 2005).

Estrategias diferentes se han propuesto para resolver el problema del diagnóstico falso que resulta de la aglutinación no específica de los reactivos de látex. Una de las más relevantes es el post-tratamiento para cubrir las partes no ocupadas de la superficie del látex con una segunda proteína inactiva que actúa como estabilizador (Okubo y col 1987). En muchas ocasiones la biomolécula empleada es la albúmina de suero bovina (BSA), una proteína globular que es capaz de acentuar la estabilidad coloidal de las partículas recubiertas de anticuerpo. La molécula de BSA, al igual que la de origen humano (HSA), es una proteína muy cargada a pH fisiológico. Ella suministra estabilización electrostática a las partículas recubiertas de anticuerpo (Peula y col 1994, 1995).

En un inmunoensayo de aglutinación de látex el objetivo es permitir selectivamente la aglutinación en presencia del analito. El reactivo inicial debe ser sensible, específico, estable y reproducible en su comportamiento. Para poder lograr esto, un balance muy delicado entre las fuerzas de atracción y repulsión debe alcanzarse mediante la manipulación del pH y la fuerza iónica del medio de reacción, así como también mediante el grado de recubrimiento de la superficie de la partícula por las moléculas específicas y no específicas, de manera que las fuerzas repulsivas mantengan la estabilidad de las partículas en un rango corto (menor que la distancia puente de una molécula de anticuerpo) mientras que al mismo tiempo mantenga energía repulsiva menor que la energía de unión de antígeno y anticuerpo (Molina y Galisteo 2005).

### **Validación**

La validación de un ensayo de látex-aglutinación en lámina, como todos los diagnosticadores, incluye varias etapas, la primera de las cuales es el diseño y justificación de la factibilidad de su producción. El paso siguiente es el establecimiento de los parámetros óptimos, conocido como estandarización, la cual tiene como prioridades el tamaño de las partículas de látex, la calidad del inmunorreactante para el recubrimiento, las condiciones de pH y fuerza iónica a emplear y, muy especialmente, el grado de sensibilización con el inmunorreactante para lograr que el reactivo funcione en el rango analítico deseado, la preparación de los controles y la estabilización de las partículas. Por tratarse de un ensayo cualitativo, en el que los resultados se

expresan como negativo/positivo, los parámetros fundamentales que se utilizan para demostrar la fiabilidad de los resultados del ensayo, etapa comúnmente referida como validación, son: el valor de discriminación, ancho de la zona gris, sensibilidad, especificidad, valores predictivos y el índice kappa (Ochoa y col 2000).

El valor de discriminación y la zona gris son parámetros relacionados. El primero se refiere a la concentración del analito por encima de la cual se obtiene un resultado positivo. Alrededor del valor de discriminación, correspondiente a la concentración del analito en la que se obtenga el 50 % de resultados positivos, se encuentra la zona gris, la cual se extiende entre el 5 % y el 95 % de resultados positivos, y cuyo ancho especifica la precisión del ensayo. La sensibilidad se define como la proporción de muestras positivas correctamente identificadas por la prueba, y es una indicación de cuán efectivo es el diagnosticador en reconocer a los individuos que tienen una enfermedad o condición particular. La especificidad se define como la proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas e indica cuán efectivo es el diagnosticador en reconocer a los individuos que no tienen la enfermedad o la condición particular que se quiere detectar. Deben estudiarse al menos 100 muestras representativas de la población sobre la que la técnica será usada, en las que se deben encontrar muestras con diverso grado de positividad y muestras negativas obtenidas de individuos con enfermedades relacionadas. Los valores óptimos de sensibilidad y especificidad dependen de los propósitos de la técnica. Generalmente, una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad, y viceversa, por lo que hay que establecer un compromiso sobre los valores deseados. El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad que tiene un individuo de estar enfermo cuando el resultado del ensayo es positivo, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de no estar enfermo cuando el resultado del ensayo es negativo. Ambos valores están relacionados con la sensibilidad y especificidad clínicas del diagnosticador. La capacidad del ensayo para detectar correctamente todos los positivos y negativos es lo que se define como eficiencia óptima del ensayo (Ochoa y col 2000, CECMED 2007).

Los estudios de concordancia se refieren a estudios comparativos en los cuales una serie de muestras de pacientes o individuos se analizan comparativamente con el diagnosticador en estudio y otro diagnosticador o método de referencia. Es recomendable utilizar entre 50 y 100 muestras en dependencia del tipo y propósito del ensayo y que las concentraciones de las muestras se encuentren distribuidas en un rango clínicamente relevante. En tales estudios se

emplea el índice kappa. Tanto el índice kappa como los valores predictivos pueden variar en dependencia de la prevalencia de la enfermedad o condición particular que se quiera investigar en el área donde se usará y en un tiempo determinado (Ochoa y col 2000, CECMED 2007).

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Corazones y sueros de pacientes**

Los corazones humanos provenientes de necropsias fueron suministrados por el Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital General Docente “Calixto García”, con consentimiento informado de los familiares. Los órganos se extrajeron hasta 24 horas después del fallecimiento y se excluyeron aquellos cuyas muertes fueron provocadas por IAM, cáncer o infecciones. En el plasma se confirmó la no presencia de anticuerpos anti-HIV y de antígeno superficial de hepatitis B en el Banco de Sangre Provincial de Ciudad Habana y los órganos se mantuvieron a -70 °C hasta el momento de su procesamiento.

Se analizaron 600 muestras de suero procedentes de 85 pacientes que fueron hospitalizados en la Sala de Cuidados Intensivos del Hospital General Docente Calixto García y en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular de Ciudad Habana, en el período 1989-1991, con diagnóstico presuntivo de isquemia coronaria. En estos enfermos se confirmó y certificó en las historias clínicas el diagnóstico de IAM y No IAM por el personal médico autorizado, según los criterios establecidos, en los que tuvieron en cuenta el estado del individuo, los estudios electrocardiográficos, los niveles de la TGO y otros factores. Se tomaron muestras de sangre de los enfermos al momento del ingreso (tiempo cero), a las 2 y 6 horas del ingreso y de ahí en adelante 4 muestras más cada 6 horas. Del Hospital Calixto García se obtuvieron muestras adicionales de 6 pacientes, cuatro que recibieron tratamiento trombolítico, a los que se les tomaron muestras de suero antes y a los 90 minutos de iniciado el procedimiento, y dos que sufrieron reinfarto (Anexo 1). Este estudio fue aprobado por los Comités de Ética de ambas instituciones.

### **2.2 Animales para las inmunizaciones**

Los conejos empleados en las inmunizaciones fueron suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana) y los carneros procedían del vivario de la Empresa de Producción de Biológicos “Carlos J. Finlay”, La Habana, donde fueron mantenidos todos los animales el tiempo que duraron los experimentos, según las normativas internacionales establecidas en la “Guía para los cuidados y el empleo de los animales de laboratorio” establecida por la Comunidad Económica Europea (EEC 1986, Louhmies 2002).



## 2.3 Columnas, equipos y reactivos

Las cromatografías se realizaron en columnas pre-empacadas comerciales con empleo del Sistema FPLC (Armeshan Biosciences, Suecia). La concentración de los volúmenes líquidos se llevó a cabo mediante ultrafiltración en una celda rotatoria AMICON (Millipore, EEUU). Las electroforesis, focalización isoelectrica y curva de titulación se efectuaron en el sistema Phast System (Armeshan Biosciences, Suecia) utilizando PhastGel y los programas recomendados por el proveedor; los espectros de absorción y lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro PV 8740 UV/VIS Scanning (Philips, Holanda). Las lecturas de los ensayos tipo ELISA se realizaron en un lector de microplacas Organon Teknika (Alemania).

La IgG humana utilizada como patrón y la albúmina humana al 10 % fueron suministradas por la Planta de Hemoderivados "Aristides Viera" (Arroyo Arenas, La Habana); las IgG purificadas de conejo y carnero, por el CENPALAB; la hemoglobina humana y los anticuerpos anti-hemoglobina humana por el Instituto de Gastroenterología; la mezcla de suero humano normal negativo a factores reumatoides, por el Banco de Sangre Provincial de Ciudad Habana.

Se utilizaron como reactivos de referencia los juegos diagnósticos RAPITEX (Behring, Alemania) y MIOLEX (Orion, Finlandia) para mioglobina, además del reactivo de látex para hemoglobina HEMOLEX (Behring, Alemania). Las partículas de látex utilizadas (0.81  $\mu\text{m}$  de diámetro) procedían de Rhone Poulenc (Francia). Las placas de microtitulación para los ensayos tipo ELISA eran de poliestireno (12x8) (Titertek, Finlandia).

Todos los reactivos químicos utilizados, de grado analítico, procedían de las firmas Sigma y BDH.

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Estudios bioinformáticos

El alineamiento y comparación de secuencias de las mioglobinas equina, de carnero y conejo, con la de la mioglobina humana, se realizó con el algoritmo FASTA (Pearson 1990) implementado en el programa BioEdit (Hall 1999). En el estudio de anfipaticidad se empleó el algoritmo optimizado por Margalit y col (1987) con el programa AMPHI escrito en FORTRAN 77; en el de protuberancia de las Mbs humana y equina, el algoritmo ELLIPSE desarrollado por Thornton y col (1986). La estructura tridimensional de la mioglobina humana se obtuvo mediante la técnica de modelación por homología (Blundell y col 1988). Se seleccionó una Mb

humana recombinante contenida en la base de datos PDB (del inglés "Protein Data Base") con el código 2mm1 (Berman y col 2000), determinada con una resolución de 2.8 Å por Hubbard y col (1990). La sustitución de residuos y la correcta orientación de las cadenas laterales se realizaron con el programa Swiss PDBViewer (Guex y Peitsch 1977). La estructura de la Mb equina se obtuvo de la base de datos PDB con el código 1nfp y se corresponde con la de la proteína salvaje. Dicha estructura se obtuvo por la técnica de difracción de rayos-x con una resolución de 1.9 Å (Copeland y col 2003). El estudio de superposición de las Mbs humana y equina se realizó con el programa SWISS PDBViewer (Guex y col 1999).

### **2.4.2 Purificación de Mb humana**

#### **Preparación del extracto de miocardio**

Se utilizó el método propuesto por Hapner y col (1968). El músculo cardíaco se liberó de grasa y tejido conectivo, se cortó en pedazos pequeños, se pesó y por cada gramo de tejido se añadió 1.5 mL de una solución de sulfato de amonio al 70 % de saturación y EDTA al 0.2 % en solución amortiguadora de fosfato 0.1 mol/L pH 6.5. La mezcla se homogeneizó en un homogeneizador de cuchillas SM-8 Aka Electric durante 45 segundos con intervalos de reposo de cinco minutos, hasta que la preparación tuvo la consistencia adecuada. El homogeneizado se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1 y se dializó exhaustivamente contra agua destilada fría. Se le determinó el contenido de proteínas y se concentró hasta 60 mg/mL (ó 100 mg/mL) por ultrafiltración con membrana de valor de corte 5000 Da y a una presión de 3.5 bar. Seguidamente, el extracto se dializó contra solución amortiguadora de Tris-HCl 0.2 mol/L pH 8.6 y se preservó con azida sódica a una concentración final del 0.2 %. Todos los pasos se realizaron a 4 °C. A esta preparación se le denominó extracto de miocardio (E).

#### **Cromatografía de exclusión molecular en Superose 12**

Se llevó a cabo en una columna pre-empacada con Superose 12 HR 10/30 a la que se aplicaron en cada corrida 500 µL (30 mg) del extracto de miocardio (60 mg/mL). En la recromatografía se aplicaron también 500 µL de las fracciones seleccionadas (y concentradas) del intercambio iónico en Mono Q. Las corridas se realizaron con solución amortiguadora de Tris-HCl 0.2 mol/L pH 8.6 con un flujo de 0.5 mL/minuto, y se colectaron fracciones de 1 mL.

### **Cromatografía de intercambio aniónico en Mono Q**

Las fracciones correspondientes al pico III obtenido en la filtración en Superose 12 se aplicaron a una columna pre-empacada con Mono Q HR 5/5. Se hizo primero una corrida isocrática durante 10 minutos con solución amortiguadora de Tris-HCl 0.06 mol/L pH 8.6. Seguidamente, se aplicó durante 10 minutos un gradiente lineal de fuerza iónica preparado con Tris-HCl 0.06 mol/L pH 8.6 (tampón inicial) y Tris-HCl 0.06 mol/L NaCl 1 mol/L pH 8.6 (tampón final). Se aplicaron 500  $\mu$ L en cada corrida a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto y se colectaron fracciones de 1 mL. Las fracciones seleccionadas correspondientes a unas 6 corridas se mezclaron y concentraron por ultrafiltración, como ya se describió en 2.3.1.1, para ser recromatografiadas en Superose 12.

### **Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose Fast Flow**

Se utilizó DEAE-Sepharose Fast Flow en una columna K26/70 equilibrada con Tris-HCl 0.06 mol/L pH 8.6. Se aplicaron 10 mL (100 mg de proteína/mL) del extracto y la corrida se realizó a un flujo de 10 mL/min. La elución y el lavado de la columna se hicieron con Tris-HCl 0.05 mol/L NaCl 1 mol/L pH 8.6. Las fracciones colectadas de 10 mL correspondientes a cada pico fueron mezcladas, después de desechar la primera y la última.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las fracciones obtenidas en las cromatografías y el extracto de miocardio fueron evaluados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, según Laemmli (1970), en un gradiente del 10-15 % de acrilamida con un entrecruzamiento del 2 % en un sistema discontinuo. Las dimensiones del PhastGel fueron las siguientes: 43 x 50 x 0.45 mm (ancho x largo x espesor) con dos zonas, una de 13 mm de gel concentrador y otra de 32 mm de gel separador. La solución amortiguadora del gel fue acetato 0.112 mol/L y Tris 0.112 mol/L pH 6.4; el de la corrida, Tricine 0.2 mol/L, Tris 0.2 mol/L y SDS 0.55 % pH 8.1, incluido en tiras de agarosa al 3 % de 4 x 10 x 6 mm (ancho x largo x espesor). Las muestras se trataron con SDS al 1 % durante 5 minutos a 100 °C en baño de agua y posteriormente se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) a 16000 g durante 10 minutos para eliminar el material insoluble. Se aplicaron 200 ng de cada muestra. La tinción de las bandas se realizó con nitrato de plata al 0.25 %.

## Cálculo del rendimiento

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry y col (1958). Se prepararon y utilizaron, además de la curva de calibración con BSA, una curva de referencia con Mb equina comercial construida al efecto. Conociendo que el músculo cardíaco humano contiene 2.4 mg de Mb por g de masa, según Swaanenburg y col (2001), y la cantidad de la globina pura obtenida a partir de los gramos de tejido procesado, se calculó el rendimiento de los dos métodos de purificación utilizados.

### 2.4.3 Caracterización de la fracción obtenida en la recromatografía en Superose

#### Estudio de focalización isoelectrica

Se desarrolló sobre el soporte PhastGel de electroenfoque de dimensiones similares a las descritas en el epígrafe anterior, en un gradiente lineal de pH 3-9. Primeramente, se hizo una precorrida para la formación del gradiente. A continuación, se aplicaron aproximadamente 200 ng de cada muestra y se efectuó la corrida (15 °C, 50 Vh) y la tinción con Azul Coomassie R-250. La determinación aproximada del pI se efectuó midiendo la distancia de migración de la proteína desde el cátodo (punto de aplicación) e interpolando este valor en la recta de calibración para un rango de 3-9. De cátodo a ánodo las proteínas utilizadas fueron:

lectina de lenteja(básica)	8.65	anhidrasa carbónica humana	6.55
lectina de lenteja (media)	8.45	anhidrasa carbónica bovina	5.85
lectina de lenteja(ácida)	8.15	β-lactoglobulina A	5.20
mioglobina (básica)	7.35	Inhibidor de tripsina de soya	4.55
mioglobina (ácida)	6.85	amiloglucosidasa	3.50

#### Estimación de la masa molecular

La estimación de la masa molecular se realizó mediante dos técnicas: cromatografía en gel y electroforesis SDS-PAGE. La primera se llevó a cabo en columna de Superose 12, bajo las condiciones descritas en 2.3.1.2. Se emplearon como proteínas patrones: inmunoglobulina G humana (150 000 Da), albúmina humana (69 000 Da), mioglobina equina (16 000 Da), citocromo *c* de corazón equino (12 300 Da) y glucagón (3 000 Da). Se determinaron las constantes de distribución ( $K_{av}$ ) con empleo de la fórmula:  $V_e - V_o / V_c - V_o$  para las muestras y las proteínas patrones y se calculó la masa molecular de la Mb interpolando en la curva de calibración los valores de  $K_{av}$  de las proteínas patrones vs logaritmo de sus masas moleculares

(Anexo 2). La estimación de la masa molecular de la Mb humana purificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó bajo las condiciones ya descritas en 2.4.2.5, utilizando los patrones de Armeshan Biosciences en el intervalo 14 300-71 500 Da: fosforilasa B 97 000 Da, albúmina bovina 67 000 Da, ovoalbúmina 43 000 Da, anhidrasa carbónica 30 000 Da, inhibidor de tripsina 20 100 Da y  $\alpha$ -lactoalbúmina 14 400 Da. Estos fueron reconstituidos en tampón fosfato de sodio 0.01 mol/L, que contenía 1 % de SDS y 0.1 % de 2-mercaptoetanol. Se calcularon las movilidades relativas (RF) de las muestras y las proteínas patrones mediante la fórmula distancia de la banda con respecto al origen / distancia del origen a un punto de referencia. La masa molecular se calculó interpolando los valores de RF en la curva de calibración: valores de RF de las proteínas patrones vs logaritmo de sus masas moleculares (Anexo 3).

### **Espectro de absorción y cálculo del RZ**

Se determinó de forma automática en el espectrofotómetro, el espectro de absorción de las fracciones seleccionadas correspondientes a la Mb humana purificada, ajustada su concentración a 4.15 mg/mL, barriendo una gama de longitudes de onda desde 220 hasta 600 nm. Con los valores de absorbancia correspondientes a 418 nm y 280 nm se calculó el RZ de la oxiMb, para utilizarlo como criterio de pureza de la globina (Brown 1961, Hanania y col 1966).

### **Estudios de antigenicidad**

La identificación inmunoquímica de la Mb (y la Hb) en las fracciones cromatográficas se realizó mediante ensayos de látex-aglutinación con los reactivos RAPITEX y MIOLEX, y HEMOLEX, respectivamente, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para estimar el contenido de las hemoproteínas en las fracciones cromatográficas se hicieron diluciones seriadas dobles de las fracciones ( $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ , etc.).

#### **2.4.4 Preparación de anticuerpos anti-mioglobina humana** **Preparación del conjugado mioglobina humana-hemocianina**

En 1 mL de tampón fosfato pH 7 se disolvieron 5 mg de Mb humana y se les añadió 2 mg de hemocianina (KLH, de la Sigma) en 1 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.85 %). A esta mezcla se le incorporó poco a poco con agitación 100  $\mu$ L de glutaraldehído (grado II, Sigma) al 2.5 % a temperatura ambiente. Se dejó reposar en la oscuridad a esa temperatura durante 24

horas. Por último, se ajustó la concentración a 200 µg/mL y se dispensó en alícuotas de 1 mL que se conservaron a -70 °C.

### **Inmunizaciones**

Se inmunizaron tres conejos y nueve carneros, a los que previamente se les hizo una extracción de sangre para obtener los sueros pre-inmunes. En los conejos el esquema demoró aproximadamente dos meses. Se hicieron cinco inoculaciones de 3 mg de Mb humana por la vía subcutánea, en cinco sitios del lomo del animal, con intervalos de 21 días entre la primera y la segunda dosis y de diez días entre las 3 restantes. La primera vez el inmunógeno se mezcló con adyuvante completo de Freund (ACF) y las siguientes, con el incompleto (AIF). Siempre se inoculó un volumen de 1 mL. El sangrado de los animales se realizó a los 10 días de la última inoculación por la arteria central de la oreja. En tres de los carneros el esquema fue similar excepto que las inmunizaciones se hicieron mensualmente. Los otros seis carneros fueron inmunizados subcutáneamente con el conjugado Mb humana-KLH, empleando 200 µg mezclados con ACF. Al mes se les administró una dosis similar con AIF. Transcurridas 2 semanas se les hizo una extracción por la vena yugular. Si el título fue satisfactorio, durante los siete días subsiguientes se les extrajo 200-250 mL de sangre. Con vistas a la obtención de segundos anticuerpos que reconocieran la IgG de conejo y de carnero en los ELISAs, se inmunizaron un carnero con IgG de conejo y un conejo con IgG de carnero. Los animales se inocularon intramuscularmente con cinco dosis de 1 mg a intervalos aproximados de un mes. La primera dosis se suministró con igual volumen de ACF y las subsiguientes, con el AIF. Se hicieron sangrados periódicos para conocer el grado de respuesta de los animales. Finalmente, se desangraron a los diez días de la última inoculación. Los sueros sanguíneos se prepararon dejando reposar la sangre recién extraída 1 hora a 37 °C y después toda la noche a 4 °C para al día siguiente centrifugarla 10 minutos a 3,000xg, obtener los sueros y conservarlos a -70 °C hasta el momento de su utilización. Los sueros normales de conejo y carnero se obtuvieron mezclando los sueros pre-inmunes.

## Titulación de anticuerpos

### Preparación de los conjugados anti-IgG de conejo y de carnero-peroxidasa.

Se obtuvo la fracción gammaglobulínica de los antisueros anti-IgG de conejo y anti-IgG de carnero diluyéndolos al doble con 5 mL de solución salina fisiológica y se adicionaron por separado gota a gota 5 mL de una solución saturada de sulfato de amonio. Se mantuvo en agitación durante 1 hora y luego se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Se centrifugó cada una de las preparaciones, se lavó 3 veces el precipitado con una solución de sulfato de amonio al 40 % de saturación, se restituyó la gammaglobulina con agua destilada y se dializó contra solución salina fisiológica. Los conjugados se prepararon por el método del periodato (Nakane y Kawaoi 1974). Para ello se disolvieron 5 mg de peroxidasa de rábano picante grado VII (Sigma) en 1.1 mL de agua destilada. Se le determinó la absorbancia a 403 y 280 nm para comprobar su RZ. A 1 mL de la solución de peroxidasa se le adicionó 0.2 mL de periodato de sodio 0.1 mol/L, e inmediatamente adquirió la solución coloración verdosa. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se dializó la mezcla toda la noche contra 500 mL de tampón acetato 0.001 mol/L pH 4.4. Paralelamente, se dializó 1 mL de la fracción gammaglobulínica correspondiente que contenía 6 mg de proteínas contra 500 mL de tampón bicarbonato 0.05 mol/L pH 9.5. Las diálisis se realizaron a 4 °C. Al día siguiente se llevaron a temperatura ambiente y se mezclaron la enzima y los anticuerpos en la proporción 1:1. Inmediatamente, el pH de la mezcla se llevó a 9.5 con bicarbonato de sodio 0.2 mol/L y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Al cabo de este tiempo, la mezcla se enfrió a 4 °C y se le añadió 0.05 mL de una solución al 0.5 % de borhidruro de sodio, recién preparada fría. Después de 2 horas de incubación a 4 °C se dializó el conjugado contra 500 mL de tampón Tris 0.1 mol/L y NaCl al 0.9 % pH 7.4 con 3 cambios del tampón. Para su conservación se mezcló el conjugado con un volumen igual de glicerol. Se le añadió albúmina de suero bovina, inhibidor de proteasa (PMSF) y timerosal para una concentración final del 1 %, 0.01 mol/L y 0.01 %, respectivamente. Se distribuyó cada uno de los conjugados en alícuotas de 50 µL, se rotularon y guardaron a -20 °C. La evaluación de los conjugados se realizó mediante ELISA directo.

### **ELISA directo para la titulación de los conjugados**

Se tapizaron los pozos de la placa de poliestireno con 100  $\mu\text{L}$ , a razón de 10  $\mu\text{g}$  de las IgG por mL, a 4 °C durante toda la noche y se bloquearon con 150  $\mu\text{L}$  de BSA al 2 % a 37 °C 1 hora. Se lavó la placa cuatro veces con solución salina fosfatada (PBS) pH 7.4 que contenía Tween 20 0.05 % (PBS-T) y se añadieron una serie de diluciones (1/500-1/20 000) de cada uno de los conjugados para hacerlos reaccionar 1 hora con su inmunoglobulina G homóloga. Se realizó un nuevo lavado y se reveló la reacción con la mezcla peróxido de hidrógeno-ortofenilendiamina (OPD) preparada al momento de su utilización en tampón citrato pH 5.5. Se incubó durante 30 minutos en total oscuridad, se paró la reacción con ácido sulfúrico al 12.5 % (50  $\mu\text{L}$ ) y a los 5 minutos se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 492 nm. Estos conjugados se utilizaron en los ELISA para la titulación de los anticuerpos anti-Mb humana obtenidos en conejo y carnero.

### **ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-Mb**

El ensayo de los anticuerpos se realizó según Voller y col (1979). Se hicieron recubrimientos con las Mbs humana y equina y la Hb humana, en tampón carbonato/bicarbonato 50 mmol/L pH 9.6 a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$  por pozo, y se incubaron las placas toda la noche a 4 °C. Las placas fueron bloqueadas con 150  $\mu\text{L}$  de BSA al 2 % durante 1 hora a 37 °C. La placa se lavó 4 veces con solución PBS-T pH 7.4 y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de los sueros diluidos convenientemente, incubándola 1 hora a 37 °C. A continuación se lavó bajo las condiciones ya descritas y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del conjugado correspondiente. Estas diluciones fueron 1/10 000 y 1/5 000 para los conjugados anti-IgG de conejo y de carnero, respectivamente, que se seleccionaron en un estudio previo, por ser las diluciones que rindieron las mayores diferencias entre los sueros preinmunes y los de los animales inmunizados con Mb humana. La placa se incubó 1 hora a 37 °C, se lavó y se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla peróxido de hidrógeno-OPD, y se incubó en la oscuridad 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico al 12.5 % y se leyeron las absorbancias a 492 nm. Se tomó como criterio de positividad una absorbancia igual o mayor que 0.3.



## **Inmunodifusión doble**

Para la titulación de los anticuerpos anti-Mb y anti-Hb se llevaron a cabo inmunodifusiones dobles bidimensionales, de acuerdo a Ouchterlony (1970). Para ello, se cubrieron láminas portaobjetos con agarosa al 1 % y se enfrentaron los antisueros y los anticuerpos purificados correspondientes de carnero a la Mb y la Hb humanas (0.1 mg/mL). Se hicieron diluciones seriadas dobles de los antisueros y de los anticuerpos purificados correspondientes para determinar los títulos.

### **2.4.5 Purificación de los anticuerpos**

#### **Cromatografía en Sepharose 4B**

Se utilizó Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno de la Amershan Biosciences. Un gramo de peso seco de la resina fue hinchado en 50 mL de HCl 1 mmol/L durante 15 minutos, lavándose el gel con 400 mL de la misma solución sobre un filtro de vidrio de porosidad G-3 y después con 50 mL de la solución de acoplamiento (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 mol/L NaCl 0.5 mol/L pH 8.3). Inmediatamente, se adicionó el ligando (7 mg de Mb humana o equina en 6 mL del tampón de unión) y se incubó a temperatura ambiente y con agitación manual durante dos horas. A continuación, se adicionó la solución de bloqueo (Tris-HCl 0.1 mol/L pH 8) y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se lavó la matriz con solución de unión y acetato 0.05 mol/L pH 4, de forma alternada cinco veces, y se equilibró finalmente con solución amortiguadora de fosfato 0.1 mol/L pH 7, quedando lista para ser usada. Para llevar a cabo la purificación de los anticuerpos se adicionó el suero del animal a la matriz y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se extrajo el suero y se lavó la matriz con glucosa 1 mmol/L hasta obtener una lectura a 280 nm menor de 0.03. Entonces se eluyó con ácido acético 0.5 mol/L y se recogieron fracciones de 6 mL, cada vez, hasta obtener lecturas menores de 0.03 a 280 nm. Por último, se equilibró la matriz con la solución de fosfato para ser reutilizada. Los anticuerpos recuperados fueron neutralizados inmediatamente con Tris saturado y congelados hasta su empleo. Se determinó su concentración por el método espectrofotométrico para conocer la cantidad de anticuerpos recuperados, utilizando los coeficientes de extinción de la IgG de conejo ( $\sum_{1\%,1\text{cm}}=16$ ) y de carnero ( $\sum_{1\%,1\text{cm}}=14$ ) (Tijssen 1985).

## **Inmunoabsorción**

### **Preparación del inmunoabsorbente**

Para la preparación del inmunoabsorbente se pesaron 250 mg de Mb de corazón equino (BDH Chemicals, LTD), se disolvieron en 5 mL de solución amortiguadora de fosfato 0.1 mol/L pH 7 y se añadió 1 mL de solución acuosa de glutaraldehído al 2.5 %, gota a gota con agitación suave. El gel así formado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas y se homogeneizó en el equipo homogeneizador. Al cabo de este tiempo se lavó con agua destilada repetidamente y se eliminó el sobrenadante por centrifugación, hasta que dio a 280 nm una lectura inferior a 0.03 (Fuchs y Sela 1986). Se equilibró el gel para lo cual se lavó dos veces con solución amortiguadora de glicina 0.1 mol/L pH 2.5 durante una hora. Se equilibró de nuevo con la solución de fosfato, se preservó con azida sódica al 0.2 % de concentración final y se conservó a 4 °C hasta el momento de su empleo. Se obtuvo un volumen de gel de aproximadamente 5 mL. Todas las centrifugaciones se realizaron a 3,000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El gel a escala de planta piloto se preparó de igual forma pero quintuplicando las cantidades de los reactantes, es decir, se partió de 1,250 mg de Mb equina y se obtuvieron aproximadamente 25 mL del inmunoabsorbente.

### **Inmunoabsorción**

Al inmunoabsorbente se le añadió 20 mL de suero (ó 100 mL en el pilotaje) previamente titulado, se mezcló bien y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente 3 horas ó a 4 °C toda la noche con agitación suave constante. Entonces se centrifugó y se extrajo el suero no absorbido. El gel se lavó repetidamente con glucosa 1 mmol/L hasta obtener una lectura menor de 0.03 a 280 nm. A continuación se procedió a desabsorber los anticuerpos unidos a la matriz mediante la adición de 5 mL de glicina pH 2.5 y el mantenimiento de la mezcla con agitación suave durante una hora. Esta operación se realizó varias veces hasta que la absorbancia de los eluatos a 280 nm estuvo por debajo de 0.1. Se mezclaron todas las fracciones y se dializaron contra glicina 0.2 mol/L pH 8.2 hasta que la mezcla de anticuerpos alcanzó ese pH. La concentración de anticuerpos se determinó espectrofotométricamente (ver epígrafe 2.4.4.4.1). Todos los procesos se realizaron a 4 °C y las centrifugaciones a 3,000xg durante 10 minutos. Los anticuerpos se preservaron con azida sódica y se conservaron a -70 °C, habiéndose determinado

su concentración para conocer la cantidad de anticuerpos recuperados. Se equilibró nuevamente el gel con la solución amortiguadora de fosfato pH 7 para ser reutilizado.

#### 2.4.6 Preparación del reactivo de látex-aglutinación en lámina para mioglobina

Los anticuerpos generados en carnero contra el conjugado Mb-KLH y purificados con las Mbs humana y equina, se concentraron por ultrafiltración hasta una determinada concentración y se dializaron contra solución amortiguadora de glicina 0.02 moles/L pH 8. A 1 mL de solución de anticuerpos se añadió 0.1 mL de suspensión al 10 % de partículas de látex de poliestireno de 0.81  $\mu\text{m}$  de diámetro y se agitó durante 2 horas en zaranda a temperatura ambiente. Se adicionó una solución estabilizante de HSA al 10 % hasta una concentración final de 0.2 % y se mantuvo en agitación entre 30 minutos y una hora. Por último, se añadió azida sódica hasta una concentración final de 0.1 %. Se prepararon, en la primera etapa del trabajo, dos reactivos: el A con anticuerpos purificados frente a Mb humana y el B, con anticuerpos purificados frente a Mb equina. En la segunda etapa se trabajó solamente con anticuerpos purificados con la Mb heteróloga. Los reactivos se conservaron a 4 °C.

#### Ensayo de látex-aglutinación en lámina

El procedimiento general empleado para el ensayo de aglutinación en lámina fue el siguiente:

Los reactivos y las preparaciones y muestras de suero se dejaron un tiempo a temperatura ambiente, se depositaron sobre un portaobjetos 50  $\mu\text{L}$  de la muestra o de los controles y 10  $\mu\text{L}$  del medio de absorción de factor reumatoide. Se agitó bien el reactivo de látex e inmediatamente se depositaron 25  $\mu\text{L}$  al lado de la muestra o de los controles. Se mezcló bien con un palillo, se

Tiempo	Codificación
Hasta 1 minuto	++++
Hasta 2 minutos	+++
Hasta 3 minutos	++
Más de 3 minutos y hasta 5 minutos	+
Más de 5 minutos	-

rotó la lámina manualmente unos tres minutos y se observaron los resultados. El control positivo debía producir casi inmediatamente la agregación de las partículas de látex mientras que con el control negativo la suspensión debía mantener su apariencia lechosa. Cuando no se produjo aglutinación inmediata se continuó rotando la lámina durante tres minutos más. El criterio que se adoptó para las lecturas se muestra a la derecha. La velocidad de agregación de las partículas guarda una relación con el contenido de Mb en las preparaciones y muestras de suero.

## **Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos inmovilizados en el látex**

Los reactivos A y B preparados con los anticuerpos anti-Mb humana purificados con Mb humana y Mb equina, respectivamente, fueron ensayados frente a concentraciones diferentes de Mb humana (1 µg, 500 y 100 ng por mL de solución de fosfato pH 7) y frente a muestras de suero, tomadas a diferentes tiempos, de tres pacientes que habían sufrido IAM.

## **Selección de la variante óptima de recubrimiento para el reactivo de látex-aglutinación**

Ya en la segunda parte del trabajo, con los anticuerpos de carnero purificados con mioglobina equina, previamente dializados contra glicina 0.02 mol/L pH 8.2 y con empleo de esta misma solución, se prepararon alícuotas de 1 mL que contenían 400, 200, 100, 50 y 25 µg. A cada tubo se le adicionó 0.1 mL de suspensión de partículas de látex y se procedió de forma similar a la descrita en la sección 2.4.5. Se ensayó la estabilidad de los cinco reactivos en una lámina portaobjetos donde se enfrentó una gota de cada uno de los reactivos con una gota de la solución reguladora de glicina pH 8.2. A continuación se enfrentaron los reactivos a concentraciones diferentes de Mb humana (50, 100, 250, 500, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500 y 3 000 ng/mL) que fueron preparadas a partir del pico II de la cromatografía en DEAE-Sepharose Fast Flow en SHN. Se seleccionó el reactivo con la menor concentración de anticuerpos que fue capaz de dar aglutinación franca de las partículas en el intervalo de 1-3 minutos frente a las concentraciones patológicas (100 - 1 500 ng/mL). Una vez seleccionada la variante óptima del reactivo, con empleo de cantidades proporcionales a las usadas en este ensayo, se prepararon 3 lotes, bajo condiciones similares a las descritas. De aquí en adelante llamaremos a este reactivo MIOLÁTEX.

## **Preparación de la solución de absorción de factores reumatoides y de los sueros controles**

Se preparó una solución bloqueadora de IgG humana polimerizada por calor que fue capaz de neutralizar 400 UI de factores reumatoides (FRs). En la preparación de los controles se utilizó el "pool" de sueros (SHN, suministrado por el Banco de Sangre Provincial Ciudad Habana), negativo a la presencia de FRs, con un contenido de Mb de  $50 \pm 10$  ng de Mb por mL, determinado mediante un radioinmunoensayo comercial (CIS-International, USA). A este SHN se le adicionó la Mb humana purificada para alcanzar una concentración de 250 ng/mL. El SHN fue el control negativo. A los 3 reactivos se les adicionó azida sódica para su preservación (concentración final de 0.1 %). Los controles positivo y negativo preparados se ensayaron frente

a los reactivos comerciales MIOLEX y RAPITEX, y al MIOLÁTEX, con los que debía producir, el primero, una aglutinación franca casi inmediata; el segundo, no aglutinación. De forma inversa, el reactivo MIOLÁTEX se evaluó frente a los controles positivo y negativo del MIOLEX y del RAPITEX.

#### **2.4.7 Evaluación del desempeño del reactivo MIOLÁTEX en el diagnóstico de IAM**

Para evaluar la precisión del método se determinaron el valor de discriminación y la zona gris del MIOLÁTEX, utilizando como material de referencia el control positivo del juego de reactivos RAPITEX (140 ng/mL). A partir del mismo, con empleo de HSA al 0.2 %, se hicieron preparaciones que contenían: 125, 120, 110, 100, 90, 80 y 70 ng/mL). A cada una de ellas se le determinó 20 veces la reactividad frente al reactivo de látex-aglutinación MIOLÁTEX y se calculó el porcentaje de resultados positivos (ver Anexo 4).

En el estudio del desempeño se tomó como método de referencia el diagnóstico final de IAM y No IAM, confirmado y certificado por el personal médico autorizado.

Un primer estudio, con muestras de 25 pacientes con sospecha de IAM, tomadas en el momento de la admisión y a las 2 y 6 horas del ingreso, evaluó el desempeño del MIOLÁTEX frente a un juego de reactivos similar, el MIOLEX, compuesto por:

1. Soporte plástico con 2 campos de reacción que contiene a la derecha un látex seco (prueba) y a la izquierda un látex seco (control).
2. Control negativo: "Pool" que contiene 60 ng de Mb por mL.
3. Control positivo: "Pool" que contiene 250 de Mb por mL.

Se procedió de la manera siguiente, según las instrucciones del fabricante:

1. Se esperó que los reactivos y sueros tuvieran la temperatura ambiente.
2. Se adicionaron 30  $\mu$ L de suero y una gota del control positivo MIOLEX sobre los campos prueba y control.
3. Se esperó 30 ó 40 segundos.
4. Se mezcló cuidadosamente con una varilla en el área circular.
5. Se rotó la placa y se esperó aglutinación durante 3 minutos.

Dado que el reactivo MIOLEX utilizado no incluye solución de absorción de factores reumatoides, se utilizó la solución bloqueadora de FR (10 µL) de la EPB Finlay para evitar esta interferencia. El criterio final adoptado para las lecturas con el MIOLEX y el MIOLÁTEX fue una aglutinación definida hasta 3 minutos.

Con las 600 muestras de suero procedentes de los 85 pacientes que fueron hospitalizados con sospecha de IAM se estudió la correspondencia de los resultados del MIOLÁTEX frente al diagnóstico final de IAM y No IAM. Se determinó su sensibilidad, especificidad, valores predictivos e índice kappa al momento de la admisión y a las 2 y 6 horas del ingreso.

Con vistas a semicuantificar los niveles de mioglobina en 38 pacientes en los que fue posible precisar el momento del inicio del dolor precordial, así como a cuatro de ellos que recibieron tratamiento trombolítico, se hicieron diluciones de los sueros tomados a los diferentes tiempos, y se adoptó el criterio siguiente:

Aglutinación hasta la dilución del suero	Corresponde a una concentración mínima en ng/mL
1:1	100
1:2	200
1:4	400
1:8	800
1:10	1 000
1:16	1 600

#### **2.4.8 Tratamiento trombolítico**

Se administró 100 mg de hidrocortisona por vía endovenosa previo a la estreptoquinasa, la cual se administró (1.5 millones de unidades) en las primeras 12 horas del inicio de los síntomas, diluida en 100 mL de salina fisiológica o dextrana al 5 % en infusión durante 1 hora. Después se administró 0.5 g de aspirina por vía oral durante 21 días. Se estudiaron cuatro pacientes a los que se les tomaron muestras de suero, antes y a los 90 minutos de comenzado el tratamiento, y hasta que los valores descendieron a la normalidad. Se estimó la concentración de Mb en los sueros mediante la dilución límite de aglutinación con el MIOLÁTEX.

#### **2.4.9 Determinación de TGO**

Se midió al momento de la admisión y cada 12 horas durante tres días, según Roca y col (1985), con el reactivo Beringwerke A.G. Hanburg (Alemania).

#### 2.4.10 Procesamiento de los datos

Para el tratamiento de los resultados por triplicado en los ensayos de ELISA se utilizaron los estadígrafos de distribución y dispersión media y desviación estándar. Se realizaron análisis de varianza de clasificación simple para probar la igualdad entre los promedios de los grupos. Para las comparaciones se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan (Sigarroa 1985).

Para validar el MIOLÁTEX, se determinó el valor de discriminación y la zona gris y se calcularon la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), así como la eficacia y el índice kappa (Ochoa y col 2000), dando así cumplimiento a las regulaciones del CECMED (2007) para la evaluación del desempeño de diagnosticadores cualitativos:

$$\text{VPP} = \frac{\text{Pacientes con IAM y pruebas positivas}}{\text{Todos los pacientes con pruebas positivas}}$$

$$\text{VPN} = \frac{\text{Pacientes sin IAM y pruebas negativas}}{\text{Todos los pacientes con pruebas negativas}}$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Pacientes con IAM y pruebas positivas}}{\text{Todos los pacientes con IAM}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Pacientes sin IAM y pruebas negativas}}{\text{Todos los pacientes sin IAM}}$$

$$\text{Eficacia} = \frac{\text{Pacientes con IAM y pruebas positivas} + \text{pacientes sin IAM y pruebas negativas}}{\text{Todos los pacientes estudiados}}$$

El coeficiente kappa (K) se determinó por el software estadístico Vassar Starts y se valoró según los márgenes propuestos por Ochoa (2000):

Valoración del índice kappa (K)	
Valor de K	Concordancia
< 0,20	Deficiente
0,21-0,40	Regular
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
0,81-1,00	Muy buena

Con el objetivo de comprobar si la prueba de MIOLÁTEX estaba asociada con el diagnóstico definitivo del paciente, se llevaron a cabo además análisis de tablas de contingencia 2x2 con empleo del estadístico G (Sigarroat 1985) a los diferentes intervalos de tiempo en que se realizaron las observaciones.



## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Primera parte.

Esta etapa fue principalmente una investigación de carácter básico, que se inició con un estudio sobre las similitudes estructurales de las mioglobinas humana, equina, de carnero y conejo, el cual constituyó punto de partida para el trabajo experimental que se realizó con vistas a obtener y caracterizar la Mb humana y sus anticuerpos específicos.

### **3.1 El estudio de las similitudes estructurales entre las mioglobinas sugirió que el carnero podía ser mejor respondedor a la Mb humana y que la Mb equina podía utilizarse en la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana.**

Las Mbs constituyen una familia de proteínas y esto se manifiesta en las semejanzas que presentan en sus características estructurales tales como secuencia de aminoácidos y estructuras secundaria y tridimensional (Stryer 1995).

La primera parte del estudio informático estuvo dirigida a evaluar cuál de las dos especies animales, conejo y carnero, podría resultar mejor productora de los anticuerpos de interés. La Mb humana difiere de la del conejo en 16 de sus 153 residuos de aminoácidos, y 8 de esas sustituciones son conservativas. Se diferencia un poco más de la del carnero, con 23 posiciones de aminoácidos suplantadas, de las cuales 8 son conservativas, como puede apreciarse en la Tabla 4. Las diferencias relativamente mayores entre las Mbs humana y de carnero podrían conducir a una mejor respuesta de anticuerpos en los animales inoculados con la Mb humana sola, tal como lo demostraron Cooper y sus colaboradores (1984), quienes inmunizaron animales de especies diferentes con mioglobinas heterólogas.

Ahora bien, el tipo de respuesta va a estar determinado por la presencia de epítomos reconocidos por células B, que son las productoras de los anticuerpos, y de epítomos reconocidos por células T del animal respondedor, las cuales cooperan con los linfocitos B para dar una respuesta de anticuerpos T-dependiente (Unanue 1993). Dado que los sitios antigénicos de la Mb humana para linfocitos B están aún pobremente caracterizados, no es posible con el estudio realizado en este trabajo hacer precisiones al respecto. No obstante, a partir del alineamiento de secuencias (Tabla 4), se pueden hacer algunas valoraciones con relación a los dos determinantes topográficos identificados por Rodda y col (1982) en la Mb humana y el segmento 15-22 reconocido como epítomo secuencial (Berzofski y Berkower 2003).

**Tabla 4. Alineamiento de secuencias de mioglobinas y porcentajes de identidad.** Se empleó el algoritmo FASTA (Pearson 1988, 1990) implementado en el programa BioEdit (Hall 1999).

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	5	15	25	35	45	55
Humano	GLSDGEWQLV	LNWVGKVEAD	IPGHGQEVLI	RLFKGHPETL	EKFDKFKHLK	SEDEMKASED
Caballo	.....Q.	.....	.A.....	...T.....	.....	T.A.....
Conejo	...A....	.....	LA.....	...HT.....	.....	.....
Carnero	.....	..A.....	VA.....	...T.....	.....	T.A.....
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	65	75	85	95	105	115
Humano	LKKHGATVLT	ALGGILKKGK	HHEAEIKPLA	QSHATKHKIP	VKYLEFISEC	IIQVLQSKHP
Caballo	....TV...	.....	....L....	.....	I.....DA	..H..H....
Conejo	....N....	..A.....	.....	.....	.....A	..H..H....
Carnero	....N....	.....	....V.H..	E...N....	.....DA	..H..HA...
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	125	135	145			
Humano	GDFGADAQGA	MNKALELFRK	DMASNYKELG	FQG		
Caballo	.N.....	.T.....N	.I.AK.....	...		
Conejo	.....A.	.S.....N	.I.AQ.....	...		
Carnero	SN.....	.S.....N	...AE..V..	...		

**Porcentajes de identidad de las mioglobinas.**

Secuencia	Humano	Caballo	Conejo	Carnero
Humano	100	87.5	89.5	84.9
Caballo	---	100	88.8	89.5
Conejo	---	---	100	86.9
Carnero	---	---	---	---

Los residuos de aminoácidos en las posiciones 34 y 113 (lisina y glutamina) de la globina humana están sustituidos en el carnero por treonina e histidina, respectivamente, y en el conejo, ambos por histidina. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 74, 87 y 142 (glicina, lisina y metionina) están suplantados, sólo en el conejo, el 74 por alanina y el 142 por isoleucina, mientras que el 87 mantiene la lisina en las dos Mbs heterólogas. Aunque la mayoría de las sustituciones son conservativas, por tratarse de determinantes antigénicos topográficos, pueden influenciar en la conformación del sitio, así como también otros residuos cercanos o lejanos en la estructura primaria, no tenidos en cuenta en el análisis. Esto lo sustenta el hecho de que la Mb de ratón, especie que proporcionó los linfocitos para la obtención de los anticuerpos

monoclonales con los cuales se caracterizaron estos dos epítomos conformacionales, tiene lisina-ácido glutámico en las posiciones 34 y 113, y treonina-glutamina-isoleucina en las posiciones 74, 87 y 142,. En el primer caso, se mantiene la lisina y el ácido glutámico sustituye a la glutamina presentes en la Mb humana, es decir, las diferencias no son al parecer notables y, no obstante, el sitio en el que participan estos dos residuos, resultó inmunogénico para el sistema inmunitario de los ratones. Si se analiza el segmento 15-22, están suplantados los residuos de aminoácidos isoleucina 21 y prolina 22 de la Mb humana por valina-alanina y leucina-alanina, en el carnero y el conejo, respectivamente. Por tratarse de un epítomo secuencial (Berkower y Berzofski 2003), situado en una región de mayor movilidad, el extremo amino terminal de la molécula, pudiera resultar inmunogénico para ambas especies animales.

En el caso de los epítomos T, se sabe que la respuesta de anticuerpos IgG va a estar influenciada por la existencia de al menos un segmento de la proteína inmunizante capaz de ser presentado por moléculas MHC II a linfocitos T del animal inmunizado. En las mioglobinas, cuando se cuantificó el número de clones que respondían a epítomos diferentes, se evidenció que el grueso de la respuesta contra la proteína completa en relación a las moléculas MHC II de los animales respondedores estaba enfocada sobre un simple sitio dentro de los residuos 102 al 118, centrado en la posición 109 (Berkower y col 1982, Kojima y col 1988).

De acuerdo al algoritmo AMPHI (Margalit y col 1987), la Mb humana presenta en su estructura varios segmentos  $\alpha$ -helicoidales anfipáticos, que podrían constituir epítomos T (Tabla 5), entre ellos, el segmento 102-114, el cual contiene el residuo de aminoácido 109. Aunque no existe evidencia experimental para suponer que este segmento pueda constituir un epítomo inmunodominante en la mioglobina humana, como lo es en la de cachalote, los experimentos con péptidos y células T han demostrado que los receptores de linfocitos T de animales de especies diferentes son capaces de unir el mismo espectro de péptidos (Shirai y col 1995).

**Tabla 5. Estudio de anfipaticidad.** Segmentos anfipáticos en las mioglobinas humana, de conejo y carnero, para el umbral de AS > 4, según el algoritmo AMPHI .

Mioglobina humana		Mioglobina de conejo			Mioglobina de carnero		
Bloque	SA	Bloque	Diferencias	SA	Bloque	Diferencias	SA
10-19	20.77	11-18		17.17	11-17	*	15.37
28-65	96.81	28-65	**	97.70	28-48	*	59.09
					58-65		19.67
69-73	13.45	70-73		10.40	70-73		11.20
102-114	28.89	102-112	*	24.33	102-112	**	24.40
117-123	10.51	118-123		9.77	118-123	**	9.99
133-140	15.08	129-138	**	20.09	129-137	*	19.20
142-145	7.91	140-145	****	10.28			

\* Diferencia en un residuo de aminoácido con la mioglobina humana.

SA: score anfipático, suma de los índices anfipáticos de los bloques sobrelapantes.

Algunos de los segmentos anfipáticos de la Mb humana difieren en determinados residuos de aminoácidos de los correspondientes a las Mbs de carnero y conejo (ver Tabla 4) por lo que podrían no ser autotolerados por el animal inmunizado y resultar inmunogénicos. En particular, la posición clave 109 (Cease y col 1986, Kojima y col 1988) en la Mb humana está ocupada por ácido glutámico, al igual que en el conejo, no así en el carnero cuya globina tiene un ácido aspártico. Sumando este último aspecto al criterio de que a menor similitud entre la Mb inmunizante y la autóloga se obtiene una mejor respuesta de anticuerpos, se mantuvo el criterio de que el carnero podría ser mejor respondedor que el conejo a la Mb humana.

La conjugación de la globina humana a la hemocianina, una proteína voluminosa bastante alejada filogenéticamente del carnero, podría aportar epítomos T al inmunógeno y por consiguiente un efecto T-B cooperativo mayor. Se haría así más factible la obtención de anticuerpos del isotipo IgG en una especie cuya Mb no muestra grandes diferencias con la humana. Esto es importante en la elaboración de un reactivo de látex-aglutinación con partículas de poliestireno, ya que las condiciones de la adsorción física de los anticuerpos IgG están bien establecidas en este sistema.

La segunda parte de este estudio se dirigió a evaluar las similitudes de las Mbs humana y equina con vistas a utilizar esta última en la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana. Dado que los anticuerpos reconocen la forma más que residuos químicos particulares de un epítomo (Roitt y col 2001) el estudio se centró en la conformación de ambas moléculas. No

obstante, la similitud entre las Mbs humana y equina en cuanto a estructura primaria (19 sustituciones de residuos de aminoácidos con 6 conservativas) es elevada (89.5 %; Tabla 4) y constituye un elemento a favor del empleo de la Mb equina en sustitución de la humana. En búsqueda de otros elementos se hicieron los estudios de protuberancia y de superposición de ambas proteínas.

El análisis de protuberancia, según el algoritmo ELLIPSE (Thornton y col 1986), mostró perfiles muy semejantes para las Mbs humana y equina (Figura 4, cuadros superior y medio, respectivamente), los cuales se superponen casi perfectamente (Figura 4, cuadro inferior). Dado que el grado de accesibilidad al medio es uno de los factores que influye sobre la inmunogenicidad, es de esperar que los anticuerpos que se produzcan contra los sitios más expuestos de la Mb humana reaccionen cruzadamente con sitios similares en la superficie de la Mb equina.

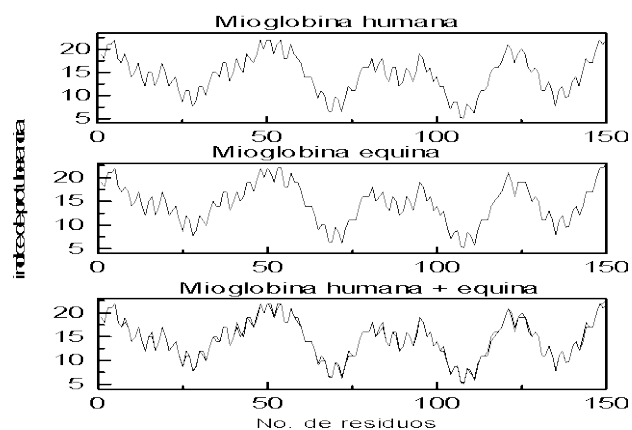
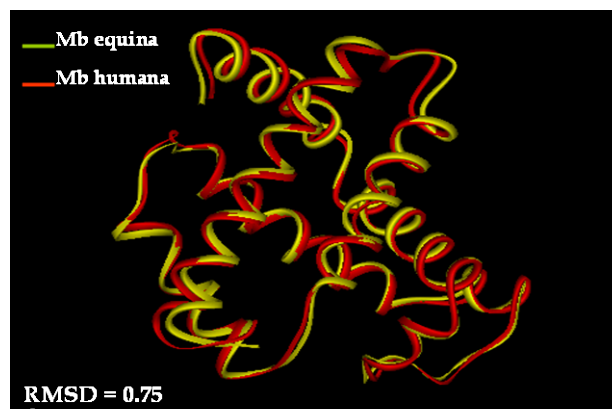


Figura 4. Estudio de protuberancia.

Para el estudio de superposición fue necesario modelar la estructura tridimensional de la mioglobina humana salvaje. El principio del método es comparar y alinear la secuencia de aminoácidos de la proteína bajo estudio con otra mioglobina de elevada homología. Se seleccionó una Mb humana recombinante, la cual tenía sustituida la arginina 45 por lisina y la cisteína 110 por alanina (Hubbard y col 1990). La modelación conllevó la sustitución de esos residuos y la orientación de sus cadenas laterales de tal modo que no produjeran interferencias estéricas con las cadenas laterales de los residuos cercanos mediante el programa Swiss PDBViewer.

El estudio de superposición con el programa SWISS PDBViewer (Guex y Peitsch 1997, Guex y col 1999) confirmó los resultados de protuberancia (Figura 5). El RMSD (del inglés, “root mean square deviation”) fue de 0.75 Å,



cuando se tuvo en cuenta sólo los carbonos  $\alpha$ , y de 1.81 Å al considerar además los nitrógenos y los oxígenos de los grupos carboxílicos, lo cual indica un alto grado de similitud y justifica el empleo de la Mb equina, disponible en el mercado, en la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana.

### **3.1.2 La combinación de las cromatografías de exclusión molecular en Superose 12 e intercambio aniónico en Mono Q rindió una Mb humana de pureza elevada (RZ = 3.6)**

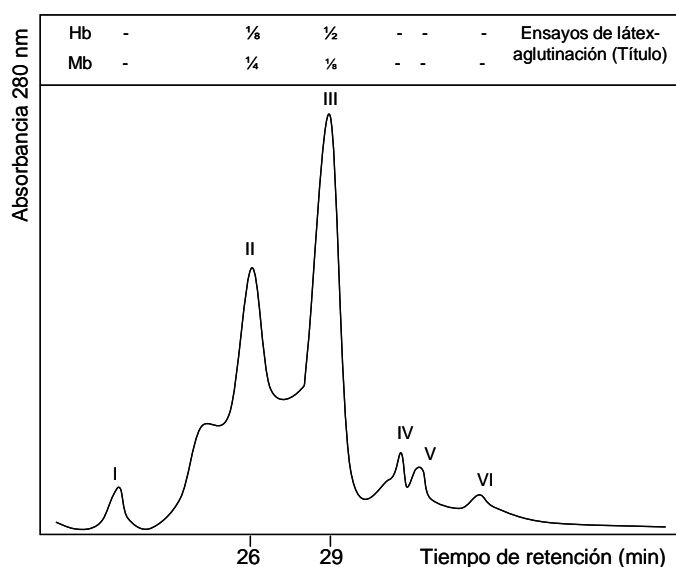
Un factor principal a tener en cuenta en la producción de anticuerpos policlonales es la pureza del inmunógeno. De este modo se favorece una respuesta dirigida hacia la molécula de interés y no se desvía el sistema inmunitario hacia la producción de otros anticuerpos contra contaminantes que, en ocasiones, pueden resultar tan o más inmunogénicos que el antígeno de interés (Dresser 1986). Este es el caso de la Hb, la cual constituye uno de los principales contaminantes en las preparaciones de Mb, y que puede resultar más inmunogénica, si se tiene en cuenta que cuadruplica la masa molecular de la Mb.

El aislamiento y la purificación de la Mb se han visto favorecidos por el alto contenido de esta proteína en el músculo y, en particular, en aquellos donde la deficiencia de oxígeno constituye una amenaza para la vida, como el corazón humano. Varios métodos han sido descritos para extraer la Mb del músculo y separarla de su contaminante principal y más abundante, la hemoglobina, la cual se libera de los vasos sanguíneos cuando se destruye el tejido en el proceso de extracción de las proteínas. La separación de ambas moléculas se ha visto facilitada a su vez por la capacidad que tiene la Mb de permanecer soluble en soluciones concentradas de sales. El método de extracción de Hapner, utilizado en este trabajo y por otros grupos (Berzofski y col 1982), se basa en la precipitación diferencial de la Hb con sulfato de amonio. La Mb contenida en el sobrenadante está parcialmente purificada y ha sido utilizada en determinados fines (Nishida y Nishida 1985, O'Brien y col 1992).

Se decidió iniciar el proceso de purificación de la mioglobina a partir del extracto con la cromatografía de exclusión molecular, la cual ha sido empleada por diferentes autores (Warris 1978, Sawhney y col 1985, Han y col 1994) desde que Berman y Kench (1963) la utilizaran por primera vez con este propósito. Para ello se evaluaron varios soportes (resultados no mostrados) y se seleccionó la filtración en Superose 12 (Figura 6). La elección de una cromatografía de exclusión molecular como primera etapa se fundamentó en la diferencia de masa molecular (1:4) entre la mioglobina y la hemoglobina. Este tipo de cromatografía

permitiría, desde el punto de vista teórico, la obtención de una fracción de Mb libre de Hb o de una parte de ella.

En el perfil cromatográfico del extracto de miocardio en columna de Superose 12 se destacaron dos fracciones mayores con tiempos de retención de 26 (pico II) y 29 minutos (pico III). Ambas fracciones presentaron una coloración parda rojiza intensa y contenían Mb y Hb, como lo evidenciaron los ensayos de inmunoaglutinación (inserto Figura 6). Esto demuestra que ni la extracción de las proteínas del músculo con sulfato de amonio a una saturación del 70 % ni la filtración molecular, ni la combinación de ambas, fueron suficientes para separar completamente ambas moléculas.

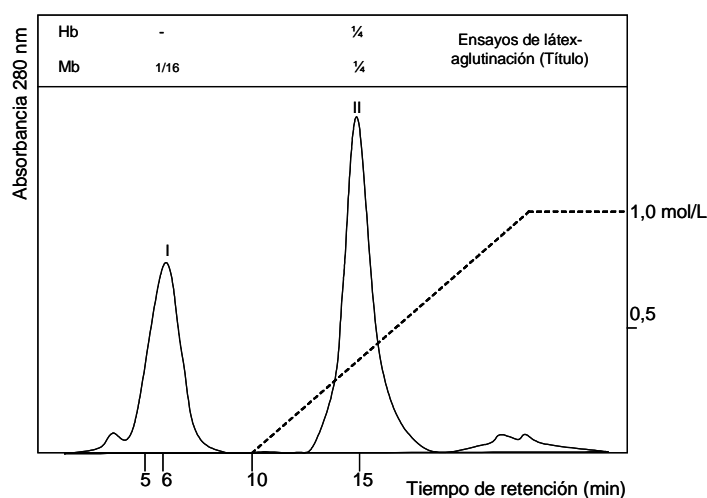


**Figura 6. Cromatografía en Superose 12.** Perfil cromatográfico del extracto de miocardio en Superose 12 HR 10/30. Tampón de corrida: Tris-HCl 0.2 mol/L pH 8.6. Velocidad de flujo: 0.5 mL/min. Se aplicaron 500 µL de extracto y se colectaron fracciones de 1 mL. Inserto: Resultados de los ensayos de látex-aglutinación HEMOLEX y RAPITEX para Hb y Mb.

Para continuar el proceso de purificación de la mioglobina se seleccionó la fracción III en base a su perfil, su mayor contenido de Mb y menor contenido de Hb (inserto Figura 6). Se utilizó la cromatografía de

intercambio aniónico, la cual ha sido empleada con éxito por diferentes autores (Akeson y Theorell 1960, Brown 1961, Yamazaki y col 1964). Se utilizó el intercambiador aniónico Mono Q y un gradiente salino y lineal. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 7. Se pueden observar dos máximos bien separados con tiempos de retención de 6 y 15 minutos. En la fracción I la Mb se encontró libre de Hb con pocos contaminantes. El pico II contenía Hb acompañada de Mb, según los resultados de los ensayos de inmunoaglutinación (inserto Fig. 7).

La corrida isocrática a pH 8.6 y fuerza iónica baja (Tris-HCl 0.006 mol/L) debía propiciar la fijación de la Hb y la elución de la Mb, o la fijación de ambas y su elución diferencial, atendiendo a los puntos isoeléctricos (pI) de la Hb y la Mb que corresponden a 6.8 y 7.2, respectivamente (Ravnskov 1975). El resultado fue que la Mb emergió en dos momentos diferentes: la mayor parte durante la corrida isocrática (pico I), que era lo previsto, y el resto (pico II) -acompañada de Hb- durante el gradiente. Estos resultados no fueron tan inesperados, pues también Yamazaki y sus colaboradores (1964), al someter el extracto de miocardio a cromatografía en DEAE-celulosa, en condiciones muy similares a las empleadas en este trabajo, recuperaron la Mb equina dividida en dos fracciones principales, una que no se retuvo en el intercambiador y otra que permaneció fija hasta que se aplicó el gradiente de fuerza iónica.

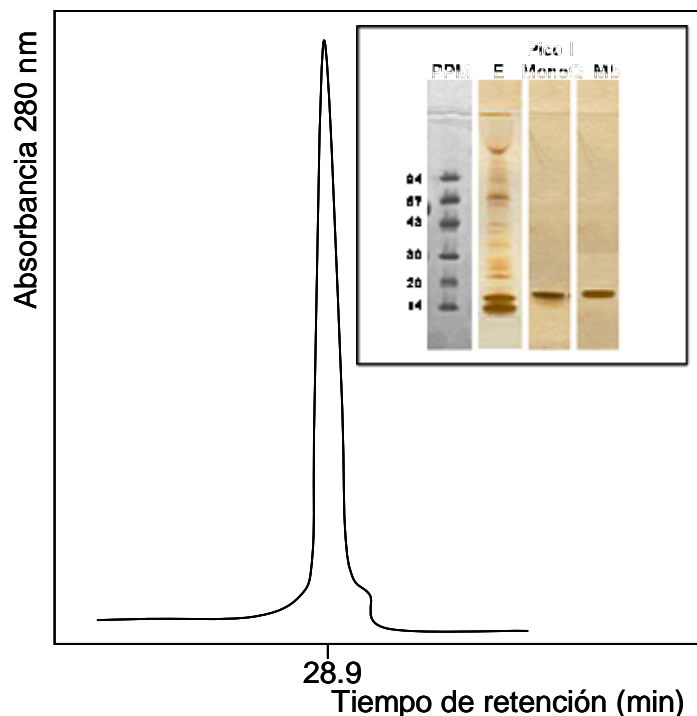


**Figura 7. Cromatografía en Mono Q.** Perfil cromatográfico en columna de Mono Q HR 5/5 del pico III de la filtración en Superose 12 del extracto de miocardio. Corrida isocrática durante 10 minutos con tampón Tris-HCl 0.006 mol/L pH 8.6. Gradiente lineal durante 10 minutos. Tampón inicial: Tris-HCl 0.06 mol/L pH 8.6. Tampón final: Tris-HCl 0.06 mol/L NaCl 1 mol/L pH 8.6. Velocidad de flujo: 1 mL/minuto. Se aplicaron 3 mL de muestra y se colectaron fracciones de 1 mL. Inserto: Resultados de los ensayos de látex-aglutinación HEMOLEX y RAPITEX para Hb y Mb.

Al recromatografiar en Mono Q el pico II de la primera corrida se obtuvo un patrón de elución similar (Figura 7), es decir, una parte de la Mb eluyó durante la corrida isocrática y la otra, durante el gradiente. También Perkoff y col (1962), quienes hicieron una pormenorizada caracterización de la Mb humana (ellos obtuvieron tres fracciones con la proteína en el intercambiador aniónico), al recromatografiar separadamente cada uno de dos de los picos, recuperaban siempre dos fracciones. Estos resultados les hicieron sugerir a Perkoff y sus colaboradores que estas formas de la mioglobina humana son interconvertibles, algo que también fue sugerido por Miyoshi y col (1968).



Con vistas a obtener una Mb de pureza elevada se procedió a recromatografiar en Superose 12 la fracción I de Mono Q. Como puede verse en la Figura 8, se obtuvo un pico bien definido que arrojó una banda única con la tinción de plata en la electroforesis SDS-PAGE, libre de los contaminantes de la fracción I de Mono Q (inserto Figura 8). A partir de este momento se



nombrará Mb humana pura (Mbhp) esta fracción de la segunda filtración en Superose 12.

**Figura 8. Recromatografía en Superose 12.** Perfil de la cromatografía en Superose 12 de la fracción I de Mono Q. Tampón de corrida: Tris-HCl 0.2 mol/L pH 8.6. Velocidad de flujo: 0.5 mL/min. Se aplicaron 500  $\mu$ L de la muestra y se colectaron fracciones de 1 mL. Inserto: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente 10-15% de archilamida. Tinción con nitrato de plata. De izquierda a derecha: Patrones de peso molecular (PPM), extracto de miocardio (E), fracción I de Mono Q y fracción de la recromatografía en Superose 12 (Mbhp).

Con relación al rendimiento, en cada proceso de purificación se partió de 30 mg de proteínas totales (500  $\mu$ L de extracto) que consistió de: una corrida en Superose 12, seis cromatografías en Mono Q y una recromatografía en Superose 12. Finalmente, en el pico obtenido en esta última se recuperaron un total de 10 mg de Mb humana pura. Esto da una recuperación total de 200 mg de Mbhp (10 mg  $\times$  20 procesos de purificación) que corresponden a 1.32 mg de Mb recuperada por gramo de músculo cardíaco procesado (198 mg/150 g de tejido).

El método de purificación de Mb humana que se propone es novedoso y permite obtener la proteína con un alto grado de pureza. Los tiempos de retención fueron similares en las 40 corridas realizadas en Superose 12 y en las más de 100 en Mono Q, lo que confirma la reproducibilidad del método propuesto. En el año 2001, la Mb humana producida por Research Diagnostics Inc (web:<http://www.researchd.com>) fue seleccionada por la Internacional Federation of Clinical Chemistry como Estándar Internacional. Esta Mb humana estándar es preparada mediante “varios pasos cromatográficos que incluyen la filtración en gel y la cromatografía de intercambio aniónico” con una pureza similar en SDS-PAGE a la obtenida por

nosotros mediante filtración en Superose 12 y cromatografía en Mono Q (web:<http://www.researchd.com>). En cuanto al rendimiento, tomando en cuenta el valor referido por Swaanenburg y col (2001) de 2.4 mg de Mb por g de tejido cardíaco, se considera satisfactorio, ya que se recupera el 55 % de la hemoproteína contenida en el músculo cardíaco. Este resultado es superior al informado por otros autores. Por ejemplo, Yamazaki y col informaron una recuperación de 0.8 g de Mb cristalizada a partir de 2 kg de músculo cardíaco, bastante inferior al obtenido por nosotros (60 mg/150 g vs 198 mg/150 g).

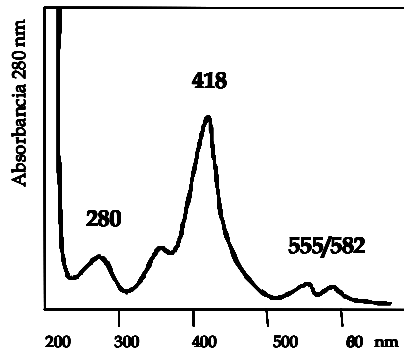
### **3.1.3 El método de purificación rindió la forma oxi de la mioglobina humana y la focalización isoeléctrica sugiere la presencia de dos variantes isoeléctricas de esta proteína**

La caracterización bioquímica de la Mb humana purificada incluyó la estimación de la masa molecular, su espectro de absorción y la focalización isoeléctrica, además de su evaluación antigénica con el anticuerpo del reactivo comercial RAPITEX.

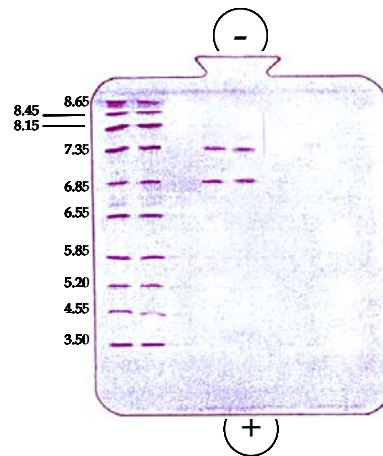
La masa molecular de la Mb humana fue bastante similar por los dos métodos ensayados: 17 500 Da por filtración molecular en Superose y 17 700 Da por SDS-PAGE, valores que se corresponden con el informado para la Mb humana del músculo esquelético (17,500 Da) por Perkoff y col (1962), Dombroskii y Poverennii (1981) y Nishida y col (1985).

El espectro de absorción mostró los cuatro máximos característicos de la oxiMb humana a 280, 418, 555 y 582 nm (Figura 9) con un cociente  $DO_{418nm}/DO_{280nm} = 3.6$ , similar al informado por Yamazaki y col (1964) y Suzuki y col (1983), el cual constituye un índice del grado de pureza de la proteína.

A focalización isoeléctrica se sometió la Mb humana pura, obtenida mediante la recromatografía en Superose 12 de la fracción I de Mono Q. Como se muestra en la Figura 10, se evidenciaron dos variantes con puntos isoeléctricos cercanos a 6.9 y 7.3. Este comportamiento fue similar al del patrón de Mb equina de la Pharmacia LKB con dos variantes de pIs 6.9 y 7.3 (Phast System Development Technique file No. 200. Pharmacia LKB Biotechnology).



**Figura 9. Espectro de absorción.** Espectro de absorción de la mioglobina purificada (4.15mg/mL) en el intervalo 200-600 nm.



**Figura 10. Focalización isoelectrica.** Focalización isoelectrica en Phast Gel de electroenfoque en un intervalo de pH 3-9. Tinción con Azul Coomassie R-250. De izquierda a derecha: calibradores pH 3-9, Mb humana pura (por duplicado).

La heterogeneidad de las Mbs ha sido un tema de interés desde que en 1956 Antonini y Rossi-Fannelli la informaron por primera vez (Akeson y Theorell 1961, Brown 1961, Atassi 1964, Yamazaki y col 1964, Strausser y col 1966, Miyoshi y col 1968). En estos trabajos los autores informaron la distribución de la hemoproteína en fracciones diferentes en la electroforesis y en intercambiadores iónicos, lo que les hizo sugerir la existencia de variantes principales y menores de las Mbs. Para Kossman y col (1964) los componentes menores eran artefactos, mientras que para Hapner y col (1968) podían resultar de la hidrólisis de residuos de glutamina o asparagina.

En este trabajo, la Mb en la cromatografía en Mono Q eluyó en dos momentos diferentes y esto pudiera corresponderse con los resultados de la focalización isoelectrica. La variante de menor pI (6.8) no se retuvo en el intercambiador aniónico, mientras que la de pI más alto (7.3) quedó inmovilizada junto con la Hb. Estas variantes de la Mb pudieran ser producto de la hidrólisis de los residuos glutamina y asparagina, como lo sugirieron Hapner y col (1968). Dado que estos residuos de aminoácidos están presentes en la estructura primaria de la Mb y algunos en sitios accesibles al solvente como el extremo amino, su hidrólisis daría lugar a los ácidos glutámico y aspártico, lo cual provocaría un aumento de la carga negativa de la globina que favorecería su retención en los intercambiadores aniónicos. En la proteína de cachalote recombinante se manifestó un fenómeno similar con una técnica de elevado poder resolutivo, el cromatoenfoque, la cual detectó dos variantes: una que se mantuvo retenida en la columna y otra que eluyó con el cambio de pH (Kang y Frey 2003). Estos y otros elementos sustentan que algún fenómeno

espontáneo, como la hidrólisis de aminoácidos, pudiera ocurrir, dando lugar a un equilibrio de dos formas isoelectricas, tal como se manifestó en la recromatografía del pico II de Mono Q.

Las capacidades antigénicas de la Mb humana se evaluaron a lo largo del proceso de purificación mediante los ensayos de látex-aglutinación. La hemoproteína fue reconocida en las diferentes fracciones que la contenían por los anticuerpos de conejo anti-Mb humana del reactivo RAPITEX. No están informados en ninguno de los trabajos revisados relacionados con la producción y utilización de anticuerpos anti-Mb humana (Grachev y col 1982, Katus y col 1988, Konings y col 1989, Moscoso y col 1990, Borque y col 1991) diferencias inmunoquímicas con relación a las posibles variantes de la hemoproteína. Sólo Crumpton (1974) se refirió a ligeras diferencias entre la Mb y la apoMb, carente esta última del grupo hemo.

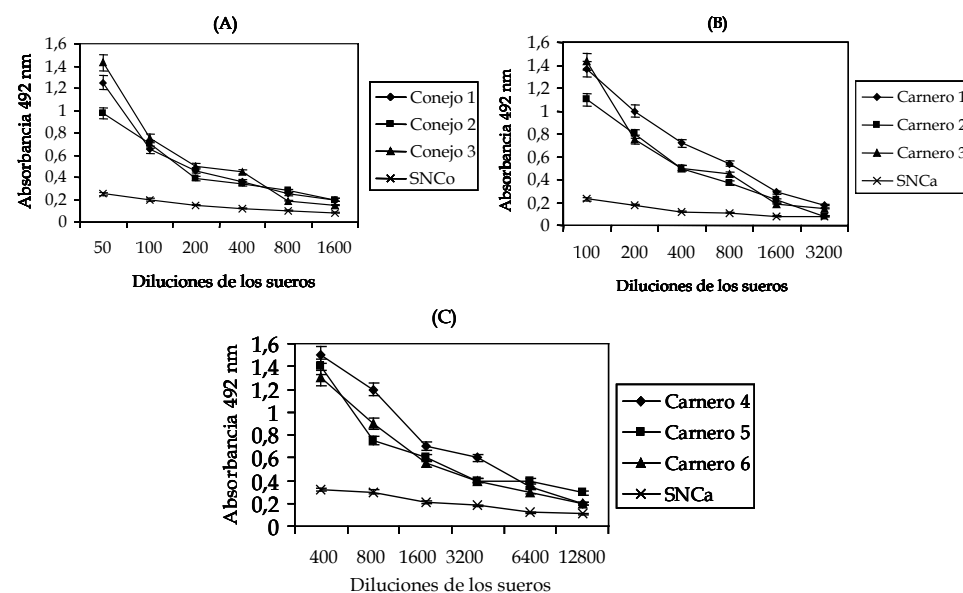
#### **3.1.4 Se obtuvieron títulos aceptables de anticuerpos anti-Mb humana en carnero con el conjugado Mb humana-hemocianina. Estos anticuerpos tuvieron una reactividad cruzada elevada con la Mb equina**

A partir de 1927 (Hecktoen y col) y hasta nuestros días se han publicado un gran número de trabajos que describen la producción de anticuerpos contra Mbs de especies diferentes en una variedad también de animales vertebrados. Rodríguez (1989) relacionó un grupo bastante representativo de esos protocolos de inmunización, donde se empleó la Mb sola. Por tratarse de una proteína de baja masa molecular que presenta gran similitud entre las especies animales (Hurrell y col 1977) constituye un mal inmunógeno y nuestras experiencias en especies animales diferentes lo confirman (resultados no mostrados).

En este trabajo se inmunizaron conejos y carneros siguiendo un esquema similar a los propuestos por Yakulis y Heller (1962), Strausser (1966), Stone y col (1975) y Kranen y col (1999), los cuales se caracterizan por dosis altas y repetidas del inmunógeno, empleo de la vía subcutánea o intramuscular y adyuvante de Freund. Se obtuvieron títulos modestos de anticuerpos, tanto en conejo (Figura 11A) como en carnero (Figura 11B), empleando como inmunógeno la Mb humana sola. No obstante, los antisueros de carnero mostraron títulos ligeramente superiores (1/800) con relación a los de conejo (1/400). Se podría argumentar que está de acuerdo a lo planteado por Cooper y col (1984), quienes sugirieron que la respuesta de anticuerpos contra una Mb va a estar influenciada por las diferencias de secuencia de aminoácidos entre la Mb exógena y la del animal que va a ser inmunizado. Siguiendo este razonamiento, las diferencias relativamente mayores entre las Mbs humana y de carnero (Tabla

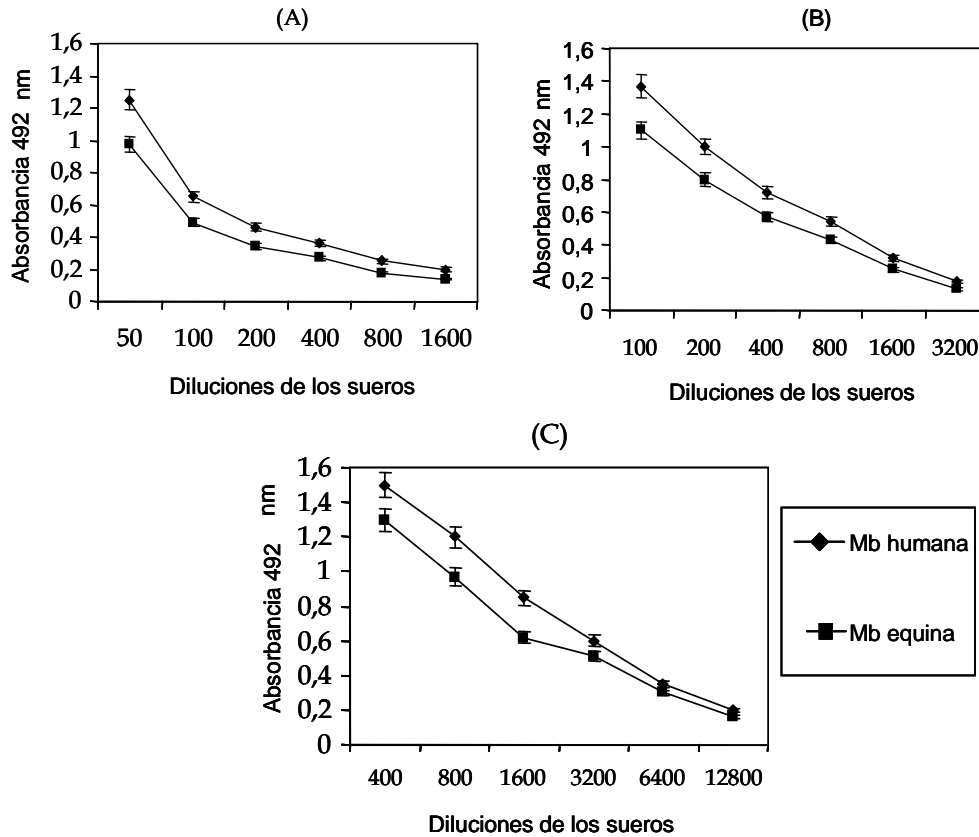
4) conducen a una mejor respuesta de anticuerpos en los animales inoculados con la Mb humana sola.

Los títulos mayores de anticuerpos correspondieron a los carneros inmunizados con el conjugado Mb-KLH (Figura 11C), llegando hasta 1/6,400 frente a la Mb homóloga en el ELISA indirecto para anticuerpos del isotipo IgG. En este caso, se suma el aporte de epítomos T que hace la hemocianina, lo cual facilita la cooperación T-B y una respuesta madura de anticuerpos. Estos resultados lo convierten en el inmunógeno de elección para la obtención de anticuerpos anti-Mb humana.



**Fig 11. Titulación de los anticuerpos anti-Mb humana obtenidos en conejo y carnero.** (A) Inmunización de conejos con Mb humana. (B) Inmunización de carneros con Mb humana. (C) Inmunización de carneros con MbH-KLH. Procedimiento: ELISA indirecto con Mb humana (10 µg/mL) en el tapizado, diluciones dobles de los sueros, conjugado anti-IgG de conejo (dil 1/10,000) o anti-IgG de carnero (dil 1/5,000) con peroxidasa y revelado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-OPD). Valor de corte 0,3. SNCo: suero normal de conejo. SNCa: suero normal de carnero. Cada punto es el promedio de tres determinaciones ± SD.

Para conocer la capacidad de estos antisueros de reaccionar cruzadamente con la Mb equina, se enfrentaron en un ELISA a la Mb heteróloga. Se muestran en la Figura 12 los resultados correspondientes a los antisueros de conejo (A) y de carnero (B) inmunizados con la Mb humana sola, así como los correspondientes a los antisueros de carnero inmunizados con el conjugado Mb-KLH (C). Los tres tipos de antisueros manifestaron reactividad cruzada frente a la Mb equina, aunque reaccionaron con menor intensidad que frente a la Mb homóloga.



**Figura 12. Estudio de reactividad cruzada de los anticuerpos anti-Mb humana frente a la Mb equina.** (A) Antisuero de conejo. (B) Antisuero de carnero inmunizado con Mbh sola. (C) Antisuero de carnero inmunizado con Mbh-KLH. Procedimiento: ELISA indirecto con Mb humana o equina (10 µg/mL) en el tapizado y anticuerpos anti-IgG de conejo o carnero conjugados con peroxidasa. Cada punto es el promedio de tres determinaciones ± SD.

Los porcentajes de identidad inmunológica entre las Mb humana y equina con los 3 tipos de antisuero fueron altos, lo que era de esperarse, pues las mioglobinas constituyen una familia de proteínas que comparten características estructurales y funcionales, pero hubo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el antisuero de conejo y el de carnero inmunizado con Mb-KLH (Tabla 6). Esta diferencia en el grado de reactividad cruzada se le pudiera atribuir a una mayor afinidad de los anticuerpos que se obtuvieron con el conjugado Mb-KLH producto de una respuesta más madura al disponer este inmunógeno de un mayor número de epítopos T (Roitt y Delves 2001).

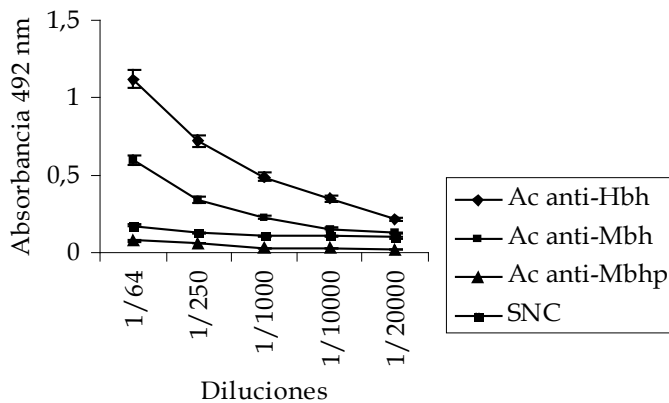
**Tabla 6. Identidad inmunoquímica entre las mioglobinas humana y equina determinada por ELISA.**

Antisuero de:	Inmunógeno	% de identidad*	
A. Conejo	Mioglobina humana	74.12 ± 2.91	a
B. Carnero	Mioglobina humana	78.28 ± 3.09	ab
C. Carnero	KLH-Mb humana	83.25 ± 2.84	bc

\*Se calculó el porcentaje de identidad tomando como 100 % la absorbancia correspondiente a la Mb humana (Figura 10). Los porcentajes que se muestran en la tabla corresponden a la media de los porcentajes obtenidos para cada dilución (n = 6). Hubo diferencia con significación estadística ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan entre los antisueros de conejo y carnero Mb-KLH.

### 3.1.5 Los antisueros anti-Mb humana fueron reactivos con la hemoglobina humana. Esta reactividad fue eliminada cuando los anticuerpos se purificaron con Mb equina

Por ser la Hb un posible contaminante de los sueros sanguíneos en los que se determinará la presencia de Mb, se evaluó la capacidad de los antisueros generados contra la Mb humana de reaccionar con la Hb homónima. A pesar de haberse inmunizado los animales con una Mb de pureza elevada, de acuerdo a los criterios bioquímicos empleados en este trabajo, los antisueros anti-Mb producidos en conejo y carnero reaccionaron con la Hb humana. En la Figura 13 se presentan resultados representativos con el antisuero de carnero fabricado con el conjugado Mb-KLH como inmunógeno. Este resultado inesperado podría deberse a la generación de anticuerpos contra trazas de la Hb no reveladas por los métodos bioquímicos empleados en la evaluación de la Mb purificada pero sí detectadas por el sistema inmunitario de los animales.



**Figura 13. Ensayo de los anticuerpos anti-Mb humana frente a hemoglobina humana.** Procedimiento: ELISA con Hb humana (10 µg/mL) en el tapizado y anticuerpos anti-IgG de carnero conjugados con peroxidasa. Ac anti-Hbh: anticuerpos anti-Mb humana. Ac anti-Mbh y anti-Mbhp: anticuerpos anti-Mb humana sin purificar y purificados frente a Mb equina. SNC: suero normal de carnero. Cada punto es el promedio de tres determinaciones ± SD.

Otra causa pudiera ser la capacidad de los anticuerpos anti-Mb de reaccionar con las dos hemoproteínas. Esto lo creemos menos probable dado que, aunque ambas globinas son muy similares en cuanto a la estructura tridimensional de sus cadenas, los residuos de aminoácidos en su superficie, principales responsables del carácter antigénico, son muy diferentes (Stryer

1995; comunicación personal de Atassi en 2007). Este resultado, entre otros propósitos, hizo necesario desarrollar un método de purificación de los anticuerpos que permitiera eliminar esta interferencia.

El empleo de anticuerpos policlonales como ligando en los reactivos de partículas de látex requiere de su purificación, ya que ellos están acompañados en el suero de otras muchas proteínas, anticuerpos o no, que pueden competir con el anticuerpo de interés por la superficie de las partículas de látex. A esto se suma que pudieran contener poblaciones de anticuerpos contra contaminantes que interfieren en las determinaciones, dando lugar a resultados positivos falsos. Éste sería el caso de los anticuerpos reactivos con la hemoglobina humana.

El método de purificación de los anticuerpos anti-Mb empleado comúnmente es la cromatografía de afinidad en columnas de Sepharose 4B con la Mb homóloga como ligando. En este trabajo se utilizó la Sepharose 4B a la cual se ligó la Mb humana y la Mb equina, además de un inmunoabsorbente de Mb equina polimerizada con glutaraldehído.

La purificación de los anticuerpos mediante Sepharose 4B-Mb humana arrojó un rendimiento de 0.28 mg de anticuerpo por mL de suero y con Mb equina, de 0.22 mg de anticuerpo/mL. Con el inmunoabsorbente de Mb de caballo polimerizada con glutaraldehído la recuperación fue superior, sobre todo con respecto a la Sepharose 4B-Mb equina, pues se obtuvieron 0.3 mg de anticuerpo/mL de suero (Tabla 7).

Según Boegman y Crumpton (1970), quienes ensayaron diferentes inmunoabsorbentes para la purificación de anticuerpos anti-Mb, la Sepharose-Mb resultó el más eficiente para este propósito. Tal criterio ha sido sustentado por el trabajo de otros investigadores (Nishida y col 1985, Moscoso y col 1990). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la polimerización de la Mb equina con glutaraldehído constituye una alternativa novedosa y económica para la purificación de grandes cantidades de anticuerpos anti-Mb humana a partir de suero sanguíneo.

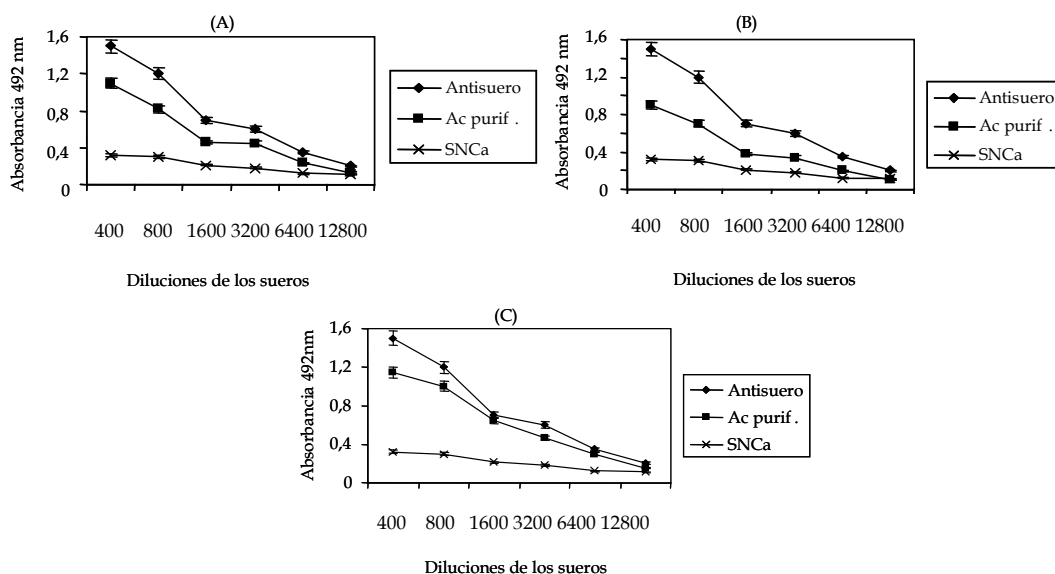


**Tabla 7. Resultados de la purificación de anticuerpos anti-mioglobina humana.**

Tipo cromatografía	mL de suero de carnero (título 1/6400)	mg de Ac recuperado*	mg de Ac recuperado /mL de suero
Sepharose 4B-Mb humana	50	14 ± 2.5	0.28
Sepharose 4B-Mb equina	50	11 ± 2.3	0.22
Inmunoabsorbente MbE	50	15 ± 1.8	0.30

\*Resultados correspondientes a 5 procesos de purificación

Para estimar el grado de recuperación de anticuerpos específicos en cada uno de los métodos de purificación ensayados, se titularon por ELISA los anticuerpos purificados y se compararon con el antisuero original. En la Figura 14 se presentan los resultados correspondientes a uno de los carneros inmunizados con el conjugado Mbh-KLH (carnero 4).



**Figura 14. Titulación de los anticuerpos anti-Mb humana purificados.** Anticuerpos obtenidos en carnero con Mb-KLH y purificados mediante: (A) Sepharose 4B-Mb humana, (B) Sepharose 4B-Mb equina y (C) Inmunoabsorbente de Mb equina polimerizada con glutaraldehído. Procedimiento: ELISA indirecto con Mb humana (10 µg/mL) en el tapizado, diluciones dobles del antisuero original correspondiente al carnero 4, de los Ac purificados concentrados hasta el volumen original del antisuero y del suero pre-inmune, conjugado anti-IgG de carnero (dil 1/5,000) con peroxidasa y revelado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -OPD). SNCa: suero normal de carnero. Cada punto es el promedio de tres determinaciones ± SD.

Con los valores de absorbancia se calcularon los porcentajes de recuperación que correspondieron a 68.83 ± 4.17 % con Sepharose 4B-Mb humana, 59.33 ± 2.66 % con Sepharose 4B-Mb equina y 78.5 ± 4.14 % con la Mb equina polimerizada (Tabla 8).

**Tabla 8. Porcentajes de recuperación de anticuerpos en la purificación.**

Método de purificación	Porcentaje de recuperación de Ac	
Sepharose 4B-Mb equina	59.33 ± 2.66	a
Sepharose 4B-Mb humana	68.83 ± 4.17	b
Mb equina polimerizada	78.5 ± 4.14	c

\*Se calculó tomando como 100 % la absorbancia correspondiente al antisuero de partida. Los porcentajes que se muestran constituyen la media de los porcentajes obtenidos para cada dilución (n = 6). Hubo diferencias con significación estadística ( $p < 0,05$ ) según la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Boegman y Crumpton (1970) recuperaron con matriz de Sepharose más del 72 % del anticuerpo anti-Mb adicionado. En nuestro caso, los resultados no fueron muy diferentes. Con la matriz de Sepharose hubo una mayor recuperación cuando se utilizó la Mb humana como ligando ( $68.83 \pm 4.17$  frente a Mb humana vs  $59.33 \pm 2.66$  frente a Mb equina), como era de esperarse, por ser el antígeno homólogo. No obstante, la capacidad de unir anticuerpos de la Mb equina polimerizada con glutaraldehído fue superior ( $78.5 \pm 4.14$ ) al de las dos matrices de Sepharose-Mb, lo cual puede atribuirse a la cantidad de Mb en el polímero, a su accesibilidad o a ambos factores.

Los inmunoabsorbentes Sepharose-Mb y Mb polimerizada fueron usados sucesivamente después de su reequilibrio con tampón fosfato 0.1 mol/L pH 7 unas 20 veces sin que se detectara disminución en sus capacidades de adsorción ni alteración en la especificidad de los anticuerpos, demostrado esto por ELISA. Los anticuerpos purificados con la Mb equina dejaron de ser reactivos frente a la hemoglobina humana (Figura 13).

### **3.1.6 Los anticuerpos anti-Mb humana purificados frente a la mioglobina equina funcionaron satisfactoriamente en el ensayo de látex aglutinación**

Llegado a este punto, era necesario demostrar que los anticuerpos anti-Mb humana generados y purificados podían funcionar en un ensayo de látex-aglutinación para la detección de Mb humana en suero sanguíneo. Para ello se prepararon 2 reactivos: el A recubierto con los anticuerpos purificados con la Mb humana y el B, con los anticuerpos purificados con la Mb equina.

La primera evaluación consistió en enfrentarlos en un ensayo de aglutinación en lámina a los controles positivo y negativo del reactivo de referencia RAPITEX (Behring). Ambos reactivos A y B aglutinaron francamente con el control positivo y no tuvieron reactividad con el control negativo. Esto significa que los anticuerpos adsorbidos a las partículas de látex fueron capaces

de reconocer la Mb humana, independientemente de haber sido purificados con la Mb humana o la heteróloga. También se enfrentaron ambos reactivos A y B a concentraciones diferentes de Mb humana en SHN. En la Tabla 9 puede apreciarse que hubo correspondencia entre la concentración del analito y la intensidad de la agregación de las partículas, aunque las aglutinaciones aparecieron más tempranamente con el reactivo B preparado con los anticuerpos anti-Mb humana purificados frente a la Mb equina (45 seg vs 60 seg, 60 seg vs 120 seg y 150 seg vs 200 seg).

**Tabla 9. Ensayo de los reactivos A y B frente a concentraciones diferentes de Mb humana.**

Reactivo	Concentraciones de mioglobina equina		
	1000 ng/mL	500 ng/mL	100 ng/mL
A (Ac purificados frente a Mb humana)	++++ 60 seg	+++ 120 seg	+ 200 seg
B (Ac purificados frente a Mb equina)	++++ 45 seg	++++ 60 seg	++ 150 seg

Se evaluaron además los reactivos A y B frente a los sueros de tres pacientes con diagnóstico final de IAM. Se repitió el comportamiento observado en la Tabla 9, es decir, las aglutinaciones con el reactivo B se manifestaron más rápidamente que con el reactivo A (Tabla 10).

**Tabla 10. Ensayo de los reactivos A y B frente a los sueros de pacientes con IAM.**

Paciente	Reactivo	Tiempo en horas*								
		0	2	4	6	8	12	16	18	24
1	A	nd	-	-	++ 180 seg	nd	+ 240 seg	-	nd	-
	B	nd	+++ 70 seg	++++ 45 seg	+++ 70 seg	nd	+++ 90 seg	+++ 90 seg	nd	+ 240 seg
2	A	++++ 60 seg	nd	nd	nd	+++ 60 seg	nd	+++ 65 seg	nd	-
	B	++++ 30 seg	nd	nd	nd	++++ 45 seg	nd	-	nd	-
3	A	++++ 45 seg	nd	nd	++++ 45 seg	nd	++++ 45 seg	nd	-	-
	B	++++ 30 seg	nd	nd	++++ 45 seg	nd	++++ 45 seg	nd	+ 210 seg	+ 280 seg

nd = no determinado; \*el tiempo cero corresponde al momento del ingreso.

De los resultados anteriores se desprende la potencialidad que tienen los anticuerpos anti-Mb humana, tanto los purificados con la proteína homóloga como los purificados con la proteína

heteróloga, de ser utilizados en la obtención de un reactivo de látex-aglutinación en lámina para la detección de Mb humana en el suero. No obstante, los anticuerpos purificados con la Mb equina manifestaron una mejor reactividad al provocar reacciones de aglutinación en un tiempo más corto.

### **3.2 Segunda parte.**

Los resultados obtenidos en la primera etapa sirvieron de base para proponer un flujo tecnológico con vistas a escalar la producción del reactivo de látex aglutinación para la determinación de mioglobina y evaluar su comportamiento en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio.

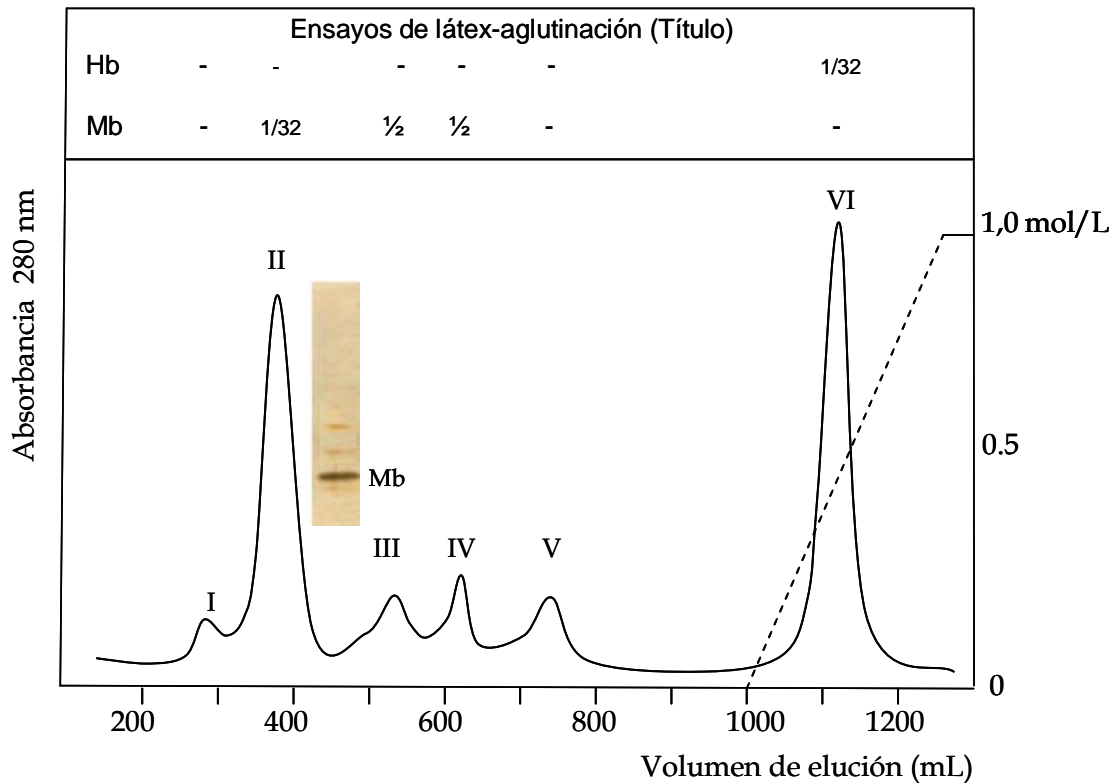
#### **3.2.1 La cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow permitió obtener, en una sola etapa, una Mb humana de pureza aceptable (RZ = 3.2) para la inmunización de los animales**

El análisis de los resultados alcanzados en la primera parte del trabajo, en particular, la reactividad de los antiseros anti-Mb humana frente a la Hb humana y su eliminación posterior mediante el método de purificación con Mb equina, permitió simplificar el proceso de purificación de la Mb humana a utilizar como inmunógeno en el proceso productivo. Los resultados obtenidos en la cromatografía en Mono Q (Figura 7) sugirieron el intercambio aniónico como alternativa.

Después de realizada la extracción de la Mb del músculo cardíaco mediante el método antes descrito (Hapner 1968), se concentró el extracto obtenido a partir de 250 g de tejido cardíaco, ahora hasta una concentración de 100 mg de proteínas totales por mL, para un volumen total de 10 mL (1,000 mg de proteínas totales). El proceso de purificación consistió de una cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow (Figura 15), que es la recomendada por Pharmacia-LKB (1989) para escalar las purificaciones con Mono Q.

Los resultados arrojaron dos fracciones cromatográficas principales (II y VI), ambas intensamente coloreadas, una que salió durante la corrida isocrática y otra que quedó atrapada en el tope de la columna. Esta fracción VI eluyó totalmente cuando se aplicó la solución amortiguadora de alta fuerza iónica.

Las pruebas inmunoquímicas realizadas a ambas fracciones evidenció la presencia de Mb en la fracción II (título 1/32) y la de Hb en la fracción VI (título 1/32), con los reactivos de referencia MIOLEX y HEMOLEX, respectivamente (inserto superior Figura 13).



**Figura 15. Perfil cromatográfico del extracto de miocardio en DEAE-Sephacel Fast Flow.** Tampón Tris-HCl 0.02 mol/L pH 8.6 (1 L) y tampón Tris-HCl 0.02 mol/L NaCl 1 mol/L pH 8.6. Velocidad de flujo 10 mL/min. Volumen de muestra 10 mL, fracciones 10 mL. Inserto superior: Resultados de los ensayos de látex-aglutinación HEMOLEX y MIOLEX para Hb y Mb. Inserto interior: Electroforesis SDS-PAGE en gradiente 10-15% de archilamida. Tinción con nitrato de plata del pico II de la cromatografía.

Como se aprecia en la electroforesis (inserto interior Figura 13), el pico II presenta, además, otros 3 componentes en concentraciones bajas, de acuerdo a la intensidad de las bandas y al nivel de detección de la técnica de tinción con nitrato de plata (0.3-0.5 ng de proteína por banda por cada  $\mu$ L aplicado). De manera que el procedimiento utilizado permite liberar a la Mb de una buena parte de las proteínas acompañantes y, en particular, de la hemoglobina, similar a lo ocurrido en la cromatografía en Mono Q (Figura 7).

El espectro realizado al pico II correspondió a la forma oxi de la mioglobina y fue similar al que se obtuvo previamente (ver Figura 10). El RZ calculado ( $DO_{418 \text{ nm}}/DO_{280 \text{ nm}}$ ) fue 3.2, lo cual indica un grado de pureza aceptable para los propósitos de la inmunización.

El método de purificación de Mb de un solo paso cromatográfico en DEAE-Sephacel Fast Flow permitió la obtención de una fracción (pico II) que contiene unos 341 mg de proteína, dado que los resultados de tres extractos y tres cromatografías arrojaron una media de  $341 \pm 8.25$  mg de

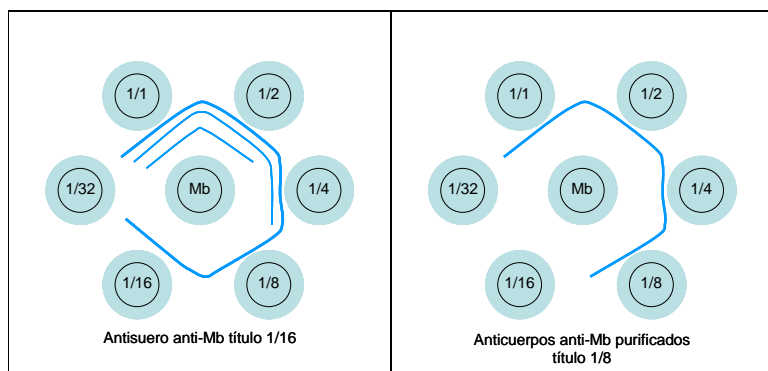
proteína. Esto corresponde aproximadamente a 1.36 mg de Mb por gramo de músculo cardíaco (341 mg/250 g de tejido), resultado muy similar al alcanzado en la primera etapa con la combinación de las cromatografías en Superose 12 y Mono Q (1.32 mg/g de músculo).

El método tuvo una reproducibilidad excelente, de acuerdo a los perfiles obtenidos en tres corridas cromatográficas realizadas y a los RZ calculados para la fracción II (3.3, 3.4 y 3.4), por lo que es adecuado para el escalado productivo, ya que permite recuperar en una sola etapa cromatográfica 341 mg de Mb humana, cuyo grado de pureza se monitorea con las lecturas de absorbancia a 418 y 280 nm y el cálculo del RZ. Este proceso posee además la ventaja de que no requiere necesariamente un FPLC, equipo costoso que encarece el proceso productivo, ya que la matriz puede ser utilizada en un equipo convencional, con resultados similares.

### **3.2.2 Resultaron factibles el escalado del programa de inmunización en carneros con empleo del conjugado Mb-KLH y la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana con el inmunoabsorbente de Mb equina**

Se seleccionó el esquema de inmunización en carneros que utiliza la Mb conjugada a KLH, con el que previamente se lograron los mayores títulos frente a la Mb humana (Figura 11). Los resultados que aquí se presentan corresponden a tres carneros, que fueron identificados I, II y III.

Con vistas a utilizar un método alternativo al ELISA para determinar los niveles de anticuerpos en los sueros de los animales durante la inmunización se valoró la inmunodifusión doble bidimensional (IDD) que, aunque es una técnica menos sensible, resulta más económica, es fácil de ejecutar y permite evaluar la respuesta inmunitaria de los animales. Para ello se titularon simultáneamente por ELISA e IDD convencional los sueros de los carneros inmunizados con la fracción II de DEAE Sepharose Fast Flow y sus anticuerpos purificados. Se encontró una correspondencia entre los niveles de anticuerpos por ambas técnicas. Después de estudiar varios antisueros de los tres carneros se observó que los títulos 1/6,400 y 1/3,200 obtenidos por ELISA se correspondían con los de 1/32 y 1/16 por IDD, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16. Resultados de la titulación de anticuerpos anti-Mb humana mediante IDD.** En el pozo central se colocó la Mb obtenida en el pico II de la cromatografía en DEAE-Sepharosa FF a 0.1 mg/mL. En el cuadro izquierdo está representado el antisuero (carnero I, título por ELISA 1/3,200) y en el derecho, los anticuerpos purificados correspondientes. Se llenaron los pozos externos con el antisuero y los anticuerpos sin diluir (1/1) y diluidos al doble en forma seriada. Es copia fiel del original.

Al enfrentar el pico II de la cromatografía en DEAE-Sepharose Fast Flow a los antisueros mediante IDD se visualizaron varias líneas de precipitado, indicativo de la inmunogenicidad de los contaminantes que acompañan a la Mb humana en esa fracción cromatográfica (inserto Figura 13 y Figura 14). Uno de ellos es la Hb, pues al enfrentar dicho antisuero a la Hb en un ensayo similar de IDD se obtuvo reactividad (título 1/4). Estas interferencias se eliminaron en los anticuerpos purificados, es decir, cuando los antisueros fueron absorbidos frente a la Mb equina (Tabla 11).

**Tabla 11. Resultado de las IDD en las que se enfrentaron antisueros y anticuerpos purificados, provenientes de los tres carneros (I, II y III), a Mb y Hb humanas.**

	Antisuero del carnero I frente a:			Antisueros de los carneros II y III frente a:		
	Mb*	Hb	No. de líneas de precipitación	Mb	Hb	No. de líneas de precipitación
Antes de la purificación	1/16	1/4	3	1/32	1/8	3
Después de la purificación	1/8	-	1	1/16	-	1

\*Fracción II de la cromatografía en DEAE Sepharosa FF

El proceso de inmunoabsorción fue escalado cinco veces (25 mL de inmunoabsorbente vs 5 mL de inmunoabsorbente a escala analítica) y permitió recuperar 18.2 mg de anticuerpos del antisuero de título 1/16, y 50.8 y 53 mg de anticuerpos de los antisueros de título 1/32, por 100 mL de suero (en 4 absorciones de 25 mL cada una), es decir, de 100 a 500 µg/mL de suero, dependiendo del título (Tabla 12); al mismo tiempo, eliminó aquellos anticuerpos no dirigidos hacia la Mb, como se apreció en la IDD (Tabla 11) y se confirmó por ELISA (resultados no mostrados).

**Tabla 12. Recobrado de los anticuerpos anti-Mb en la inmunoabsorción por cada 100 mL de antisuero.**

<b>Antisuero</b>	<b>Título de anticuerpos (IDD)</b>	<b>mg de Ac recuperado*</b>	<b>mg de Ac recuperado /mL de suero</b>
Carnero I	1/16	18.2 ± 3.4	0.18
Carnero II	1/32	50.8 ± 2.3	0.51
Carnero III	1/32	53.0 ± 5.2	0.53

\*Resultados correspondientes a 5 procesos de purificación

La purificación por inmunoabsorción de estos antisueros con volúmenes mayores del inmunoabsorbente resultó adecuada a las condiciones del centro productivo y resultó efectiva, particularmente, en cuanto a la eliminación de contaminantes con empleo de la Mb equina. La utilización de un proceso de inmunoabsorción en vez de una cromatografía de afinidad convencional redonda también en una importante reducción de los costos de producción, si se tiene en cuenta el valor de las matrices de afinidad en el mercado y de los sistemas cromatográficos. Un análisis similar puede hacerse con la IDD con respecto al ELISA para la titulación de los anticuerpos.

Una vez obtenidos y purificados los anticuerpos anti-Mb humana, el próximo paso lo constituyó el recubrimiento óptimo de las partículas de látex con los anticuerpos.

### **3.2.3 Se desarrolló un método que permite evaluar el grado de sensibilización óptimo de las partículas de látex**

Una vez demostrada, en la primera etapa del trabajo, la capacidad que tienen los anticuerpos generados y purificados con la Mb heteróloga de adsorberse y funcionar adecuadamente en el reconocimiento de la Mb humana en el suero humano, fue necesario determinar la concentración de anticuerpos capaz de brindar un recubrimiento óptimo de las partículas de látex.

El recubrimiento adecuado u óptimo de las partículas con los anticuerpos anti-Mb humana es aquel que permite que la agregación de las partículas tenga lugar sólo a partir de los niveles patológicos de Mb en el suero sanguíneo (por encima de 100 ng/mL) y en un rango analítico suficientemente amplio, permaneciendo las partículas estables, sin agregación, al enfrentarse a niveles normales de la hemoproteína (< 100 ng/mL de suero, según Stone y col 1977).



La adsorción física de los anticuerpos IgG sobre superficies hidrofóbicas como el látex es usualmente un proceso irreversible que ocurre muy rápidamente (Ortega e Hidalgo-Alvarez 1994). Esta unión está influenciada por diversos factores; en nuestro caso, el más importante fue la concentración de anticuerpos a emplear en la sensibilización. Y es que, para los demás factores, las condiciones más favorables ya fueron establecidas a lo largo del estudio y producción de un número importante de inmunodiagnosticadores de látex-aglutinación por diversos investigadores y productores (van Oss y Singer 1966, Molina y Galisteo 2005). Esto ha sido posible porque los anticuerpos son muy similares en cuanto a estructura, lo que hace que tengan un comportamiento muy parecido bajo condiciones análogas. Así se recomienda, a pesar de que la mayor capacidad de adsorción física de las inmunoglobulinas al látex se encuentra en su punto isoeléctrico, realizarla lo más lejos posible de este pH, siempre dentro de un rango en el que pueda llevarse a cabo la unión antígeno-anticuerpo (pH 6-9; Tijssen 1985). Esto es debido a que en el pI las fuerzas repulsivas entre los brazos Fab se neutralizan y estos se colapsan, lo que impide la captura posterior eficiente del analito/antígeno. Otro aspecto a tener en cuenta es la orientación del anticuerpo sobre la superficie, es decir, que la unión a la partícula se produzca por las regiones Fc para que los brazos queden expuestos al solvente y disponibles para su unión al antígeno. Esto se ve favorecido porque la región Fc de la molécula anticuerpo es más hidrofóbica que las Fab, de manera que -al menos las primeras moléculas que llegan a la superficie (aproximadamente, el 30 % de la concentración de saturación, según Johansen y col 1983)- tengan una buena orientación, ya que las que lo hacen después estarán sometidas a interacciones laterales que pudieran inhabilitar los Fab. Se plantea que un pH cercano a 8.2 y una fuerza iónica de 0.2 moles/L son condiciones idóneas para lograr una buena adsorción física de los anticuerpos a las partículas de látex (Singer y Plotz 1956, Chase 1971, Molina y Galisteo 2005) y esas fueron las condiciones que se emplearon en este trabajo.

Una vez adoptados los parámetros de pH y fuerza iónica para la adsorción, la variable a estudiar más importante fue, como ya se dijo, la concentración de anticuerpos. La cantidad máxima de ligando que puede ser enlazado a una partícula depende del diámetro de la misma y del nivel de grupos cargados de la superficie. La saturación de la superficie de la partícula se logra cuando se pone en contacto con cantidades del ligando muy superiores a las que se adsorben y está influenciada por el pH, la fuerza iónica y la temperatura (Tijssen 1985). Esa concentración de ligando se denomina concentración de saturación. En el caso de los anticuerpos, se conoce (Bangs 1990b) que sobre la superficie de poliestireno la adsorción máxima

es 6 mg/m<sup>2</sup> y para partículas de 0.81 µm de diámetro, de 0.022 mg/m<sup>2</sup>. Para los anticuerpos IgG esta saturación se alcanza con una concentración de 220 µg de anticuerpos/mL para partículas de látex de 0.81 µm al 1 %. Sin embargo, lo importante no es lograr un recubrimiento máximo sino un nivel de cobertura que proporcione un ensayo sensible, acorde a los niveles del analito que se va a detectar. Sí es necesario conocer la concentración saturante porque concentraciones muy elevadas darían una doble capa y un reactivo inestable, además del fenómeno de deformación que se produce durante el proceso de adsorción, lo que hace recomendable el empleo de concentraciones de anticuerpos menores que la de saturación (Molina y Galisteo 2005).

En este trabajo, la selección de la concentración óptima de anticuerpos para alcanzar el grado de sensibilización adecuado de las partículas partió de una concentración de anticuerpos (400 µg/mL) que es prácticamente el doble de la saturante (220 µg/mL) pero que al mismo tiempo es la mayor concentración de anticuerpos que se recomienda utilizar para lograr reactivos estables (Van Oss y Singer 1966).

Siempre quedará anticuerpo libre después de la adsorción. En aquellos casos en los que la concentración del analito/antígeno en la muestra es muy elevada, la presencia de anticuerpos libres puede ser beneficiosa, pues neutralizaría parte del antígeno y evitaría un efecto de prozona, el cual inhibe la reacción de aglutinación, dando lugar a resultados negativos falsos. En cambio, cuando las concentraciones del analito son bajas, la eliminación del anticuerpo libre por centrifugación elevaría la sensibilidad del reactivo. Por éstas y otras razones, la concentración de anticuerpos debe ser ajustada cuidadosamente, así como el empleo de la centrifugación posterior a la centrifugación, de acuerdo a los requerimientos de sensibilidad del ensayo.

En este trabajo se probaron 5 concentraciones de anticuerpos (400, 200, 100, 50 y 25 µg/mL). Se puede apreciar en la Tabla 13 que las concentraciones de adsorción de 400 y 200 µg/mL del anticuerpo sólo lograron detectar en el ensayo de látex-aglutinación concentraciones de Mb superiores a 250 ng/mL. Esto significa que el anticuerpo libre fue capaz de neutralizar concentraciones de 100 y 200 ng/mL. En cambio, cuando las partículas fueron recubiertas con niveles de 100 y 50 ng/mL, se lograron detectar hasta 100 ng/mL, o sea, que estas variantes fueron capaces de revelar las concentraciones patológicas mínimas, manteniéndose homogéneas con las concentraciones normales. Cuando se emplearon en el recubrimiento los anticuerpos a

25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sucedió el fenómeno de aglutinación espontánea. La razón de esto es que, como el látex es una suspensión coloidal de partículas hidrofóbicas, su estabilidad depende de las cargas activas de la superficie. La adición de pequeñas cantidades de proteína puede causar la agregación de las partículas debido a la disminución del potencial zeta; en la medida en que se incrementa la concentración del ligando las partículas tienden a estabilizarse (Molina y Galisteo 2005).

**Tabla 13. Ensayo de los reactivos preparados con distintas concentraciones de los anticuerpos anti-Mb purificados frente a diferentes concentraciones de Mb humana.**

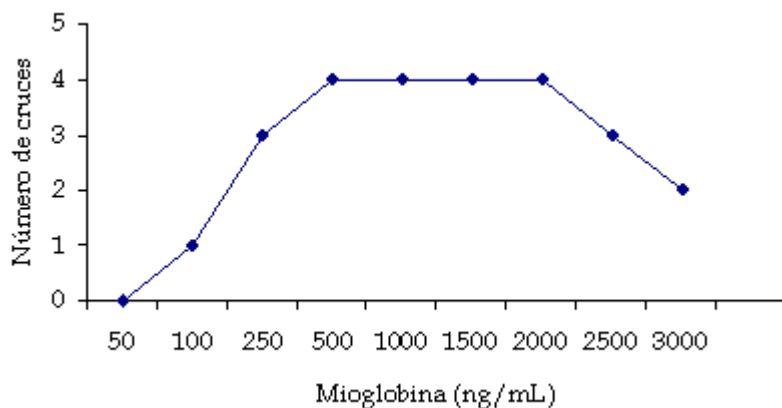
Conc. de anticuerpos anti-Mb humana ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentraciones de Mb humana ( $\text{ng}/\text{mL}$ )					
	Tampón	50	100	250	500	1000
25	+	NR	NR	NR	NR	NR
50	-	-	+	+++	++++	++++
100	-	-	+	+++	++++	++++
200	-	-	-	++	++++	++++
400	-	-	-	++	++++	++++
Lote 1	-	-	+	+++	++++	++++
Lote 2	-	-	+	+++	++++	++++
Lote 3	-	-	+	+++	++++	++++

NR: No realizada; los lotes corresponden a 3 reactivos preparados con niveles de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Acs.

La selección de un productor es la variante más económica. En nuestro caso lo fue la preparada con los anticuerpos a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentración que está de acuerdo con la indicación de que la concentración debe ser menor que la de saturación (220  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el látex al 1 %). Estos resultados nos condujeron a preparar 3 lotes del reactivo, cada uno en las condiciones ya descritas, los cuales tuvieron un comportamiento similar, como se muestra en la Tabla 13.

No obstante, la selección de la concentración óptima de anticuerpos a emplear en el recubrimiento de las partículas de látex es un paso que se recomienda realizar cada vez que se elabore un lote de reactivo con antisueros de otros animales y, aún con los procedentes del mismo animal, si las extracciones se realizan en intervalos grandes o después de nuevos “boosters”, pues los anticuerpos policlonales pueden diferir en composición de un animal a otro y durante el tiempo de inmunización. El método que se utilizó en este trabajo satisface este propósito, es sencillo en su ejecución, por lo que deberá ser utilizado en el proceso productivo con vistas a determinar, cada vez que sea aconsejable, la concentración adecuada de anticuerpos para un recubrimiento óptimo.

A partir de estos resultados se puede hacer un análisis de los niveles de anticuerpos en los sueros de carnero que se necesitarían para un adecuado proceso productivo, utilizando para ello los resultados que se reflejaron en la Tabla 12. Los anticuerpos purificados correspondientes a 100 mL de los antisueros con título 1/32 (51-53 mg) permitirían elaborar reactivo suficiente para 40,000 determinaciones. Sin embargo, el suero de menor título (1/16), que rindió unos 18 mg de anticuerpos purificados, sólo daría reactivo para unas 14,400 determinaciones, es decir, menos de la mitad. De ahí que recomendamos los títulos de 1/32 o superiores de anticuerpos anti-Mb humana en los sueros de los carneros inmunizados como los más apropiados y que los títulos menores no sean excluidos pero sí valorados.



**Figura 17. Curva de inmunoaglutinación.**

Los carneros son animales que aportan grandes cantidades de antisuero, ya que se le pueden extraer de una sola vez elevados volúmenes de sangre (200- 300 mL, según Harlow y Lane 1988). Estos animales mantienen los títulos de anticuerpos con la aplicación periódica de “boosters” durante un tiempo largo por lo que pueden ser utilizados como productores durante al menos dos años. Existe en la EPB “Carlos J. Finlay” una experiencia acumulada en la producción de anticuerpos en esta especie animal. Con los resultados obtenidos con las partículas de látex-aglutinación recubiertas con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpos anti-Mb humana se construyó un gráfico que muestra el comportamiento de la aglutinación, expresado mediante el número de cruces, frente a las concentraciones de Mb humana, barriendo un rango más amplio que el presentado en la Tabla 13 (50 - 3 000  $\text{ng}/\text{mL}$ ), lo cual se muestra en la Figura 17. El tipo de curva es muy similar al que clásicamente muestra la inmunoprecipitación cuantitativa (Roitt y Delves 2001), con una zona de equivalencia (plato de la curva) más extensa, tal y como ha sido informado para los ensayos de inmunoaglutinación (Molina y Galisteo 2005). Esta curva satisface los requerimientos para la detección de los niveles que alcanza la Mb en la isquemia coronaria, los cuales no van más allá de 1-1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Kawada y col 2008). El fenómeno de zona por exceso de antígeno no afecta las determinaciones de Mb porque se manifiesta a concentraciones por encima de los 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.2.4 Se diseñó un flujo tecnológico para la elaboración del reactivo MIOLÁTEX factible para la industria

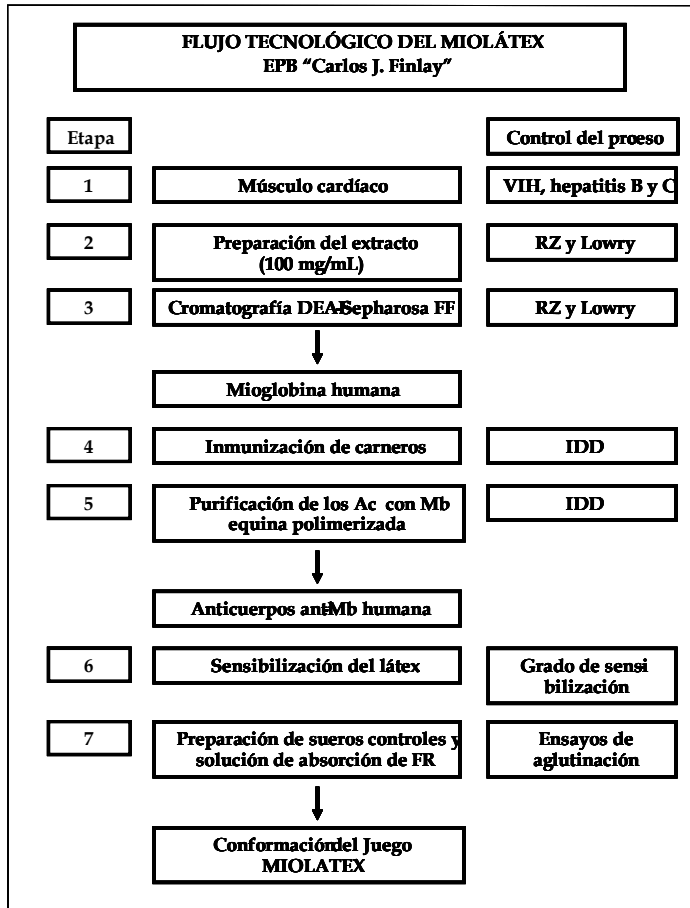


Figura 18. Flujo tecnológico para la producción del reactivo de látex-aglutinación MIOLÁTEX.

El desarrollo de la industria del diagnóstico "in vitro" no descansa sólo en lo novedoso. Una prueba de ello es el ensayo de látex-aglutinación en lámina, introducido en el diagnóstico en la década de los 50 del siglo pasado y que ha tenido un crecimiento importante en los últimos veinte años (Galloway y Hicks 1989, Molina y Galisteo 2005) con la asimilación de numerosas determinaciones para dar respuesta rápida a las exigencias de la clínica. A pesar de la historia de la técnica, desarrollar un reactivo es una tarea compleja aunque existan en el mercado productos similares. Cada fabricante deberá llegar con sus propios medios a obtenerlo, pues esta información no se encuentra disponible y constituye lo que se conoce como "secreto de producción". En este trabajo, las experiencias desarrolladas, primero en el laboratorio de investigación y después en el laboratorio de producción, sirvieron de base para proponer un flujo tecnológico factible para la industria con vistas a producir el juego de reactivo de látex-aglutinación para la determinación de Mb sérica para el que sugerimos el nombre MIOLÁTEX (Figura 18).

Además de las partículas de látex recubiertas con los anticuerpos anti-Mb humana, el juego diagnosticador requirió la preparación de los sueros controles y la solución de absorción de factores reumatoides. Los controles positivo y negativo se ajustaron a los requerimientos del reactivo, esto es: Aglutinación franca en un tiempo menor de dos minutos para el control positivo con el reactivo de látex, y no aglutinación para el control negativo durante 5 minutos de agitación. Los controles son reactivos indispensables en este tipo de diagnosticador, no sólo porque permiten evaluar la calidad del reactivo, que debe conservar su estabilidad y reactividad

El desarrollo de la industria del diagnóstico "in vitro" no descansa sólo en lo novedoso. Una prueba de ello es el ensayo de látex-aglutinación en lámina, introducido en el diagnóstico en la década de los 50 del siglo pasado y que ha tenido un crecimiento importante en los últimos veinte años (Galloway y Hicks 1989, Molina y Galisteo 2005) con la asimilación de numerosas determinaciones para dar respuesta rápida a las exigencias de la clínica. A pesar de la historia de la técnica, desarrollar un reactivo es una tarea compleja aunque existan en el mercado productos similares. Cada fabricante deberá llegar con sus propios medios a obtenerlo, pues esta información no se encuentra disponible y constituye lo que se conoce como "secreto de producción". En este trabajo, las experiencias desarrolladas, primero en el laboratorio de investigación y después en el laboratorio de producción, sirvieron de base para proponer un flujo tecnológico factible para la industria con vistas a producir el juego de reactivo de látex-aglutinación para la determinación de Mb sérica para el que sugerimos el nombre MIOLÁTEX (Figura 18).

por un período de tiempo no menor de un año, sino porque muestran de manera objetiva al técnico que ejecuta el ensayo los patrones de reactividad y no reactividad.

La solución de absorción de factores reumatoides (FR) fue capaz de neutralizar 400 UI de estas entidades. La mezcla de 10  $\mu$ L de la solución de absorción con 25  $\mu$ L del suero de referencia previno su aglutinación con el reactivo de látex-aglutinación para FR (EPB "Carlos J. Finlay"). Los factores reumatoides son autoanticuerpos que manifiestan una afinidad elevada por la porción Fc de las inmunoglobulinas G cuando éstas se encuentran modificadas (Jonsson 1993). Al acoplar los anticuerpos a la partícula de látex (u otra superficie de poliestireno) las moléculas se modifican y se produce una reacción de aglutinación, si los FRs se encuentran presentes en la muestra de suero, la cual se suele calificar de "inespecífica". En el juego de reactivos MIOLÁTEX, la solución de IgG modificada por calor, al ponerse en contacto con la muestra, neutraliza dichos factores, lo que evita la aglutinación "inespecífica" por esa causa.

El juego de reactivos MIOLÁTEX quedó finalmente compuesto por (Figura 19):

- Reactivo 1 (látex anti-mioglobina, 1 mL): Suspensión de partículas de látex de poliestireno de 0.8  $\mu$ m sensibilizadas con anticuerpos anti-Mb humana.
- Reactivo 2, (control positivo, 2 mL): "Pool" de suero humano líquido que contiene 250 ng de Mb humana por mL.
- Reactivo 3 (control negativo, 2 mL): "Pool" de suero humano líquido que contiene 60 ng de Mb humana por mL.
- Reactivo 4 (solución de absorción, 2 mL): Sustancia bloqueadora de factores reumatoides.



Figura 19. Juego de reactivos MIOLÁTEX.

Agente preservante: Azida sódica (máximo 1 g/L) en todos los reactivos.

Conservación: 2-8 °C

El juego de reactivos permite realizar 40 determinaciones con empleo de 50  $\mu$ L de la suspensión de látex. No obstante, se puede reducir ese volumen a la mitad (12.5  $\mu$ L), lo que permite realizar hasta 80 determinaciones.

El procedimiento que se propone para ejecutar el ensayo es el siguiente:

1. Esperar que los reactivos y los sueros alcancen la temperatura ambiente.
2. Depositar en una lámina portaobjetos dividida en 3 campos: 50  $\mu\text{L}$  de suero control positivo, 50  $\mu\text{L}$  de suero control negativo y 50  $\mu\text{L}$  del suero del paciente en cada uno de los campos.
3. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de la solución bloqueadora a cada uno de los campos.
4. Agitar bien el reactivo de látex y depositar 25  $\mu\text{L}$  del mismo en cada uno de los campos de reacción.
5. Mezclar con una varilla o palillo simulando un círculo y evitando que se junten las manchas.
6. Rotar manualmente la placa durante 5 minutos y observar la aparición o no de aglutinado.

Al evaluar los resultados debe observarse una aglutinación franca en el campo correspondiente al control positivo, y no aglutinación en el del control negativo que debe permanecer como una suspensión homogénea de aspecto lechoso. Los criterios de lectura son similares a los que aparecen en el epígrafe 2.4.5.1 (materiales y métodos). Ver prospecto en el Anexo 5.

Se realizó un estudio de estabilidad del juego MIOLÁTEX durante 12 meses, que es el tiempo recomendado para este tipo de reactivo, de acuerdo a las regulaciones del CECMED (2007), (ver Anexo 6). La producción de este diagnosticador en el país reduciría notablemente el costo de una prueba si se le compara con el precio de un reactivo similar comercial (ver Anexo 7).

### 3.2.5 El reactivo MIOLÁTEX tuvo un desempeño satisfactorio, que lo hace útil para diagnosticar y, en particular, descartar el IAM a las seis horas de la admisión del paciente

Primeramente se evaluó la precisión del ensayo (Figura 20). El valor de discriminación fue 84.23 ng/mL, muy similar al de 85 ng/mL informado por Stone y col (1977) como límite superior de los niveles de Mb en los individuos sanos.

La zona gris da información sobre la precisión del ensayo (70 ng/mL - 98.24 ng/mL), el cual es satisfactorio, dado que se extiende en una región estrecha donde no se pueden determinar con precisión los resultados positivos y negativos (Ochoa

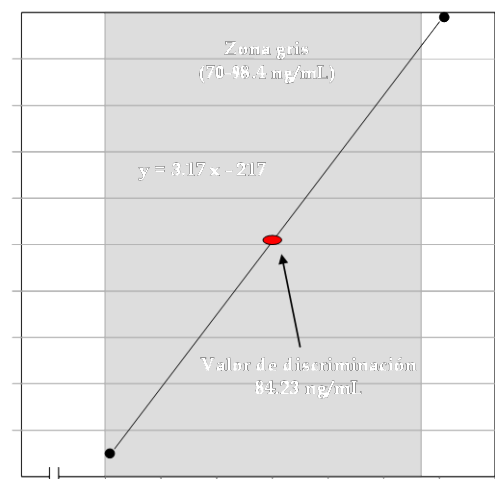


Figura 20. Zona gris y valor de discriminación.

y col 2000). No obstante, se observó el 100 % de resultados positivos con las concentraciones de Mb correspondientes a 100, 110, 120 y 125 ng/mL, lo que está en correspondencia con el criterio adoptado en la elaboración del reactivo MIOLÁTEX de que las aglutinaciones tengan lugar frente a concentraciones de Mb sérica iguales o mayores que 100 ng/mL.

La evaluación del desempeño del reactivo MIOLÁTEX en el diagnóstico del IAM se inició con 50 muestras de 25 pacientes (17 IAM vs 8 No IAM), las cuales se ensayaron simultáneamente con el reactivo comercial MIOLEX. En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos con los sueros de las muestras de sangre tomadas en la admisión y a las dos horas del ingreso:

**Tabla 14. Resultados de la prueba de látex-aglutinación en muestras de 25 pacientes con síntomas de IAM al momento del ingreso.**

Reactivo	Resultado de la prueba	Pacientes con:			
		IAM	No IAM	IAM	No IAM
		En la admisión		A las 2 horas	
MIOLEX	Positiva	13	3	15	3
MIOLÁTEX		13	4	17	4
MIOLEX	Negativa	4	5	2	5
MIOLÁTEX		4	4	0	4

Al momento de la admisión, ambos reactivos tuvieron una sensibilidad del 76.4 % (13 pacientes infartados con resultado positivo/17 pacientes con IAM). A las 2 horas del ingreso, los cuatro enfermos con IAM que resultaron negativos al inicio exhibieron con el MIOLÁTEX resultados positivos, denotando la elevación de los niveles de Mb sérica, para una sensibilidad de 100 %, mientras que el MIOLEX detectó los niveles patológicos sólo en dos de esos cuatro pacientes, manteniéndose la prueba negativa en los otros dos enfermos, lo que equivale a una sensibilidad del 88.2 % (15/17) (ver Tabla 15).

**Tabla 15. Valores predictivos, sensibilidad y especificidad del MIOLEX y el MIOLÁTEX con muestras de 25 pacientes .**

Parámetro (%)	Reactivo	En la admisión	A las 2 horas
Sensibilidad	MIOLEX	76.4	88.2



<b>Especificidad</b>	<b>MIOLÁTEX</b>	76.4	100
	<b>MIOLEX</b>	62.5	62.5
	<b>MIOLÁTEX</b>	50	50
<b>Valor predictivo positivo</b>	<b>MIOLEX</b>	81.2	83.3
	<b>MIOLÁTEX</b>	76.4	80.9
<b>Valor predictivo negativo</b>	<b>MIOLEX</b>	55.5	71.4
	<b>MIOLÁTEX</b>	50	50

Así, el valor predictivo positivo (VPP) del MIOLÁTEX, que al momento del ingreso fue 76.4 % (13 pacientes infartados con resultado positivo/17 pacientes con prueba positiva), a las dos horas se incrementó al 81 % (17/21). El MIOLEX mostró VPP al inicio y a las dos horas de 81 % (13/16) y 83.3 % (15/18), respectivamente.

El comportamiento de los dos reactivos fue muy similar, lo que sustenta el valor de este tipo de diagnosticador para identificar tempranamente la necrosis miocárdica, ya que en todos los individuos infartados se detectan en sangre niveles patológicos de Mb si, como fue el caso de estos 25 pacientes, las personas acuden al hospital antes de las 24-36 horas del dolor precordial u otro síntoma, porque al cabo de ese tiempo los niveles de la globina retornan a la normalidad.

Con respecto a la especificidad y el valor predictivo negativo (VPN), se pone de manifiesto, en ambos reactivos, que otras afecciones pueden provocar la liberación de Mb y sus elevaciones en sangre, sobre lo cual se tratará más adelante. Éste es un factor que hay que tener en cuenta al utilizar cualquier reactivo para Mb en el diagnóstico bioquímico del IAM, y que además influye en el VPP, dado que el número de pacientes con prueba positiva se divide por el número total de enfermos con prueba positiva. La especificidad y el VPN correspondientes al MIOLEX fueron más elevados, ya que la prueba sólo resultó positiva para tres de los ocho casos con No IAM, mientras que el MIOLÁTEX detectó elevaciones de la globina en cuatro de estos ocho pacientes. Esto pudiera deberse a una mayor sensibilidad del MIOLÁTEX con respecto al MIOLEX, como lo sugiere el hecho de que a las dos horas detectó los 17 casos de IAM no así el MIOLEX que sólo detectó 15. Como se conoce, la sensibilidad aumenta en detrimento de la especificidad y ésta es una cuestión que se adecua a los propósitos del ensayo. No obstante, la

especificidad y el VPN mejoraron para el MIOLÁTEX cuando se evaluó frente a un número mayor de muestras, como se verá más adelante.

Al no contar con solución de absorción de factores reumatoides el reactivo MIOLEX utilizado en el estudio, se evaluó la presencia de estos factores en los sueros de los 25 pacientes, resultando uno de ellos, al que se le diagnóstico finalmente IAM, positivo a la prueba para FRs. Siguiendo las indicaciones del propio fabricante, de los 13 casos positivos registrados por el MIOLEX, sólo 12 pueden tenerse en cuenta para dar los resultados de la prueba. Muestras como éstas sí pueden ser evaluadas correctamente con el juego de MIOLÁTEX porque dispone de la solución de absorción, lo que permitió que se detectaran los niveles patológicos de Mb en el suero de ese paciente, a pesar de la presencia de factores reumatoides en la muestra.

A continuación se presentarán los resultados obtenidos con la prueba del MIOLÁTEX en relación al diagnóstico final de IAM y No IAM en 81 de los 85 pacientes estudiados. Se excluyeron los resultados de cuatro enfermos que llegaron al hospital después de 24 horas de iniciados los síntomas de IAM, de ahí que el total de los pacientes evaluados se redujera a 81. Las muestras correspondientes a esos 81 pacientes fueron agrupadas en tres tiempos: el momento de admisión, y a las dos y seis 6 horas después del ingreso (Tabla 16).

Se observó una elevada correspondencia entre el diagnóstico final de IAM y los resultados de la prueba de aglutinación, haciéndose más notable a medida que transcurrió el tiempo de admisión al hospital. Los pacientes infartados, cuyas muestras fueron negativas al momento del ingreso, se hicieron positivos en la prueba a las 2 y 6 horas siguientes. Así, en el tiempo cero resultaron positivas 49, a las dos horas, 55, y a las seis horas, las muestras de los 58 pacientes con IAM. Se concluye que a las 6 horas del ingreso todos los casos con infarto tenían niveles patológicos de Mb en el suero sanguíneo y estos fueron detectados por el MIOLÁTEX, en total correspondencia con el diagnóstico médico final.

**Tabla 16. Resultado de la prueba del MIOLÁTEX a las 0, 2 y 6 horas de admisión de 81 pacientes con diagnóstico definitivo de IAM y no IAM. Valores registrados por la prueba estadística G (tabla de contingencia 2x2).**

Diagnóstico definitivo	No. de pacientes	Prueba de MIOLÁTEX a tiempos diferentes					
		0 horas		2 horas		6 horas	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
IAM	58	49	9	55	3	58	0

No IAM	23	6	17	6	17	6	17
Total	81	55	26	61	20	64	17

G = 22.559 \*\*\*

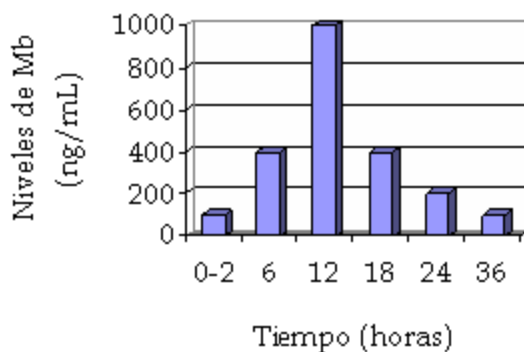
G = 37.718 \*\*\*

G = 50.097 \*\*\*

\*\*\* Significativa con probabilidad < 0.01 (equivalente a 99.9 %)

En cuanto a los 17 casos, del total de 23 pacientes No IAM, cuyas muestras resultaron negativas con el MIOLÁTEX al momento del ingreso, mantuvieron esa condición todo el tiempo, como era de esperar. En cuanto a los seis casos que fueron positivos, también se mantuvieron constantes en el tiempo, porque tenían realmente aumentados sus niveles de Mb en el suero y correspondían a otras patologías en las que se registran elevaciones de la Mb sérica. Tres de esos enfermos tenían angina de pecho severa, dos insuficiencia cardíaca y uno politraumatismo. Se distinguieron estos casos por su comportamiento cinético, al observarse una meseta a diferencia del pico de Mb en los casos de infarto (resultados no mostrados), tal como lo demostraron Mainard y col (1985).

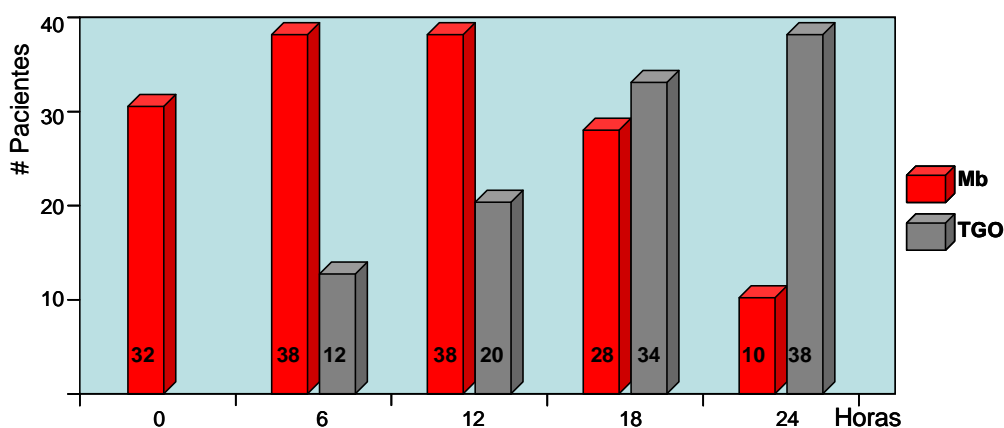
Es necesario tener en cuenta que los estudios realizados se refieren al momento de la admisión (tiempo cero) de los pacientes y no al de iniciación de los síntomas. Esto obligó a excluir de la validación los cuatro casos que acudieron al hospital después de 24 horas del comienzo del dolor precordial, tiempo en el que los niveles de Mb descienden a la normalidad si la evolución del paciente es satisfactoria (Bachem 1983, Wong 1996). Así lo demostraron los resultados negativos de las pruebas realizadas a esos cuatro individuos con IAM.



**Figura 21. Niveles de mioglobina en el tiempo detectados con el MIOLÁTEX.** Resultados representativos de uno de los 38 pacientes en los que se pudo precisar el momento del inicio del dolor precordial.

En 38 de los pacientes infartados sí se pudo precisar el momento del inicio del dolor precordial, por lo que fue posible investigar cómo se comportaron en el tiempo los niveles de Mb sérica. En la Figura 21 se muestran los resultados correspondientes a uno de estos pacientes, los cuales son representativos de los obtenidos con el resto de los enfermos. Se observa una cinética similar a la referida por diferentes investigadores (Wong 1996, Dati y Metzmann 2005).

Los resultados de las pruebas de inmunoaglutinación de estos 38 pacientes se compararon con los de la prueba de la TGO porque es un marcador bioquímico que se utiliza en nuestros centros de salud. En la Figura 22 se hace evidente la superioridad de la Mb como marcador bioquímico temprano en comparación con la TGO, la cual eleva sus niveles en sangre más lentamente, detectando todos los casos de infarto a las 24 horas. En ese tiempo la Mb había descendido prácticamente a los niveles normales en un número importante de los enfermos, lo que demuestra la utilidad de la TGO para diagnosticar IAM cuando los pacientes demoran su llegada al centro hospitalario y para su confirmación.



**Figura 22. Detección de mioglobina y TGO en función del tiempo de aparición del dolor precordial en 38 pacientes infartados.** Los números en las barras indican el número de muestras positivas para cada ensayo.

Como puede observarse en la Tabla 17, la sensibilidad y los valores predictivos positivo y negativo y variaron con el tiempo, mientras que la especificidad del MIOLÁTEX se mantuvo constante en los tres tiempos analizados.

**Tabla 17. Resultados del desempeño del reactivo MIOLÁTEX en el estudio de 81 pacientes (58 IAM vs 23 No IAM).**

Parámetro	0 horas	2 horas	6 horas
Sensibilidad (%)	84.4	94.8	100
Especificidad (%)	73.9	73.9	73.9
VP Positivo (%)	89	90	90.6
VP Negativo (%)	65.3	85	100

Eficiencia (%)	81.4	88.9	92.3
Índice kappa	0.56	0.72	0.80

La sensibilidad, es decir, la capacidad que tiene la prueba para detectar los casos con IAM, se elevó en el tiempo, alcanzando el 100 % a las 6 horas de la admisión. Esto permite diagnosticar en ese momento con gran seguridad todos los casos de infarto, ya que -si hay lesión miocárdica- la Mb se libera al torrente sanguíneo y aumenta sus concentraciones en sangre.

La especificidad se mantuvo constante (~74 %) y esto se debió a la persistencia de pruebas positivas en los seis pacientes con afecciones que producen también elevación de la mioglobina sérica. Por ser un reactivo para el diagnóstico del IAM, estos casos le restan especificidad al ensayo y a todos los reactivos que utilizan la Mb como marcador bioquímico. Pero este comportamiento de la especificidad está presente en todas las pruebas, no sólo en aquéllas basadas en biomarcadores. No obstante, en nuestro estudio, la especificidad de la prueba del MIOLÁTEX fue superior a la de cada una de las otras pruebas realizadas a los pacientes con sospecha de (Tabla 18). Por ello, el diagnóstico final se sustenta en una combinación de diagnósticos (Nomenclatura and criteria for diagnosis of ischemic heart disease, 1979).

**Tabla 18. Especificidad de las pruebas realizadas para diagnosticar el IAM.**

Prueba	Tiempo (horas)	IAM		No IAM		Especificidad (%)
		+	-	+	-	
Diagnóstico clínico	0	58	0	23	0	-
ECG	0	46	12	8	15	65
TGO	24	58	0	14	9	39
<b>Mb (MIOLÁTEX)</b>	<b>6</b>	<b>58</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>74</b>

Según los resultados obtenidos, los valores predictivos positivo y negativo se incrementaron en el tiempo. El VPP se mantuvo casi constante a partir de las dos horas, lo que pone de manifiesto la buena efectividad de la prueba para predecir tempranamente el IAM, aunque no alcanza el valor 1 como el valor predictivo negativo. Transcurridas 6 horas después de la admisión (aproximadamente 0-6 horas del inicio del dolor u otra sintomatología clínica), el VPN alcanzó el 100 %, lo que implica poder excluir el IAM si a las seis horas de la admisión no se observa una reacción positiva. Esto significa que el reactivo ofrece una mayor seguridad para descartar el IAM, lo que también es de gran valor en la práctica médica. Aunque estos valores pudieran estar afectados por la prevalencia de la enfermedad, en el caso del infarto agudo del miocardio las tasas en Cuba se han mantenido sin grandes variaciones en los últimos 15 años (Anuario Estadístico de Salud de Cuba; web:<http://www.infomed.sld.cu/servicios/estadística/anuario>). En correspondencia con los resultados de los valores predictivos, la eficacia de la técnica demostró que tiene una buena capacidad para identificar correctamente los positivos y negativos en cuanto a si están o no infartados, en particular, a las seis horas, cuando alcanzó el valor 92.3 %. El índice kappa se elevó con el tiempo alcanzando grados que evidencian buena concordancia con el diagnóstico de IAM y No IAM.

Los resultados correspondientes al desempeño del reactivo de látex-aglutinación MIOLÁTEX ponen de manifiesto que cuenta con las características de especificidad, sensibilidad, valores predictivos y eficiencia que requiere este tipo de diagnosticador para el IAM, a lo que se suma la sencillez de su ejecución y el breve tiempo (3-5 minutos) en los que se obtienen los resultados.

### 3.2.6 El reactivo MIOLÁTEX permitió monitorear el tratamiento trombolítico y detectar reinfarto

Los cuatro casos que fueron tratados con la estreptoquinasa habían tenido una franca reacción de aglutinación a las 0 y 2 horas del ingreso. A las cinco horas de su admisión se les suministró el medicamento y a los 90 minutos siguientes hubo un claro aumento de los niveles de Mb con respecto a los que tenían en sangre antes del inicio del tratamiento (Tabla 19). Esto fue indicativo, como lo refirieron Christenson y col (1997), que tuvo lugar la reperfusión y por tanto una buena respuesta al tratamiento, ya que los enfermos se recuperaron y fueron dados de alta.

**Tabla 19. Resultados de la prueba del MIOLÁTEX en cuatro pacientes infartados que recibieron tratamiento trombolítico.**

Paciente	Tiempo (horas)* de iniciado el tratamiento	Niveles mínimos de Mb (ng/mL)	
		Antes del tratamiento	A los 90 minutos
1	7.5	800	1 600
2	8	800	1 600
3	8,5	1 000	1 600
4	10	1 000	1 600

\*Tiempo transcurrido desde el inicio del dolor torácico.

El seguimiento del ensayo para Mb sérica permitió detectar dos casos de reinfarto, ocurridos aproximadamente a las 38 y 50 horas del ingreso, cuando los niveles de Mb ya eran normales, detectándose su incremento a las 42 y 54 horas. Uno de ellos ingresó a las 18 horas del inicio de los síntomas, detectándose en ese momento un nivel patológico de Mb que se negativizó a la 36 horas. El dolor le repitió aproximadamente a las 50 horas con incrementos patológicos en la muestra tomada a las 54 horas. En el segundo caso el paciente se negativizó a las 32 horas detectándose niveles alterados de Mb a las 42 horas, momento del reinfarto.

## **CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN GENERAL**

### **4.1 Sobre la utilidad del conocimiento de las similitudes antigénicas entre las mioglobinas**

La mioglobina humana disminuye su inmunogenicidad y por ende la producción de anticuerpos en la medida en que se asemeja más a la mioglobina de las especies animales empleadas comúnmente en la inmunización experimental. Esta es una cualidad extrínseca de las moléculas antigénicas porque depende del organismo respondedor, identificada durante muchos como “carácter extraño” del inmunógeno, el cual ha sido reconocido, entre otras características, como un factor a considerar en la inmunogenicidad (Sela 1969, Dresser 1986, Harlow y Lane 1988, Tijssen 1985, Berzofski y Berkower 2003). A la luz de los conocimientos actuales, quizás sea más fácil de explicar y de entender este criterio en términos de epítomos T, porque son continuos en la secuencia primaria de la proteína, y tienen unos pocos residuos de aminoácidos claves para su anclaje en las moléculas MHC, que los capturan y presentan en forma de complejos a las células T (Berzofski y Berkower 2003). Si los animales son tolerantes a las proteínas propias de su especie, en particular, cuando son monomórficas, como es el caso de las mioglobinas, una diferencia en unos pocos residuos de aminoácidos podría conllevar a diferencias con los péptidos propios tolerados y por tanto a la activación de poblaciones de células T auxiliaadoras en el animal respondedor, tal como lo demostraron Berkower y col (1982) y Kojima y col (1988). Los primeros inmunizaron con mioglobina de cachalote dos líneas isogénicas de ratón y evidenciaron que la activación y respuesta de poblaciones de células T auxiliaadoras dependía de un residuo de aminoácido particular en la posición 109. Los segundos demostraron que estas poblaciones celulares estaban concentradas contra un segmento de esa globina. De hecho, la inmunización con la mioglobina sola en una especie heteróloga es capaz de inducir anticuerpos del isotipo IgG, como se demostró en este trabajo (Figuras 11a y 11b) y en los de otros investigadores (Atassi 1975, Hurrell y col 1977, Cooper y col 1984), aunque los títulos alcanzados son bajos. Al no conocerse en profundidad y extensión, como sucede con el humano y el ratón, los haplotipos MHC del conejo y del carnero, la predicción de epítomos T MHC II (y de MHC I) en la Mb humana para estas especies animales resulta difícil en la actualidad y sólo pueden predecirse tales sitios a partir de algoritmos basados en la estructura primaria, como el desarrollado por el grupo de Berzofski (Margoliat y col 1987) utilizado en este trabajo.



Con relación a los sitios reconocidos por los linfocitos B, y los anticuerpos, su estudio y reconocimiento son mucho más complejos, debido a que una buena parte de los epítomos B (Lando y col 1982), si no la mayoría (Sweredoski y Baldi 2008), son dependientes de la conformación de la molécula proteica. Esto conllevó, en el caso de la mioglobina de chachalote, uno de los prototipos antigénicos en los estudios inmunoquímicos de las proteínas, a diversos trabajos y disquisiciones teóricas sobre la antigenicidad de las mioglobinas (Atassi 1975, Hurrell y col 1977, East y col 1980, Berzofski y col 1980 y 1982, Rodda y col 1986) y de las proteínas en general, que condujeron a avances notables en la inmunoquímica de los antígenos. Significa que el alineamiento de las secuencias primarias de la mioglobina inmunizante y la heteróloga no es una herramienta segura para localizar epítomos B y discriminar si será o no inmunogénica y en qué grado para una especie particular, tomando en cuenta solamente las sustituciones de residuos de aminoácidos en la estructura primaria. Y es que otros residuos distantes en la estructura primaria pero cercanos por el plegamiento de la cadena polipeptídica podrían estar jugando un papel en la conformación del sitio, más importante en la mayoría de los epítomos B que los propios residuos que lo constituyen (Thornton y col 1986). Similarmente, ninguno de los algoritmos predictivos desarrollados hasta el momento ha demostrado poseer una buena eficacia para pronosticar tales sitios y es por eso que la comunidad científica se ha pronunciado en ese sentido y se ha trazado estrategias de trabajo conjunto para mejorar los algoritmos (Greenbaum y col 2007). No obstante, la práctica ha demostrado que existe una relación entre el grado de similitud secuencial y la inmunogenicidad (Cooper y col 1984) y así se reconoce por autoridades en este campo (Tijssen 1985, Harlow y Lane 1988, Berzofski y Berkower 2003). En nuestro caso, la inmunización de carneros con la mioglobina equina sola, la cual tiene un mayor grado de identidad con la globina humana (89.5 %, Tabla 4) que la del conejo y el carnero, así lo confirmó, ya que estos carneros, sometidos a un esquema similar al empleado en este trabajo con la mioglobina humana, respondieron mal, y los títulos determinados por ELISA fueron muy bajos (resultados no mostrados). Un razonamiento elemental indica que, mientras menor sea la similitud de secuencias primarias entre dos proteínas, mayor será la probabilidad de que algunos de los residuos sustituidos estén involucrados directa o indirectamente en un epítomo B. Por eso nos inclinamos a predecir al inicio del trabajo que la mioglobina humana sería más inmunogénica en el carnero que en el conejo, como realmente sucedió con todos los animales inmunizados.

Si bien es cierto que el grado de similitud de las Mbs en las diferentes especies animales va en detrimento de su inmunogenicidad, puede resultar útil para otros fines. Las similitudes entre las Mb humana y equina en cuanto a estructura primaria (19 sustituciones de residuos de aminoácidos con 6 conservativas) y los estudios de protuberancia y superposición hicieron pensar que se podía emplear Mb equina para la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana. Esto ofrece la ventaja que se elimina una gran parte del trabajo con el músculo cardíaco humano, lo que presenta inconvenientes de tipo ético y operativo, pudiendo limitarse la obtención de Mb humana sólo a las cantidades que se necesitan para la inmunización de los animales. Y, como segunda ventaja, que al purificar los anticuerpos con la proteína equina, se elimina la reactividad con la hemoglobina, la cual está presente en los sueros hemolizados. Por otra parte, el inmunoabsorbente de Mb equina polimerizada con glutaraldehído permite sustituir las matrices de importación y además utiliza Mb equina, un reactivo comercial más asequible que la Mb humana.

No obstante, al preparar los reactivos de látex con los anticuerpos purificados frente a la Mb humana y a la equina y ensayarlos frente a diferentes concentraciones de Mb humana en los sueros preparados con concentraciones diferentes de la globina y a los sueros de los pacientes infartados, el reactivo B preparado con los anticuerpos purificados con la Mb heteróloga mostró en todos los casos tiempos de aglutinación menores que el reactivo A, preparado con anticuerpos purificados con Mb humana (Tablas 9 y 10). Estos resultados constituyen un beneficio adicional del empleo de la Mb equina en la purificación de los anticuerpos anti-Mb humana, no pensado al inicio de la investigación, y que puede deberse a la eliminación ventajosa de poblaciones de anticuerpos con menor afinidad. Es sabido que los anticuerpos de más elevada afinidad manifiestan mayor grado de reactividad cruzada (Berzofski y Berkower 2003). De esta forma, al purificar los anticuerpos anti-Mb humana con la proteína equina, se recuperan las inmunoglobulinas de mayor afinidad, que resultan más efectivas en la captura de la Mb sérica en el ensayo de aglutinación.

Para concluir, se desarrolló un método de purificación de anticuerpos anti-Mb humana con empleo de Mb heteróloga que rindió niveles satisfactorios de recuperación de anticuerpos y que puede ser utilizado a nivel de planta de producción. Los anticuerpos purificados no reconocieron la hemoglobina humana y pueden ser utilizados en el desarrollo de inmunoensayos para detectar y cuantificar niveles normales y/o patológicos de Mb en suero

sanguíneo, manifestando incluso una mejor reactividad que los anticuerpos purificados frente a la Mb homóloga, como se demostró con el ensayo de aglutinación del reactivo B.

Sólo se encontró en la literatura consultada, que fue bastante extensa, la utilización de la reactividad cruzada entre mioglobinas en un ELISA desarrollado por Sawhney y col (1985), quienes propusieron un RIA heterólogo para cuantificar los niveles de Mb en plasma humano. Ellos utilizaron mioglobina equina en sustitución de la humana, lo que habla a favor de que es precisamente esta proteína heteróloga la que presenta mayor similitud en cuanto a comportamiento antigénico con la humana.

## **4.2 Sobre la utilidad de la mioglobina en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio**

El infarto agudo del miocardio es una enfermedad frecuente, de evolución incierta, cuya mortalidad durante la fase aguda se estima entre el 20 y el 50% (Castillo-López 2007). Se pudiera pensar, a priori, que siendo una de las primeras si no la primera causa de muerte en muchos países, el diagnóstico de esta enfermedad es un problema resuelto, sobre todo, si se tiene en cuenta que la aplicación eficaz y en tiempo de la terapia trombolítica puede salvar la vida del paciente. Según McCord y col (2001), aproximadamente el 85 % de las personas que llegan a los cuerpos de guardia con posible síndrome coronario no tienen IAM, y lo más lamentable es que, según Pope y col (2000), el 2-5 % de los individuos realmente infartados son “despachados” erróneamente con consecuencias severas. En un estudio realizado en Cuba por Castillo-López y col (2007), en el Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”, se determinó que sólo el 26.3 % de 72 pacientes que sufrieron IAM recibieron tratamiento trombolítico, y esto se lo adjudicaron, principalmente, a demoras en el diagnóstico. De ahí la importancia del diagnóstico al nivel primario de salud para descartar a las personas no infartadas e ingresar en la unidad de cuidados coronarios a aquéllas que sí lo necesitan. Y esto, por supuesto, en un tiempo prudencial y con un costo razonable. Para iniciar esta discusión se hará un breve recuento histórico del diagnóstico del infarto agudo del miocardio y sus limitaciones.

Durante las tres últimas décadas, la enfermedad isquémica aguda ha sido considerada como un fenómeno binario: IAM o No-IAM, según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, que proponían el cumplimiento de al menos dos de tres criterios diagnósticos bien conocidos: dolor torácico agudo, severo y prolongado; presencia de cambios significativos en el

ECG y elevación anormal no equívoca de actividades enzimáticas en suero (Dati y Metzmann 2005). El dolor torácico es, sin embargo, un indicador no confiable: más del 33 % de los pacientes con IAM pueden no tener dolor torácico y son clínicamente silentes al presentarse al hospital (Canto y col 2000). El ECG, una prueba relativamente rápida y económica, continúa siendo la piedra angular para el diagnóstico temprano de isquemia aguda, mostrando cambios del segmento ST en los primeros segundos del insulto isquémico en aproximadamente el 60 % de los pacientes. Sin embargo, esta prueba puede ser no conclusiva en el restante 40 % de los casos, mostrando una sensibilidad global baja (Rouan y col 1989). A esto habría que añadir los casos falsos positivos de esta prueba, así como los del diagnóstico clínico (Ancillo 2003), que con cierta frecuencia ingresan en la unidad de cuidados coronarios. También son bien conocidas la sensibilidad y especificidad imperfectas de los marcadores enzimáticos tradicionales (TGO, LDH, CK total) para la detección de daño miocárdial (Panteghini 1999). En este contexto histórico, el riesgo de diagnósticos perdidos es relativamente alto. Varios estudios estiman que del 2-8 % de los pacientes con IAM fueron inadvertidamente enviados a su casa desde los departamentos de emergencia, debido a las limitaciones del diagnóstico electrocardiográfico y bioquímico (Kontos y Jesse 2000). Este “despacho” inapropiado resulta en una morbilidad y mortalidad significativamente superiores (Lee y col 1987, Pope y col 2000).

Teniendo en cuenta los escollos del criterio tradicional para el diagnóstico del IAM y la aparición de nuevos marcadores sensibles y específicos de daño del músculo cardíaco, el Comité para la Estandarización de Marcadores de Daño Cardíaco (C-SMCD) de la IFCC hizo en 1999 una recomendación para redefinir el criterio bioquímico para el diagnóstico del IAM (Alpert y Thygesen 2000). Este Comité propuso a la troponina como el mejor marcador bioquímico para detectar necrosis miocárdial (Jaffe y col 2000) y considera el uso de la CK-MB una alternativa aceptable cuando no se dispone de los ensayos de troponina. Aunque muchos autores están de acuerdo con el empleo de la troponina como marcador único (Amodio y col 2007, Kavsak y col 2007), es conveniente señalar que algunos autores han expresado sus reservas sobre sustituir totalmente este marcador (Wu y col 1999) y que muchos médicos emplean la concentración pico en suero de la isoenzima MB de la CK para estimar cuantitativamente el tamaño del infarto.

Éste es, a grandes rasgos, el desarrollo que ha tenido el diagnóstico del IAM, donde lo más sobresaliente es el peso que en los últimos años se le ha dado al diagnóstico bioquímico, por ser un índice que puede reflejar inequívocamente el daño miocárdial en una forma no invasiva.

Sin lugar a dudas, en el diagnóstico del IAM, la tarea más difícil es clasificar a las personas que llegan al departamento de urgencias con síntomas clínicos de isquemia y el ECG resulta no diagnóstico (Panteghini 2004). Es posiblemente la situación donde los marcadores bioquímicos, bien manejados, pueden contribuir a un diagnóstico más exacto y temprano del infarto del miocardio, lo que a su vez posibilita una terapia oportuna. Dos estrategias han sido propuestas para afrontar esta situación (Panteghini 2002). La primera de ellas, de mayor aceptación, emplea la combinación de dos marcadores: uno de elevación temprana, la mioglobina, y un marcador que se eleve más tardíamente pero que sea más específico, las troponinas cardíacas o la CK-MB, para de esta forma poder detectar a los pacientes que se presentan tempranamente y un tiempo después del comienzo de los síntomas. En particular, el algoritmo diagnóstico basado en la medida combinada de Mb y troponina I se ejecuta en un tiempo satisfactorio y mejora significativamente la eficiencia del diagnóstico de laboratorio de pacientes con sospecha de IAM, permitiendo además el monitoreo sucesivo de la reperfusión coronaria (Plebani y Zaninotto 1998).

Debido a su baja masa molecular, la Mb aparece en la sangre después del daño tisular más tempranamente que la isoenzima MB de la CK y las troponinas cardíacas (Montague y Kircher 1995, Apple y col 1995, Panteghini y col 1999). El otro marcador bioquímico temprano es la proteína que une ácido graso (FABP) la cual se investiga más recientemente (Glatz y col 1998, Okamoto y col 2000, Furuhashi y col 2004). La Mb difunde rápidamente a través del sistema vascular y se incrementa en el plasma, según Wong (1996), tan tempranamente como 0.5 a 2 horas después del comienzo del dolor torácico, y se mantienen sus niveles elevados durante 5-12 horas. Por todo esto, la Mb es ventajosa como marcador bioquímico temprano del IAM (Panteghini y col 1999) y numerosos estudios han demostrado su elevada sensibilidad para la detección del IAM dentro de las pocas primeras horas después de la presentación (Brogan y col 1994). Sin embargo, su uso tiene limitaciones, como la mayoría de los marcadores bioquímicos de daño miocárdico, ya que tiene baja especificidad, en particular, en pacientes con fallo renal o trauma del músculo esquelético. Otra desventaja de la Mb como marcador pudiera ser que se eleva y cae rápidamente en el IAM. Esto hace que una sola medida en el momento de la admisión podría ser normal para pacientes que acuden enseguida al centro médico y también para aquéllos que se presentan más de 24 horas después del comienzo de los síntomas (Stone y col 1975). Estas limitaciones pueden ser resueltas mediante (1) la determinación combinada de Mb y un marcador específico cardíaco (isoforma MB de la CK o troponina I/T) o un marcador

esquelético específico (anhidrasa carbónica III) o (2) con la evaluación de Mb en muestras seriadas. No obstante, la elevación y caída rápida de los niveles de mioglobina en sangre constituye una ventaja frente al resto de los marcadores bioquímicos que mantienen sus concentraciones aumentadas un tiempo más prolongado, porque permite su utilización para detectar reinfartos (Hasic y col 2006).

El papel diagnóstico de la Mb en pacientes con sospecha de síndrome coronario agudo está bien demostrado y es, de acuerdo a las guías de la IFCC (y la NACB), el marcador de elección para la determinación temprana del IAM, en combinación con la CK-MB 4 horas después de la admisión con una sensibilidad del 96 % (Stork y col 2000, O'Neil y Ross 2001). En un estudio realizado por Mc Cord y col (2001), en el que midieron Mb, CK-MB y TnI en el cuerpo de guardia en 817 pacientes con sospecha de síndrome isquémico y ECG no diagnóstico, pudieron excluir el IAM a los 90 minutos de la admisión sólo con Mb y TnI. Con este fin, existen en el mercado una disponibilidad amplia de juegos diagnósticos para Mb sola o en combinación con otros marcadores cardíacos.

¿Cuál es la situación del diagnóstico en Cuba del IAM y qué papel puede jugar el MIOLÁTEX? Actualmente, los criterios que se utilizan para diagnosticar el IAM a nivel de cuerpo de guardia e ingresar a los pacientes en la unidad de cuidados coronarios toman en cuenta, fundamentalmente, el diagnóstico clínico y los resultados del ECG. No resulta útil en esos momentos la determinación de la CK total, la CK-MB o la TGO séricas porque se elevan a las 6-8 horas del inicio de los síntomas, de manera que sólo aquéllos que demoran su traslado al centro asistencial de salud pueden resultar positivos a esas pruebas en el momento de su admisión. Contar con un reactivo como el MIOLÁTEX en los cuerpos de guardia permitiría excluir en el momento de la admisión el 53 % de los pacientes no infartados, a las 2 horas el 77 % y a las 6 horas el total de ellos, según los resultados presentados en este trabajo (Tablas 15 y 16). Téngase en cuenta que los aumentos de la CK total y la CK-MB se producen a partir de este tiempo. A pesar de no ser un marcador específico de daño miocárdial, la mioglobina contribuye también al diagnóstico de los infartos durante las primeras horas del inicio de los síntomas, antes de que se eleven los marcadores específicos de tejido cardíaco, en particular, en los pacientes con síndrome coronario y ECG no diagnóstico.

La prueba del MIOLÁTEX, unida al diagnóstico clínico y electrocardiográfico, permitiría tomar oportunamente la decisión de la terapia trombolítica o la intervención coronaria percutánea (ACTP), acciones terapéuticas que deben ser ejecutadas durante las 12 horas siguientes de producido el infarto y mucho mejor durante las 6 primeras horas (Quirós, comunicación personal). A esto debemos agregar que se trata de una prueba rápida, no invasiva, que puede ser ejecutada de una forma sencilla y en un tiempo corto (2-3 minutos). El aspecto más negativo de la prueba se manifiesta en las primeras horas de la admisión con los falsos negativos constituidos por aquellos pacientes que demoraron su llegada al centro de salud y por tanto los niveles de Mb sérica descendieron a la normalidad. El otro aspecto negativo de la determinación de Mb son los falsos positivos que no están infartados y tienen niveles elevados de Mb sérica. Estos son aspectos que podrían ser aclarados durante el interrogatorio médico y con la determinación de la CK-MB.

No obstante estos aspectos negativos, son muchos más los aspectos positivos del MIOLÁTEX, por lo que del balance final resulta que la determinación de Mb sérica con un reactivo de látex-aglutinación constituye una herramienta útil para excluir el IAM en los servicios de urgencia de las instituciones de salud del país en las primeras seis horas del ingreso y contribuir además a su diagnóstico. La restauración del flujo de la arteria coronaria ocluida responsable del infarto ha supuesto un avance importante en la reducción de la mortalidad por esta causa, pero el tiempo es un factor crítico ya que el tratamiento debe llevarse a cabo dentro de las primeras horas del comienzo de los síntomas. De ahí la necesidad de un diagnóstico definido temprano. A esto hay que añadir la utilidad del reactivo para evaluar el éxito de la reperfusión después de la terapia trombolítica, con vistas a la toma de decisiones en aquellos pacientes en los que la fibrinólisis ha sido ineficaz. Según Ancillo (2003), la Mb constituye el marcador por excelencia, midiéndose antes y 90 minutos después de la intervención. El reactivo MIOLÁTEX es también útil para detectar reinfarto, basado en el hecho de que a las 24 horas se recuperan los valores normales en sangre, así como también para identificar la angina de pecho, dado el comportamiento cinético en forma de meseta, muy diferente al pico que genera la liberación de mioglobina sérica en el infarto. Podría tener, además, otras aplicaciones no tratadas en este trabajo pero que son de interés de otras instituciones, como la medicina forense, la medicina deportiva y la antropología.

Una voz autorizada en este campo del diagnóstico de IAM, Mauro Panteghini, al referirse al valor de la mioglobina como marcador isquémico, plantea: “La determinación de mioglobina tiene el mérito de una evidencia científica robusta, con más de 30 estudios publicados sobre el uso de esta proteína como un marcador sensible y precoz para excluir el IAM (Panteghini y col 1999, Panteghini 2002). La Mb tiene por tanto la utilidad potencial para excluir tempranamente al IAM en pacientes que se presentan en el departamento de urgencias con dolor torácico. El valor predictivo negativo de este marcador excluye el infarto 4 horas después de la admisión al hospital, según Christenson y Duh (1999), quienes obtuvieron un valor del 100 %. Este resultado es superior al obtenido con el MIOLÁTEX pues fue a las seis horas de la admisión que alcanzó el 100 % de valor predictivo negativo en las muestras estudiadas. No obstante, es muy probable que este tiempo se acorte cuando el reactivo se haya probado con un número mayor de muestras.

Para finalizar: el ensayo de látex-aglutinación para la determinación temprana de mioglobina sérica, en combinación con la CK-MB como marcador específico, podría dar respuesta a las exigencias actuales del diagnóstico de laboratorio del infarto agudo del miocardio, según las guías de la IFCC, en las instituciones de salud cubanas. Los autores de esta investigación sugerimos una determinación seriada de mioglobina con el MIOLÁTEX a las cero, dos y seis horas de la admisión en los servicios de urgencia ante la sospecha de síndrome coronario agudo. Esto permitiría excluir con gran seguridad y precozmente el IAM y los resultados positivos podrían ser confirmados a nivel de laboratorio con la determinación de la isoenzima MB de la CK. Una vez aplicada la terapia trombolítica o la ACTP, la determinación de Mb sérica permitiría evaluar el éxito de la reperfusión miocárdica.



## CONCLUSIONES

1. El método de purificación de la mioglobina humana consistente en una cromatografía de exclusión molecular en Superose 12 y un intercambio aniónico en Mono Q con empleo del Sistema FPLC permite la obtención de una fracción con una pureza elevada, que presenta dos variantes de mioglobina con puntos isoeléctricos 6.9 y 7.3.
2. Los métodos de inmunización y de purificación de los anticuerpos anti-mioglobina humana utilizados permiten obtener niveles satisfactorios de anticuerpos selectivos y funcionales en látex-aglutinación en lámina para la detección de la mioglobina humana, lo que evidencia la importancia de conocer las similitudes antigénicas entre las mioglobinas de diferentes especies.
3. Es factible desarrollar en las condiciones de la industria farmacéutica (Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay") el flujo tecnológico que se propone para la producción del inmunoensayo de látex-aglutinación MIOLÁTEX.
4. Todos los pacientes infartados resultaron positivos en la prueba del MIOLÁTEX a las seis horas posteriores al ingreso, lo que demuestra la utilidad de una prueba negativa en ese tiempo de admisión para descartar con seguridad el infarto agudo del miocardio, además de contribuir a su diagnóstico, al monitoreo de la reperfusión y a la detección de reinfarto.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio detallado sobre la factibilidad económica de producir el juego de reactivos MIOLÁTEX con la tecnología propuesta en la EPB "Carlos J. Finlay".
2. Registrar el producto e introducirlo a la producción.
3. Evaluar la utilidad del MIOLÁTEX en otras situaciones, patológicas o no.
4. Desarrollar un inmunoensayo cuantitativo para mioglobina humana.

## LISTADO DE REFERENCIAS

- Abe S, Arima S, Nomoto K, Maruyama I, Miyata M, Yamaguchi H, Okino H, Yamashita T, Atsuchi Y, Tahara M y col (1993) Early detection of coronary reperfusion by rapid assessment of plasma myoglobin. *Int J Cardiol* **38**(1):33-40.
- Abe S, Arima S, Yamaguchi H, Asuchi Y, Tahara M, Nakao S, Tanaka H, Maruyama I, Nomoto K, Ueno M (1991) Non-invasive evaluation of coronary reperfusion using myoglobin: significance of quantitative or semi-quantitative latex agglutination methods. *J Cardiol* **21**(4):847-855.
- Agmon N (2004) Coupling of protein relaxation to ligand binding and migration in myoglobin. *Biophys J* **87**(3):1537-1543.
- Akeson A, Theorell M (1960) *Arch Biochem Biophys* **91**:319. Citado por Brown 1961 y Yamazaki y col 1964.
- Akeson A, von Ehrenstein G, Hevesy G, Theorell H (1961) *Arch Biochem Biophys* **91**:310, 1960. Citado por Brown 1961.
- Alix AJ (2000) Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine* **18**: 311-314.
- Alpert J, Thygesen K, Antman E, Bassand JP (2000) Myocardial infarction redefined. A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **36**:959-969.
- Amodio G, Antonelli G, Varraso L, Ruggieri V, Di Serio F (2007) Clinical impact of the troponin 99th percentile cut-off and clinical utility of myoglobin measurement in the early management of chest pain patients admitted to the Emergency Cardiology Department. *Coron Artery Dis* **18**(3):181-186.
- Ancillo P (2003) Marcadores en el síndrome agudo. *Medicina intensiva* **27**(9):598-600.
- Andersen H, Nielsen M, Lund O (2006) Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* **15**(11): 2558-2567.
- Andrade J (1985) *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*; Andrade JD Ed; Plenum Publishers: New York, Vol 2: 1.
- Andriambelason E, Witting PK (2002) Chemical regulation of nitric oxide: a role for intracellular myoglobin? *Redox Rep* **7**(3):131-136.
- Anesi A, Rondanelli M, Trotti R, Melzi, d'Eril GV (2000) Biological variability of myoglobin in healthy elderly and younger subjects. *Aging (Milano)* **12**(3):168-172.
- Antonini E, Rossi-Fanelli A (1956) Heterogeneity of human myoglobin. *Arch Biochem Biophys* **65**(2):587-590.
- Apple FS, Voss E, Lund L, Preese L, Berger CR, Henry TD (1995) Cardiac troponin, CK-MB and myoglobin for the early detection of acute myocardial infarction and monitoring of reperfusion following thrombolytic therapy. *Clin Chim Acta* **237**(1-2):59-66.
- Arai T, Norde W (1990) . The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces. *Colloids Surf* **51**:1-15.
- Asmark H, Osterman P, Roxin L, Venge M (1981) Radioimmunoassay of serum myoglobin in neuromuscular diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **4**:68-72.
- Atassi MZ (1964) Properties of components of myoglobin in sperm whale. *Nature* **202**:496-497.
- Atassi MZ (1975) Antigenic structure of myoglobin: the complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structure of proteins. *Immunochemistry* **12**:423-438.
- Atassi MZ, Yokota Sh, Twining SS, Lehmann H, David ChN (1981) Genetic control of the immune response to myoglobin. VI. Inter-site injections in T-lymphocyte proliferative response from analysis of cross-reactions of ten myoglobins in terms of substitutions in the antigenic sites and in environmental residues of the sites. *Molecular Immunol* **18**:945-948.
- Awad E (1963) Chromatographic separations of hemoglobin and myoglobin on Sephadex gel. *Nature* **198**:1201-1203.
- Bachem MG, Paschen K, Strobel B, Keller HE, Kleinschnittger B (1983) Myoglobin-latex test. A new rapid test for the improvement of the early diagnosis of acute myocardial infarct. *Dtsch Med Wochenschr* **108**(31-32):1190-1194.
- Bakker AJ, Boymans DA, Dijkstra D, Gorgels JP, Lerk R (1993) Rapid determination of serum myoglobin with a routine chemistry analyser. *Clin Chem* **39**(4):653-658.

- Bangs LB (1988) *Amer Clin Lab News* **7**(4A):20. Citado por Molina y Galisteo 2005.
- Bangs LB (1990a) New developments in particles-based tests and immunoassays. *J Int Fed Clin Chem* **2**(4):188-193.
- Bangs LB (1990b) *J Clin Immunoassays* **13**(3):127. Citado por Molina y Galisteo (2005).
- Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ (1984) The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu Rev Immunol* **2**:67-101.
- Berkower I, Buckenmeyer G, Gurd F, Berzofsky JA (1982) A possible immunodominant epitope recognized by murine T lymphocytes immune to different myoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:4723-4727.
- Berkower IJ, Buckenmeyer G, Berzofsky JA (1986) Molecular mapping of a histocompatibility-restricted immunodominant epitope with synthetic and natural peptides: implications for T cell antigenic structure. *J Immunol* **136**:2498-2503.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindylalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res* **28**(1):235-242.
- Berman MC, Kench J (1963) Separation of myoglobin and haemoglobin on a column of dextran gel. *J Clin Pathol* **16**:385.
- Berzofsky JA (1988) Immunodominance in T lymphocyte recognition. *Immuno Lett* **18**:83-92.
- Berzofsky JA, Berkower I (2003) Immunogenicity and antigen structure. En: William E Paul, editor. *Fundamental Immunology*, 5th edition. New York: Lippincot Williams and Wilkins:646-671.
- Berzofsky JA, Buckenmeyer G, Hicks G, Gurd F, Feldman R, Minna J (1982) Topographic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin. *J Biol Chem* **257**:3189-3198.
- Berzofsky JA, Hicks G, Fedorko J, Minna J (1980) Properties of monoclonal antibodies specific for determinants of a protein antigen, myoglobin. *J Biol Chem* **255**:1188-1191.
- Bhasin M, Raghava GP (2004a) Prediction of CTL epitopes using QM, SVM and ANN techniques. *Vaccine* **22**(23-24):3195-3204.
- Bhasin M, Raghava GP (2004b) Analysis and prediction of affinity of TAP binding peptides using cascade SVM. *Protein Science* **13**:596-607.
- Bhasin M, Raghava GP (2005) Pcleave: An SMV based method for prediction of constitutive proteasome and immunoproteasome cleavage sites in antigenic secuencias. *Nucleic Acids Res* **33**:202-207.
- Birkhahn RH, Gaeta TJ, Paraschiv D, Bove JJ, Suzuki T, Katoh H, Nagai R (2001) Serum levels of myoglobin, creatine phosphokinase, and smooth muscle heavy-chain myosin in patients with ectopic pregnancy. *Ann Emerg Med* **38**(6):628-632.
- Blanchetot A, Price M, Jeffreys AJ (1986) The mouse myoglobin gene: characterization and sequence comparison with other mammalian myoglobin genes. *Eur J Biochem* **159**: 469-474.
- Blomberg LM, Blomberg MR, Siegbahn PE (2004) A theoretical study of myoglobin working as a nitric oxide scavenger. *J Biol Inorg Chem* **9**(8):923-935.
- Blundell T, Carney D, Gardner S, Hayes F, Howlin B, Hubbard T, Overington J, Singh DA, Singh BL, Sutcliffe M (1988) Knowledge-based protein modelling and design. *Eur J Biochem* **172**:513-520.
- Boegman RJ, Crumpton M (1970) Comparison of immunosorbents prepared by coupling sperm whale myoglobin to a variety of insoluble polymers. *Biochem J* **120**:373-379.
- Borque L, Rus A, Ruiz R (1991) Quantitative automated latex nephelometric immunoassay for determination of myoglobin in human serum. *J Clin Lab Anal* **5**:175-179.
- Brash JL, Lyman DJ (1969) Adsorption of plasma proteins in solution to uncharged, hydrophobic polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* **3**:175-189.
- Brogan GX Jr, Friedman S, McCuskey C, Cooling DS, Berruti L, Thode HC Jr, Bock JL (1994) Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann Emerg Med* **24**(4):665-671.
- Brown DW (1961) Chromatography of myoglobin on DEAE-cellulose columns. *J Biol Chem* **236**:2238-2240.
- Brunori M (2001) Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem Sci* **26**(4):209-210.
- Brunori M, Bourgeois D, Vallone B (2004) The structural dynamics of myoglobin. *J Struct Biol* **147**(3):223-234.
- Brunori M, Bourgeois D, Vallones B (2008) Structural dynamics of myoglobin. *Methods Enzymol* **437** :397-416.
- Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T (2002) Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* **4**:416-421.
- Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**:520-523.

- Cadenas E (1989) Lipid peroxidation during the oxidation of haemoproteins by hydroperoxides. *Biolumine Chemilumine* **4**:208-218.
- Canto JG, Shlipak MG, Rogers WJ, Malmgren JA, Frederick PD, Lambrew CT, Ornoto JP, Barron HV, Kiefe CI (2000) Prevalence, clinical characteristics, and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain. *JAMA* **283**:3223-3229.
- Carbone FR, Fox BS, Schwartz RH, Paterson Y (1987) The use of hydrophobic  $\alpha$ -helix-defining peptides in delineating the T cell determinant for pigeon cytochrome c. *J Immunol* **138**:1838-1844.
- Castillo B, Campuzano A, Parellada J, Hernández W, Trueba D, López M (2007) Caracterización de los pacientes fallecidos por infarto del miocardio agudo. *Rev Cub Med Int Emerg* **6**(1):651-657.
- Cease KB, Berkower I, York-Jolley J, Berzofski JA (1986) T cell clones specific for an amphipathic alpha helical region of sperm whale myoglobin show differing fine specificities for synthetic peptides : a multi-view/single structure interpretation of immunodominance. *J Exp Med* **164**:1779-1784.
- CECMED (2000) Regulación No. 23-2000 Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos.
- CECMED (2007) Regulación 47-2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Cuba.
- Chapelle JP, Heusghem C (1985) Semi-quantitative estimation of serum myoglobin by a rapid latex agglutination method: an emergency screening test for acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **145**(2):143-150.
- Chase W (1971) Latex fixation techniques: Methods in immunology and immunochemistry. Academic Press. IV: 115-120.
- Chen H, Ikeda-Saito M, Shaik S (2008) Nature of the Fe-O<sub>2</sub> bonding in oxy-myoglobin: effect of the protein. *J Am Chem Soc* **130**(44):14778-14790.
- Chen W, Zhang J, Eljgelshoven MH, Zhang Y, Zhu XH, Wang C, Cho Y, Merkle H, Ugurbil K (1997) Determination of deoxymyoglobin changes during graded myocardial ischemia: an in vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study. *Magn Reson Med* **38**:193-197.
- Chou PY, Fasman GD (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **47**:45-148.
- Christenson RH, Duh SH (1999) Evidence based approach to practice guides and decision thresholds for cardiac markers. *Scand J Clin Lab Invest* **59**(suppl 230):90-102.
- Christenson RH, Ohman EM, Topol EJ, Peck S, Newby LK, Duh SH, Kerejakes DJ, Worley SJ, Aloszana GL, Wall TC, Califf RM (1997) Assessment of coronary reperfusion after thrombolysis with a model combining myoglobin, creatine kinase-MB, and clinical variables.
- Chu K, Vojtechovsky J, McMahon BH, Sweet RM, Berendzen J, Schlichting I (2000) Structure of a ligand-binding intermediate in wild type carbonmonoxy myoglobin. *Nature* **403**:921-923.
- Cliquet F, Montagne P, Cuilliere ML, Varcin P, Duheille J (1992) Development of a rapid microparticle-enhanced nephelometric immunoassay for serum myoglobin in acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal* **6**(4):176-181.
- Cloonan MJ, Donald TG, Neole C, Wilekin DE (1976) The detection of myoglobin in urine and its application in the diagnosis of myocardial infarction. *Pathology* **8**:313-320.
- Cohen J, Arkhipov A, Braun R, Schulten K (2006) Imaging the migration pathways for O<sub>2</sub>, CO, NO, and Xe inside myoglobin. *Biophys J* **91**(5):1844-1857.
- Cooper H, East J, Todd P (1984) Antibody response to myoglobin: effect of host species. *Molecular Immunol* **21**:479-487.
- Copeland DM, West AH, Richter-Addo GB (2003) Crystal structures of ferrous horse heart myoglobin complexed with nitric oxide and nitrosoethane. *Proteins Struct Funct* **53**:182-192.
- Cornette JL, Margalit H, DeLisi C, Berzofski JA (1989) Concepts and methods in the identification of T cell epitopes and their use in the construction of synthetic vaccines. *Methods Enzymol* **178**:611-634.
- Cornette JL, Margalit H, DeLisi C, Berzofski JA (1993) The amphipathic helix as a structural feature involved in T-cell recognition. En: Epand RM y col Ed. *The amphipathic helix*. Boca Raton: CRC Press:333-346.
- Crumpton M (1974) Protein antigens: the molecular bases of antigenicity and immunogenicity. En: Sela M, editor. *The antigens*, vol 2. New York: Academic Press:1-79.
- Crumpton M, Wilkinson J. (1965) The immunological activity of some of the chymotryptic peptides of sperm whale myoglobin. *Biochem J* **94**:545-556.

- D'Agnillo F, Alayash AI (2000) Interactions of hemoglobin with hydrogen peroxide alters thiol levels and course of endothelial cell death. *Am J Physiol* **279**:H1880-H1889.
- Dati F, Metzmann E (2005) Acute coronary syndromes. En: Proteins: Laboratory testing and clinical use. DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Alemania: 306-320.
- DeGroot AS, Jesdale BM, Berzofsky JA (1998) Prediction and determination of MHC ligands ant T cell epitopes. In: Kaufmann SHE, Kabelitz D eds. *Immunology of infection*. London: Academic Press:79-108.
- Delanghe J, Chapelle JP, el Allaf M, De Buyzere M (1991) Quantitative turbidimetric assay for determining myoglobin evaluated. *Ann Clin Biochem* **28**(Pt 5):474-479.
- DeLisi C, Berzofsky JA (1985). T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:7048-7052.
- Dolar ML, Suarez P, Ponganis PJ, Kooyman GL (1999) Myoglobin in pelagic small cetaceans. *J Exp Biol* **202**(Pt3):227-236.
- Dombrovskii V, Poverennii A (1981) Método de obtención de mioglobina. *Vopr Med Khim* **27**:566-568.
- Drabkin DL (1945) Crystallographic and optical properties of human hemoglobin. A proposal for standardization of hemoglobin. *Am J Med Sc* **209**:268-271.
- Dresser DW (1986) Immunization of experimental animals. En: Weir DM editor. Handbook of Experimental Immunology, fourth edition, volume 1, Immunochemistry, Oxford: Blackwell Scientific Publications:8.4.
- Ducobu J, Stamatakis L, Dupont P (1986) Early diagnosis of acute myocardial infarction by myoglobin latex agglutination test. *Lancet* **1**(8496):1491-1495.
- East I, Hurrell J, Todd P, Leach S (1982) Antigenic specificity of monoclonal antibodies to human myoglobin. *J Biol Chem* **257**:3199-3202.
- East I, Todd P, Leach S (1980) On topographic antigenic determinants in myoglobins. *Molecular Immunol* **17**:519-525.
- Ebersold MF, Zydney AL (2004) Separation of protein charge variants by ultrafiltration. *Biotechnol Prog* **20**(2):543-549
- EEC (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* **L358**:1-29.
- Elgersma AV, Zsom RLJ, Norde W, Lyklema J (1991) *Colloids Surf* **54**:89. Citado por Molina y Galisteo (2005).
- Fechner G, Hauser R, Sepulchre MA, Brinkmann B (1991) Immunohistochemical investigations to demonstrate vital direct traumatic damage of skeletal muscle. *Int J Legal Med* **104**:215-219.
- Feins M, Sirkar KK (2004) Highly selective membranes in protein ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng* **86**(6):603-611.
- Fesmire FM, Christenson RH, Fody EP, Feintuch TA (2004) Delta creatine kinase-MB outperforms myoglobin at two hours during the emergency department identification and exclusion of troponin positive non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Ann Emerg Med* **44**(1):12-19.
- Fiet J, Le Rapt J, Louvard Y, Villette JM, Laureaux C, Claudel JP, Foglietti MJ, Haag JC (1985) Value of the detection of myoglobin by immunoagglutination in myocardial infarction. *Pathol Biol (Paris)* **33**(8):861-864.
- Flögel U, Gödecke A, Klotz LO, Schrader J (2004) Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *FASEB J* **18**(10):1156-1158.
- Flögel U, Gödecke A, Schrader J (2001a) Myoglobin is important for postischemic recovery in the heart. *Circulation* **104** (17) Supplement:II-227.
- Flögel U, Laussmann T, Gödecke A, Abanador N, Schafers M, Fingas CD, Metzger S, Levkau B, Jacoby C, Schrader J (2005) Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection. *Circ Res* **96**(8):68-75.
- Flögel U, Merx MW, Gödecke A, Decking UK, Schrader J (2001b) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(2):735-740.
- Fraser J, de Mello LV, Ward D, Rees HH, Williams DR, Fang Y, Brass A, Gracey AY, Cossins AR (2006) Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(8):2977-2981.
- Fraunfelder H, McMahon BH (2001) Relaxations and fluctuations in myoglobin. *Biosystems* **62**:3-8.
- Fraunfelder H, McMahon BH, Austin RH, Chu K, Groves JT (2001) The role of structure, energy landscape, dynamics, and allostery in the enzymatic function of myoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2370-2374.
- Fuchs S, Sela M (1986) Immunoabsorbents. En: Weir DM, editor. Handbook of Experimental Immunology, fourth edition, volume 1 Immunochemistry, Oxford: Blackwell Scientific Publications:16.4.

- Furuhashi M, Ura N, Hasegawa K, Tsuchihashi K, Nakata T, Shimamoto K (2004) Utility of serum ratio of heart-type fatty acid-binding protein to myoglobin for cardiac damage regardless of renal dysfunction. *Circ J* **68**(7):656-659.
- Galisteo F, Puig J, Martin A, Serra J, Hidalgo-Alvarez R (1994) *Colloids Surf B Biointerfaces* **2**:435. Citado por Molina y Galisteo (2005).
- Galloway R, Hicks C (1989) Microparticles immunoassays techniques. Seradyn Inc.
- Garry DJ, Bassel-Duby R, Richardson JA, Grayson J, Neuffer PD, Williams RS (1996) Postnatal development and plasticity of specialized muscle fiber characteristics in the hindlimb. *Dev Genetics* **19**:146-156.
- Garry DJ, Kanatous SB, Mammen PP (2003) Emerging roles for myoglobin in the heart. *Trends Cardiovasc Med* **13**(3):111-116.
- Garry DJ, Ordway GA, Lorenz JN, Radford NB, Chin ER, Grange RW, Bassel-Duby R, Williams RS (1998) Mice without myoglobin. *Nature* **395**:905-908.
- Gayeski TE, Honig CR (1991) Intracellular PO<sub>2</sub> in individual cardiac myocytes in dogs, cats, rabbits, ferrets, and rats. *Am J Physiol* **260**:H522-H531.
- George P, Irvine DH (1955) A possible structure for the higher oxidation state of metmyoglobin. *Biochem J* **60**:596-604.
- Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**:457-462.
- Glatz JFC, van der Vusse GJ, Simoons ML, Kragten JA, van Dieijen-Visser MP, Hermens WT (1998) Fatty acid-binding protein and the early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **272**(1):87-92.
- Gödecke A, Flögel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UKM, Schrader J (1999) Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(18):10495-10500.
- Grachev M, Matvee L, Pressman E, Roschke V (1982) A rapid method for myoglobin radioimmunoassay as a diagnostic tool in myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **124**:235-238.
- Grange RW, Meeson A, Chin E, Lau KS, Stull JT, Shelton JM, Williams RS, Garry DJ (2001) Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am J Physiol* **281**:C1487-C1494.
- Greenbaum JA, Andersen PH, Blythe M, Bui HH, Cachau RE, Crowe J, Davies M, Kolaskar AS, Lund O, Morrison S, Mumey B, Ofran Y, Pellequer JL, Pinilla C, Ponomarenko JV, Raghava GP, van Regenmortel MH, Roggen EL, Sette A, Schlessinger A, Sollner J, Zand M, Peters B (2007) Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. *J Mol Recognit* **20**(2):75-82.
- Grenadier E, Keidar S, Kahana L, Alpan G, Marmur A, Palant A (1983) The roles of serum myoglobin, total CPK, and CK-MB isoenzyme in the phase of myocardial infarction. *Am Heart J* **105**:408-416.
- Gross SS, Lane P (1999) Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(18):9967-9969.
- Grunwald EW, Richards MP (2006) Mechanisms of heme protein-mediated lipid oxidation using hemoglobin and myoglobin variants in raw and heated washed muscle. *J Agric Food Chem* **54**(21):8271-8280.
- Guest TM, Jaffe AS (1995) Rapid diagnosis of acute myocardial infarction. *Cardiol Clin* **13**(3):283-294.
- Guex N, Diemand A, Peitsch MC (1999) Protein modeling for all. *TIBS* **24**:364-367.
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PDBViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**:95-98.
- Hamelryck T (2005) An amino acids has two sides: a new 2D measure provides a different view of solvent exposure. *Prot. Struct. Func. Bioinform* **59**: 38-48.
- Han D, McMillin KW, Godber JS (1994) Hemoglobin, myoglobin, and total pigments in beef and chicken muscles: Chromatographic determination. *J Food Sci* **59**:1279-1282.
- Hanania GIM, Yeghioyan A, Cameron BF (1966) Absorption spectra of sperm whale ferrimyoglobin. *Biochem J* **98**:189-192.
- Hapner KD, Bradshaw R, Hartzell Ch, F Gurd (1968) Comparison of myoglobin from harbor seal, porpoise and sperm whale. *J Biol Chem* **243**:690-696.
- Harlow E, Lane D (1988) Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring, Harbor Laboratory.
- Hasic S, Jadric R, Kiseljakovic E, Radovanovic J, Winterhalter-Jadric M (2006) Comparison of creatine kinase activity and myoglobin blood level in acute myocardial infarction patients. *Bosn J Basic Med Sci* **6**(1):19-23.

- Haynes CA, Norde W (1995) Structures and stabilities of adsorbed proteins. *J Colloid Interface Sci* **169**:313-328.
- Hecktoen L, Robscheit R, Whipple G (1927) The specific precipitin reaction of the muscle hemoglobins of the dog. *J Infect Dis* **42**:31-34. Citado por Luginbuhl 1962.
- Hendgen-Cotta UB, MerxMW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassat T (2008) Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(29):10256-10261.
- Higuchi K, Abe S, Matsuoka T, Nakajima H, Toda H, Akazaki Y, Torii H, Kuwahata S, Atsuchi Y, Mawaari K, Toyama Y, Saigo M, Ogawa M, Kawasaki T, Ootani T, Yamaguchi K, Mishima M, Tei C (2003) Usefulness of rapid quantitative cardiac troponin T and myoglobin assays for the diagnosis of acute myocardial infarction. *J Cardiol* **41**(2):55-62.
- Hochachka PW (1999) The metabolic implications of intracellular circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:12233-12239.
- Hodson AW, Skillen AW, Argent NB (1992) An ELISA method to measure human myoglobin in urine. *Clin Chim Acta* **209**(3):197-207.
- Hofmann D, Buettner M, Rissner F, Wahl M, Sakka SG (2007) Prognostic value of serum myoglobin in patients after cardiac surgery. *J Anesth* **21**(3):304-310.
- Holt S, Moore K (2000) Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp Nephrol* **8**(2):72-76.
- Honda Y, Katayama T (1984) Detection of myocardial infarction extension or reattack by serum myoglobin radioimmunoassay. *Int J Cardiol* **6**:325-335.
- Hopp TP, Woods KR (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl Acad. Sci* **78**: 3824-3828.
- Horneman DA, Wolbers M, Zomerdijk M, Ottens M, Keurentjes JT, van der Wielen LA (2004) Surfactant-aided size exclusion chromatography. *J Chromatogor B Analyt Technol Biomed Life Sci* **807**(1):39-45.
- Hubbard SR, Hendrickson WA, Lambright DG, Boxer SG (1990) X-ray crystal structure of a recombinant human myoglobin mutant at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **213**(2):215-218.
- Hurrell J, Smith J, Todd P, Leach S (1977) Cross-reactivity between mammalian myoglobins: linear vs spatial antigenic determinants. *Immunochemistry* **14**:283-288.
- Ignarro LJ, Buga GM, Word KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(24):9265-9269.
- Innes G, Christenson J, Weaver WD, Liu T, Hoekstra J, Every N, Jackson RE, Frederick P, Gibler WB (2002) Diagnostic parameters of CK-MB and myoglobin related to chest pain duration. *CJEM* **4**(5):322-30
- Iqbal MP, Kazmi KA, Mehboobali N, Rahbar A (2004) Myoglobin –a marker of reperfusion and a prognostic indicator in patients with acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* **27**(3):144-150.
- Isakov A, Shaptra I, Burke M (1988) Serum myoglobin levels in patients with ischemic myocardial insult. *Arch Intern Med* **148**:1762-1765.
- Ishikawa T, Zhu BL, Li DR, Zhao D, Michine T, Maeda H (2007) Immunohistochemical investigation of ubiquitin and myoglobin in the kidney in medicolegal autopsy cases. *Forensic Sci Int* **171**(2-3):136-141.
- Ishiyama I, Kamiya M, Rose M, Komuro E, Takatsu A (1982) Fulminant deletion of myoglobin from myocardial fibres in state of acute cardiac failure inducing sudden cardiac arrest. *Lancet* **2**(8313):1468-1469.
- Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H (2000) It's time for a change to a troponin standard. *Circulation* **102**:1216-1220.
- Jaffery Z, Nowak R, Khoury N, Takarski G, Lanfear DE, Jacobsen G, McCoird J (2008) Myoglobin and troponin I elevation predict 5-year mortality in patients with undifferentiated chest pain in the emergency department. *Am Hearth J* **156**(5):939-945.
- Ji HF, Shen L, Grandori R, Müller N (2008) The effect of heme on the conformational stability of micro-myoglobin. *FEBS J* **275**(1):89-96.
- Jonsson T (1993) Studies on the clinical significance of reumathoid factor isotypes. Tesis de grado de doctorado. Universidad de Islandia.
- Juronen EI, Viikmaa MH, Mikelsaar AN (1988) Rapid, simple and sensitive antigen capture ELISA for the quantitation of myoglobin using monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* **111**:109-115.
- Kagen L (1967) Precipitin reactions of anti-human myoglobin serum with several human and animal muscle extract. *Immunol* **17**:519-525.



- Kagen LJ, Christian CL (1996). Immunologic measurements of myoglobin in human adult and fetal skeletal muscle. *Amer J Physiol* 211:656-601.
- Kagen LJ, Scheidt S, Roberts L, Porter A, Paul H (1975) Myoglobinemia following acute myocardial infarction. *Am J Med* 58:177-182.
- Kang X, Frey DD (2003) High-performance cation-exchange chromatofocusing of proteins. *J Chromatogr A* 991(1):117-128.
- Kaplan L, Pesce A (1987) Laboratory approaches. *Methods in Clinical Chemistry*, the CV Mosby Co St Louis. Washington DC Toronto.
- Karplus PA, Schultz GE (1985) [Prediction of chain flexibility in proteins.] *Naturwissenschaften* 72:212-213.
- Katayama Y, Kawada Y, Moriwaki K, Yoneda K, Fujita S, Matsuyama T (1991) Early diagnosis and early detection of successful reperfusion by latex agglutination turbidimetry of serum myoglobin in patients with acute myocardial infarction. *Rinsho Byori* 39(11):1155-1160.
- Katus H, Diederich K, Scheffold T, Vellner M, Schwarz F, Kubler W (1988) Non-invasive assessment of infarct reperfusion: the predictive power of the time to peak value of myoglobin, CKMB, and CK in serum. *European Heart J* 9:619-624.
- Kavsak PA, MacRae AR, Newman AM, Lustig V, Palomaki GE, Ko DT, Tu JV, Jaffe AS (2007) Effects of contemporary troponin assay sensitivity on the utility of the early markers myoglobin and CKMB isoforms in evaluating patients with possible acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 380(1-2):213-216.
- Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 276:25318-25323.
- Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, Shimizu S, Mizuno M, Li M, Sugimachi M (2008) Vagal stimulation suppresses ischemia-induced myocardial interstitial myoglobin release. *Life Sci* 83(13-14):490-495.
- Keil W, Yoshida H, Ishiyama I (1984) The effect of electricity on the Mb content of the human heart and skeletal muscles. *Z Rechtsmed* 91:185-193. Citado por Kitao y col (1995)
- Kelm M, Schrader J (1990) Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 66(6):1561-1575.
- Kendrew JC (1963) Myoglobin and the structure of proteins. *Science* 139:1259-1266.
- Kendrew JC, Bodo G, Dinzis HM (1958) A three dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662-666.
- Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR, Phillips DC, Shore VC (1960). Structure of myoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 185:422-427.
- Khan KK, Mondal MS, Pady L, Mitra S (1998) The role of distal histidine in peroxidase activity of myoglobin. *Eur J Biochem* 257:547-555.
- Kitao T, Miyaishi S, Ishizu H (1995) Identification of human skeletal muscle from a tissue fragment by detection of human myoglobin using a double-sandwich ELISA. *Forensic Sci Int* 71:205-214.
- Knochel J (1981) Rhabdomyolysis and myoglobinuria. *Seminars in nephrology* 1:75-86.
- Kohno Y, Berzofsky JA (1982). Genetic control of the immune response to myoglobin. V. Antibody production "in vitro" is macrophage and T-cell dependent and is under control of two determinant-specific Ir genes. *J Immunol* 128:2458-2464.
- Kojima M, Cease K, Buckenmeyer G, Berzofsky JA (1988). Limiting dilution comparison of the repertoires of high and low responder MHC-restricted T cells. *J Exp Med* 167:1100-1113.
- Koketsu J, Atassi MZ (1974). Immunochemistry of sperm whale myoglobin: accurate delineation of the single region in sequence 1-55 by immunochemical studies of synthetic peptides. Some conclusions concerning antigenic structures of proteins. *Immunochemistry* 11:1-8.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276(1-2):172-174.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276(1-2):172-174.
- Konings C, Kupper A, Verheugt F (1989) Comparison of two latex agglutination test kits for serum myoglobin in the exclusion of acute myocardial infarction. *Ann Clin Biochem* 26:254-258.

- Kontos MC, Garg R, Anderson FP, Roberts CS, Omato JP, Tatum JL, Jesse RL (2007) Ability of myoglobin to predict mortality in patients admitted for exclusion of myocardial infarction. *Am J Emerg Med* **25**(8): 873-879.
- Kontos MC, Jesse RL (2000) Evaluation of the emergency department chest pain patients. *Am J Cardiol* **85**:32B-39B.
- Kossman R, Fainer D, Boyer S (1964) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **29**:375. Citado por Miyoshi y col 1968.
- Kranen RW, van Kuppevelt TH, Goedhart HA, Veerkamp CH, Lambooy E, Veerkamp JH (1999) Hemoglobin and myoglobin content in muscles of broiler chickens. *Poultry Science* **78**:467-476.
- Kreutzer U, Jue T (2006) Investigation of bioactive NO-scavenging role of myoglobin in myocardium. *Pflugers Arch* **452**(1):36-42.
- Kumar SA, Chen SM (2007) Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin on redox-active self-assembling monolayers derived from nitroaniline modified electrode. *Biosens Bioelectron* **22**(12):3042-3050.
- Kunishige M, Mitsui T, Akraike M, Shono M, Kawai H, Saito S (1996) Localization and amount of myoglobin and myoglobin mRNA in ragged-red fiber of patients with mitochondrial encephatomyopathy. *Muscle Nerve* **19**(2):175-182.
- Laemmli EK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:660-685.
- Lancaster JR Jr (1994) Simulation of the difusión and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(17):8137-8141.
- Lando G, Berzofsky JA, Reichlin M (1982) Antigenic structure of sperm whale myoglobin. I.Partition of specificities between antibodies reactive with peptides and native protein. *J Immunol* **129**:206-211.
- Larsen JE, Lund O, Nielsen M (2006) Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* **2**:2.
- Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH (1995) Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* **8**:1-21.
- Le Moigne F, Beauvieux MC, Derache P, Darmon YM (2002) Determination of myoglobin: comparative evaluation of the new automated VIDAS(R) assay with two other immunoassays. *Clin Biochem* **35**(4):255-262.
- Leadbeatter S, Wawman HM, Jasani B (1989) Immunocytochemical diagnosis of early myocardial ischaemic/hypoxic damage. *Forensic Sci Int* **40**:171-180.
- Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, Brand DA, Acampora D, Staciulewicz C, Walshon J, Terranova G, Gottlieb L, Goldstein-Wayne B, Copen D, Daley K, Brandt AA, Mellors J, Jakubowski R, Cook EF, Goldman L (1987) Clinical characteristics and natural history of patients with acute myocardial infarction sent home from the emergency room. *Am J Cardiol* **60**:219-224.
- Lestin M, Hergert M, Lestin HG, Brinker C, Storm H, Kuhrt E, Kuhrt B, Lambrecht HG, Kuhnel W (2002) Evaluation of the chemiluminescence immunoassays for the measurement of troponin I, myoglobin and CK-MB using the IMMULITE system in comparison to other measuring systems. *Clin Lab* **48**(3-4):211-221.
- Lin PC, Kreutzer U, Jue T (2007) Myoglobin translational diffusion in rat myocardium and its implication on intracellular oxygen transport. *J Physiol* **578**(Pt2):595-603.
- Lomonte B (1999) Bases moleculares del reconocimiento de los antígenos. *Acta Pediátr Costarric* **13** (2):52-54.
- Louhmies S (2002) Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *ATLA* **30**(Suplemento 2):217-219.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Luginbuhl W (1960) A method of crystallization of human myoglobin. *Proc Soc Exp Biol* **105**:504-505.
- Maeda Y (1939) Studies uber das muskel hamoglobin. *Jap MJ Sc VII Social. Med and Hyg* **3**:38-41. Citado por Luginbuhl 1962.
- Mainard F, Massoubre B, Le Marec H, Madec Y (1985) Study of a myoglobin test in patients hospitalized for suspected myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **153**(1):1-8.
- Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, Morass B, Smidt J, Wagner I, Dienstl F, Puschendorf B (1992) Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immunoturbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J* **68**(5):462-468.
- Mair J, Morandell D, Genser N, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B (1995) Equivalent early sensitivities of myoglobin, creatine kinase MB mass, creatine kinase isoform ratios, and cardiac troponins I and T for acute myocardial infarction. *Clin Chem* **41**:1266-1272.

- Malik GH (1998) Rhabdomyolysis and myoglobin-induced acute renal failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl* **9**(3):273-284.
- Mammen PPA, Meeson A, Hawke TJ, Garry DJ (2001) Cellular and molecular adaptations are insufficient for the maintenance of cardiac function in myoglobin deficient mice. *Circulation* **104** (17) Supplement:II-202.
- Mammen PPA, Shelton JM, Goetsch SC, Williams SC, Richardson JA, Garry MG, Garry DJ (2002) Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem* **50**:1591-1598.
- Margalit H, Spouge JL, Cease KB, DeLisi C, Berzofsky J (1987) Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol* **138**:2213-2229.
- Margalit H, Spouge JL, Cornette JL, Cease KB, DeLisi Ch, Berzofsky JA (1987) Prediction of immunodominant helper T-cell antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol* **138**:2213-2229.
- Marlar RA, Leonard BL, Billman BR, Lambert PM, Marlar JE (2000) Biochemical evidence of cannibalism at a prehistoric Puebloan (Anasazi) site in southwestern Colorado *Nature* **407**:74-78.
- Masuda K, Truscott K, Lin PC, Kreutzer U, Chung Y, Sriram R, Jue T (2008) Determination of myoglobin concentration in blood-perfused tissue. *Eur J Appl Physiol* **104**(1):41-48.
- Mathews CK, van Holde KE (1990) Biochemistry, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., New York, NY.
- Maxwell J, Bloor C (1981) Effects of conditioning on exertional rhabdomyolysis and serum creatine kinase after severe exercise. *Enzyme* **26**:177-181.
- McCarthy PM, Kane M, Gosling JP (1998) Development of a sensitive ELISA for myoglobin detection in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Biochem Soc Trans* **26**(1):S41.
- McCord J, Nowak RM, McCullough PA, Foreback C, Borzak S, Tokarski G, Tomlanovich MC, Jacobson G, Weaver WD (2001) Ninety-minute exclusion of acute myocardial infarction by use of quantitative point-of-care testing of myoglobin and troponin I. *Circulation* **104**(13):1483-1488.
- Meeson AP, Radford N, Shelton JM, Mammen PPA, DiMaio JM, Jutcherson K, Kong Y, Elberman J, Williams RS, Garry DJ (2001) Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circ Res* **88**:713-720.
- Meister GE, Roberts CG, Berzofsky JA, De Groot AS (1995) Two novel T cell epitope prediction algorithms based on MHC-binding motifs; comparison of predicted and published epitopes from Mycobacterium tuberculosis and HIV protein sequences. *Vaccine* **13**(6):581-591.
- Melanson SF, Lewandrowski EL, Januzzi JL, Lewandrowski KB (2004) Reevaluation of myoglobin for acute chest pain evaluation: would false-positive results on "fist-draw" specimens lead to increased hospital admissions? *Am J Clin Pathol* **121**(6):804-808.
- Menéndez-Fernández JM, Romero Tarín E, Fernández B, Fernández T, del Busto F, Mayordomo J (1992) Latex myoglobin: a fast early marker in acute myocardial infarction. *Med Clin (Barc)* **99**(6):213-217.
- Merx MW, Godecke A, Flögel U, Schrader J (2005) Oxygen supply and nitric oxide scavenging by myoglobin contribute to exercise endurance and cardiac function. *FASEB J* **19**(8):1015-1017.
- Miyaishi S (1991) An enzyme immunoassay for human myoglobin and its application to forensic medicine. *Jpn J Legal Med* **45**:6-25.
- Miyata M, Abe S, Arima S, Nomoto K, Kawataki M, Ueno M, Yamashita T, Hamasaki S, Toda H, Tahara M (1994) Rapid diagnosis of coronary reperfusion by measurement of myoglobin level every 15 min in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **23**:1009-1015.
- Miyoshi K, Saijo K, Kuryu Y, Oshima Y, Nakano M, Kawai H (1968) Myoglobin subfractions: Abnormality in Duchenne type of progressive muscular dystrophy. *Science* **159**:736-737.
- Molina-Bolívar JA, Galisteo-González F (2005) Latex immunoagglutination assays. *J Macromolecular Science-Polymer Reviews* **45**(1):59-98.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**(2):109-142.
- Montague C, Kircher T (1995) Myoglobin in the early evaluation of acute chest pain. *Am J Clin Pathol* **104**(4):472-476.
- Moran MM, Siegel RJ, Said JW, Teshbein MC (1985) Demonstration of myoglobin and CK-MB in myocardium. *Histochem and Cytochem* **33**(11):1110-1115.
- Moscato H, Kiefer Ch, Shyamala M, von Dohlen T, Garver F (1990) Monoclonal antibody-based immunoassays for serum myoglobin quantification in acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal* **4**:437-442.

- Moscoso H, Kiefer CR, Shyamala M, Teabeaut RI, Garver FA (1993) The levels of serum myoglobin in cardiac patients with elevated creatine kinase MB and suspected acute myocardial infarction. *J Clin Lab Anal* **7**(2):111-115.
- Naka H, Nogami K, Sekine S (1991) The determination of serum and urine myoglobin. *Rinsho Byori* **39**(2):115-123.
- Naka T, Jones D, Baldwin I, Fealy N, Bates S, Goehl H, Morgera S, Neumayer HH, Bellomo R (2005) Myoglobin clearance by super high-flux hemofiltration in a case of severe rhabdomyolysis: a case report. *Crit Care* **9**(2):R90-5.
- Nakane P, Kawaoi A (1974) Peroxidase-labeled antibody: A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* **22**:1084-1091.
- Nienhaus K, Nienhaus GU (2004) The effect of protein internal cavities on ligand migration and binding in myoglobin. *Micron* **35**(1-2):67-69.
- Nikulina VA, Kizim EA, Massino YS, Segal OL, Smirnova MB, Avilov VV, Saprygin DB, Smotrov SP, Kolyaskina GI, Dmitriev AD (1999) Triple-site antigen capture ELISA for human myoglobin can be more effective than double-site assay. *Biochemistry (Mosc)* **64**(10):1138-1145.
- Nishida Y, Kawai H, Nishino H (1985) A sensitive sandwich enzyme immunoassay for human myoglobin using Fab'-horseradish peroxidase conjugate: methods and results in normal subjects and patients with various diseases. *Clin Chim Acta* **153**:93-104.
- Nishikai M, Reichli M (1984) Radioimmunoassay in Duchenne muscular dystrophy carrier detection: a comparison with CK and hemopoxin using logistic discrimination. *Am J Med Genet* **18**:279-287.
- Nistico C, Bria E, Cuppone F, Carpino A, Ferretti G, Vitelli G, Sperduti I, Calabretta F, Toglia G, Tomao S, Cognetti F, Terzoli E (2007) Troponin-T and myoglobin plus echocardiographic evaluation for monitoring early cardiotoxicity of weekly epirubicin-paclitaxel in metastatic breast cancer patients. *Anticancer Drugs* **18**(2):227-232.
- Norde W (1986) Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Adv Colloid Interface Sci* **25**:267-340.
- Norde W, Galisteo-González F, Haynes CA (1995) Immunoreactivity of polymer microspheres with their hydrophilic and hydrophobic heterogeneous surface sensitized with an antibody. *Polym Adv Tech* **6**:518-523.
- Norde W, Lyklema J (1979) Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: A colloidal-chemical approach. *J Colloid Interface Sci* **71**:350-366.
- Noren SR, Williams TM (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **126**(2):181-191.
- Noren SR, Williams TM, Pabst DA, McLellan WA, Dearolf JL (2001) The development of diving in marine endotherms: preparing the skeletal muscles of dolphins, penguins, and seals for activity during submergence. *J Comp Physiol B* **171**(2):127-134.
- Norregård-Hansen K, Hangaard J, Norgaard-Pedersen B (1984) A rapid latex agglutination test for detection of elevated levels of myoglobin in serum and its value in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* **44**(2):99-103.
- O'Brien PJ, Shen L, McCutcheon LJ, O'Grady M, Byrne PJ, Ferguson HW, Mirsalimi MS, Julian RJ, Sargeant JM, Tremblay RRM, Blackwell TE (1992) Rapid, simple and sensitive microassay for skeletal and cardiac muscle myoglobin and hemoglobin: use in various animals indicates functional role of myohemoproteins. *Mol Cell Biochem* **112**:45-52.
- Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García AM, Ferriol X, Blanco R, Sotolongo F (2000). Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor* **9**(1):17-20.
- Okamoto F, Sohmiya K, Ohkaru Y, Kawamura K, Asayama K, Kimura H, Nishimura S, Ishii H, Sunahara N, Tanaka T (2000) Human Heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB. *Clin Chem Lab Med* **38**(3):231-238.
- Okubo M, Yamamoto Y, Uno M, Kalnei S, Matsumoto T (1987) On the adsorption of IgG onto polystyrene particles: electrophoretic mobility and critical coagulation concentration. *Colloid Polym Sci* **265**:1061.
- Olivero J, Ayus J (1978) Rhabdomyolysis and acute myoglobinuric renal failure. *Arch Intern Med* **15**:623-628.
- Olson JS, Soman J, Phillips GN Jr (2007) Ligand pathways in myoglobin: a review of Trp cavity mutations. *IUBMB Life* **59**(8-9):552-562.

- Olsson T, Bergstrom K, Thore A (1984) Chemiluminiscent immunosorbent assay of serum myoglobin based on the luminal reaction. *Clin Chem Acta* **138**:31-40.
- Ono I (1953) Studies on myoglobinuria. *Tohoku J Exper Med* **57**:273-81. Citado por Luginbuhl 1962.
- Ordway GA, Garry DJ (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* **207**(Pt 20):3441-3446.
- Ortega JL, Hidalgo-Alvarez R (1994) The adsorption of F(ab')<sub>2</sub> on positively and negatively charged polystyrene beads. *J Biomater Sci Polymer Ed* **6**(3):269-279.
- Ostermann A, Waschipky R, Parak FG, Nienhaus GU (2000) Ligand binding in conformational motions in myoglobin. *Nature* **404**:205-208.
- Ouchterlony O (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* **5**:1-78.
- Oxley DK (1984) Failure to diagnose myocardial infarction. *JAMA* **252**(5):625-626.
- Oxley DK, Bolton MR, Shaeffer ChW (1979) Myoglobin in myocardial in a coronary care-unit population. *Am J Clin Pathol* **72**:137-141.
- Ozdemir M, Durakoglugil E, Gulbahar O, Turkoglu S, Sancak B, Pasaoglu H, Cengel A (2007) Heart fatty acid binding protein and myoglobin after reperfusion of acute myocardial infarction. *Acta Cardiol* **62**(5):473-478.
- Pankratz H, Liebhardt E (1990) Myoglobinkonzentrationen des Leichenblutes bei Stromtodesfällen. *Beitr Gerichtl Med* **48**:325-327. Citado por Kitao y col (1995).
- Panteghini M (1999) Biochemical assessment of myocardial damage with new diagnostic tools. *Cardiologia* **44**:419-425.
- Panteghini M (2002) Acute coronary syndrome. Biochemical strategies in the troponin era. *Chest* **122**:1428-1435.
- Panteghini M (2004) Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology. *Eur Heart J* **25**(14):1187-1196.
- Panteghini M, Apple FS, Christenson RH, Dati F, Mair J, Wu AH (1999) Use of biochemical markers in acute coronary syndromes. IFCC Scientific Division, Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage. International Federation of Clinical Chemistry. *Clin Chem Lab Med* **37**(6):687-693.
- Panteghini M, Pagani F, Bonetti G (1999) The sensitivity of cardiac markers: an evidence-base approach. *Clin Chem Lab Med* **37**:1097-1106.
- Parker JM, Guo D, Hodges RS (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* **25**(19):5425-5432.
- Peake J, Wilson G, Mackinnon L, Coombes JS (2005) Carbohydrate supplementation and alterations in neutrophils, and plasma cortisol and myoglobin concentration after intense exercise. *Eur J Appl Physiol* **93**(5-6):672-678.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *PNAS* **85**:2444-2448.
- Pearson WR (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology* **183**:63-98.
- Perkoff G, Hill R, Brown D, Taylor F (1962) The characterization of adult human myoglobin. *J Biol Chem* **237**:2820-2827.
- Perkoff GT, Tyler FH (1958) Estimation and physical properties of myoglobin in various species. *Metabolism* **7**(6):751-759.
- Perutz MF (1978) Hemoglobin structure and respiratory transport. *Sci Amer* **239**(6):92-125.
- Perutz MF, Lehmann H (1968) Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature* **219**:902-909.
- Peula JM, Callejas J, de las Nieves FJ (1994) *Surface Properties of Biomaterials*. Editores West R, Batts G, Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Peula JM, Hidalgo-Alvarez R, de las Nieves FJ (1995) Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: I. Sequential and competitive coadsorption isotherms. *J Biomater Sci Polym Ed*, **7**:231-240.
- Pharmacia LKB Biotechnology Catalogue (1989):107.
- Plebani M, Zaninotto M (1998) Diagnostic strategies using myoglobin measurement in myocardial infarction. *Clin Chim Acta* **272**(1):69-77.
- Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schopfer P, Cadenas E, Boveris A (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Arm J Physiol*

274:C112-C119.

- Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, Griffith JL, Selker HP (2000) Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med* **342**(16):1163-1170.
- Powell S, Friedlander E, Shohobi Z (1984) Myoglobin determination by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* **317**:87-92.
- Pupo A (2008) Desarrollo de un nuevo método de predicción de epítomos T clase II con un enfoque híbrido. Tesis para optar por el título de Máster en Bioquímica, Mención Inmunología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- Pupo A, Moreno E (2008) Do rotamer libraries reproduce the side-chain conformations of peptide ligands from the PDB. *J Mol Graph Model* (en prensa).
- Radu I, Costache L, Simionescu L, Zamfirescu I (1985) Determination of myoglobin in biological fluids by the ELISA inhibition reaction. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* **30**(4):327-334.
- Rammensee HG (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* **7**(1):85-96.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**(3-4):213-219.
- Ravnskov U (1975) Low molecular weight proteinuria in association with paroxysmal myoglobinuria. *Clin Nephrol* **3**(2):65-69.
- Retchlin M, Visco PJ, Klocke JF (1978) Radioimmunoassay for human myoglobin. *Circulation* **57**:52-56.
- Roberts R (1977) Myoglobinemia as index to myocardial infarction. *Annals of Int Med* **87**: 788-789.
- Roca R, Smith V, Paz E, Losada J, Pérez H, Serret B, Llamas N, Valle C (1985) Cardiopatía isquémica. En: Temas de medicina interna. Ediciones Pueblo y Educación, 3ra edición, tomo I: 267-281.
- Rodda S, Geysen H, Mason T, Schoofs P (1986) The antibody response to myoglobin. I. Systematic synthesis of myoglobin peptides reveals location and substructure of species-dependent continuous antigenic determinants. *Molecular Immunol* **23**:603-610.
- Rodríguez JC (1989) Obtención y purificación de anticuerpos anti-mioglobina. Tesis de diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- Roitt IM, Delves PJ (2001) *Essential Immunology*, décima edición. Blackwell Science: 203.
- Roitt IM, Brostoff J, Male D (2001) *Immunology*, séptima edición. Mosby: 73, 207.
- Rouan GW, Lee TH, Cook EF, Brand DA, Weisberg MC, Goldman L (1989) Clinical characteristics and outcome of acute myocardial infarction in patients with initially normal or non-specific electrocardiograms: a report from the Multicenter Chest Pain Study. *Am J Cardiol* **64**:1087-1092.
- Roxin L, Culler I, Groth T, Hallgreen T, Vence P (1984) The value of serum myoglobin determinations in the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Acta Med Scand* **215**:417-425.
- Rozman MJ, Peterson JA, Adams EC Jr (1964) Differentiation of hemoglobin and myoglobin by immunochemical methods. *Inv Urology* **1**:518-525.
- Rumpf K, Henz T, Kaiser H, Prange H, Scheler F (1985) Rhabdomyolysis and myoglobinuria in 19 patients with chronic alcoholism. *Proc EDTA-ERA* **22**:1091-1095.
- Ruscio JZ, Kumar D, Shukia M, Prisant MG, Murall TM, Onufriev AV (2008) Atomic level computational identification of ligand migration pathways between solvent and binding site in myoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(27):9204-9209.
- Sallach SM, Nowak R, Hudson MP, Tokarski G, Khoury N, Tomlanovich MC, Jacobsen G, de Lemos JA, McCord J (2004) A change in serum myoglobin to detect acute myocardial infarction in patients with normal troponin I levels. *Am J Cardiol* **94**(7):864-867.
- Salomon J, Flower DR (2006) Predicting class II MHC-peptide binding: a Kernel based approach using similarity scores. *BMC Bioinformatics* **7**:501.
- Sawhney RC, Singh T, Tiwari RS, Rai RM (1985) A heterologous radioimmunoassay of myoglobin. *Indian J Med Res* **82**:365-370.
- Schultz A, Larsen CE, Kristensen SD, Schmidt EB, Astrup G (1986) Serum myoglobin measured by latex agglutination: rapid test for exclusion of acute myocardial infarction. *Am Heart J* **112**(3):609-610.
- Scott EE, Gibson QH, Olson JS (2001) Mapping the pathways for O<sub>2</sub> entry into and exit from myoglobin. *J Biol Chem* **276**(7):5177-5188.
- Sela M (1969) Antigenicity: some molecular aspects. *Science* **166**:1365-1374.

- Sette A, Doria G, Adorini L (1986) A microcomputer program for hydrophilicity and amphipathicity analysis of protein antigens. *Mol Immunol* **23**:807-810.
- Shirai M, Arichi T, Nishioka M, Nomura T, Ikeda K, Kawanishi K, Engelhard VH, Feinstone SM; Berzofski JA (1995) CTL responses of HLA-A2.1- transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J Immunol* **154**:2733-2742.
- Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:7212-7217.
- Shoenborn BP, Watson HC, Kendrew JC (1965) Binding of xenon to sperm whale myoglobin. *Nature* **207**:28-30.
- Sigarroa A (1985) Biometría y diseño experimental. Tomo II, Editorial Pueblo y Educación: 451.
- Silva PD, Landt Y, Porter ES, Landerson HJ (1991) Development and application of monoclonal antibodies to human cardiac myoglobin in a rapid fluorescent immunoassay. *Clin Chem* **37**(8):1356-1364.
- Silverton EW, Navia MA, Davies DR (1977) Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(11):5140-5144.
- Singer J, Plotz C (1956) The latex fixation test. *Am J Med* **21**:888-892.
- Smith J, Hurrell J, Leach S (1977) A novel method for delineating antigenic determinants peptide synthesis and radioimmunoassay using the same solid support. *Immunochemistry* **14**:565-569.
- Srinivas VS, Cannon CP, Gibson CM, Antman EM, Greenberg MA, Tanasijevic MJ, Murphy S, de Lemos JA, Sokol S, Braunwald E, Mueller HS (2001) Myoglobin levels at 12 hours identify patients at low risk for 30-day mortality after thrombolysis in acute myocardial infarction: a Thrombolysis in myocardial infarction 10B substudy. *Am Heart J* **142**(1):29-36.
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) Crystal structure of the human class II protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* **368**:215-221.
- Stewart JM, Blakely JA, Karpowicz PA, Kalanxhi E, Thatcher BJ, Martin BM (2004) Unusually weak oxygen binding, physical properties, partial sequence, autoxidation rate and a potential phosphorylation site of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) myoglobin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **137**(3):401-412.
- Stone M, Waterman M, Harimoto D, Murray G, Wilson N, Platt M, Blomqvist G, Willerson J (1977) Serum myoglobin levels as diagnostic test in patients with acute myocardial infarction. *British Heart J* **39**:375-380.
- Stone M, Willerson J, Gomez-Sanchez C, Waterman M (1975) Radioimmunoassay of myoglobin in human serum. *J Clin Inv* **56**:1334-1339.
- Stone MJ, Waterman MR, Poliner LR, Templeton GH, Buja LM, Willerson JT (1978) Myoglobinemia is an early quantitative index of acute myocardial infarction. *Angiology* **29**:386-392.
- Stork TV, Wu AH, Muller-Bardorff M, Gareis R, Muller R, Hombach V, Katus H, Mockel M, North-Wurtttemberg Infarction Study (NOWIS) Group (2000) Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. North-Wurtttemberg Infarction Study (NOWIS) Group. *Am J Cardiol* **86**(12):1371-1374.
- Strausser H, Rothfeld E, Buesi R (1966) Isolation and preservation of human myoglobin for use in immunologic detection of myoglobinuria. *Proc Soc Exp Biol Med* **122**:621-626.
- Stryer L (1995) Proteínas: conformación, dinámica y función. En: Bioquímica, 4ta edición, Editorial Reverté S.A., Barcelona: 147-177.
- Stuart C, Palmer F, Nevad G, Lewis J, Jutzy R, Nelson J (1975) Serum myoglobin levels in the diagnosis of myocardial infarction. *Am J Cardiol* **35**:603-610.
- Sunni S, Geer JC, Kent SP (1984) Staining in normal and ischemic human myocardium. *Arch Pathol Lab Med* **108**:649-653.
- Suzuki T, Kashimura S, Umetsu K (1983). Zur postmortalen Einschwemmung von Myoglobin in das Blut. *Z Rechtsmed* **90**:297-301. Citado por Kitao y col (1995).
- Swaanenburg J, Visser-VanBrummel PJ, De-Jongste M, Tiebosch A (2001) The content and distribution of troponin I, troponin T, myoglobin, and alpha-hydroxybutyric acid dehydrogenase in the human heart. *Am J Clin Pathol* **115**:570-577.
- Sweredoski MJ, Baldi P (2008) PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics* **24**(12):1459-1460.
- Takahashi E, Sato K, Endoh H, Xu Z, Doi K (1998) Direct observation of radial intracellular PO<sub>2</sub> gradients in a single cardiomyocyte of the rat. *Am J Physiol* **275**:H225-H233.

- Tanasijevic JM (2007) Non-invasive assessment of coronary artery patency after thrombolysis using serum myoglobin measurements. *Prilozi* **28**(1):5-11.
- Taylor DJ, Matthews PM, Radda GK (1986) Myoglobin -dependent oxidative metabolism in the hypoxic rat heart. *Respir Physiol* **63**:275-283.
- Teeter MM (2004) Myoglobin cavities provide interior ligand pathway. *Protein Sci* **13**(2):313-318.
- Theorell H (1932) *Biochem* **252**:1. Citado por Luginbuhl 1960.
- Theorell H, de Duve Ch (1947) Crystalline human myoglobin from heart muscle and urine. *Arch Biochem* **12**.
- Thomas M, Ibels L (1985) Rhabdomyolysis and acute renal failure. *Aust NZ J Med* **15**:623-628.
- Thornton J, Edwards M, Taylor W, Barlow D (1986) Location of "continuous" antigenic determinants in the protruding regions of proteins. *The EMBO J* **5**:409-413.
- Tijssen P (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Laboratories in Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Burdon RH y Van Knippenberg PH. Elsevier, NY:347-349.
- Tilton RF, Kuntz ID, Petsko GA (1984) Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry* **23**:2849-2857.
- Tsurui H, Takahashi T (2007) Prediction of T-cell epitope. *J Pharmacol Sci* **105**(4):299-316.
- Twining S, Atassi MZ (1979) Use of immunosorbents for the study of antibody binding to sperm whale myoglobin and its synthetic antigenic sites. *J Immunol Methods* **30**:139-151.
- Unanue E (1993) Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. En: William E Paul editor. *Fundamental Immunology*, 3<sup>rd</sup> edition. New York: Raven Press:111-44.
- Urban R, Schröder G, Tröger HD (1988) Myoglobingehalt der Herzmuskulatur nach postmortaler Stromeinwirkung. *Beitr Gerichtl Med* **46**:345-349. Citado por Kitao y col (1995).
- van Oss C, Singer J (1966) The binding of immune globulins and other proteins by polystyrene latex particle. *J Reticuloendothelial Society* **3**:29-40.
- van Roosmalen D, Lazzara MJ, van der Broeke LJ, Keurentjes JT, Blankschtein D (2004) Protein partitioning driven by excluded-volume interactions in an aqueous nonionic micellar-gel system. *Biotechnol Bioeng* **87**(6):695-703.
- Vatansever S, Akkaya V, Erk O, Ozturk S, Karan MA, Salmayenli N, Tascioglu C, Guler K (2003) The diagnostic value of troponin I and myoglobin levels in a myocardial infarction: a study in Turkish patients. *J Int Med Res* **31**(2):75-83.
- Voller A, Bidwell D, Bartlett A (1979) The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): A guide with abstracts of microplate applications., Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia.
- Warris PD (1978) The determination of myoglobin by gel chromatography. *Anal Biochem* **90**:447-450.
- Weber MA, Kinscherf R, Krakowski-Roosen H, Aulmann M, Renk H, Künkele A, Edler L, Kauczor HU, Hildebrandt W (2007) Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? *J Mol Med* **85**(8):887-896.
- Weller P, Jeffreys AJ, Wilson V, Vlanchetot A (1984) Organization of the human myoglobin gene. *EMBO J* **3**:439-446.
- Wen Ch (1987) Myoglobin: methods in clinical chemistry. The CV Mosby Co: 918-920.
- Werner M, Brooks SH, Mohrbacker RJ, Wasserman AG (1982) Diagnostic performance of enzyme in the discrimination of myocardial infarction. *Clin Chem* **28**:297-302.
- White T, Ibrahimi I, Wilson A (1978) Evolutionary substitutions and the antigenic structure of globular proteins. *Nature* **274**:92-94.
- Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook JA, Krishna MC, De Graff WG, Mitchell JB (1994) Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol* **7**:519-525.
- Wittenberg BA, Wittenberg JB (1985) Oxygen pressure gradients in isolated cardiac myocytes. *J Biol Chem* **260**(11):6548-6554.
- Wittenberg BA, Wittenberg JB (1989) Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol* **51**:857-878.
- Wittenberg JB (1959) Oxygen transport: a new function proposed for myoglobin. *Biol Bull* **117**:402-403.
- Wittenberg JB (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol Rev* **50**(4):559-636.



- Wittenberg JB (2007) On optima: the case of myoglobin-facilitated oxygen diffusion. *Gene* **398**(1-2):156-161.
- Wittenberg JB, Wittenberg BA (2007) Myoglobin-enhanced oxygen delivery to isolated cardiac mitochondria. *J Exp Biol* **210**(Pt 12):2082-2090.
- Witting PK, Douglas DJ, Mauk AG (2000) Reaction of human myoglobin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **275**:20391-20398.
- Witting PK, Mauk AG, Lay PA (2002) Role of tyrosine 103 in myoglobin peroxidase activity: kinetic and steady-state studies on the reaction of wild-type and variant recombinant human myoglobins with H<sub>2</sub>O. *Biochemistry* **41**:11495-11503.
- Wong SS (1996) Strategic utilization of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Clin Lab Sci* **26**:301-312.
- Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes RJ (1999) National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases. *Clin Chem* **45**:1104-1121.
- Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T (2004) Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res* **105**(1):65-78.
- Xi Y, Obara M, Ishida Y, Ikeda S, Yoshizato K (2007) Gene expression and tissue distribution cytoglobin and myoglobin in the Amphibia and Reptilia: possible compensation of myoglobin with cytoglobin in skeletal muscle cells of anurans that lack the myoglobin gene. *Gene* **398**(1-2):94-102.
- Yakulis V, Heller P (1962) The detection of myoglobin by means of immunological technics. *Am J Clin Pathol* **37**:253-256.
- Yamazaki I, Yokota K, Shikama K (1964) Preparation of crystalline oxymyoglobin from horse heart. *J Biol chem* **239**:4151-4153.
- Yang W, de Bono D (1993) Myoglobin protects against endothelial cell membrane damage associated with hydrogen peroxide or xanthine/xanthine oxidase. *FEBS Lett* **319**:145-150.
- Yoshihiko N, Hisaomi K, Hiroshi N (1985) A sensitive sandwich enzyme immunoassay for human myoglobin using Fab-horseradish peroxidase conjugate methods and results in normal subjects and patients with various diseases. *Clin Chim Acta* **153**:93-104.
- Zarour HM, Storkus WJ, Brusic V, Williams E, Kirkwood JM (2000) NY-ESO-1 encodes DRB\*0401-restricted epitopes recognized by melanoma-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. *Cancer Res* **60**(17):4946-4952.
- Zhu BL, Ishida K, Quan L, Taniguchi M, Oritani S, Kamikodai Y, Fujita MQ, Maeda H (2001) Post-mortem urinary myoglobin levels with reference to the causes of death. *Forensic Sci Int* **115**(3):183-8.

## ANEXOS

# ANEXO 1: CUESTIONARIO LLENADO A LOS PACIENTES

## ESTUDIO DE VALIDACIÓN DEL ENSAYO LÁTEX-AGLUTINACIÓN PARA MIOGLOBINA "MIOLÁTEX"

\_\_\_\_\_  
Primer apellido                      Segundo apellido                      Nombres

Edad: \_\_\_\_\_ HC: \_\_\_\_\_ Fecha del ingreso: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Color de la piel: \_\_\_\_\_ Oficio: \_\_\_\_\_

Dirección particular: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Antecedentes:	Sí	No	Tiempo
Inyecciones i.m.			
Inyecciones i.v.			
Traumatismos			
Otros:			

Medicamentos usados recientemente: \_\_\_\_\_

Descripción y evolución del dolor: \_\_\_\_\_

Tiempo transcurrido desde el dolor precordial y la toma de la primera muestra: \_\_\_\_\_

Estudio enzimático:	Tiempo transcurrido desde el momento de la admisión (0 horas)					
	0 horas	2 horas	6 horas	12 horas	18 horas	24 horas
Mioglobina						
TGO						
CKtotal/CK-MB						

Electrocardiogramas (0 horas al momento de la admisión)

0 horas	
horas	
horas	
horas	

Diagnóstico final: \_\_\_\_\_

Tomografía ventricular: \_\_\_\_\_

Nombre del informante: Dr: \_\_\_\_\_

Institución: \_\_\_\_\_

## ANEXO 2: CURVA PARA DETERMINAR MASA MOLECULAR

### COLUMNA SUPEROSE 12

Proteína patrón	Masa Molecular (kDa)
Inmunoglobulina G	150
Albúmina humana	69
Mioglobina equina	16
Citocromo c	12.3
Glucacón	3

Se determinó la  $K_{av}$  de las proteínas patrones y de la mioglobina purificada mediante la expresión:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

donde,  $V_e$  = volumen de elución,  $V_c$  = volumen de columna (mL) y  $V_o$  = volumen muerto (mL).

El  $V_c$  se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$V_c = \frac{\pi \cdot d^2}{4} \cdot h$$

donde,  $d$  = diámetro de la columna (cm) y  $h$  = altura del lecho (cm).

La curva de calibración se confeccionó tomando como eje de las abscisas los valores de  $K_{av}$  de las proteínas patrones y en el eje de las ordenadas los logaritmos de sus masas moleculares en kDa. La masa molecular de la mioglobina se estimó interpolando el valor de su  $K_{av}$  (3.53) en la curva de calibración y correspondió a 17,500 Da. Curva de calibración:

$$\text{Log(masa molecular)} = -0.7665 K_{av} + 3.9528$$

$$r^2 = 0.9969$$

## ANEXO 3: CURVA PARA DETERMINAR MASA MOLECULAR

### ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Proteína patrón	Masa Molecular (kDa)
Fosforilasa B	97
Albúmina bovina	67
Ovalbúmina	43
Anhidrasa carbónica	30
Inhibidor de tripsina	20.1
$\alpha$ -Lactoalbúmina	14.4

Se calcularon las movilidades relativas (RF) de las proteínas patrones y de la mioglobina purificada con respecto a un punto.

La curva de calibración se confeccionó tomando como eje de las abscisas los valores de RF de las proteínas patrones y en el eje de las ordenadas los logaritmos de sus masas moleculares en kDa. La masa molecular de la mioglobina se calculó interpolando el valor de su RF (0.754) en la curva de calibración y correspondió a 17,700 Da. Curva de calibración:

$$\text{Log(masa molecular)} = -1.431 \text{ RF} + 2.3269$$

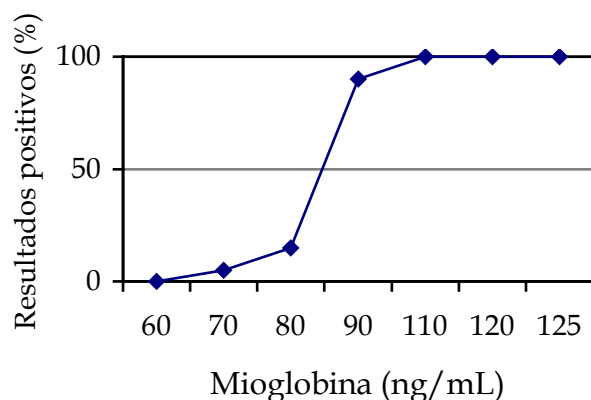
$$r^2 = 0.9978$$

## ANEXO 4: VALOR DE DISCRIMINACIÓN Y ZONA GRIS

Para la determinación de la zona gris se utilizó el control positivo (CP) del juego de reactivos RAPITEX con una concentración de 140 ng/mL y, a partir del mismo con empleo de una solución de HSA al 0.2 %, se hicieron preparaciones que contenían: 125, 120, 110, 100, 90, 80 y 70 ng/mL. A cada una de ellas se le determinó 20 veces la reactividad frente al reactivo de látex-aglutinación y se calculó el porcentaje de resultados positivos.

<b>Resultados para determinar zona gris del reactivo MIOLÁTEX</b>			
<b>ng de Mb/mL</b>	<b>V de CP + V de HSA</b>	<b>Resultados positivos (#) en 20 determinaciones</b>	<b>Resultados positivos (%) en 20 determinaciones</b>
60	429 µL + 571 µL	0	0
70	500 µL + 500 µL	1	5
80	571 µL + 429 µL	3	15
90	360 µL + 640 µL	18	90
100	714 µL + 286 µL	20	100
110	786 µL + 214 µL	20	100
120	857 µL + 143 µL	20	100
125	892 µL + 108 µL	20	100

Con el porcentaje de resultados positivos vs la concentración de mioglobina, se trazó el gráfico correspondiente:



Se obtuvo la curva de mejor ajuste para los resultados correspondientes al intervalo 70 ng/mL - 100 ng/mL:

$$y = 3.17 x - 217$$

Con esta ecuación se calculó el valor de discriminación (84.23 ng/mL) y el intervalo de la zona gris (70 ng/mL - 98.4 ng/mL).

## ANEXO 5: PROSPECTO DEL MIOLÁTEX

### MIOLÁTEX

Prueba rápida para la detección cualitativa de mioglobina humana en suero para el diagnóstico temprano del infarto agudo del miocardio.

Sólo para uso profesional de diagnóstico "in vitro".

#### Significado diagnóstico

La mioglobina es una proteína que está presente en las células musculares estriadas y en el músculo cardíaco. Por su pequeño tamaño (17 500 Da), cuando el músculo sufre daño y, en particular, en el infarto agudo del miocardio, se libera rápidamente a la sangre y alcanza valores patológicos antes que las enzimas CK, CK-MB, GOT, LDH y las troponinas cardíacas I y T. Como límite superior del valor normal se ha establecido una concentración de mioglobina de 85 ng/mL. Sus niveles se elevan en el suero a las 2-3 horas del inicio de los síntomas, alcanzando un máximo (1-1.5 µg/mL) a las 10-12 horas para retornar a la normalidad a las 24-36 horas del inicio de la isquemia coronaria. Al momento de la admisión, en casos con sospecha de infarto del miocardio, el resultado positivo tiene un valor pronóstico positivo de 89 % y el resultado negativo tiene un valor pronóstico del 65 %, mientras que a las 6 horas los valores predictivos positivo y negativo se elevan a 90 y 100% respectivamente. Esto significa que puede descartarse el infarto del miocardio con gran seguridad si el suero obtenido a las 6 horas de admisión tampoco produce aglutinación. Lo recomendado es hacerle la prueba en forma seriada: al momento de la admisión y a las 2 y 6 horas siguientes, a aquellas personas que llegan a los servicios médicos de urgencia con síntomas de infarto del miocardio. Dado que la mioglobina se encuentra en el músculo esquelético, pueden presentarse mioglobinemias de distinta etiología, especialmente, en el shock grave, en traumas musculares y en la intoxicación alcohólica severa. Una insuficiencia renal terminal puede conducir también a valores elevados de mioglobina en el suero, a causa de una disminución en la eliminación renal.

#### Composición

1. Reactivo 1, látex anti-mioglobina, 2 mL: Suspensión de partículas de látex de polidireno de 0.8 µm sensibilizadas con anticuerpos anti-Mb humana.
  2. Reactivo 2, control positivo, 2 mL: "Pool" de suero humano líquido que contiene 250 ng de Mb humana por mL.
  3. Reactivo 3, control negativo, 2 mL: "Pool" de suero humano líquido que contiene 60 ng de Mb humana por mL.
  4. Reactivo 4, solución de absorción, 2 mL: Sustancia bloqueadora de factores reumatoides.
- Agente preservante: Azida sódica (máximo 1 g/L) en todos los reactivos.
- El juego de reactivos permite realizar 40 determinaciones con empleo de 50 µL de la suspensión de látex. No obstante, se puede reducir ese volumen a la mitad (25 µL), lo que permite realizar hasta 80 determinaciones.

#### Estabilidad y almacenamiento

El juego de reactivo conservado a 2-8 °C, aún después de abierto el envase, puede utilizarse hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta (12 meses). Hay que mantener el cierre perfecto de los frascos pues la suspensión de látex puede desecarse y flocular.

### Método

#### Principio:

Reacción inmunoquímica entre la mioglobina y los anticuerpos anti-mioglobina inmovilizados sobre las partículas de látex. En caso de concentración elevada de mioglobina (>100 ng/mL) se producirá una aglutinación visible de las partículas (resultado positivo).

#### Realización:

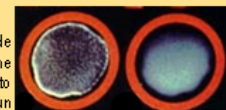
1. Esperar que los reactivos y los sueros alcancen la temperatura ambiente.
  2. Depositar en una lámina portaobjetos dividida en 3 campos: 50 µL de suero control positivo, 50 µL de suero control negativo y 50 µL del suero del paciente en cada uno de los campos.
  3. Adicionar 10 µL de la solución bloqueadora a cada uno de los campos.
  4. Agitar bien el reactivo de látex y depositar 25 µL del mismo en cada uno de los campos de reacción.
  5. Mezclar con una varilla o palillo simulando un círculo y evitando que se junten las manchas.
  6. Rotar manualmente la placa durante 5 minutos y observar la aparición o no de aglutinado.
- El juego de reactivos permite realizar 40 determinaciones con empleo de 50 µL de la suspensión de látex. No obstante, se puede reducir ese volumen a la mitad (25 µL), lo que permite realizar hasta 80 determinaciones.

#### Valiación:

1. En presencia de un infarto cardíaco la mayoría de los sueros reaccionan ya a los 3 minutos con resultado claramente positivo.
2. Afín de no pasar por alto los resultados de muestras débilmente positivas, se continuará rotando la placa durante 2 minutos más. Si la muestra da una aglutinación débil, se repetirá con una nueva muestra de suero 1 ó 2 horas más tarde.

#### Advertencia:

La intensidad de la reacción en las muestras positivas puede compararse con la del control positivo (aspecto de leche cortada); la no aglutinación con el control negativo (aspecto lechoso). Una aglutinación franca indica normalmente un contenido de mioglobina de 100 ng/mL o mayor.



#### Valoración semicuantitativa mediante diluciones seriadas

El suero se diluye con solución de NaCl y se procede según el método descrito. Se valora la dilución mayor de suero que en el transcurso de 5 minutos, da una clara aglutinación.

Agglutinación hasta la dilución de suero	Corresponde a una concentración mínima en ng/mL
1:2	200
1:4	400
1:8	800
1:16	1600

**Referencias:** Wemer M, Brooks SH, Mohrbaker RJ, Wasserman AG (1982) *Clin Chem* 28:297-302.  
Mainard F, Massoubre B, Le Marec H, Madec Y (1985) *Clin Chim Acta* 153(1):1-8.  
Isabel Giraldo, Mario Alvarez, María Cristina Pico, Paula Pedrosa (1993) *Revista Cubana de Farmacia* 27(2):88-94.

## ANEXO 6: ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL MIOLÁTEX

Los tres lotes de reactivo fueron evaluados mensualmente hasta un período de 12 meses, que es el tiempo que se recomienda para este tipo de diagnosticador, según las regulaciones del CECMED para los estudios de estabilidad(2000). Se comprobó la estabilidad de la suspensión de látex (apariencia homogénea o presencia de aglutinados) y su reactividad frente a los sueros controles positivos (+) y negativos (-) del juego de reactivos MIOLÁTEX y del juego RAPITEX. Los resultados correspondientes a los 6 y 12 meses se muestran en la Tabla:

**Estudio de estabilidad del MIOLÁTEX a los 6 y 12 meses.**

Lote	6 meses					12 meses				
	Estabilidad	Ensayo frente a suero control				Estabilidad	Ensayo frente a suero control			
		MIOLÁTEX		RAPITEX			MIOLÁTEX		RAPITEX	
		+	-	+	-		+	-	+	-
1	Homogéneo	++++	-	++++	-	Homogéneo	++++	-	++++	-
2	Homogéneo	++++	-	++++	-	Homogéneo	++++	-	++++	-
3	Homogéneo	++++	-	++++	-	Homogéneo	++++	-	++++	-



## ANEXO 7: ESTIMACIÓN ECONÓMICA PRELIMINAR DEL MIOLÁTEX

Se tomó como referencia el reactivo de látex-aglutinación para microalbuminuria (Microalb-Látex) desarrollado en y producido por la EPB "Carlos J. Finlay". Este diagnosticador tiene un principio similar al del MIOLÁTEX y utiliza anticuerpos policlonales producidos en carnero. El estudio de gastos y precio fue realizado por la Sección de Finanzas y Precios del Dpto. Económico de la EPB "Carlos J. Finlay". El componente pesos convertibles (4.28 CUC) está contenido en el total unitario (CUP) de cada uno de los gastos.



ESTUCHE DE MICROALB-LATEX PARA 100 DETERMINACIONES	
CONCEPTO DE GASTOS	TOTAL UNITARIO
Materia prima y materiales fundamentales	3.8634
Gastos fuerza de trabajo	2.6203
Gastos indirectos de producción	5.5567
Gastos generales y de administración	2.9592
Gastos de distribución y venta	0.0005
Gastos Totales o Costo de Producción	<b>15.0001</b>
Margen utilidad s/base autorizada	2.2273
Precio de venta	<b>17.227</b>
Una determinación con MicroAlb-Látex	<b>0.1723</b>
Una determinación con el reactivo similar importado	<b>0.90 - 1.00 USD</b>

Una prueba con un reactivo comercial similar al MIOLÁTEX (el RAPITEX) cuesta 2.4 USD.

### Referencias:

- Díaz-Machado Leyda (2004) Inmunoensayo de látex-aglutinación para determinación de microalbuminuria. Tesis para optar por el título Maestra en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.
- Ficha para precios y su componente en pesos convertibles. Código 105 de 10/09/2008, EPB "Carlos J. Finlay".

## ANEXO 8: AUTOBIBLIOGRAFÍA

Empleo de un reactivo de látex (mioglobina) para el diagnóstico precoz del infarto agudo del miocardio

Isabel Giralдино, Mario Alvarez, **María Cristina Pico**, Paula Pedroso

*Revista Cubana de Farmacia* **27**(2):88-94, 1993

Mioglobina humana: Aislamiento y purificación

Isabel Giralдино, **María Cristina Pico**, Roberto Alegre

*Revista Biología* **9**:23-29, 1995

Inmunoensayo de látex para mioglobina en el diagnóstico del infarto agudo del miocardio

**María Cristina Pico**, Isabel Giralдино, Mario Alvarez, Rosabel Falcón, Elda Palomo

*Revista Biología* **10**:101-106, 1996

Purificación de anticuerpos anti-mioglobina humana con empleo de mioglobina heteróloga

**María Cristina Pico**, Isabel Giralдино, Mario Alvarez, Paula Pedroso, Humberto Carol, Joaquín Díaz

*Revista Biología* **18** (1):80-86, 2004

Mioglobina: Dos caras de una moneda. Artículo de revisión

**María Cristina Pico**, Isis Casadelvalle, Isabel G. Giralдино, Aurora I. Roque, Joaquín Díaz-Brito

*Revista Biología* **21**(1-2):5-17, 2007.

### OTRAS PUBLICACIONES DE LA AUTORA RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS

Inmunología Experimental (libro de texto para pre y postgrado)

**María Cristina Pico**, Isabel Giralдино, Anselmo Otero

Editora Félix Varela, 1998

Inmunogenicidad y especificidad antigénica de sticholisinas I y II, dos citolisinas de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*

**María Cristina Pico**, Alberto del Monte, Youdine Torres, Ariel Basalto, Eric Felicó, Anselmo J. Otero

*Revista Biología* **14**(2):156-159, 2000

Cross-reactivity and inhibition of haemolysis by policlonal antibodies raised against St II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*

**María Cristina Pico**, Ariel Basalto, Alberto del Monte, Abdel Hidalgo, Maria Eliana Lanio, Carlos Alvarez, Erik Felico, Anselmo Otero

*Toxicon* **43**: 167-171, 2004

Immunohistochemical targeting identifies sea anemone cytolysins on tentacles, mesenteric filaments, and isolated nematocysts of *Stichodactyla helianthus*

Ariel Basalto, Viviana M. Pérez, Yarielys Noa, Anselmo Otero, Carlos Varela, **María C. Pico**.

*Journal of Experimental Zoology*, Jan 23; **305A**(3):253-258, 2006

## ANEXO 9: TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS

1. Preparación de mioglobina humana. **María C. Pico**, Isabel Giralдино, Mario Alvarez, Roberto Alegre. X Seminario Científico del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1988.
2. Diagnóstico precoz del infarto de miocardio con un reactivo de látex de producción nacional. Isabel Giralдино, Mario Alvarez, **María C. Pico**. Evento XX Aniversario de EPB Carlos J. Finlay, 1990.
3. Evaluación de la respuesta inmune a mioglobina en dos especies animales. Paula Pedroso, Isabel Giralдино, Mario Alvarez, **María C. Pico**. Evento XX Aniversario de EPB Carlos J. Finlay, 1990.
4. Desarrollo de un reactivo de látex para el diagnóstico precoz del infarto de miocardio. Isabel Giralдино, Mario Alvarez, **María C. Pico**. Congreso Latinoamericano de Biotecnología, 1990.
5. A latex reagent for the early diagnosis of acute myocardial infarction. Isabel Giralдино, Mario Alvarez, **María C. Pico**. Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica, México, 1992.
6. Comportamiento de la mioglobina sobre Mono Q HR 5/5. Isabel Giralдино, **María C. Pico**. Seminario de Cromatografía del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1993.
7. Inmunoensayo de látex para mioglobina. Foro de Ciencia y Técnica de la Universidad de la Habana, 1994. Premio.
8. Latex test for serum myoglobin in the diagnosis of acute myocardial infarction. **María C. Pico**, Isabel G. Giralдино, Mario Álvarez, Paula Pedroso y Humberto Carol. 6to Congreso Latinoamericano de Inmunología y 3er congreso Cubano de Inmunología 9-13 diciembre 2002.

---

9. Purificación de anticuerpos anti-mioglobina humana con mioglobina equina y funcionalidad de los anticuerpos en un inmunoensayo de látex-aglutinación para mioglobina humana. **María C. Pico**, Isabel Giralдино, Mario Alvarez, Paula Pedroso, Joaquín Díaz, Geraudis Mustelier. V Congreso Nacional y VII Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional. Palacio de las Convenciones, mayo 16-20, 2005.
10. Estudios inmunogénicos y antigénicos de mioglobinas mediante inmunoensayos enzimáticos y técnicas bioinformáticas. **MC Pico**, I Giralдино, J Díaz-Brito. Tercer Simposio de Bioquímica y Biología Molecular. Palacio de las Convenciones de La Habana, 16-20 octubre de 2006.