



Asociación Médica Argentina

Nanotecnología: Avances
en Bioquímica Clínica
Dr. Juan Miguel Castagnino

Estructura celular tridimensional





Genoma

Información genética completa constituida por la codificación de las cuatro bases químicas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

Secuencia que produce 3000 millones de letras de código o pares de bases en el genoma humano.

- **Los genes:** son los encargados de unir específicamente los 20 aminoácidos para configurar una proteína determinada.

- **Las proteínas:** pueden tener distintas características de estructura y función, según la reacción de plegamiento de las estructuras planares y tridimensionales.

Células sanas y enfermas pueden sintetizar proteínas funcionalmente diferentes generadas por el mismo genoma.



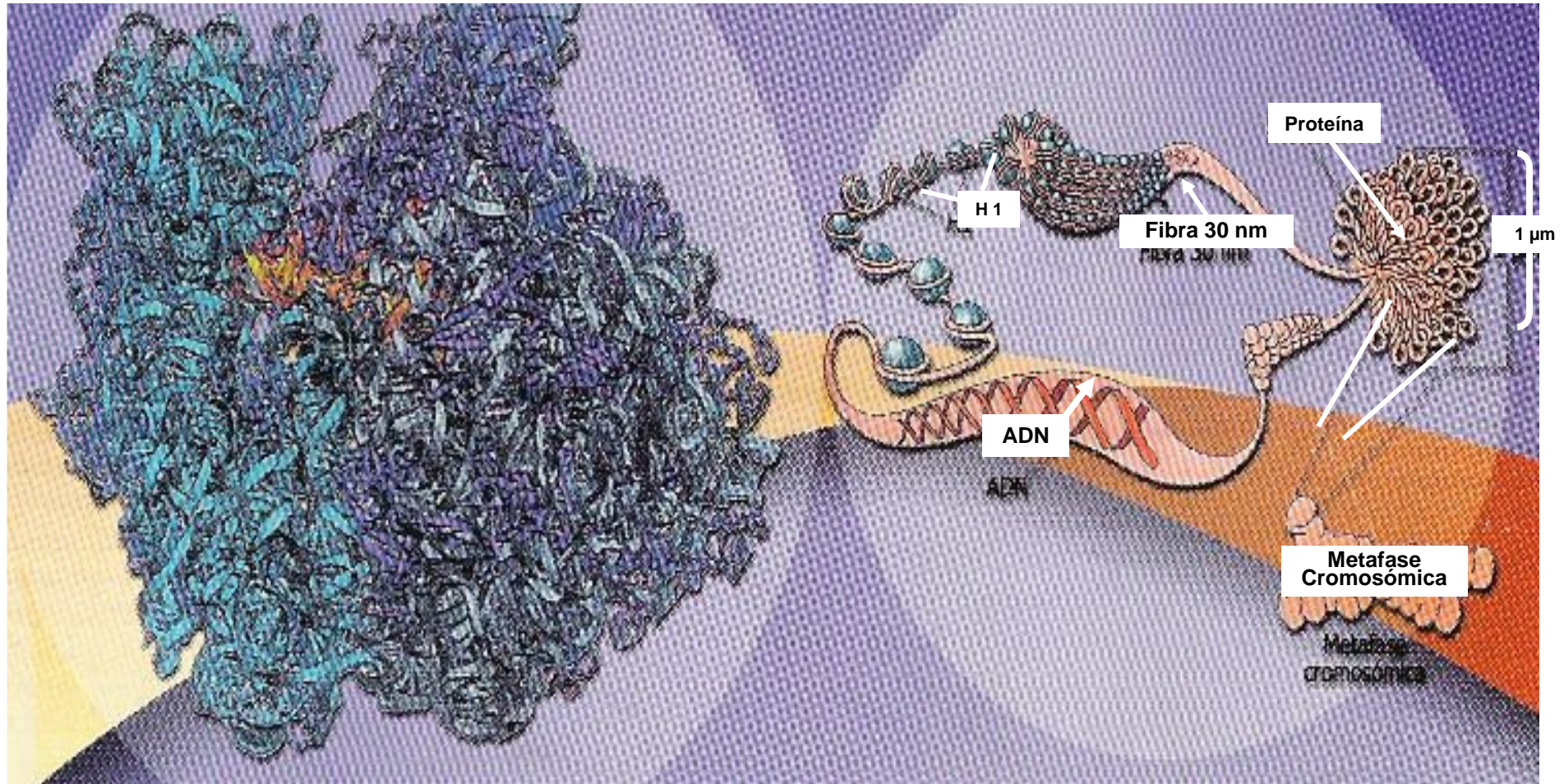
Proteoma

Término sugerido en 1994 por Marc. R. Wilkins, de Proteoma Systems en Sydney, para designar la totalidad de las proteínas codificadas por un genoma.

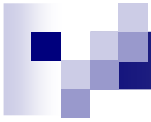
Esta definición involucra tres actividades principales:

- **Identificación de todas las proteínas sintetizadas por una células o tejido en el organismo.**
- **Determinación del modo en que interaccionan para formar redes semejantes a circuitos eléctricos.**
- **Trazado de estructura tridimensional precisa de la proteína como medio para encontrar lugares donde pueden ser activadas o desactivadas por la acción de fármacos.**

GENOMA



PROTEOMA

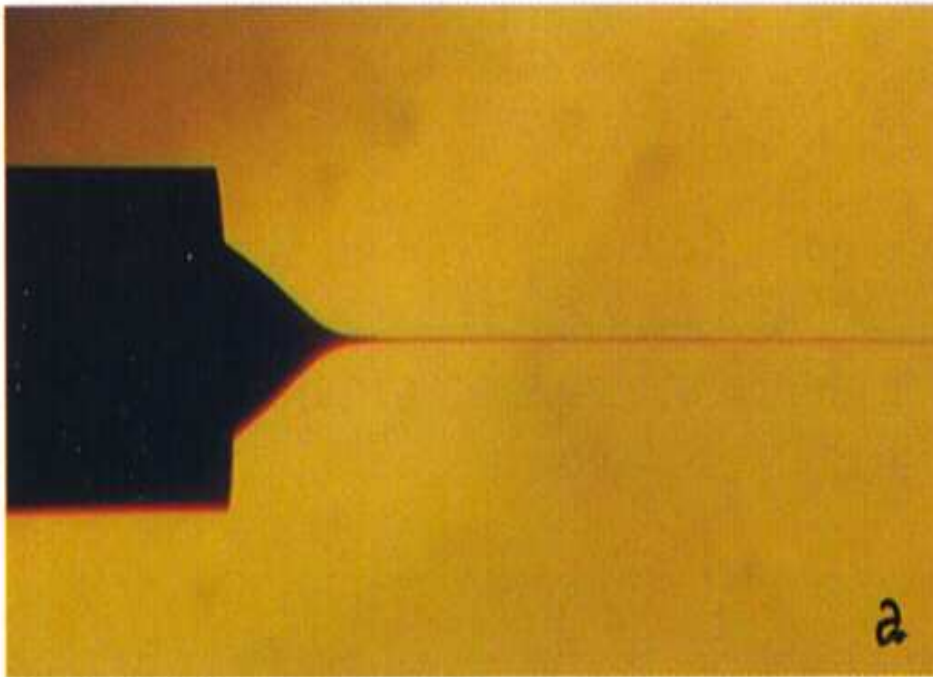


Meso-espacio entre 1 y 100 nanómetros
donde rigen las leyes de la mecánica
cuántica de Planck.



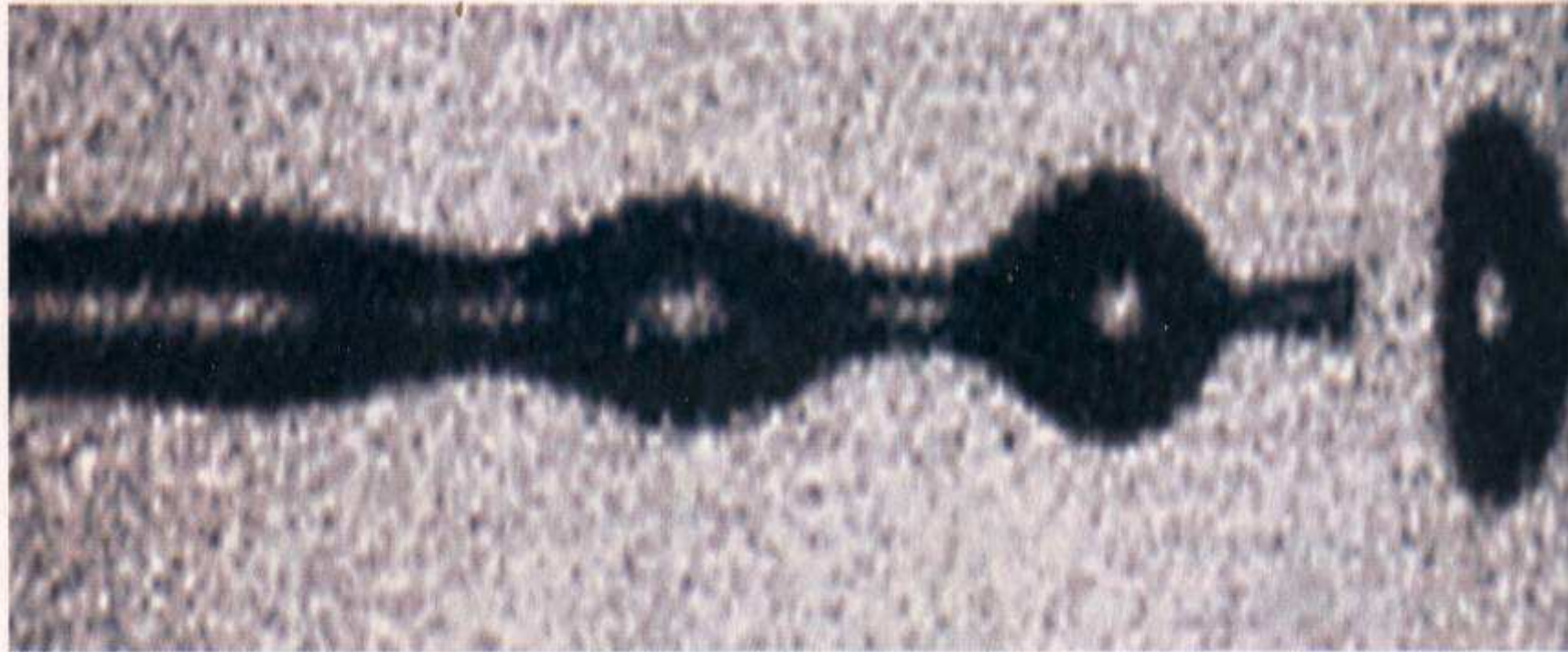
Prefijo	Símbolo	Factor	Valor Numérico
tera	T	10^{12}	1.000.000.000.000
giga	G	10^9	1.000.000.000
mega	M	10^6	1.000.000
kilo	k	10^3	1.000
hecto	h	10^2	100
deka	da	10^1	10
-	-	10	1
deci	d	10^{-1}	0.1
centi	c	10^{-2}	0.01
mili	mili	10^{-3}	0.001
micro	μ	10^{-6}	0.00001
nano	n	10^{-9}	0.00000001
pico	p	10^{-12}	0.000000000001
femto	f	10^{-15}	0.000000000000001
atto	a	10^{-18}	0.000000000000000001
zepto	z	10^{-21}	0.000000000000000000001
yocto	y	10^{-24}	0.000000000000000000000001

Microspray



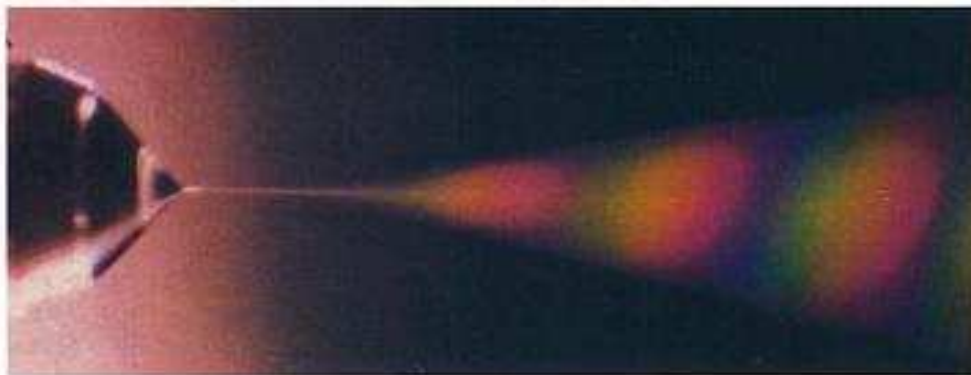
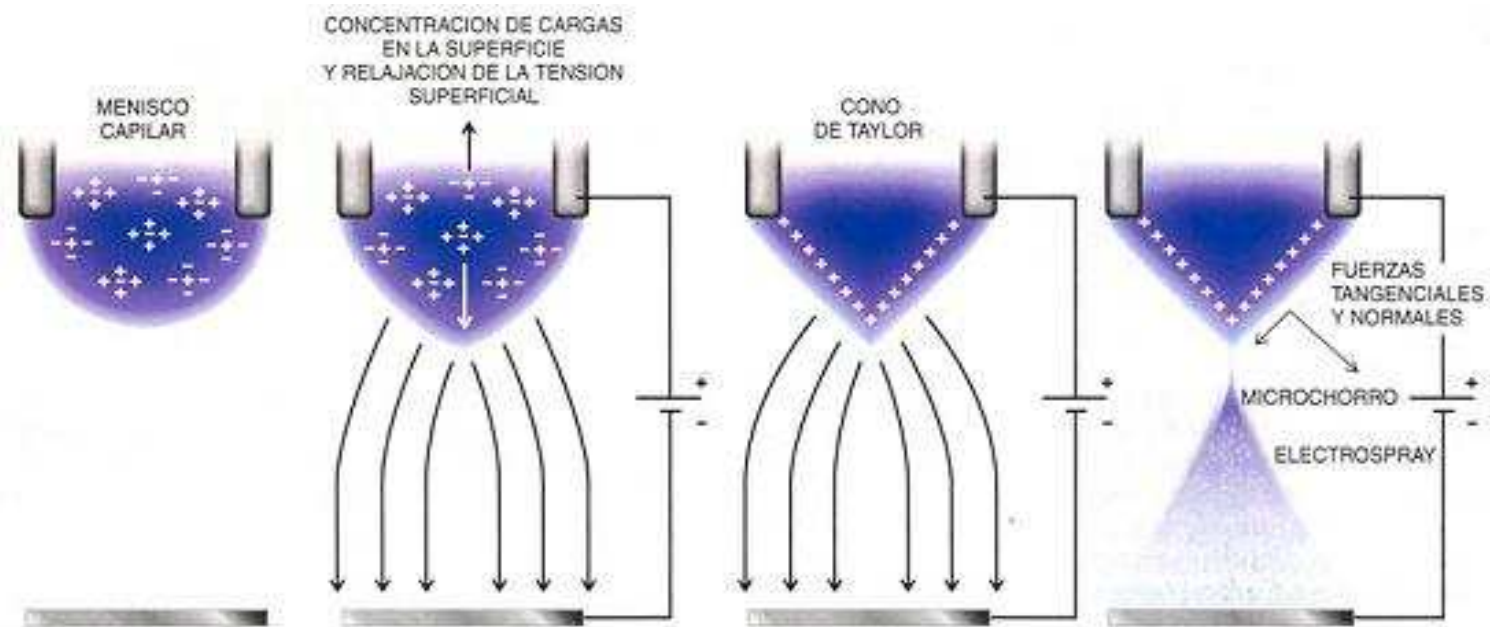
2. LA VISCOSIDAD aumenta la estabilidad de un chorro y, por tanto, la longitud que alcanza sin romperse. En la imagen, el chorro de agua (*b*) se atomiza mucho antes que el de glicerina (*a*), más viscoso y, por tanto, más estable y más largo.

Nanotecnología



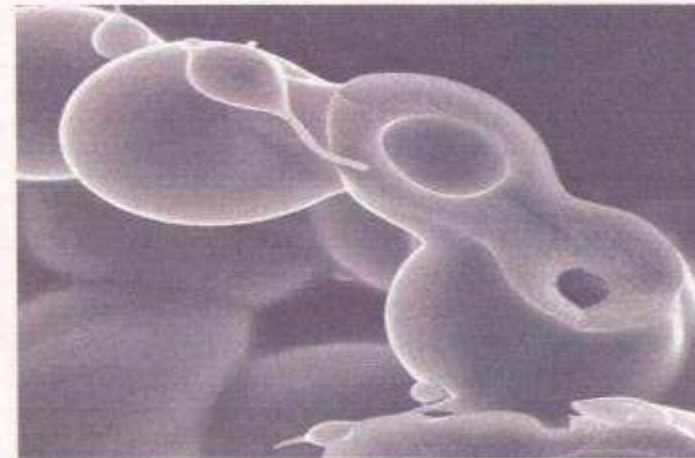
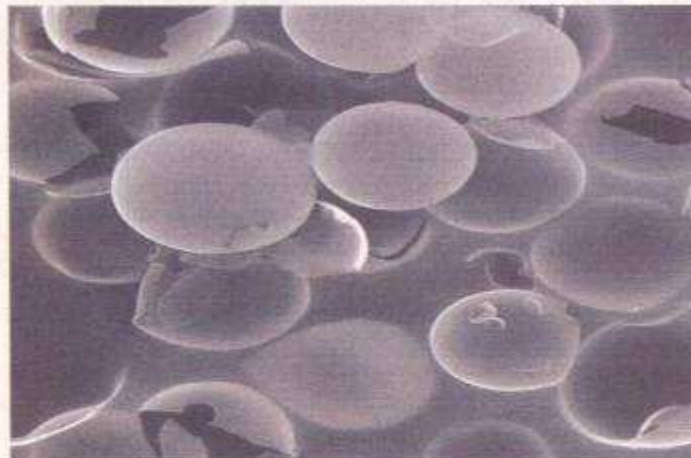
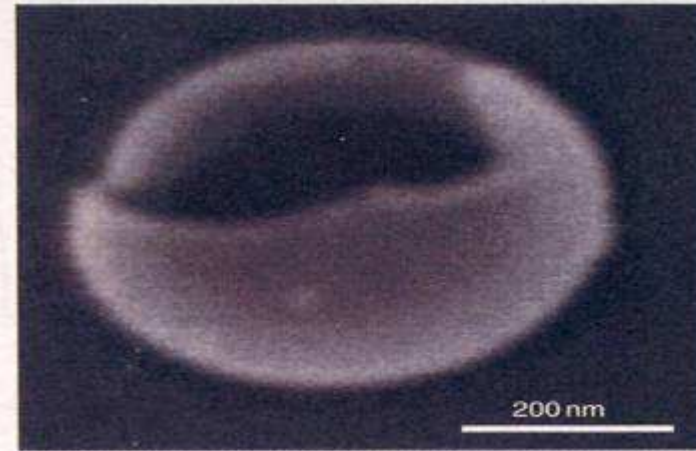
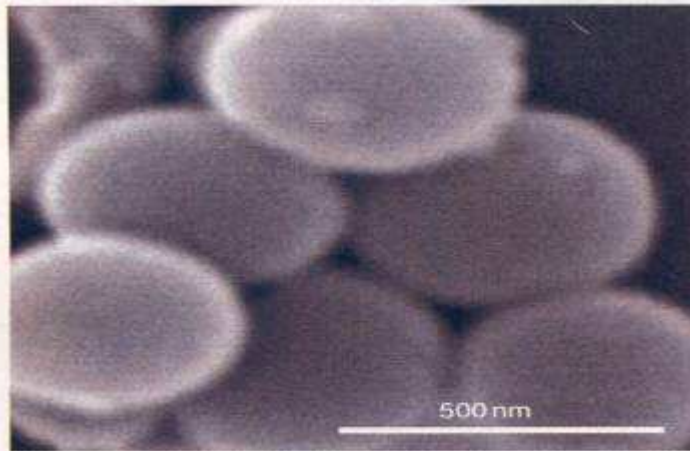
1. LAS INESTABILIDADES VARICOSAS terminan por romper en gotas este chorro capilar líquido de 400 micras de diámetro (superposición de imágenes obtenidas con luz estroboscópica).

Electrospray



ELECTROSPRAY DE METANOL en el que se observa el efecto Tyndall. Las gotas con diámetros de entre 380 y 720 nanómetros reflejan la luz azul e impiden su paso a través del spray por ser éstas mayores que la longitud de onda de dicha radiación (380 nm). En cambio, las otras componentes de la luz blanca (de longitud de onda mayor) pasan sin dificultad a través de la nube de gotas.

Nanoesferas

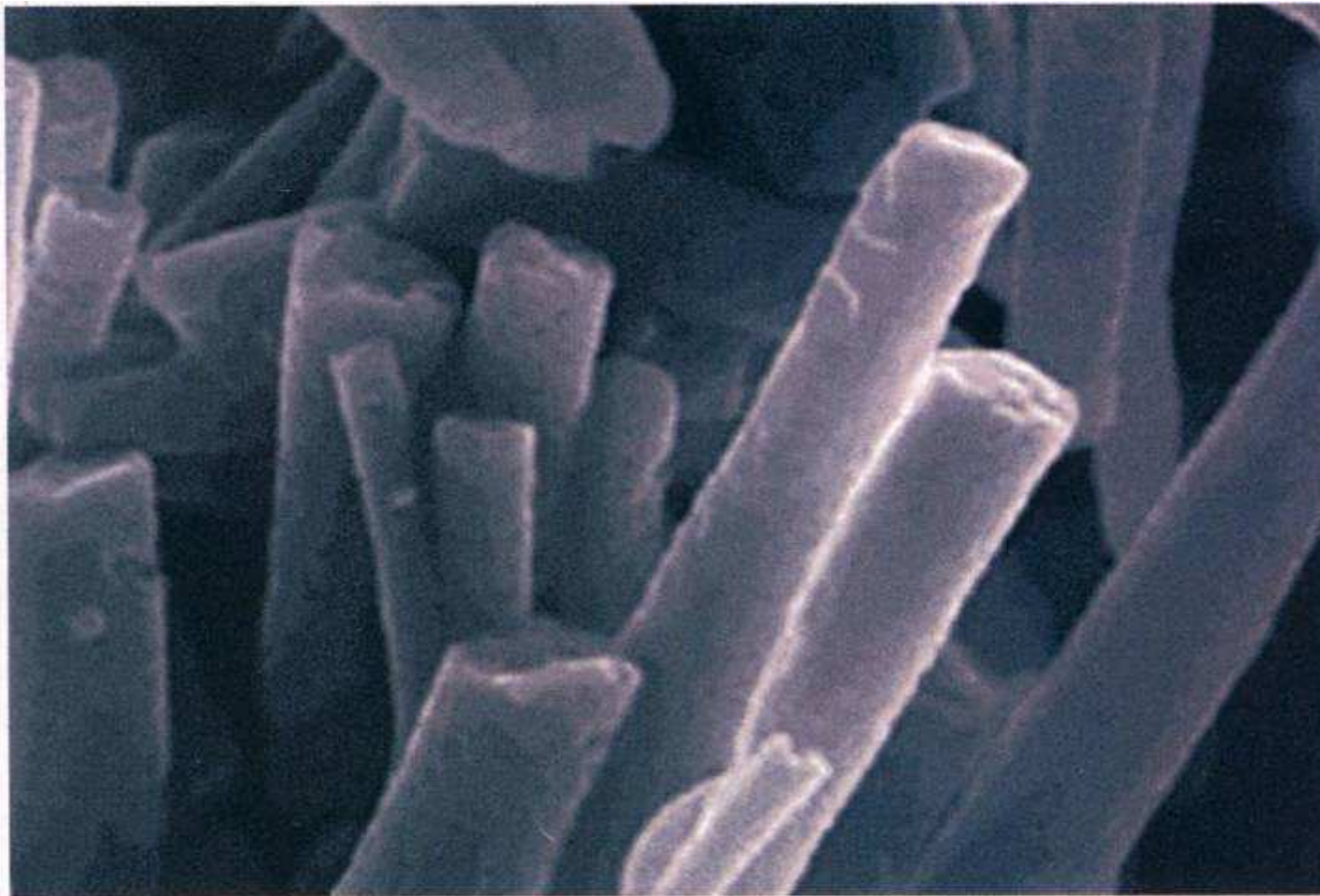


4. NANOESFERAS HUECAS para uso en microelectrónica de alta velocidad obtenidas a partir de chorros coaxiales electrificados y técnicas sol-gel. Imágenes de espectroscopía electrónica de barrido.

Atomización de fluidos



Nanofibras



5. NANOFIBRAS de óxido de alúmina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) obtenidas mediante electrospray simple y técnicas sol-gel. Diámetros por debajo de 150 nanómetros y longitudes varias veces mayores.

Nanotubos

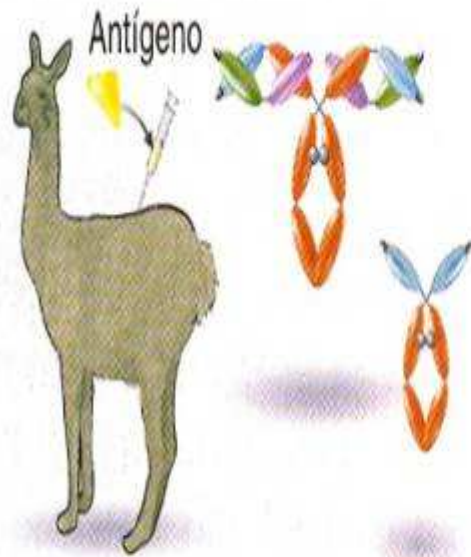
TIEMPO
DE SOLIDIFICACION

TIEMPO DE CRECIMIENTO
DE LA PERTURBACION



LIQUIDO INTERIOR: ACEITE
LIQUIDO EXTERIOR: SOLUCION SOL-GEL

1 Inmunización



Se inmuniza un camello o una llama para que produzca anticuerpos normales (*izquierda*) y anticuerpos de cadena pesada (*derecha*) específicos de esa diana

2 Aislamiento y clonación



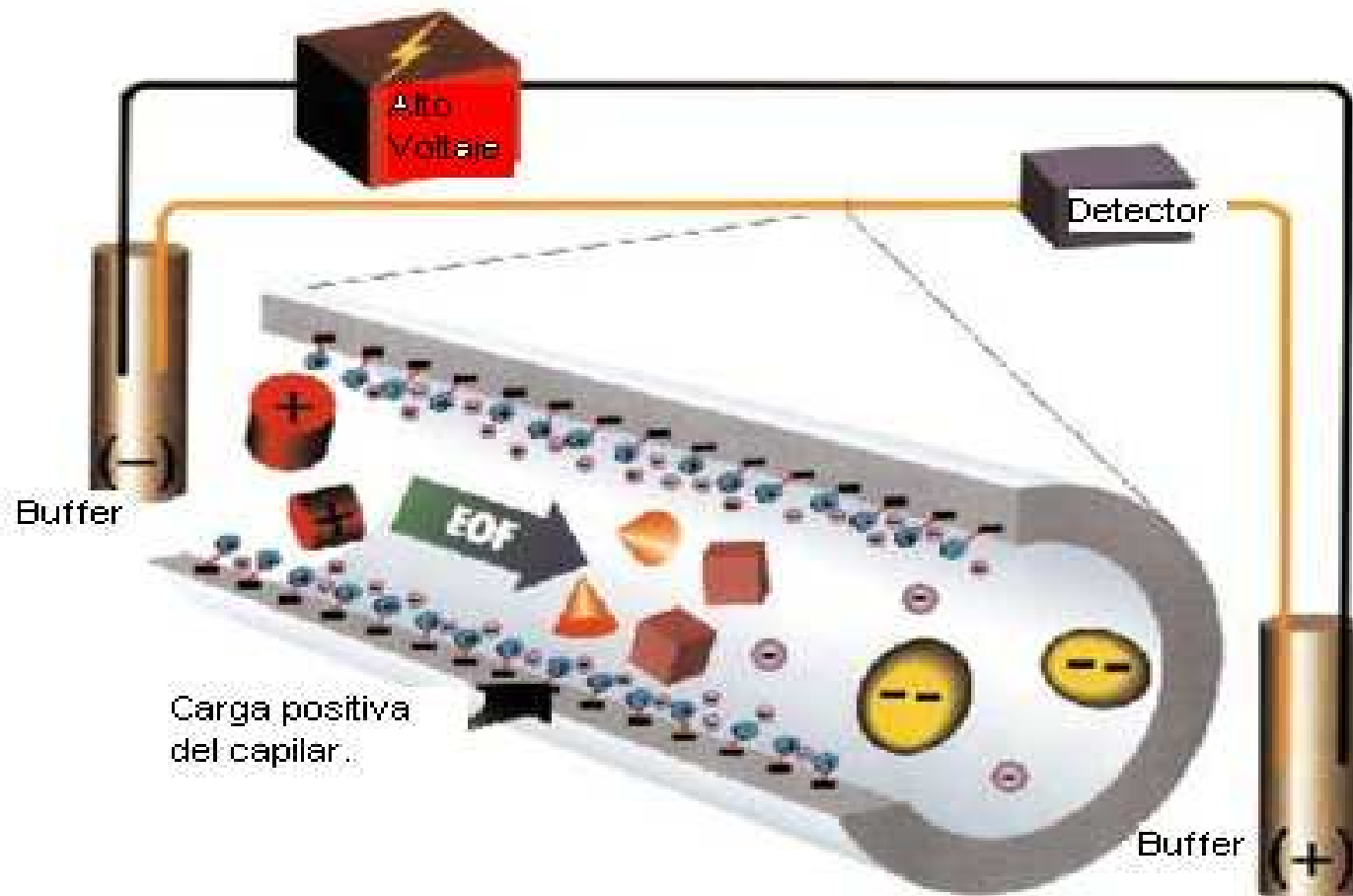
En una muestra de sangre, se identifican las células productoras de anticuerpos de cadena pesada de gran afinidad por la diana. Luego, se obtiene la secuencia de ADN para los genes que codifican el anticuerpo

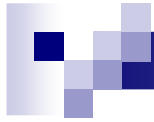
3 Ingeniería genética



El ADN se recorta hasta obtener sólo la parte que codifica un segmento variable pesado: el nanocuerpo. Para identificar la de mayor utilidad farmacológica, se ensayan numerosas formas ligeramente mutadas del anticuerpo

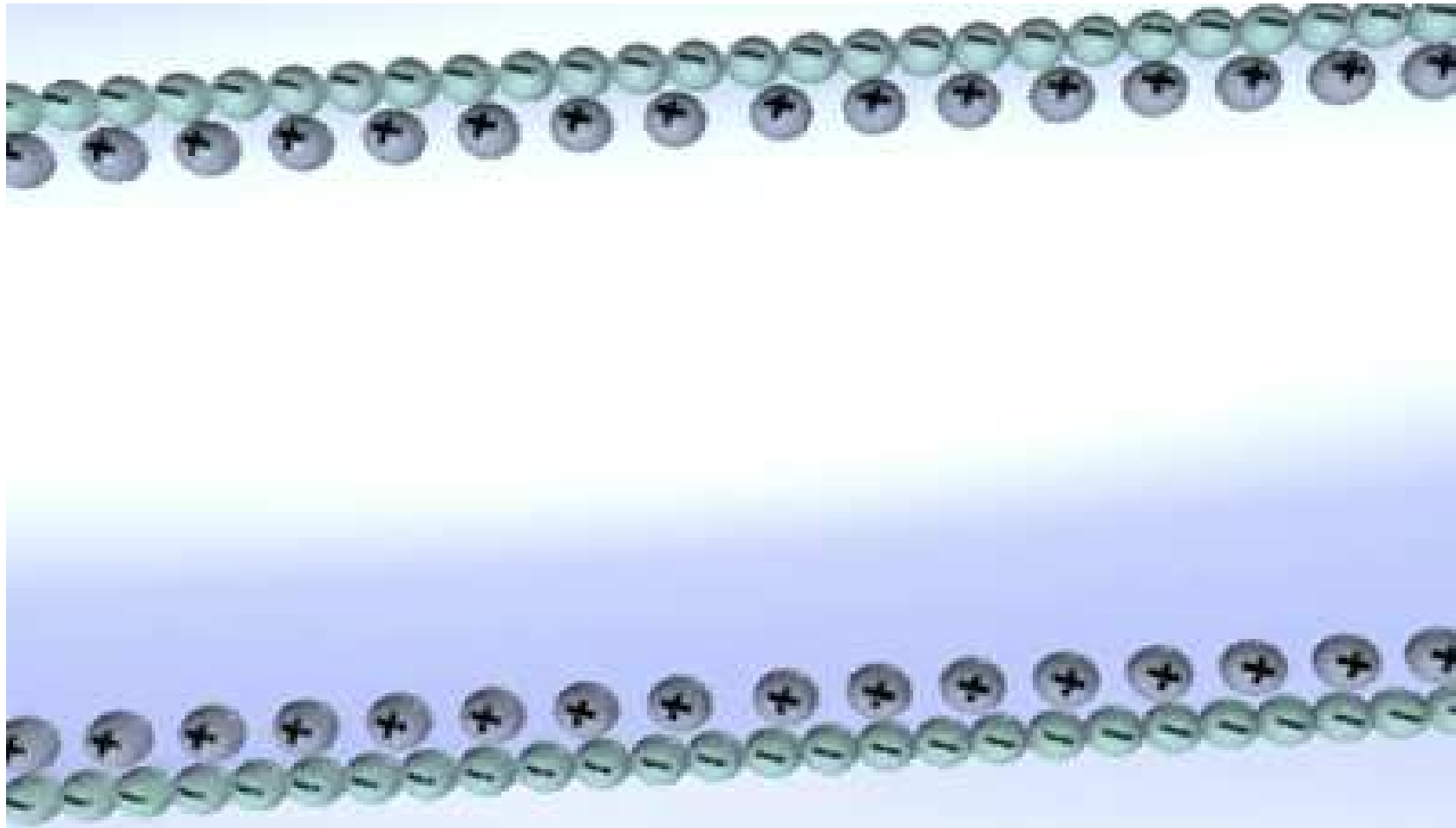
Migración Interna en la Electroforesis Capilar



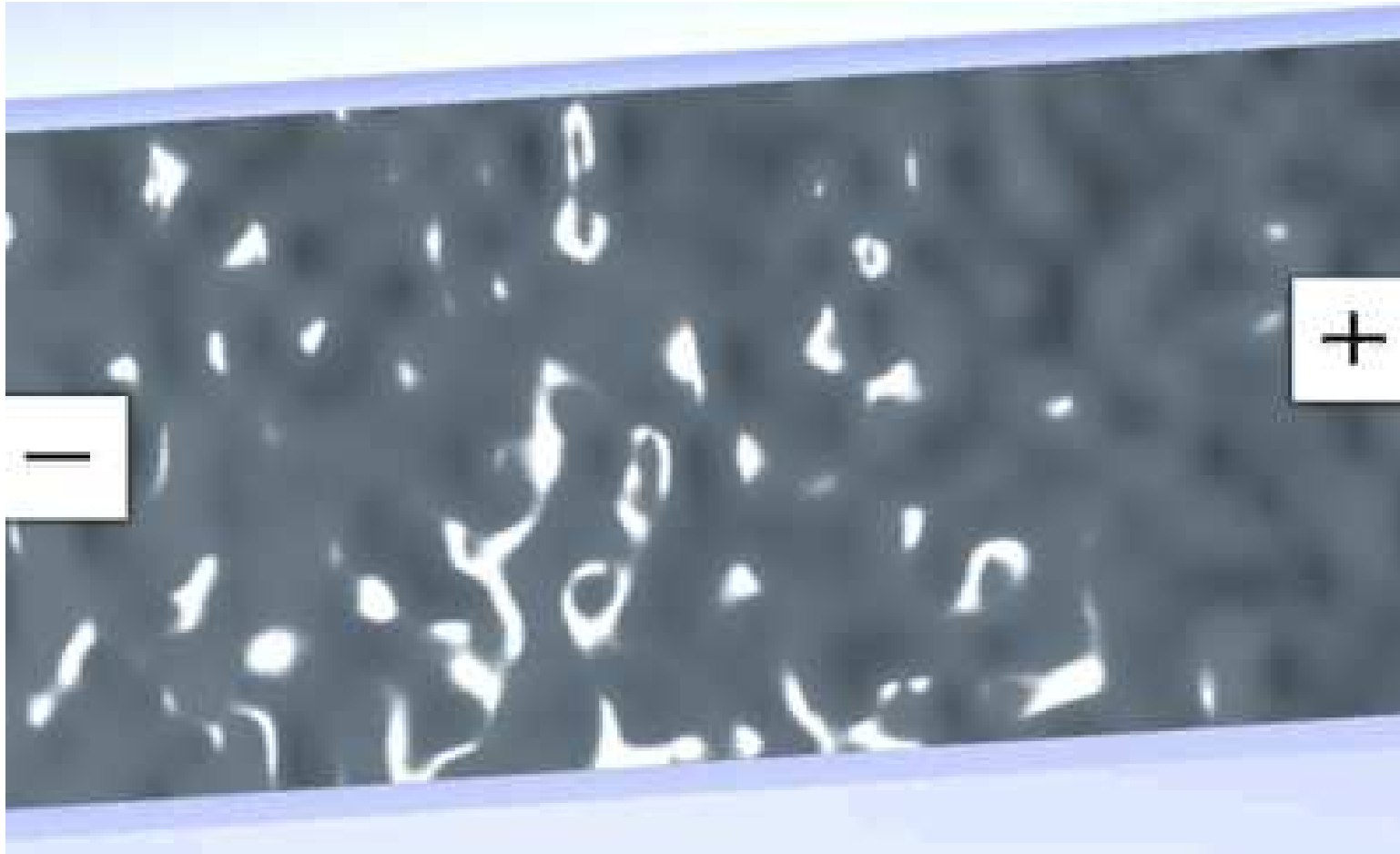


Dinámica de la Electroforesis

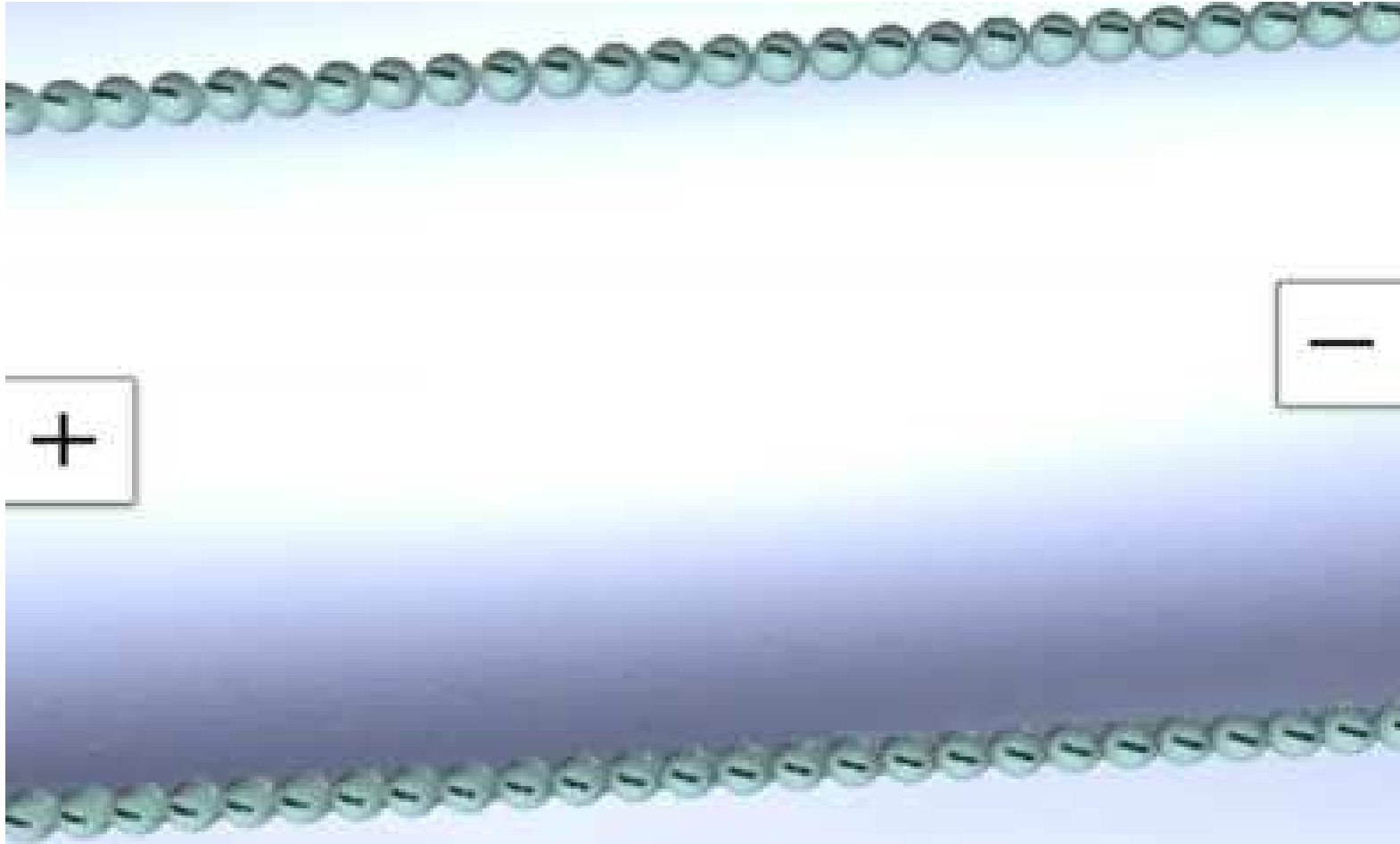
Electroendósmosis



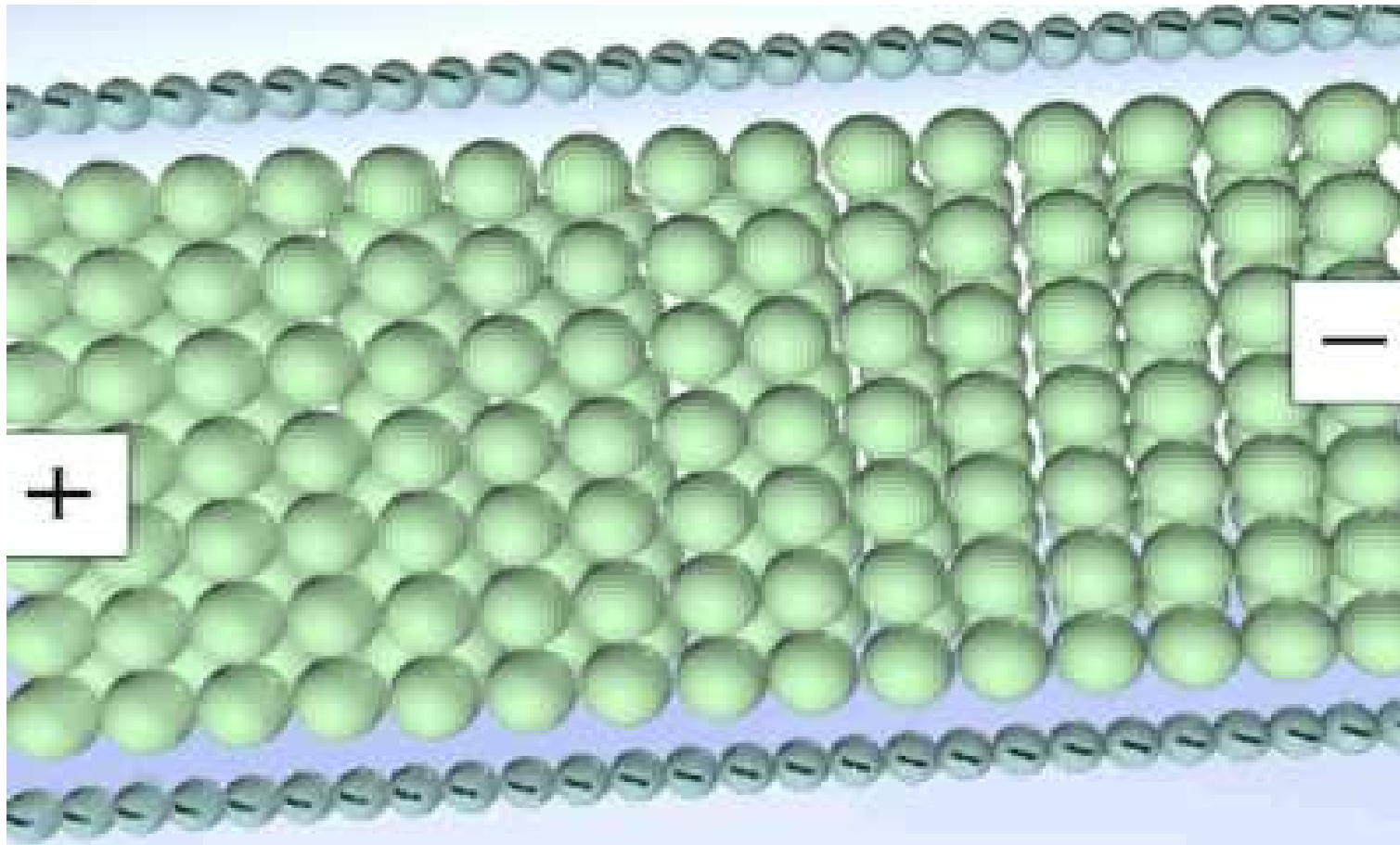
Electroforesis en Gel



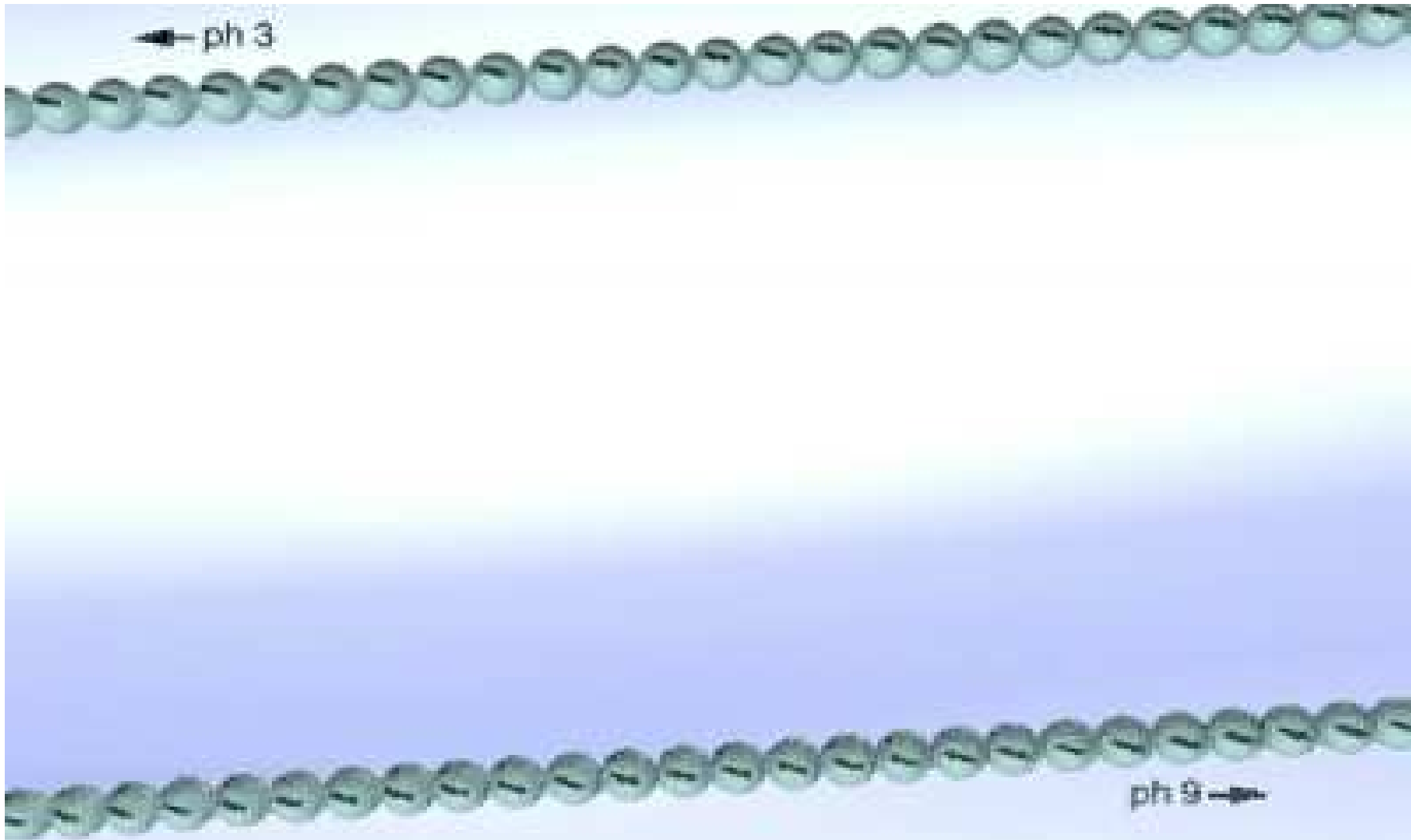
Electroforesis Zonal



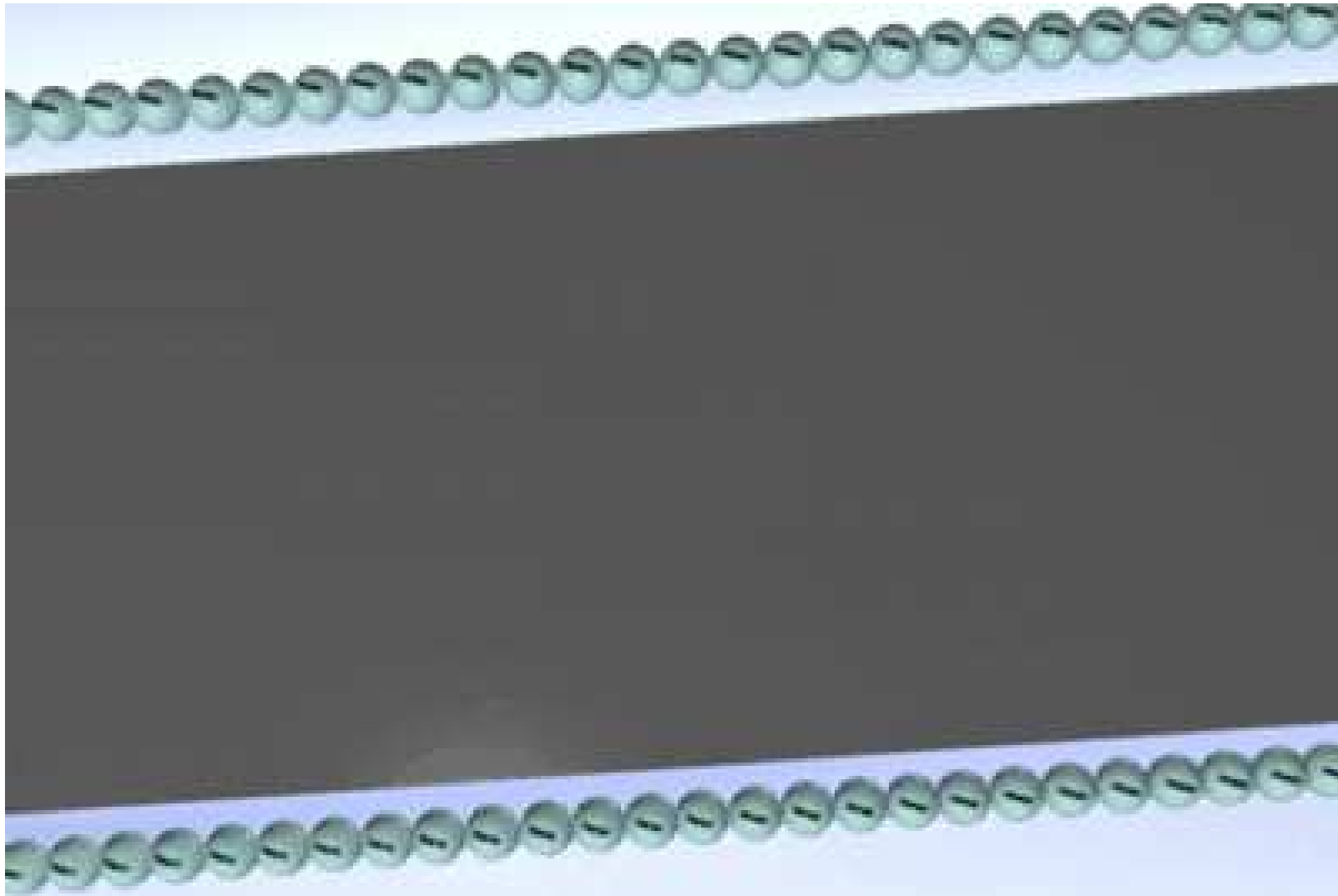
Cromatoelectroforesis



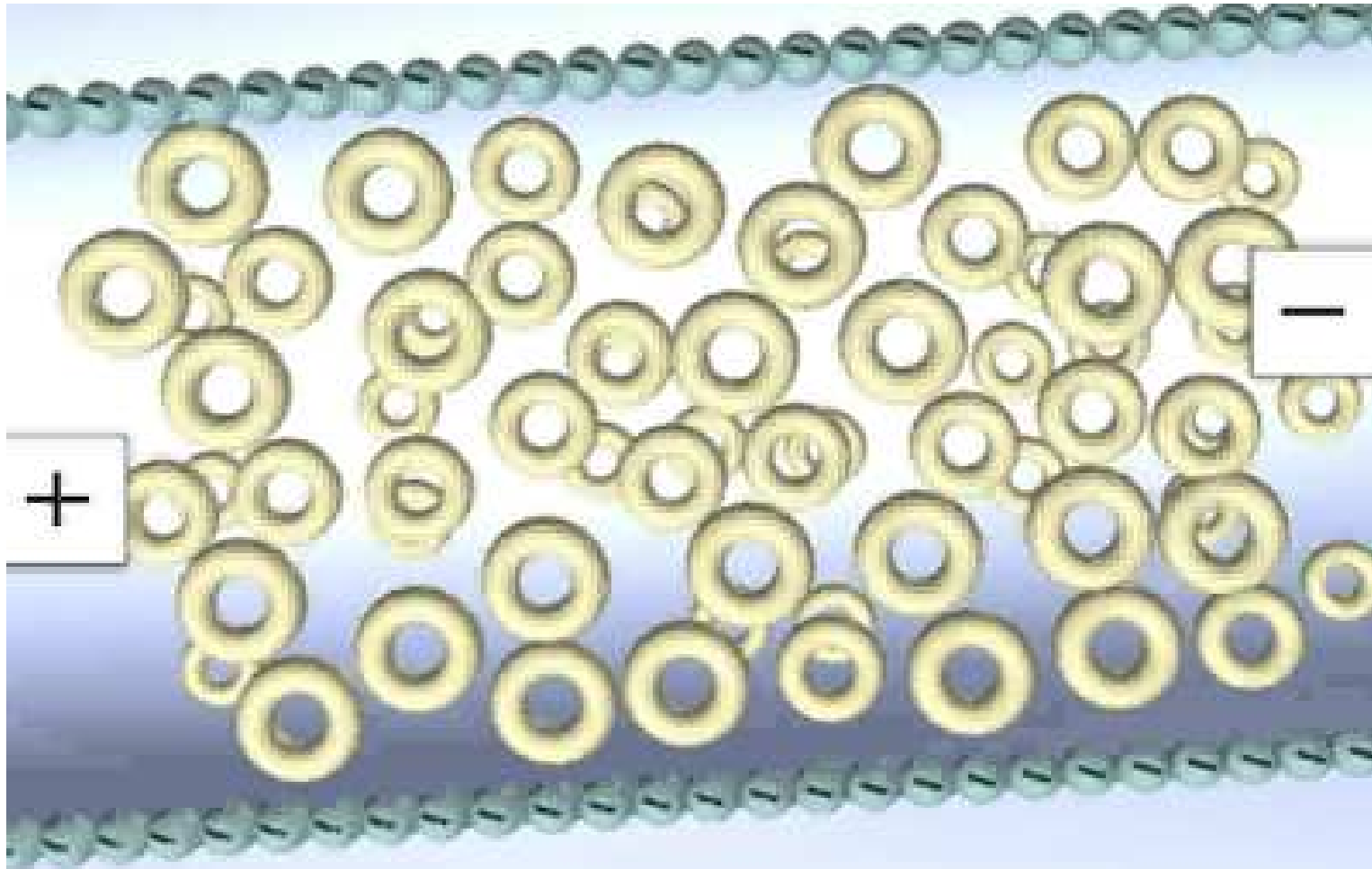
Isoelectroenfoque



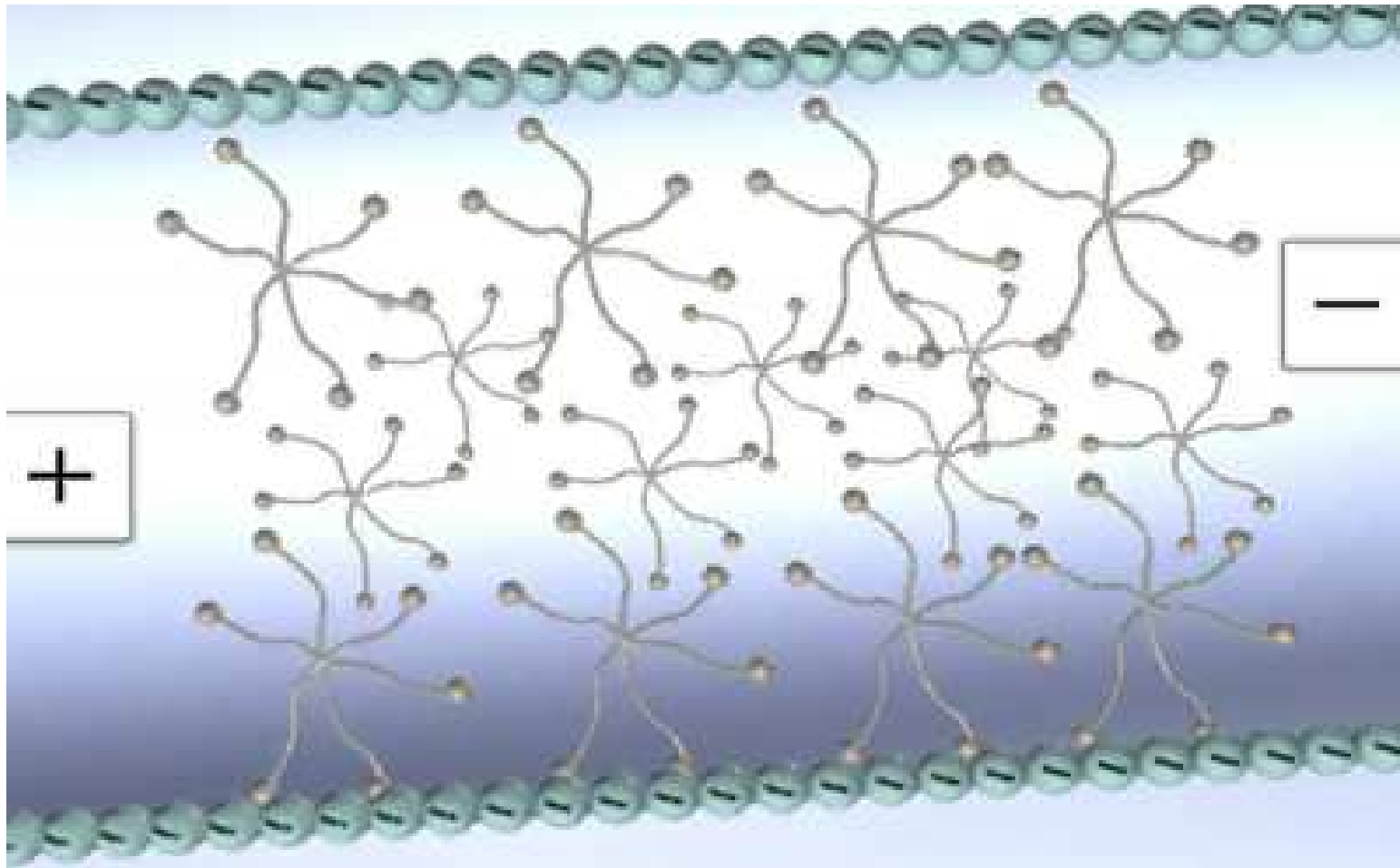
Isotacoforesis



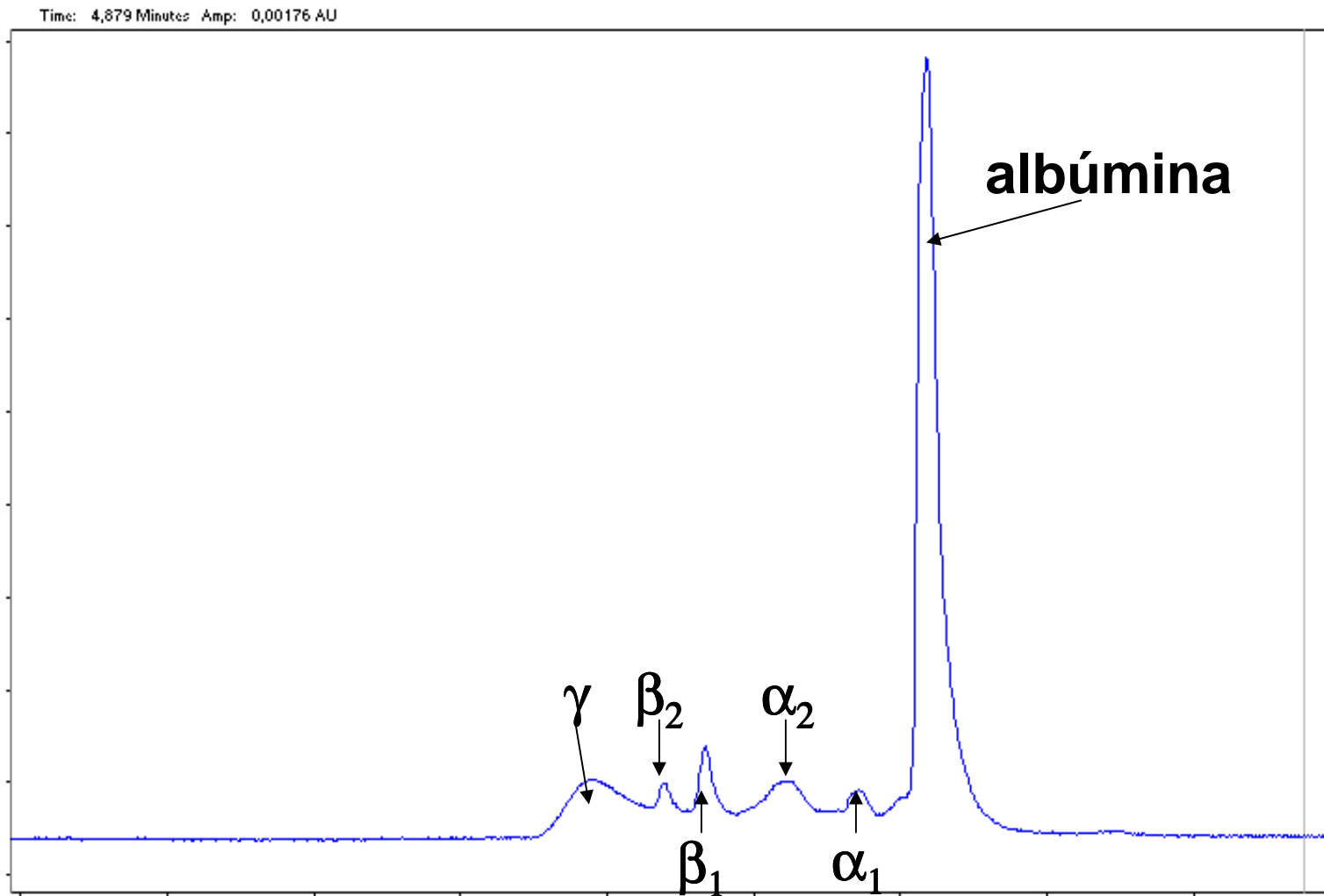
Electroforesis Quiral

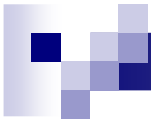


Electrocromatografía micelar

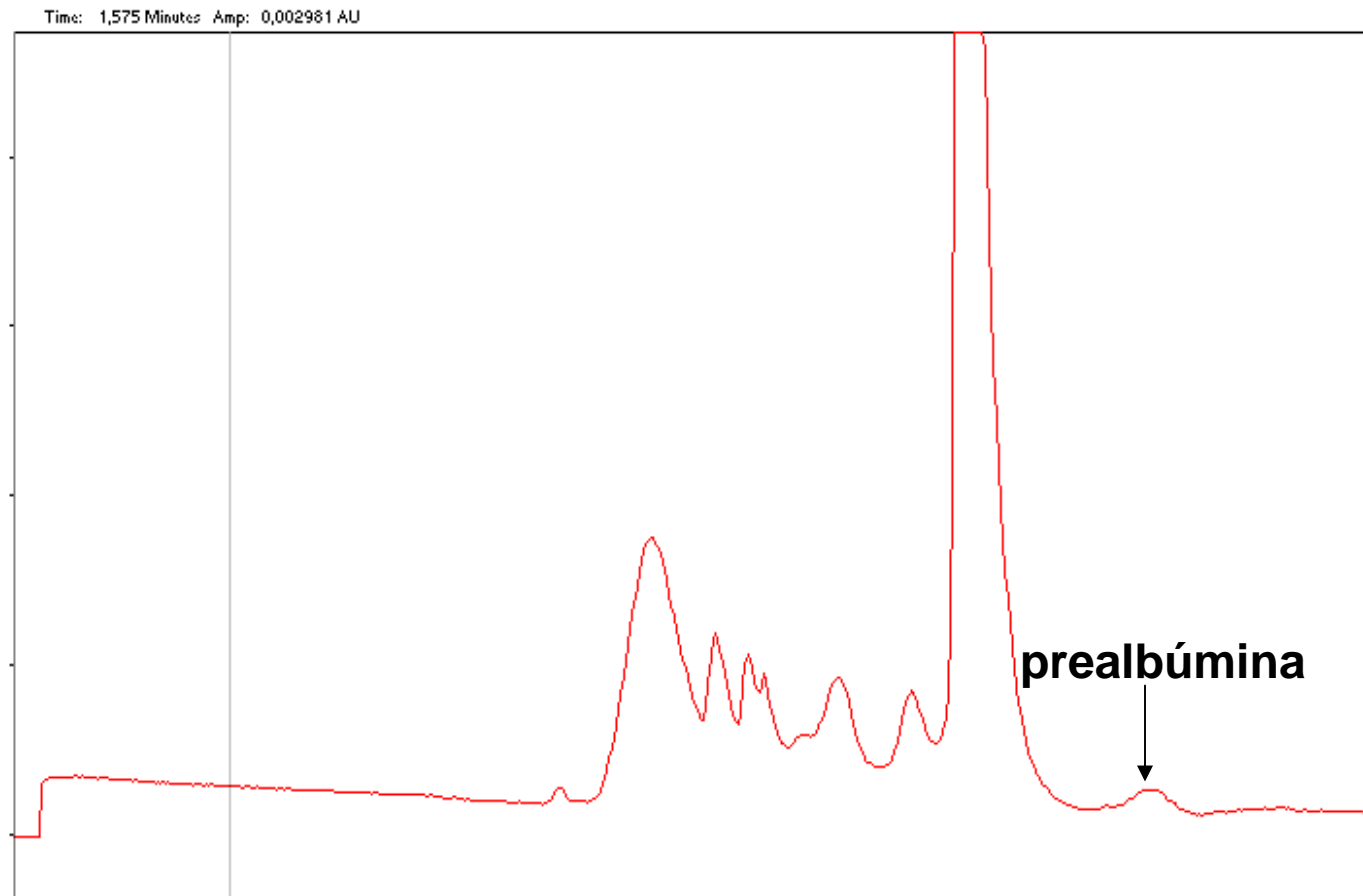


PROTEINOGRAMA DE SUERO NORMAL

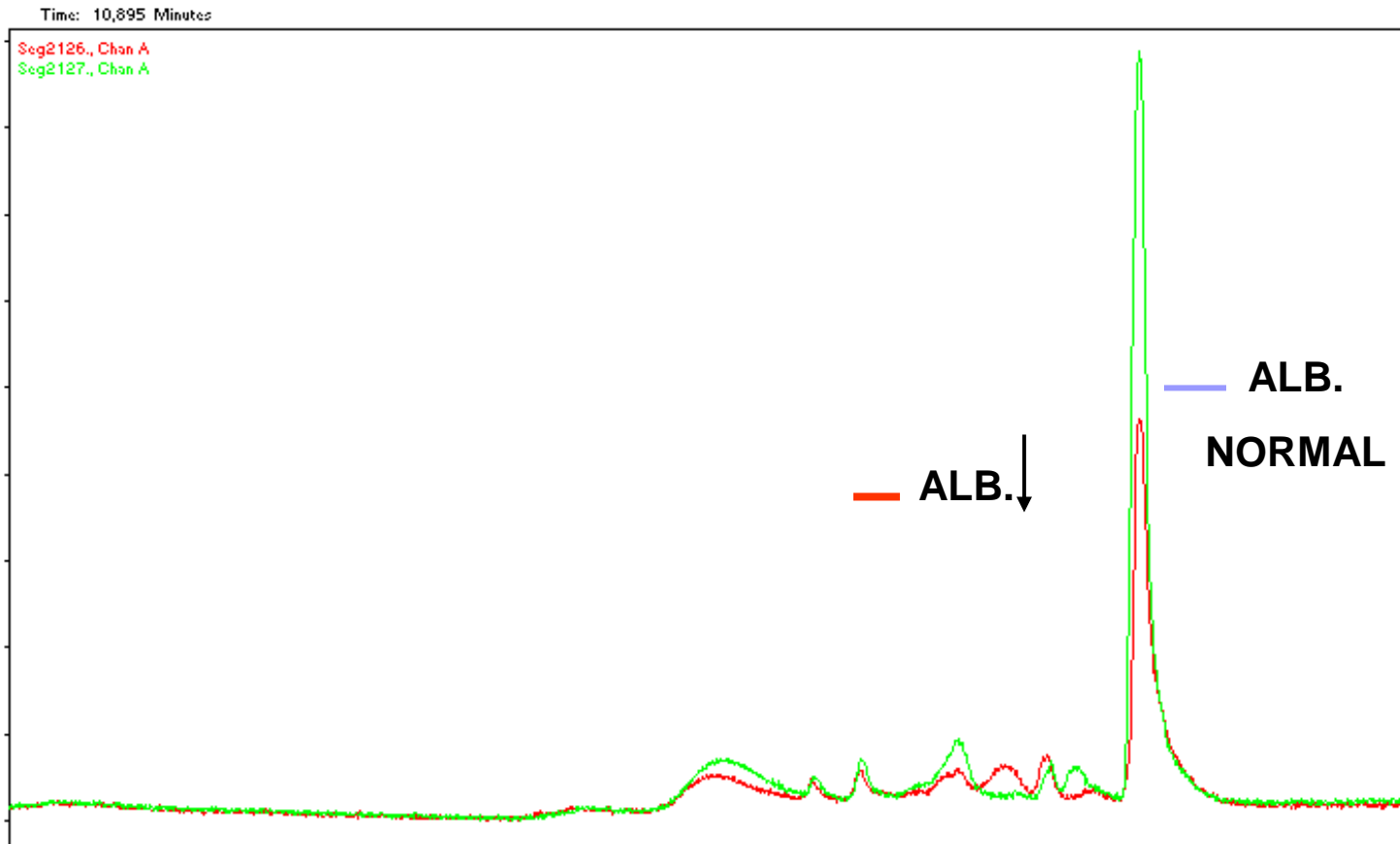




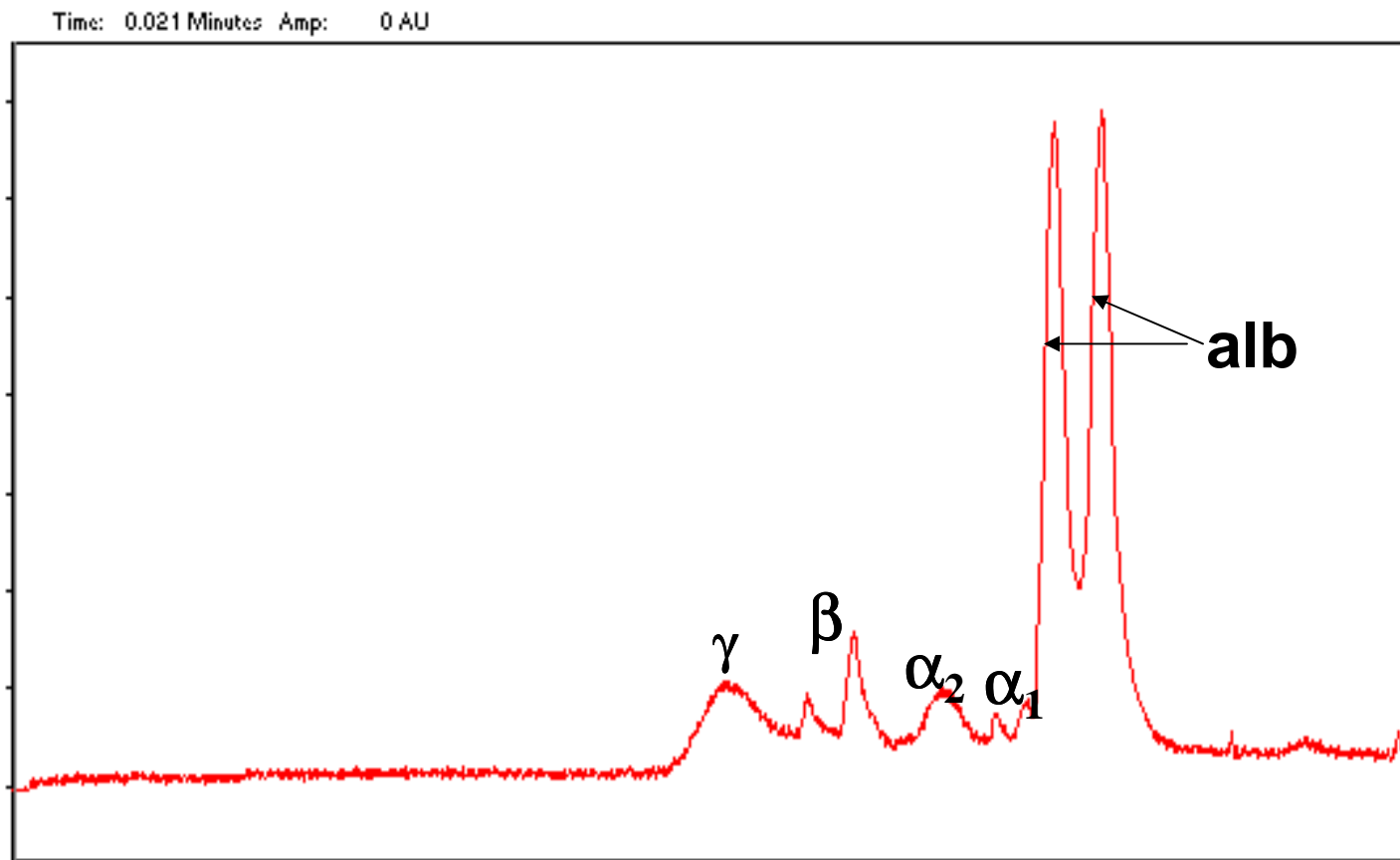
Prealbúmina



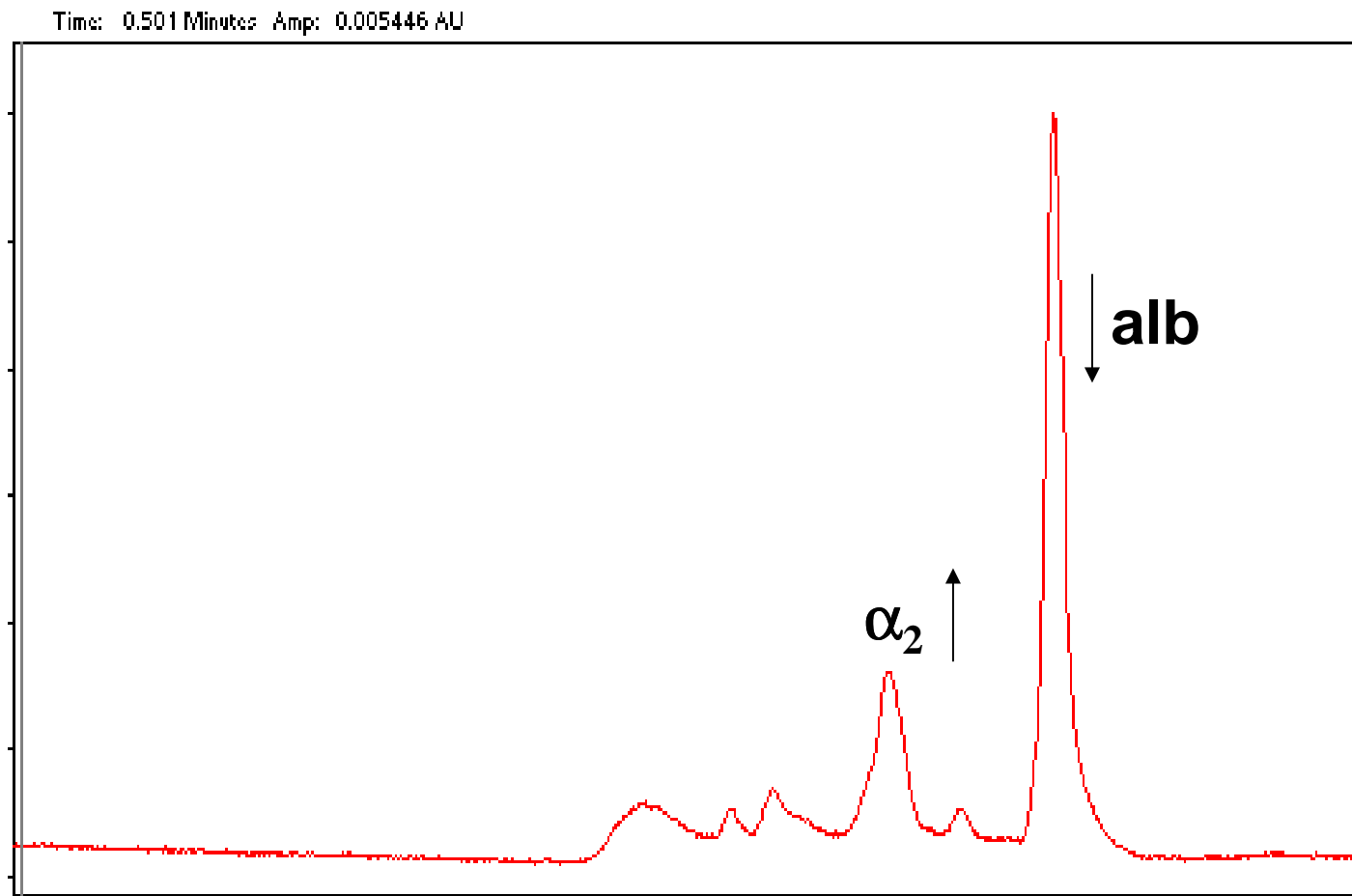
ALBUMINA BAJA: ÍNDICE DE DESNUTRICIÓN



Bisalbuminemia

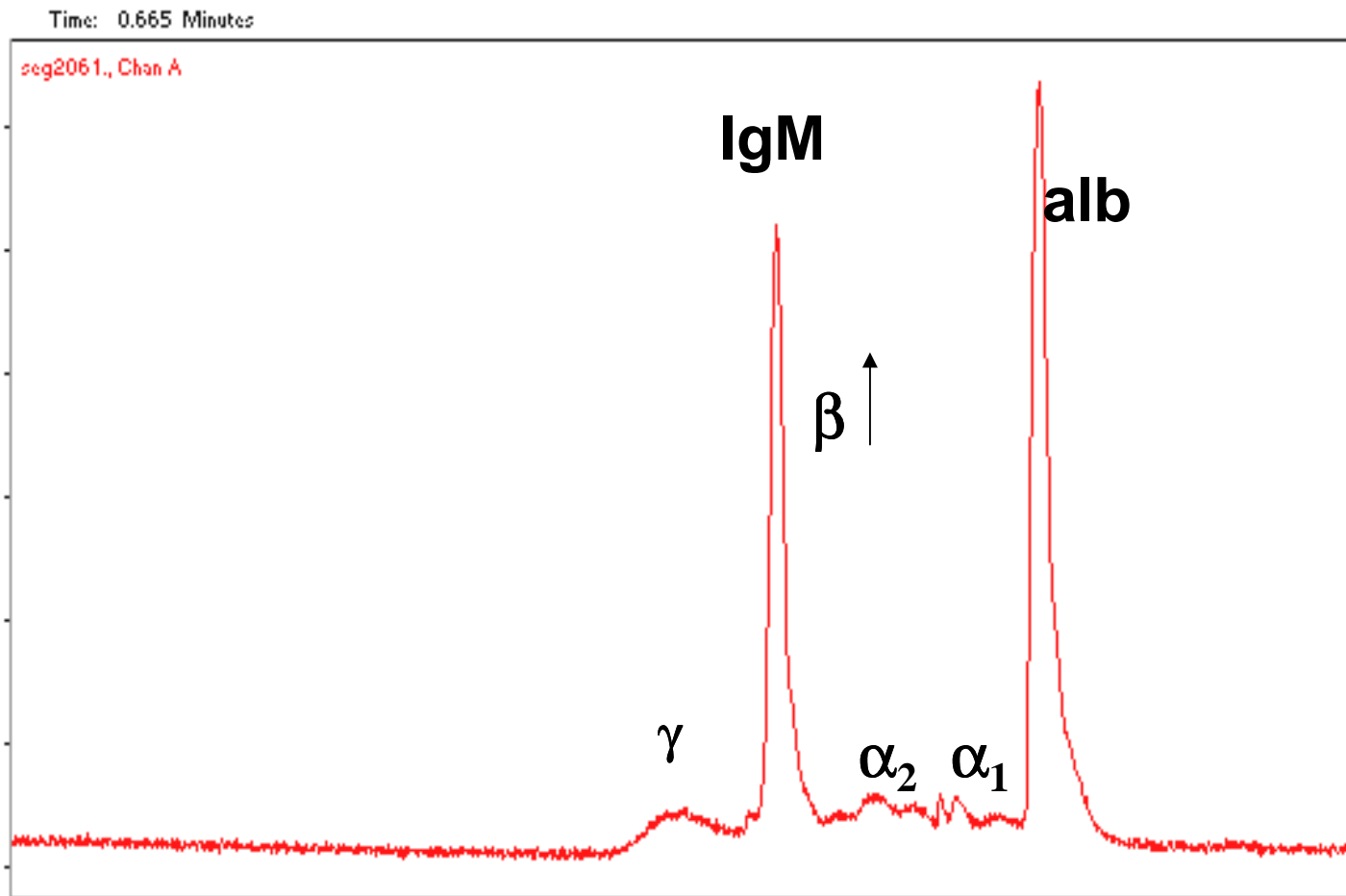


Suero con α_2

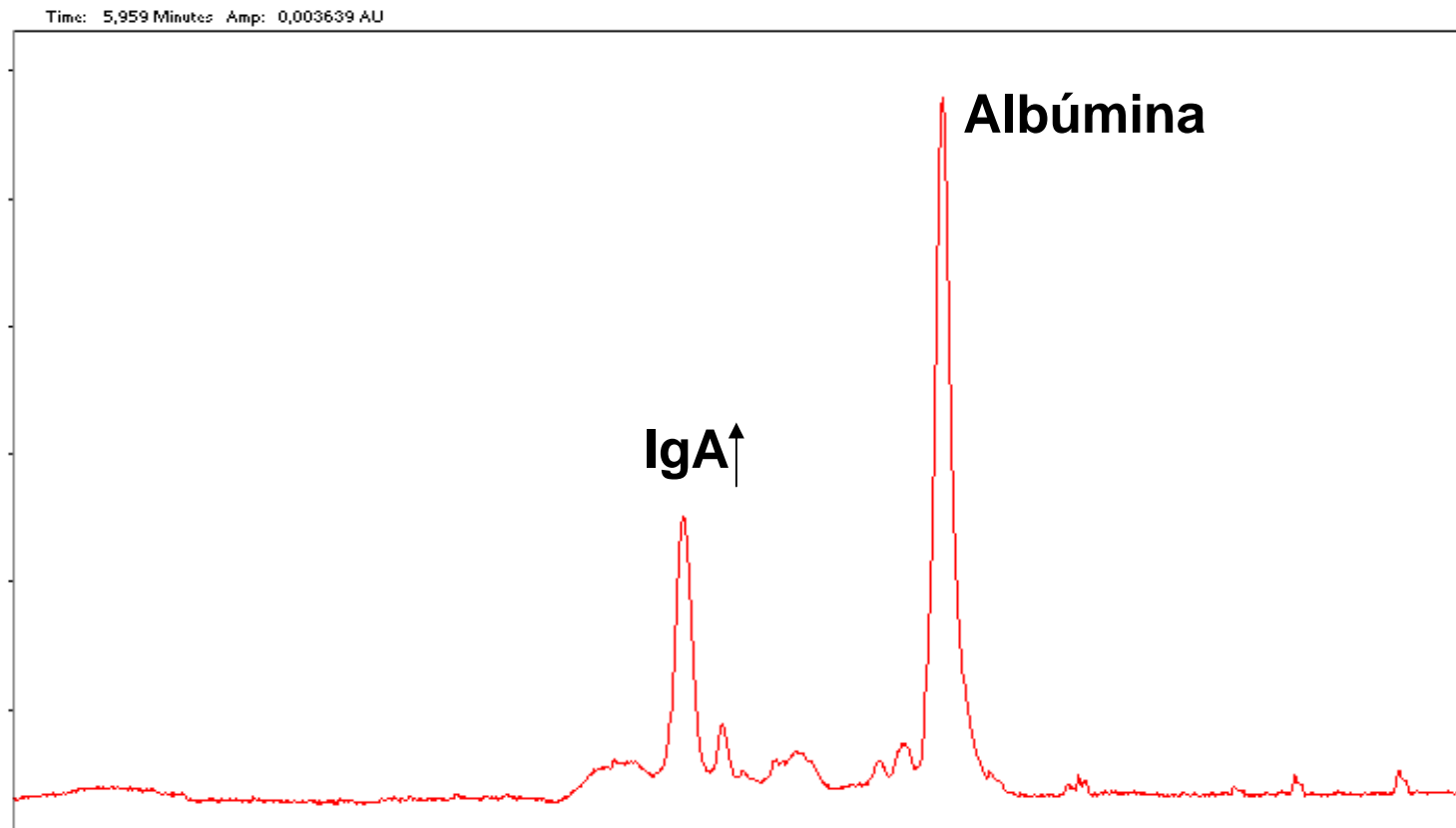


SUERO CON β

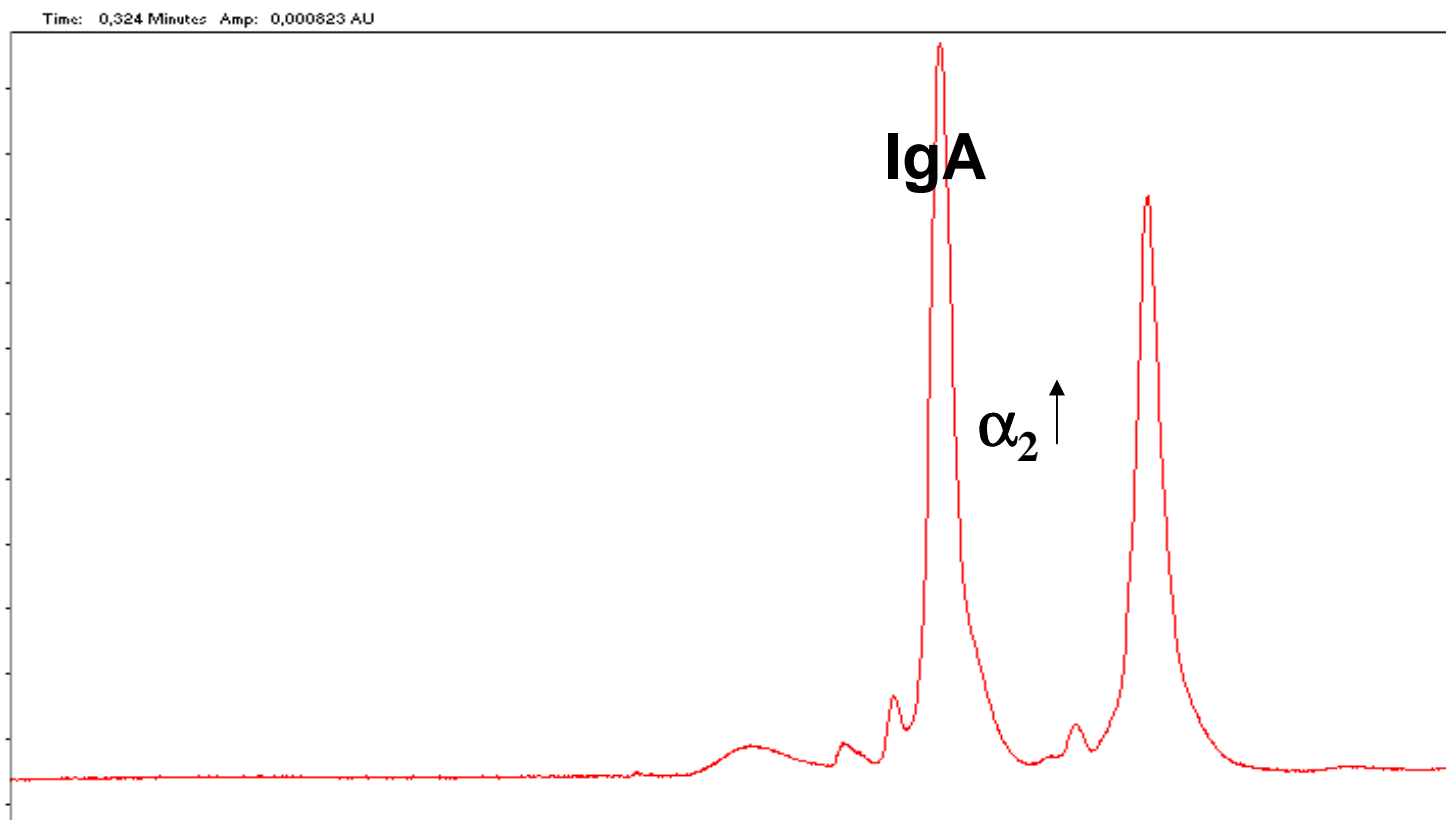
Identificada como IgM



Suero con β_2 ↑ Identificada como IgA

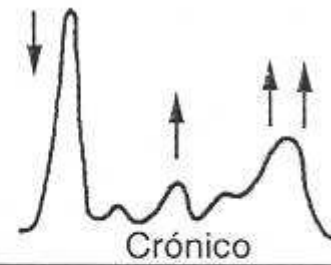
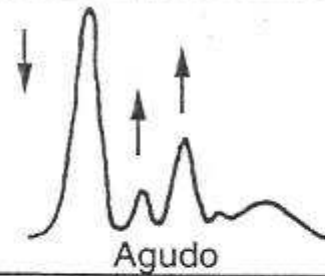


SUERO CON FRACCION α_2
Identificada como IgA

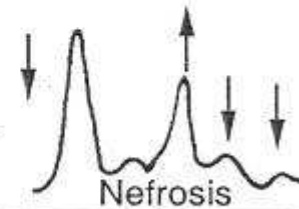
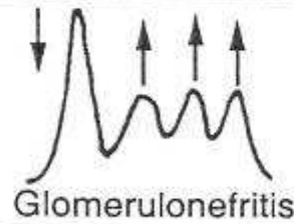


Cuadros Disproteínémicos

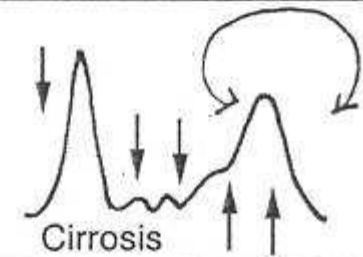
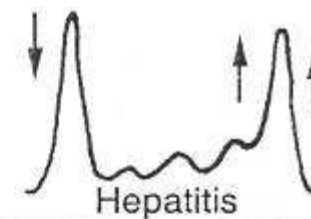
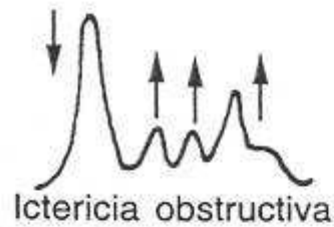
Procesos inflamatorios



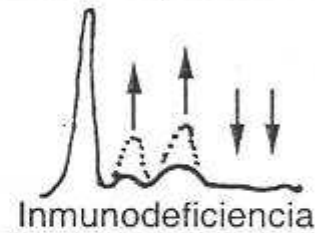
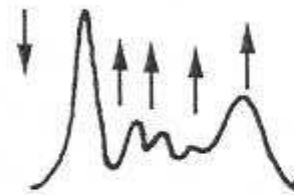
Procesos renales



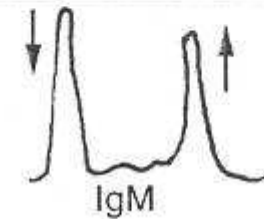
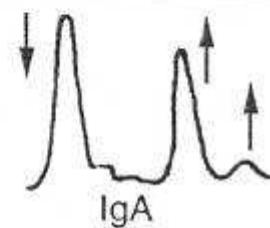
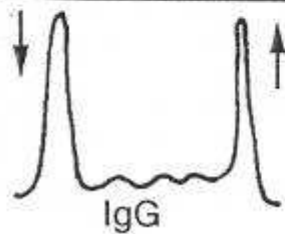
Procesos hepáticos

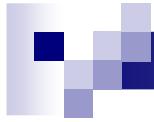


Procesos tumorales



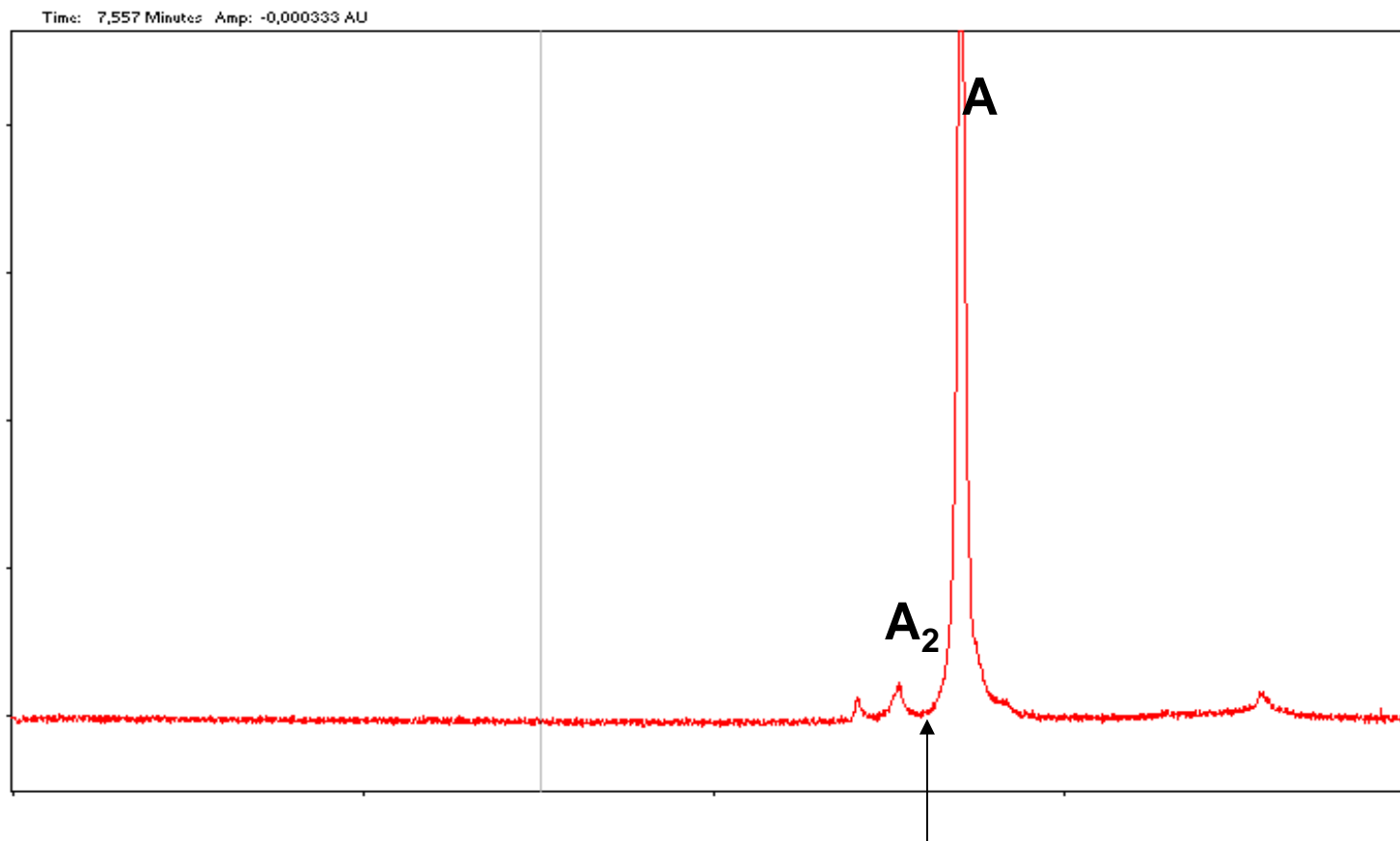
Gammapatías Monoclonales





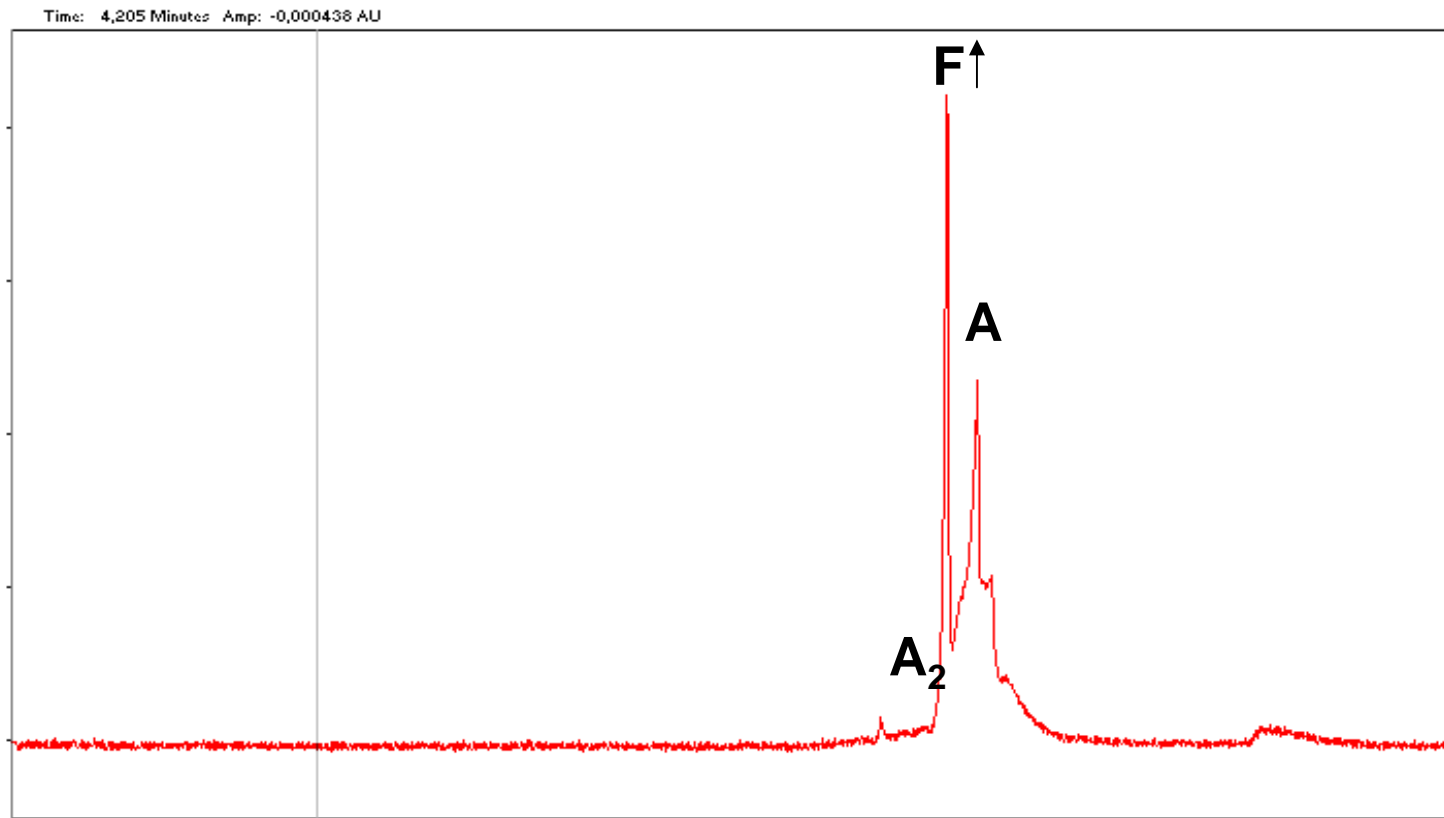
Hemoglobinas

Hemoglobina normal

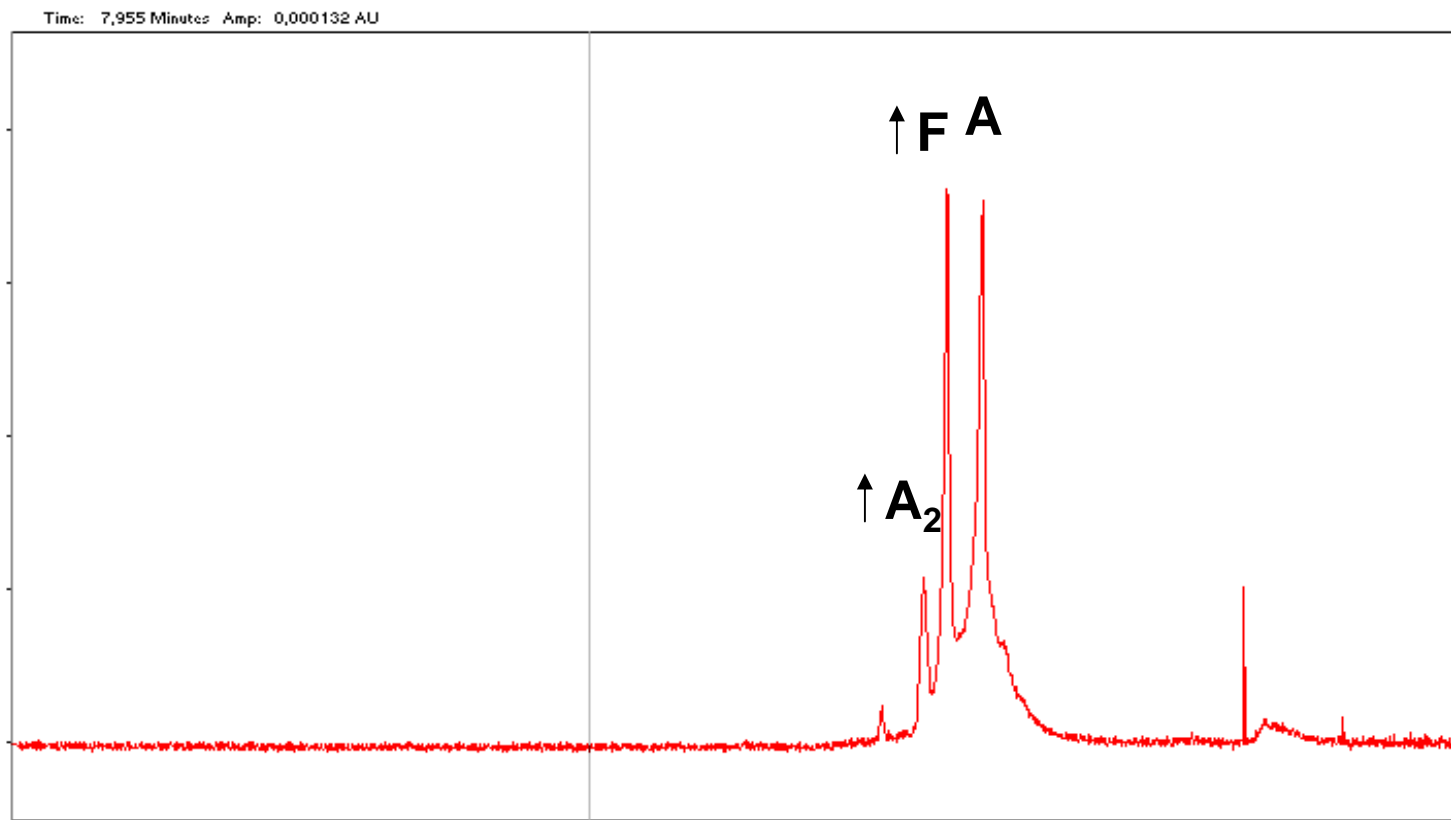


Hg F no detectable

Hemoglobina F



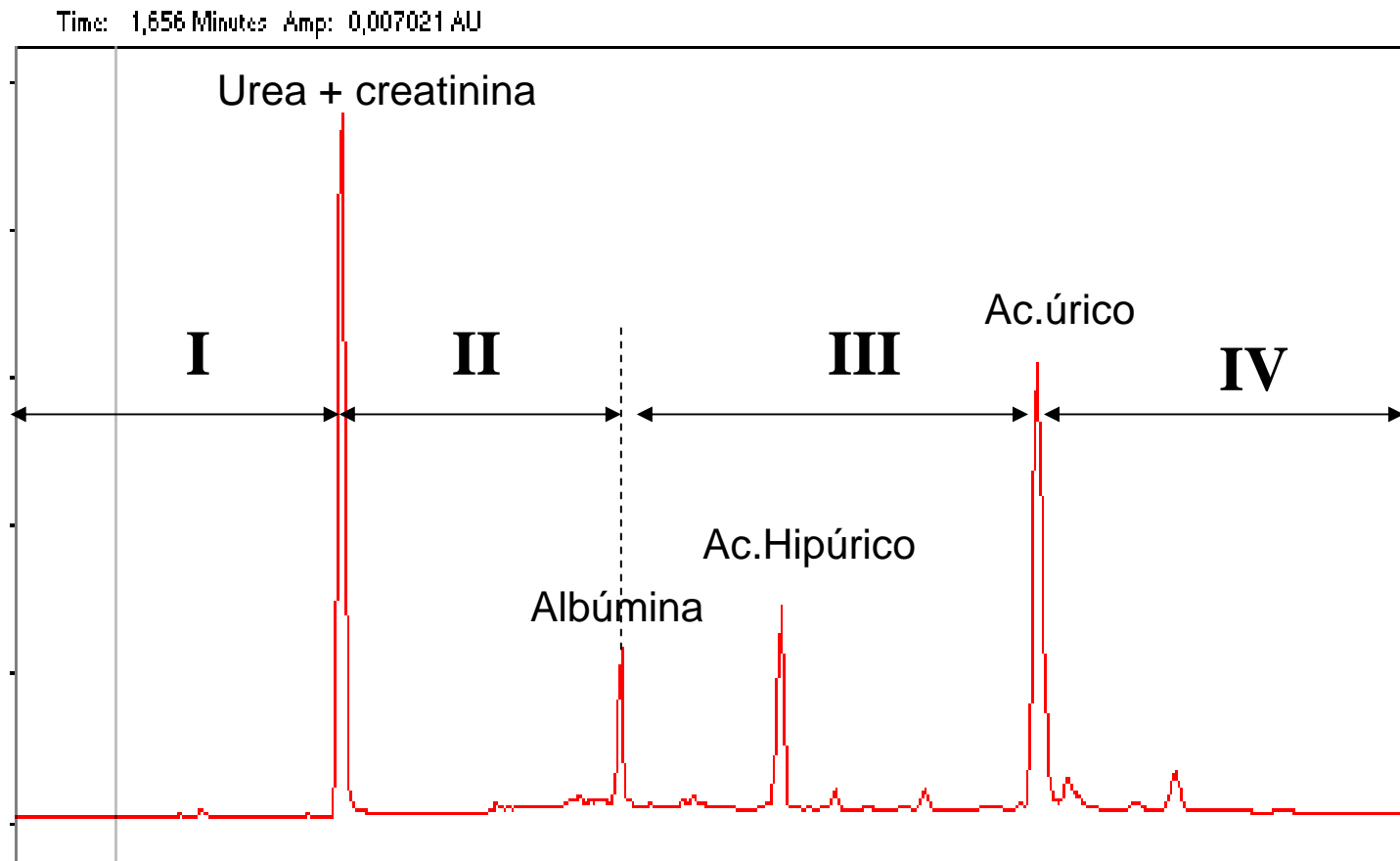
Hemoglobina A_2 + F \uparrow \uparrow



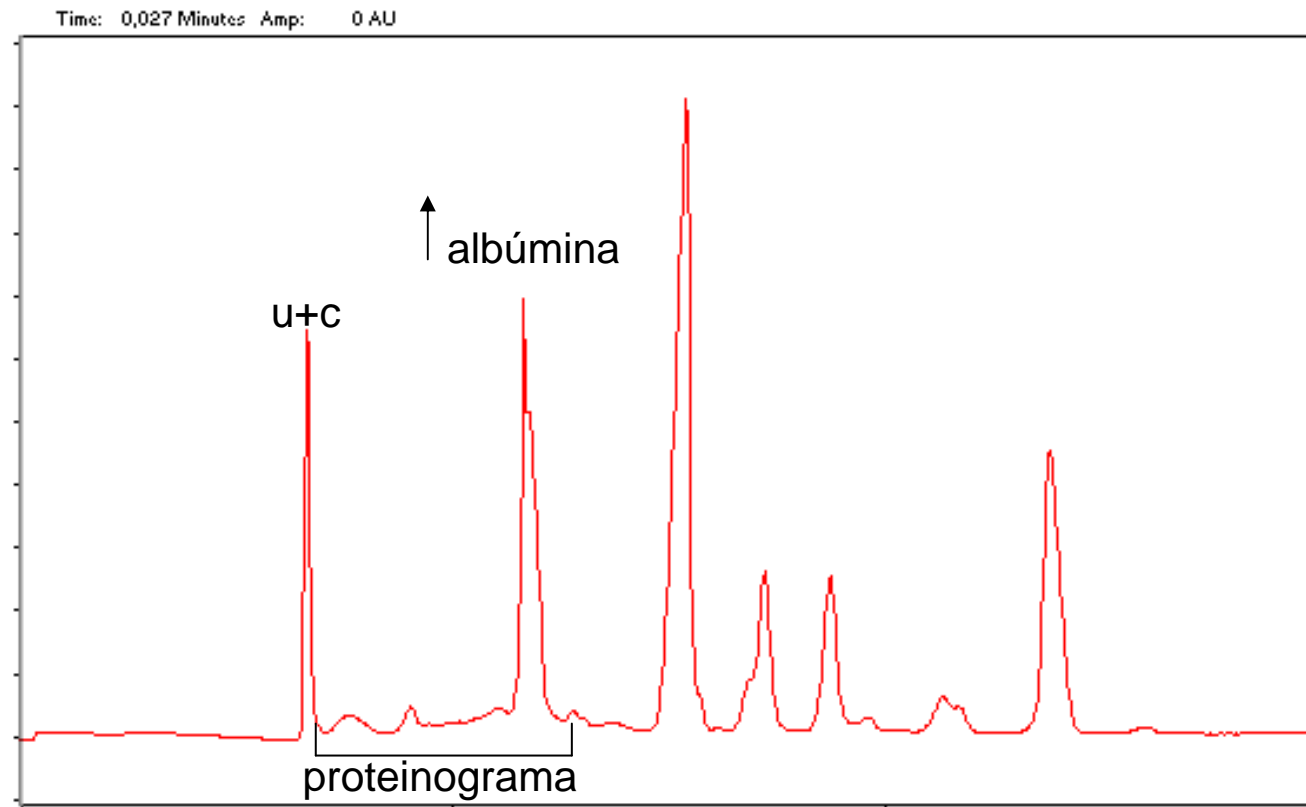


Electroforegrama Urinario

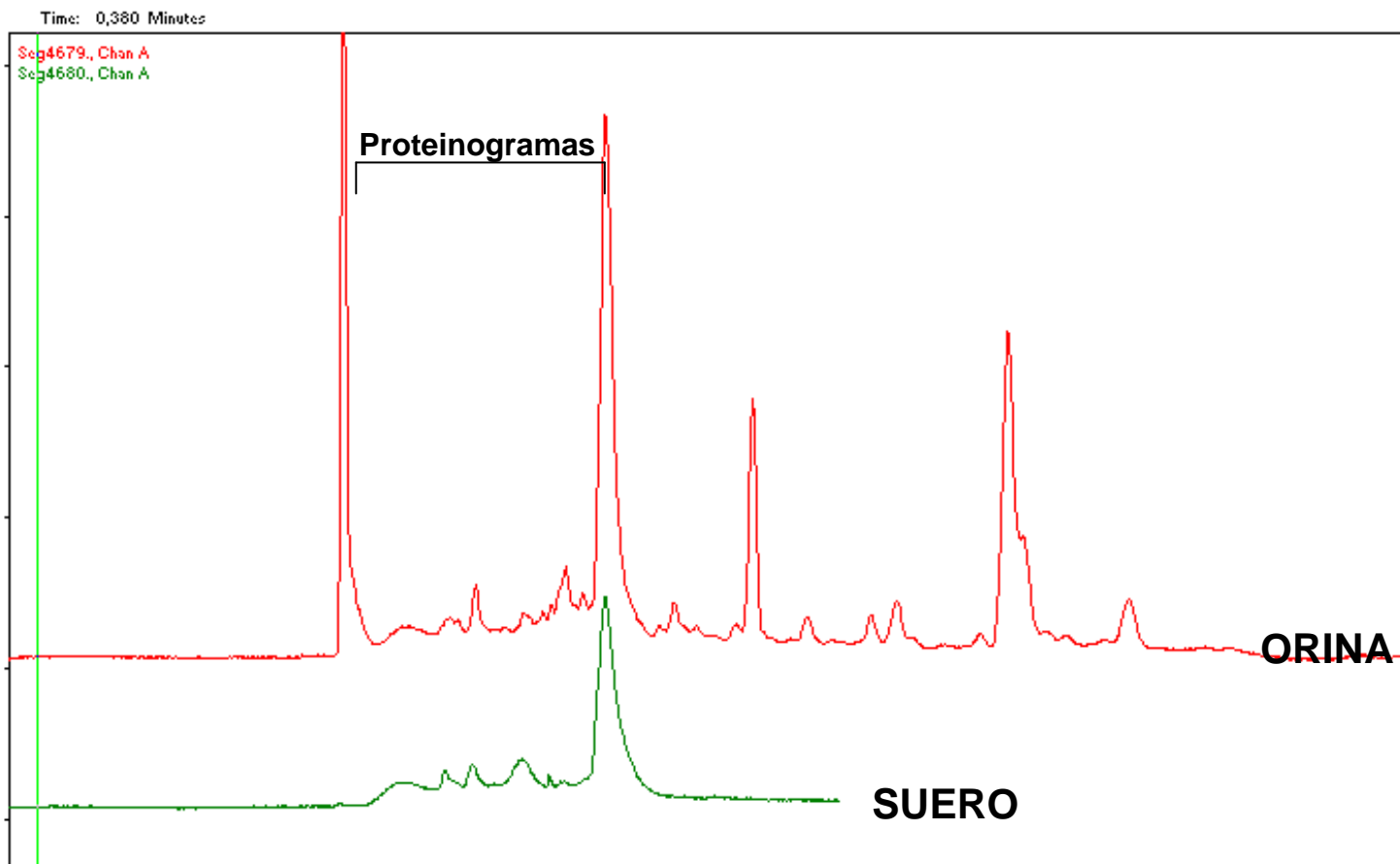
Orina normal



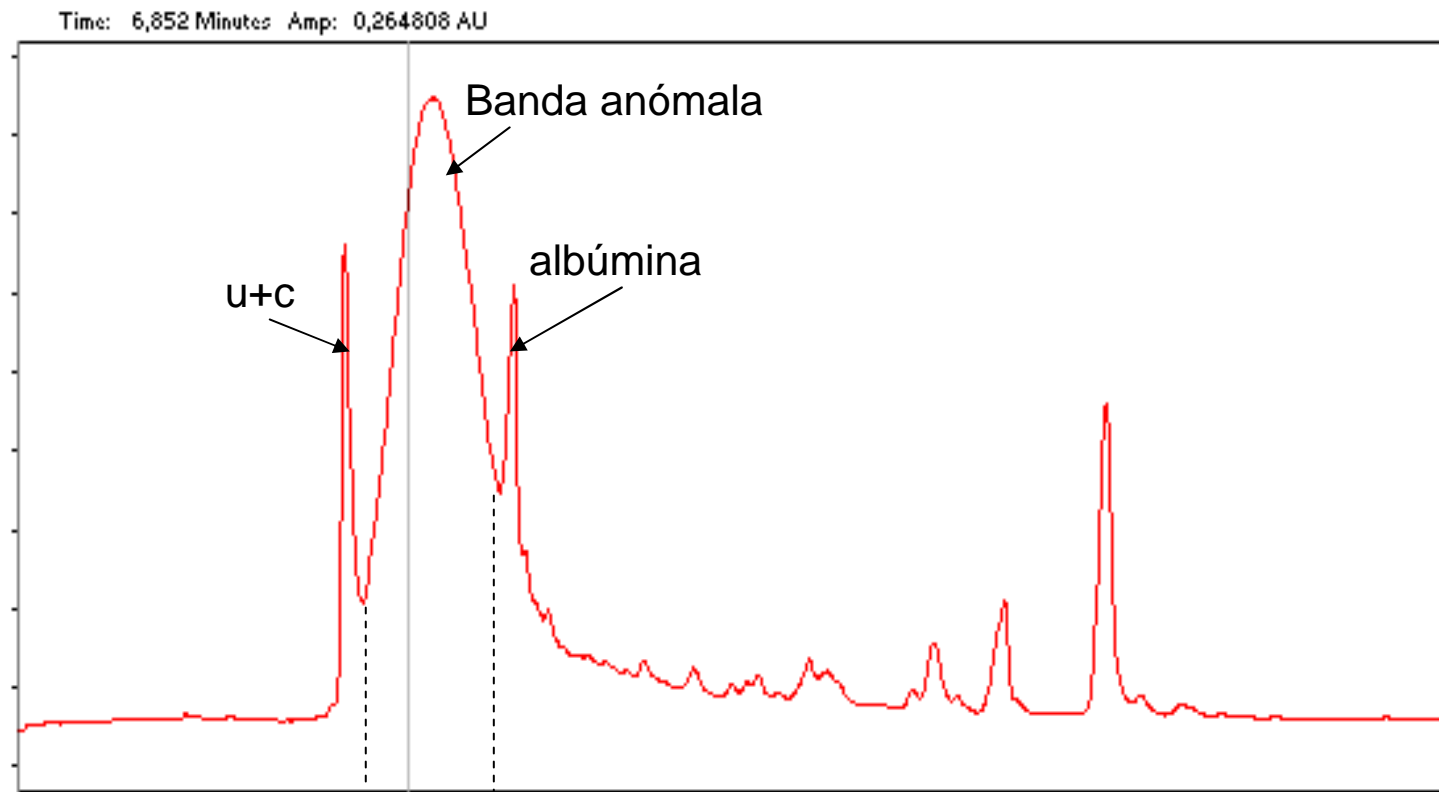
ECU con proteinuria



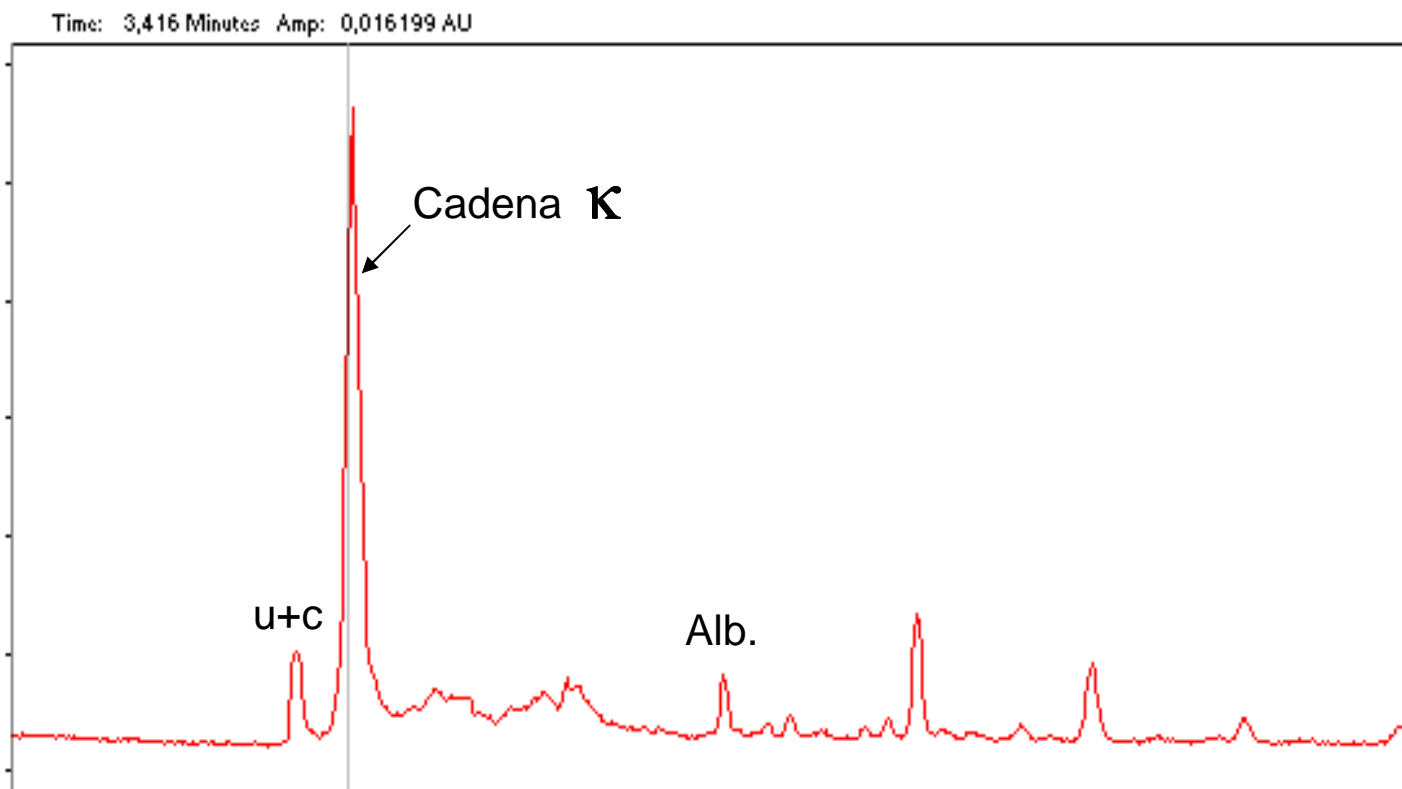
ORINA CON PROTEINURIA PACIENTE EN DIALISIS



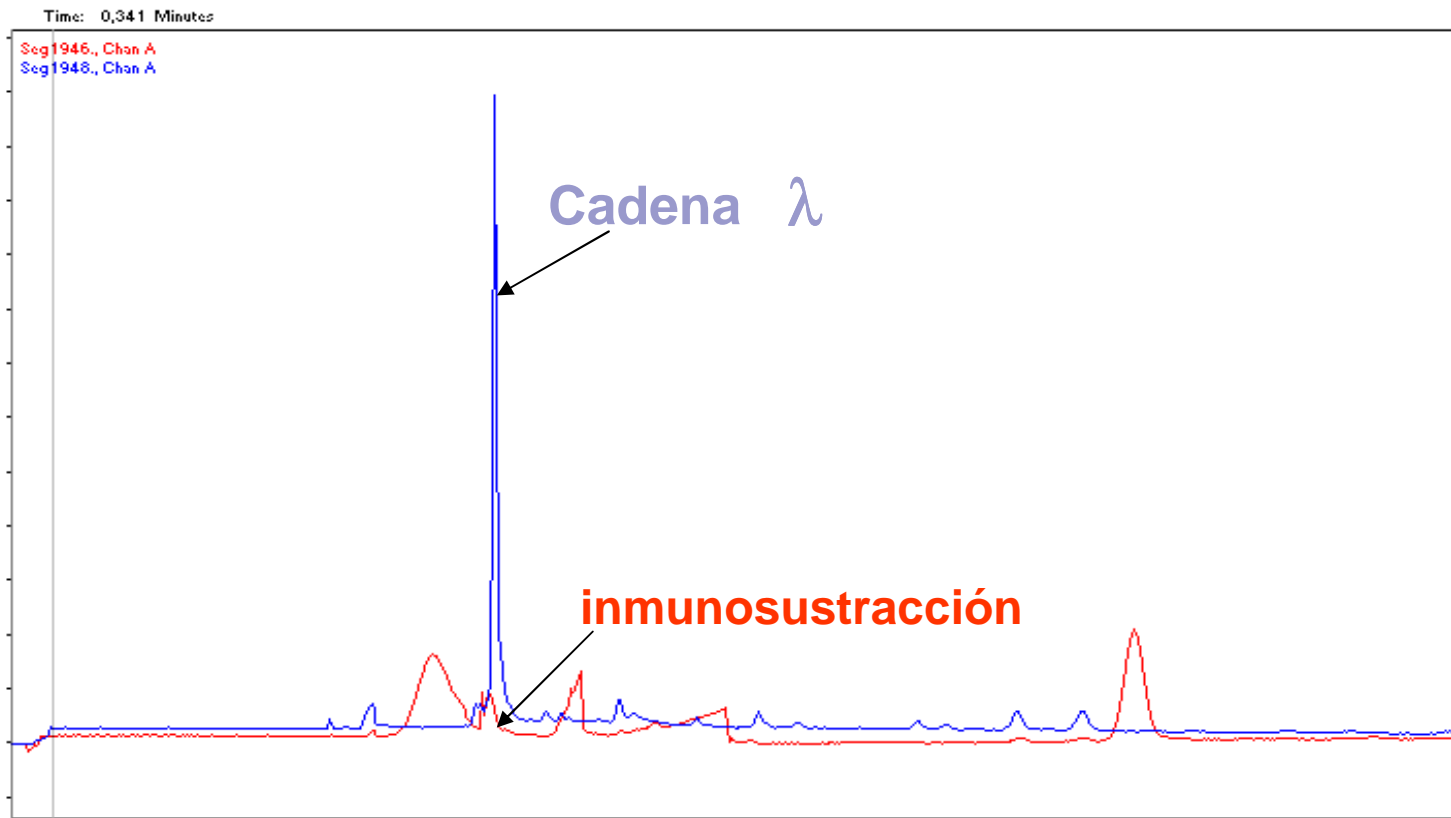
Presencia de banda anómala en zona II de ECU en paciente post-quirúrgico



Proteína de Bence-Jones (cadena κ)



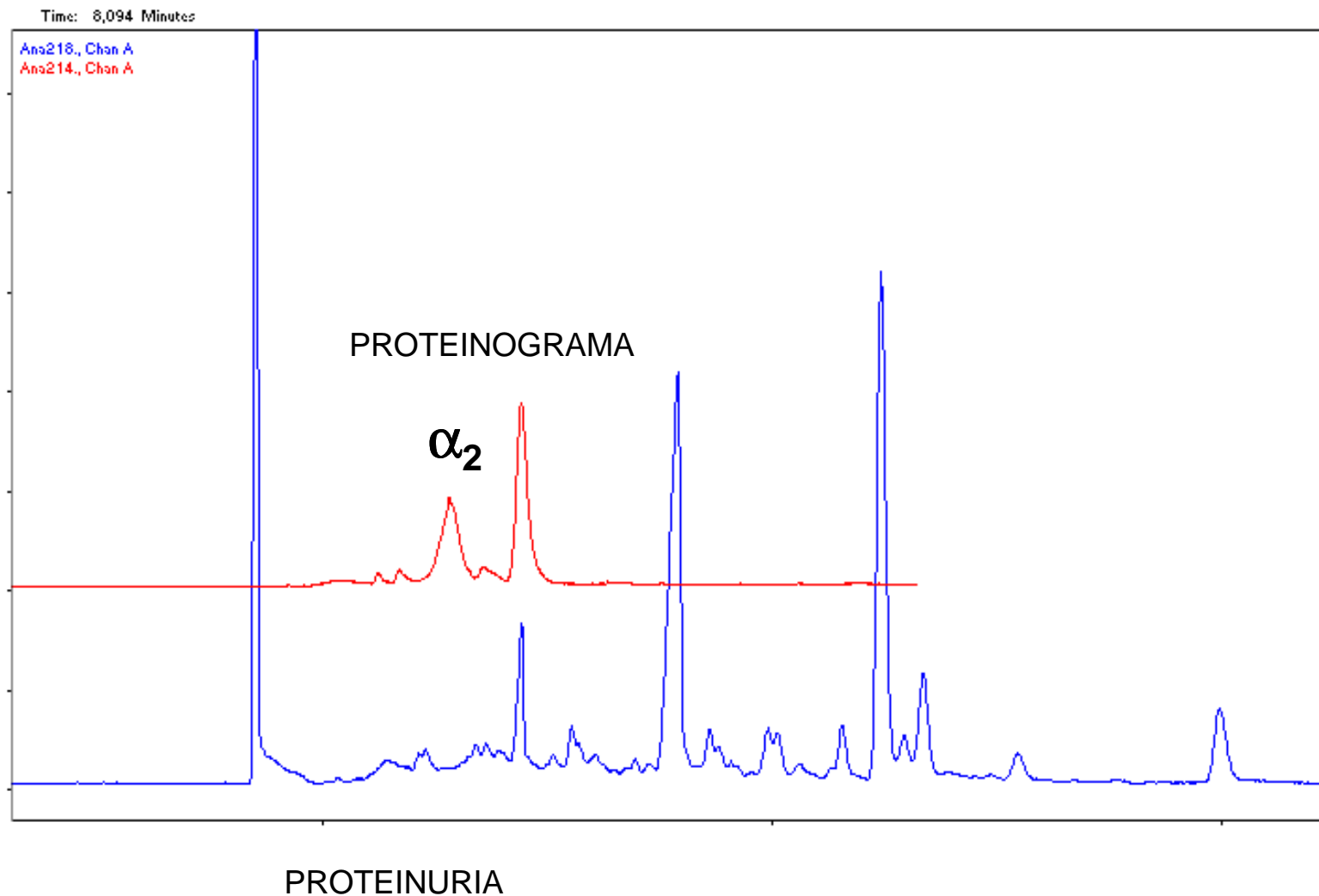
Proteína de Bence-Jones (cadena anómala λ confirmada por inmunosustracción)



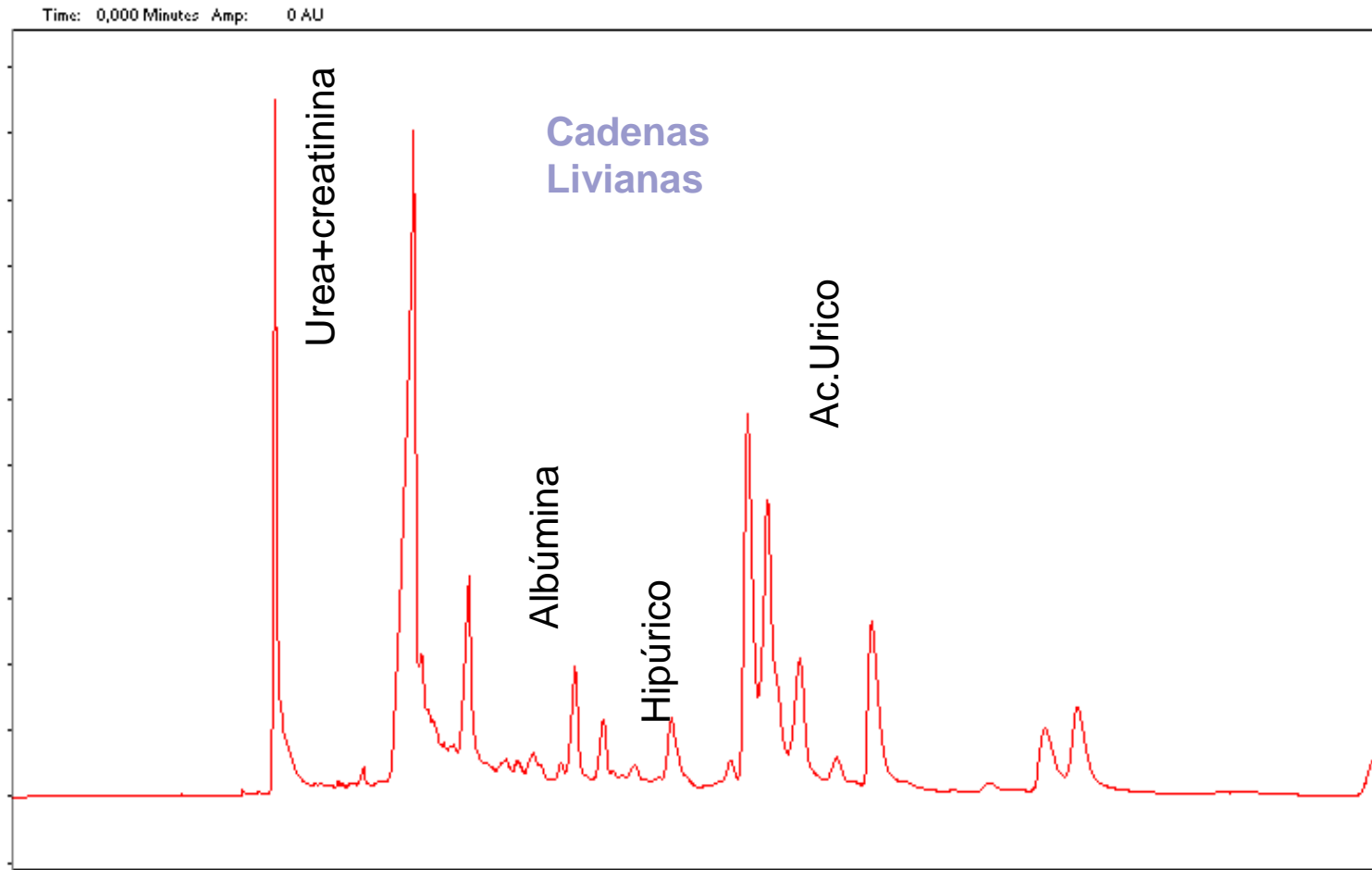
Paciente con MIELOMA MULTIPLE

Suero con fracción α_2 de 37% Identificada como IgA

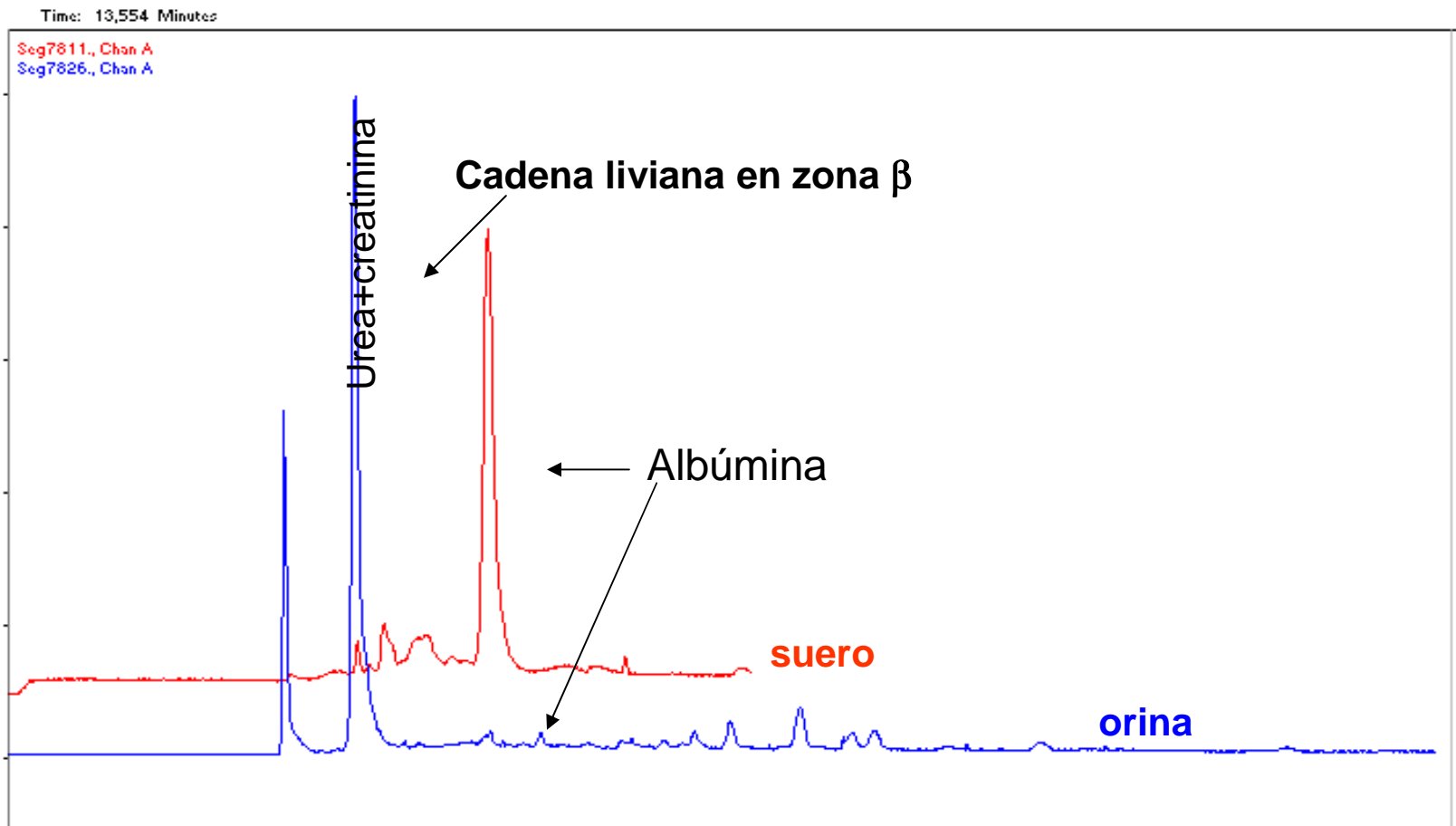
Orina con elevada proteinuria 39,7 mg/dl



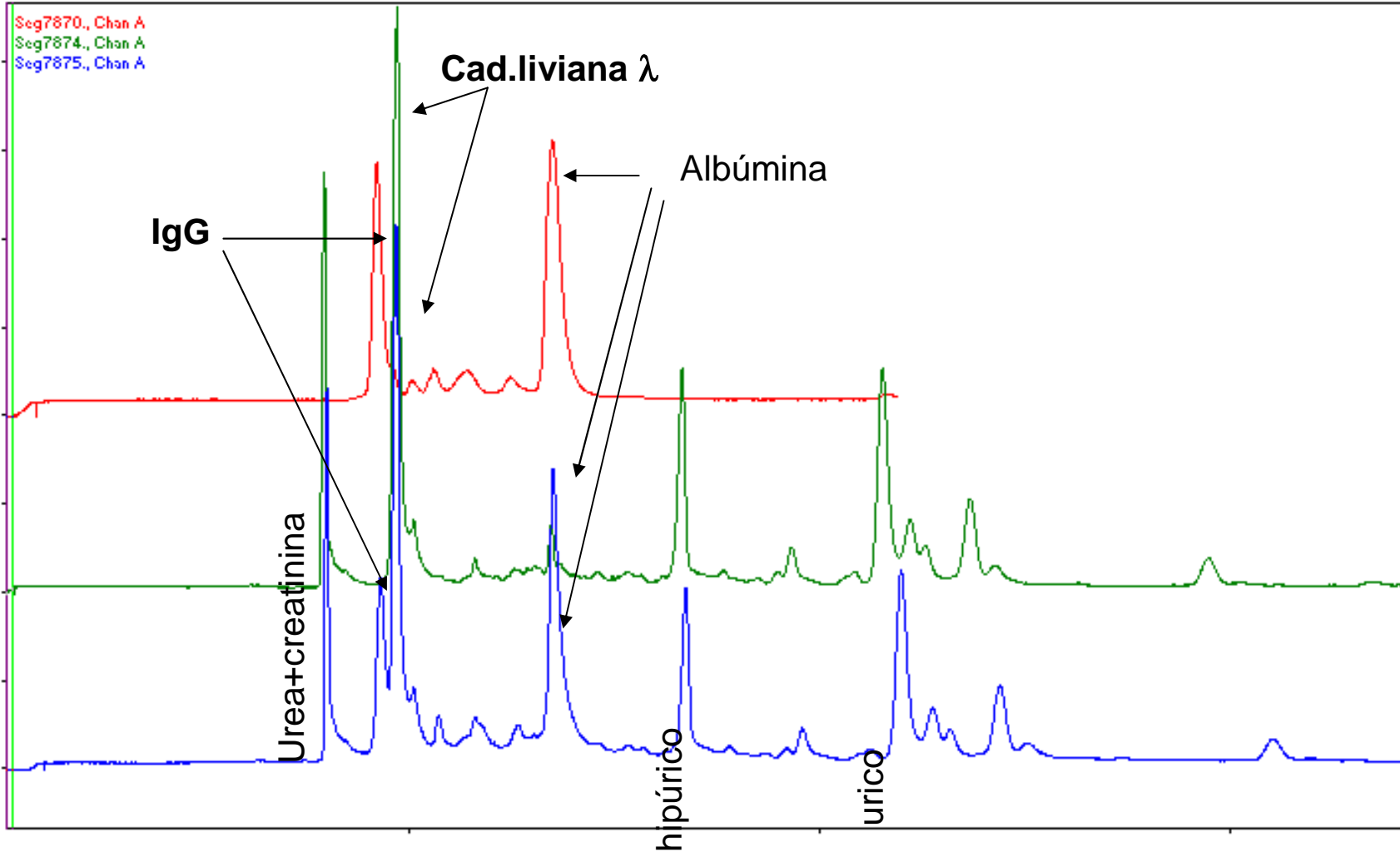
Cadenas Livianas de Bence-Jones en Orina



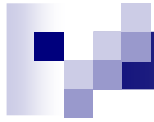
Por Inmuno fijación presenta banda en zona β



Time: 0,079 Minutes

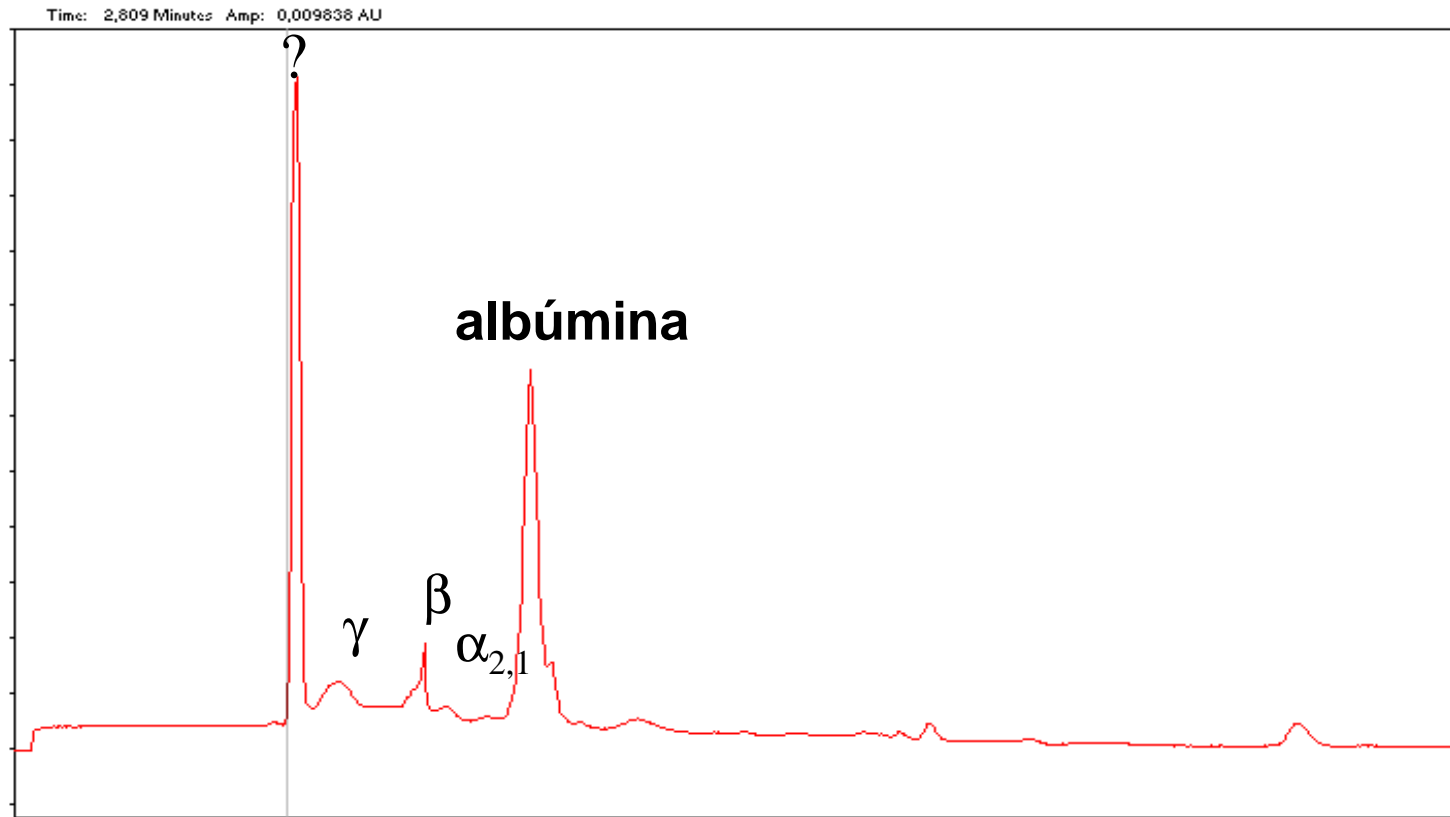


- proteinograma del suero
- proteinograma de la orina
- proteinograma de suero+orina

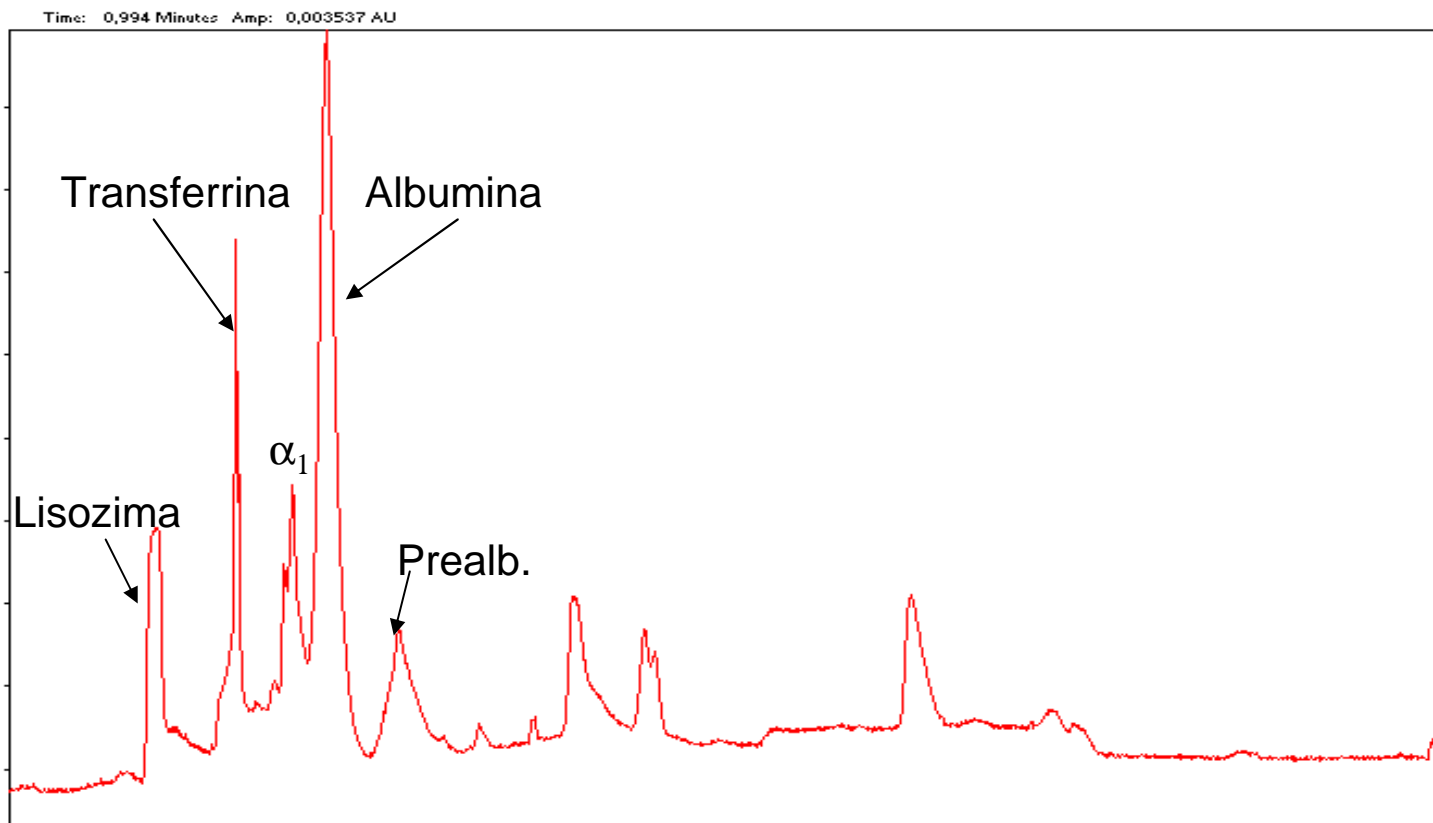


Líquido de punción Cefalo-Raquídeo

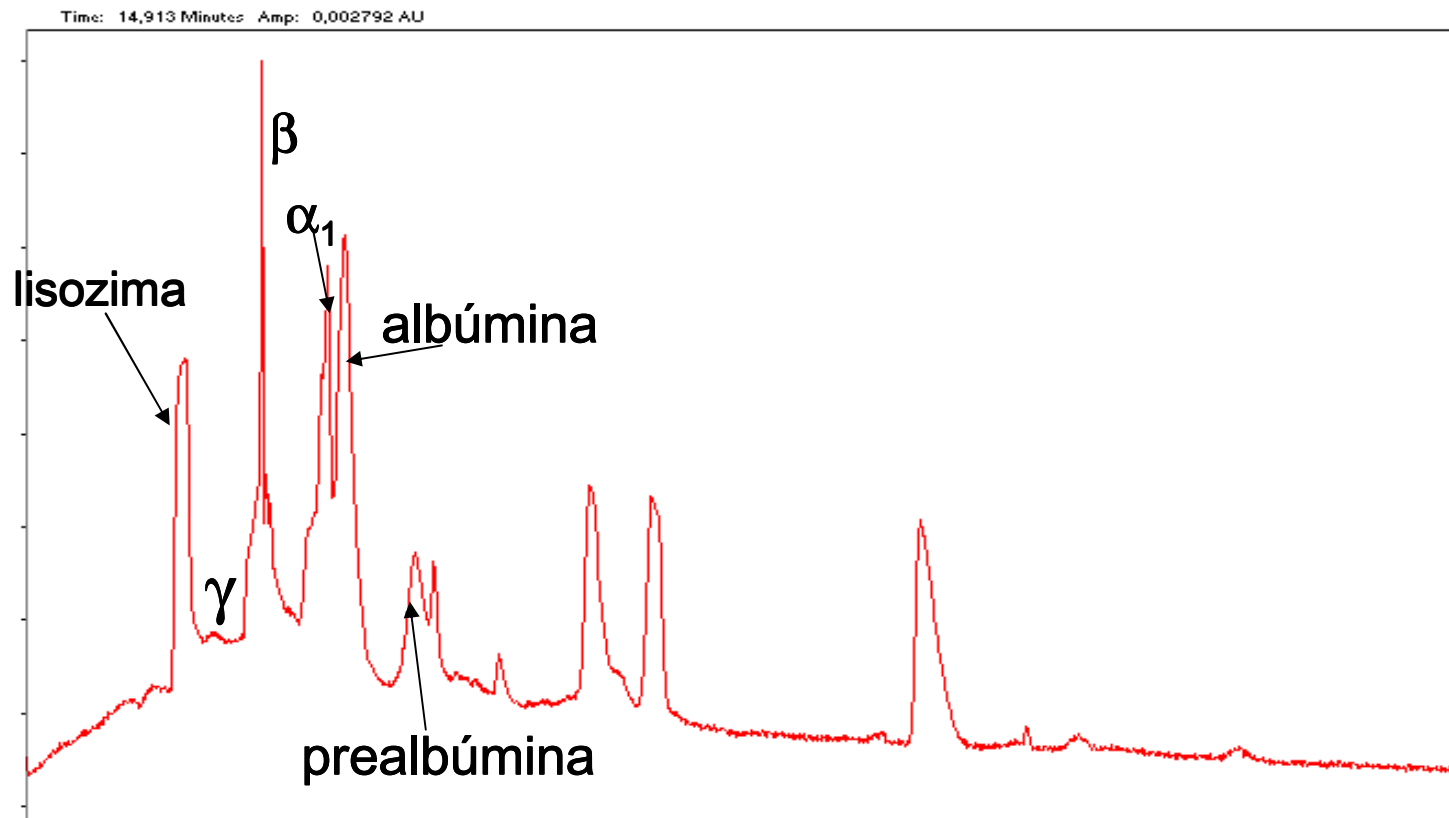
Líquido de punción céfalo -raquídeo



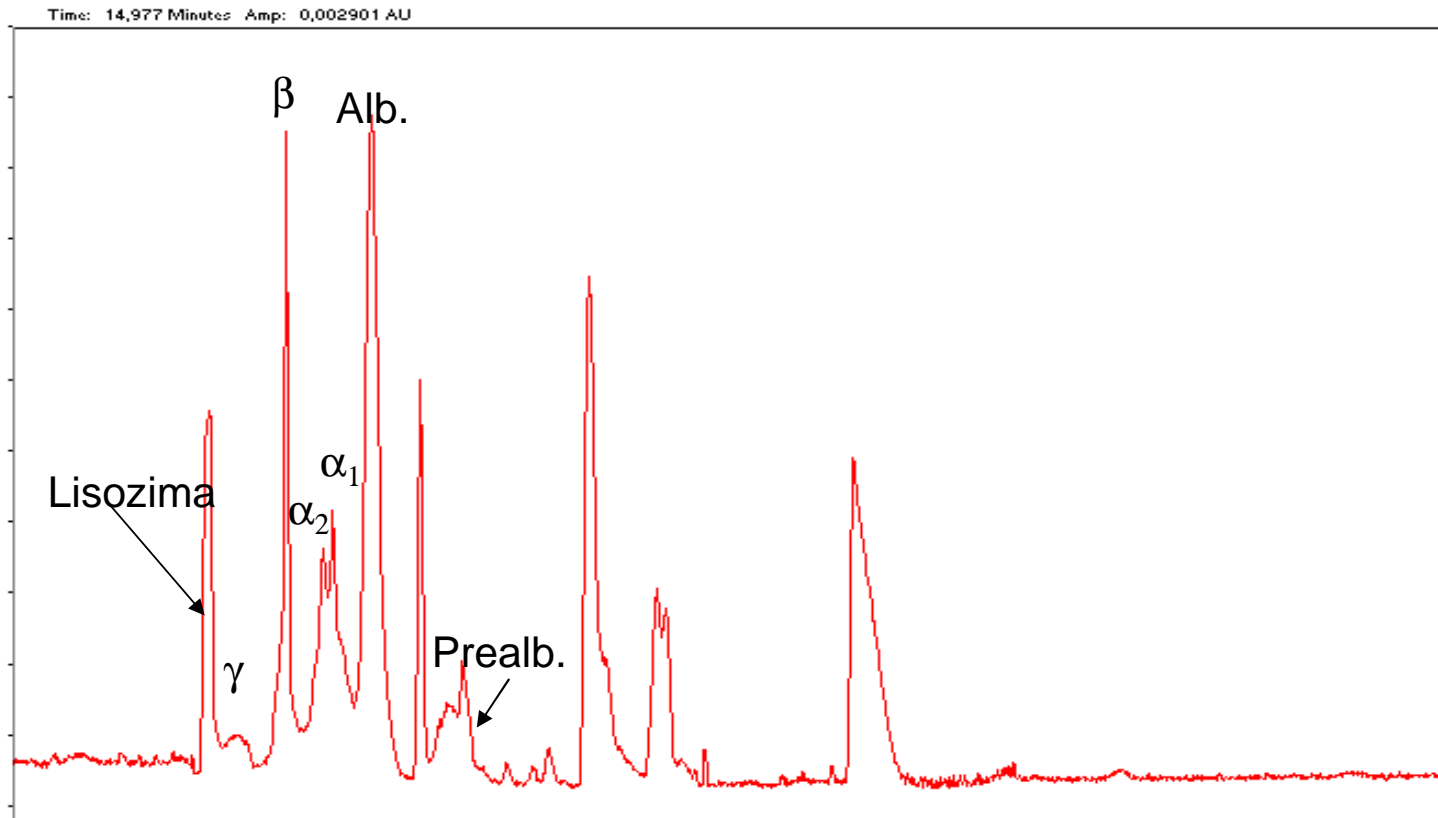
L.C.R. con parámetros normales proteínas 20 mg/dl



L.C.R. con parámetros normales proteínas < 10 mg/dl

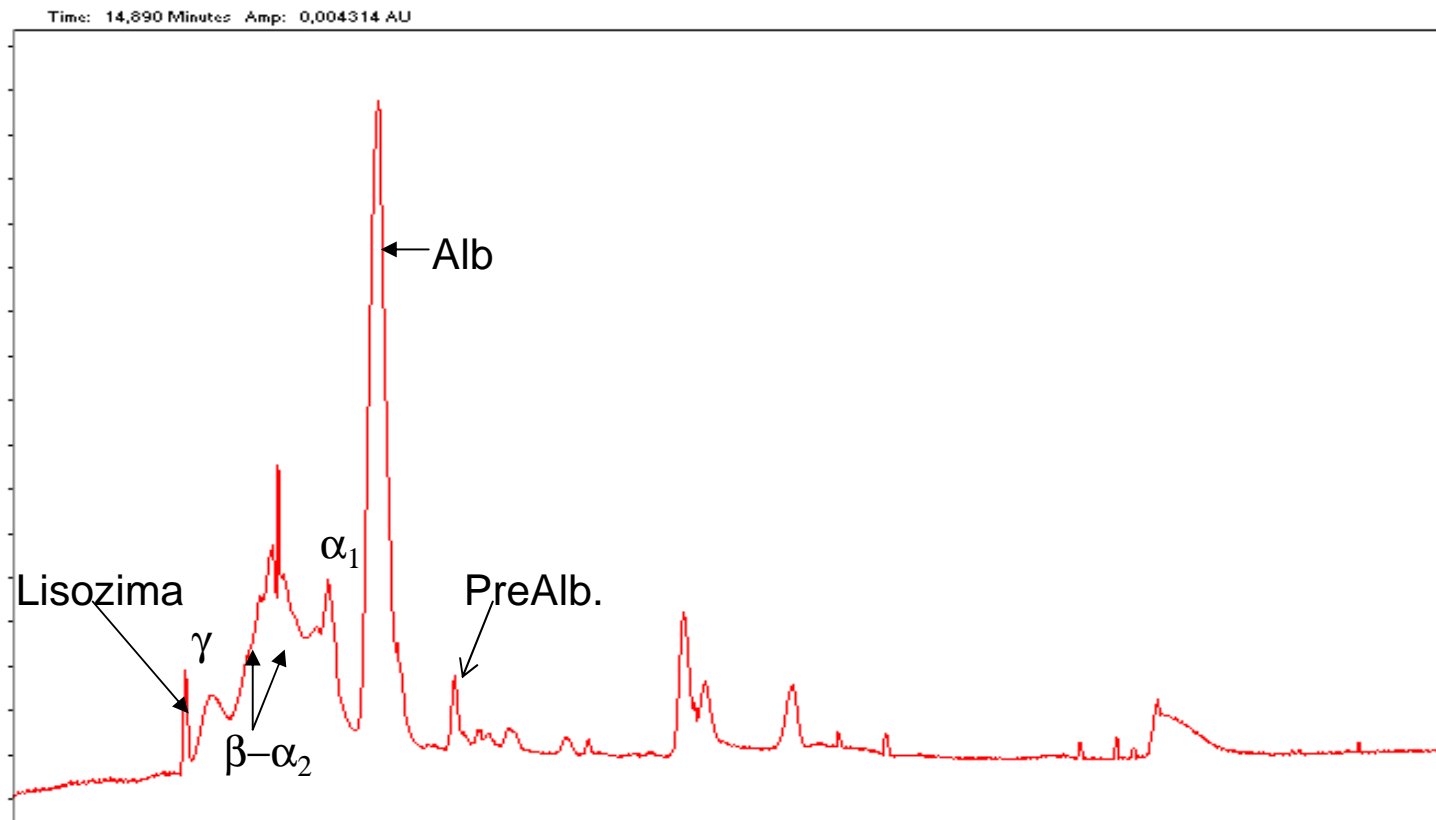


L.C.R. muestra normal B
con parámetro alterado
proteínas:21.3 mg/dl

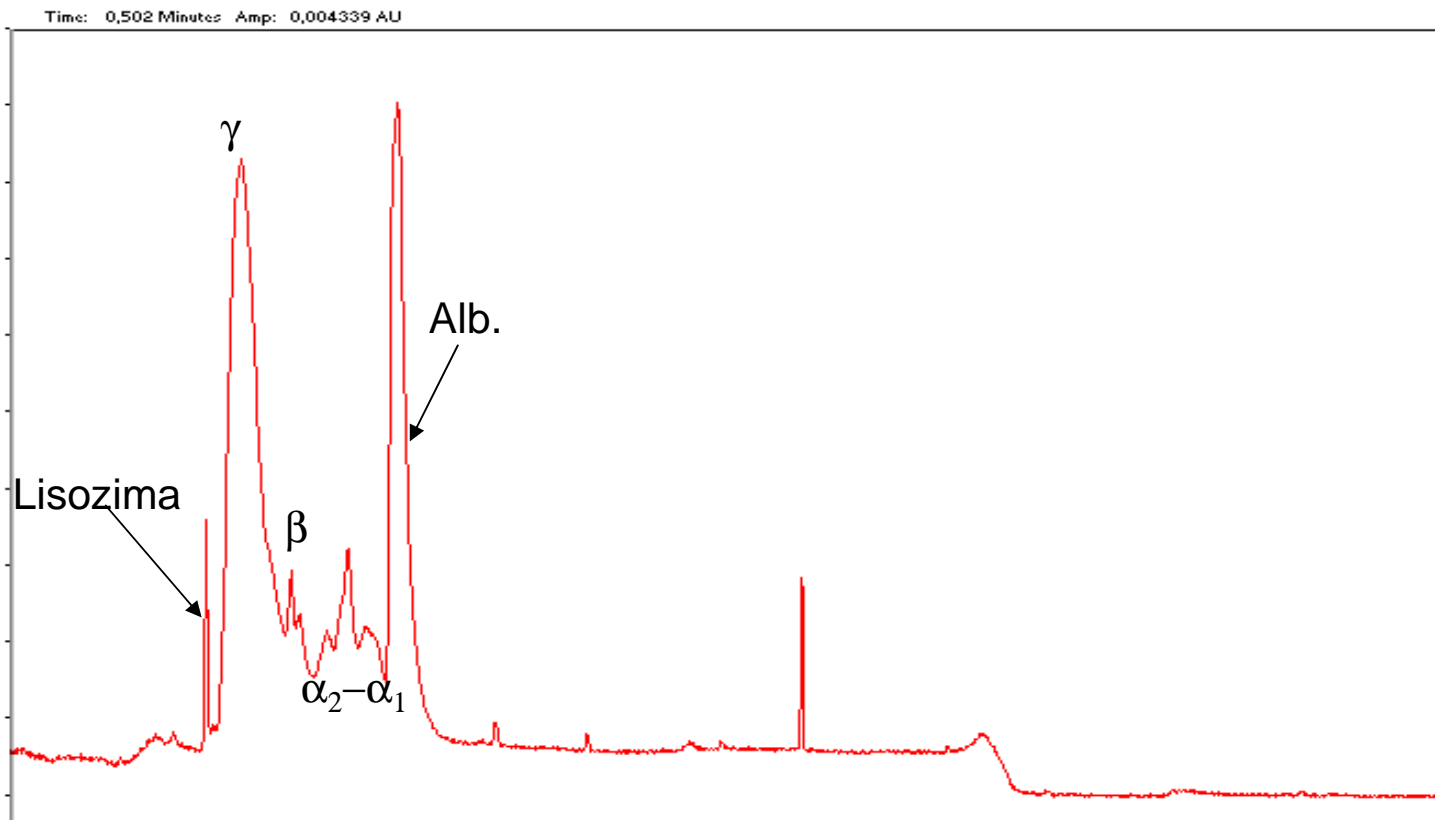


L.C.R. Muestra Patológica-Infección Bacteriana

proteínas Totales 230 mg/dl

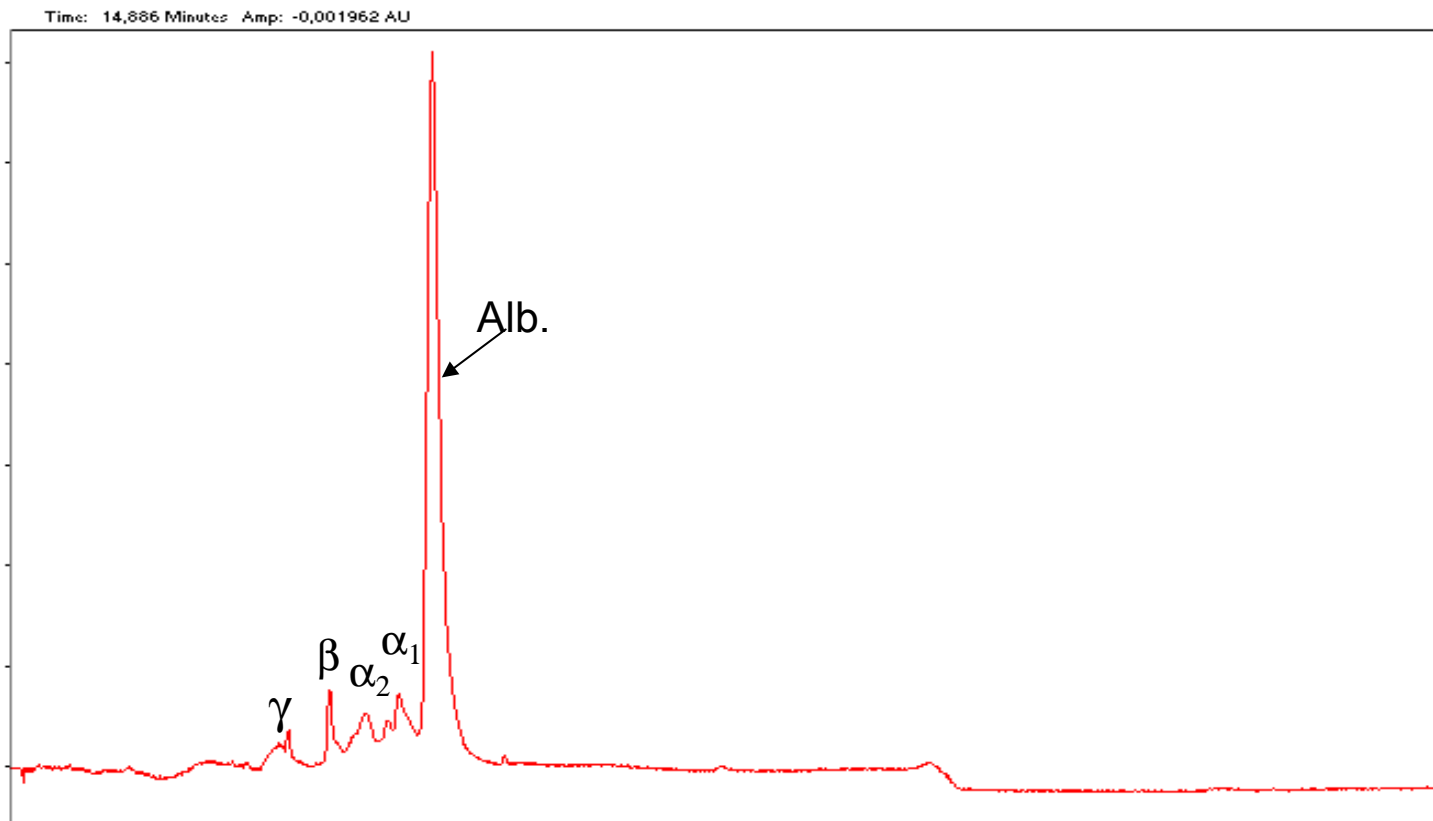


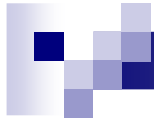
L.C.R. Proteínas 6800 mg/dl (Absceso)



LCR Proteínas: 3850 mg/ml

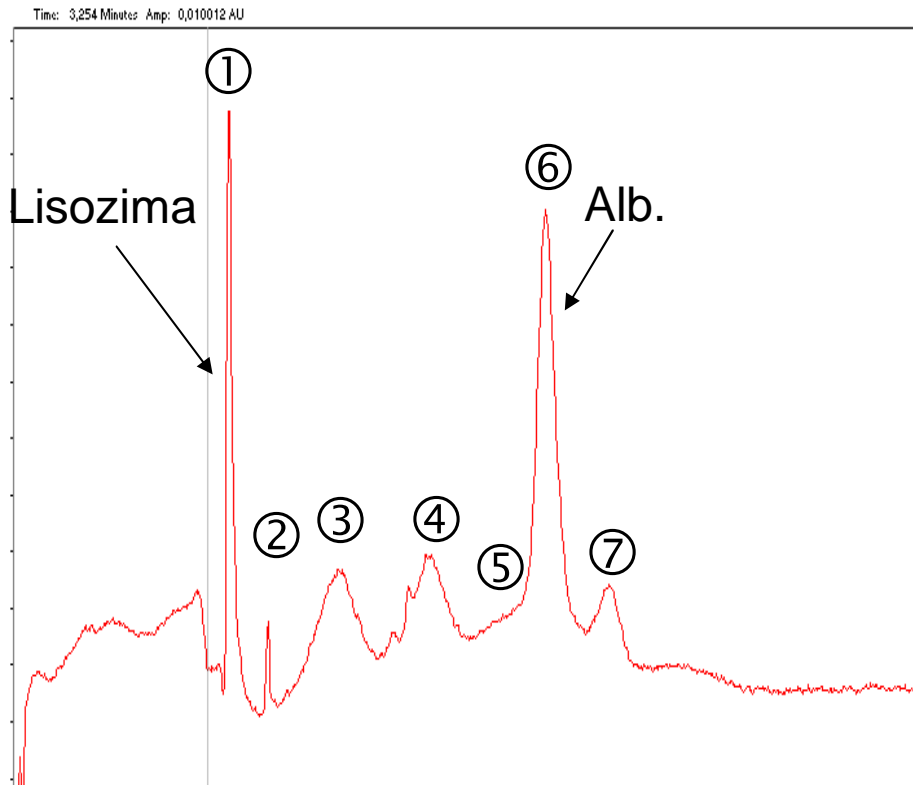
Ruptura de la barrera hemato-encefálica





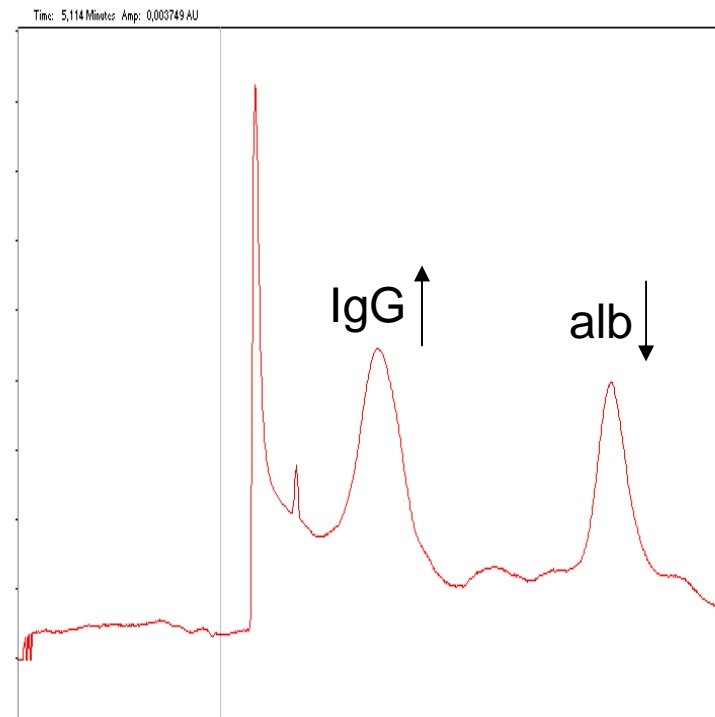
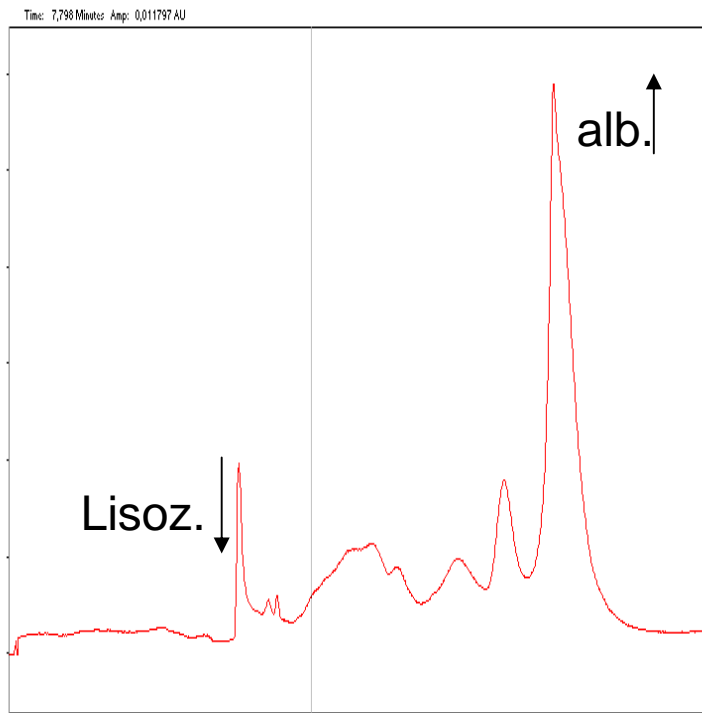
Proteinograma en Lagrimas

Lágrimas

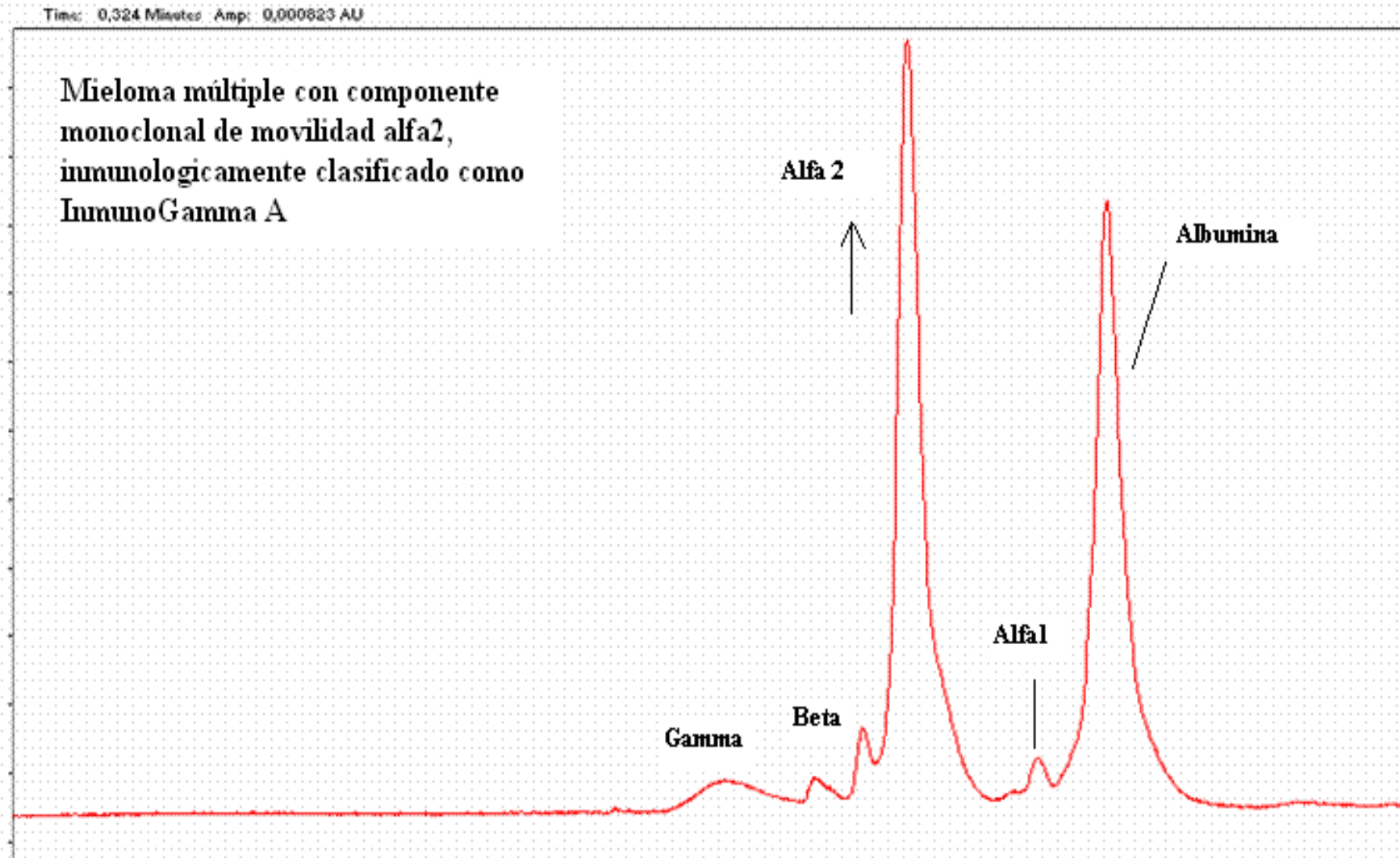


Fracción	Area % media	Desv.Std.
1=Lisozima	15,39	± 5,42
pico 2	2,97	± 2,20
fracc.3=IgG	17,30	± 9,62
fracc.4=Ltf	14,08	± 4,39
fracc.5	3,74	± 2,42
6=Albumina	36,05	± 8,38
fracc.7=PMR	10,73	± 5,38

Lágrimas - Perfiles Patológicos



Talidomida y Mieloma Múltiple, control terapéutico por Electroforesis Capilar.



Electroforesis Capilar de orina y de la talidomida identificada

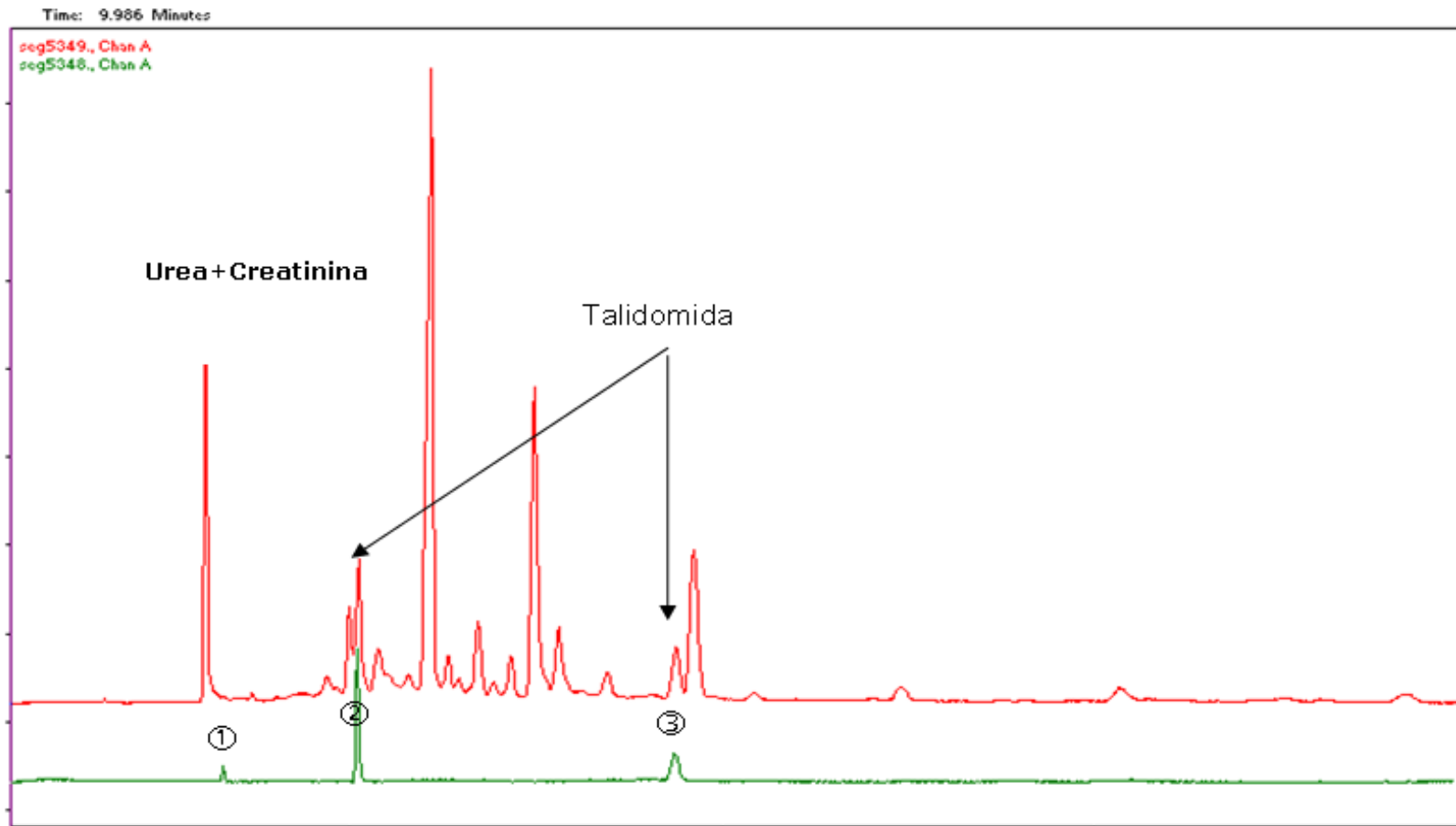


Figura 3: --- Electroferograma capilar de la orina del paciente durante el tratamiento con Talidomida.
--- Electroferograma de la droga Talidomida.

Evolución del proteinograma hacia la normalidad

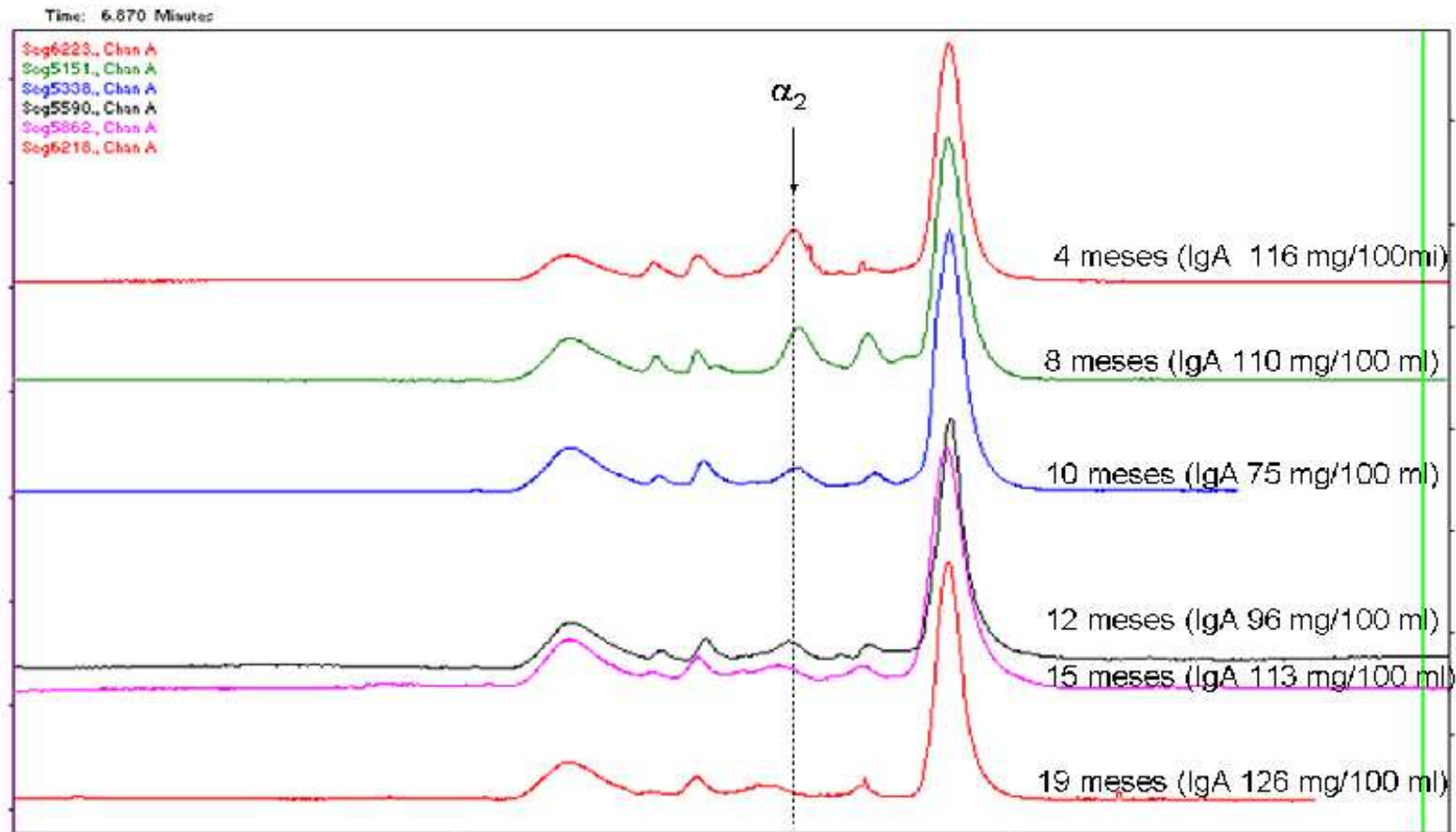
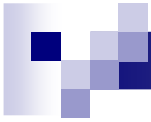
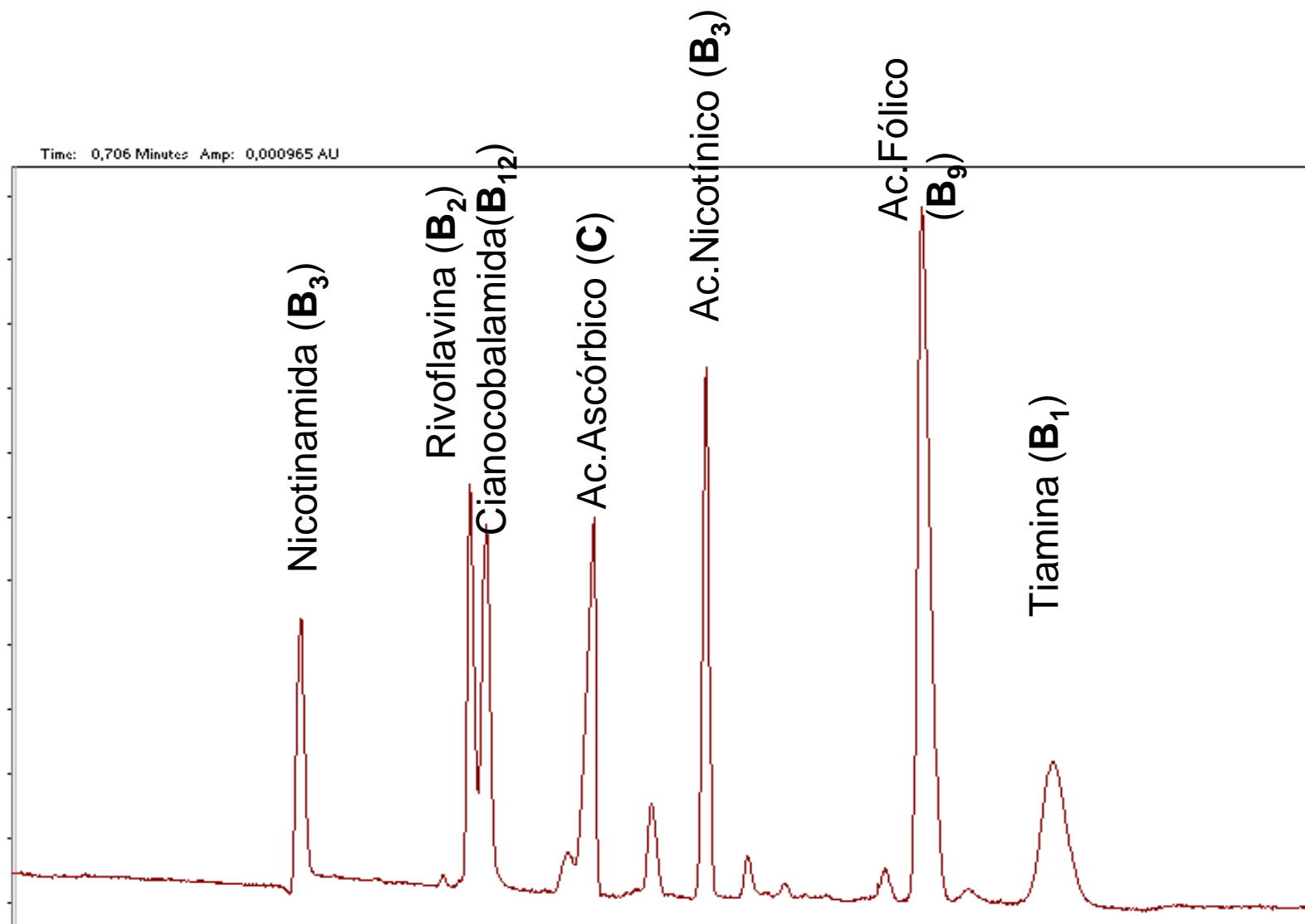


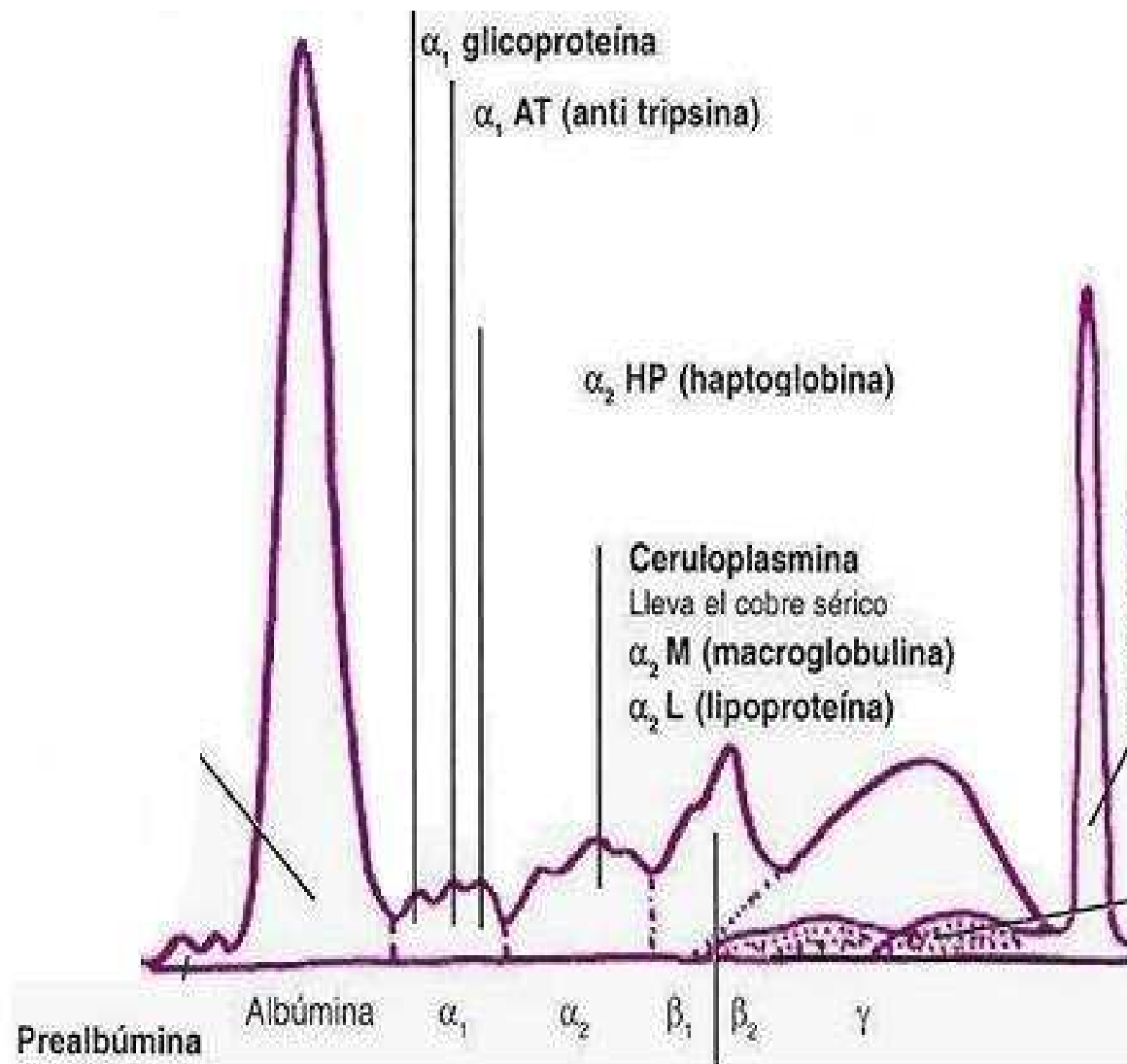
Figura 2: Proteinograma del suero del paciente a los 4, 8, 10, 12, 15 y 19 meses después de haber comenzado el tratamiento con Talidomida. -Notar la disminución de la fracción α_2 , hasta la normalidad.



Otras aplicaciones

Corrida de Vitaminas solubles en agua





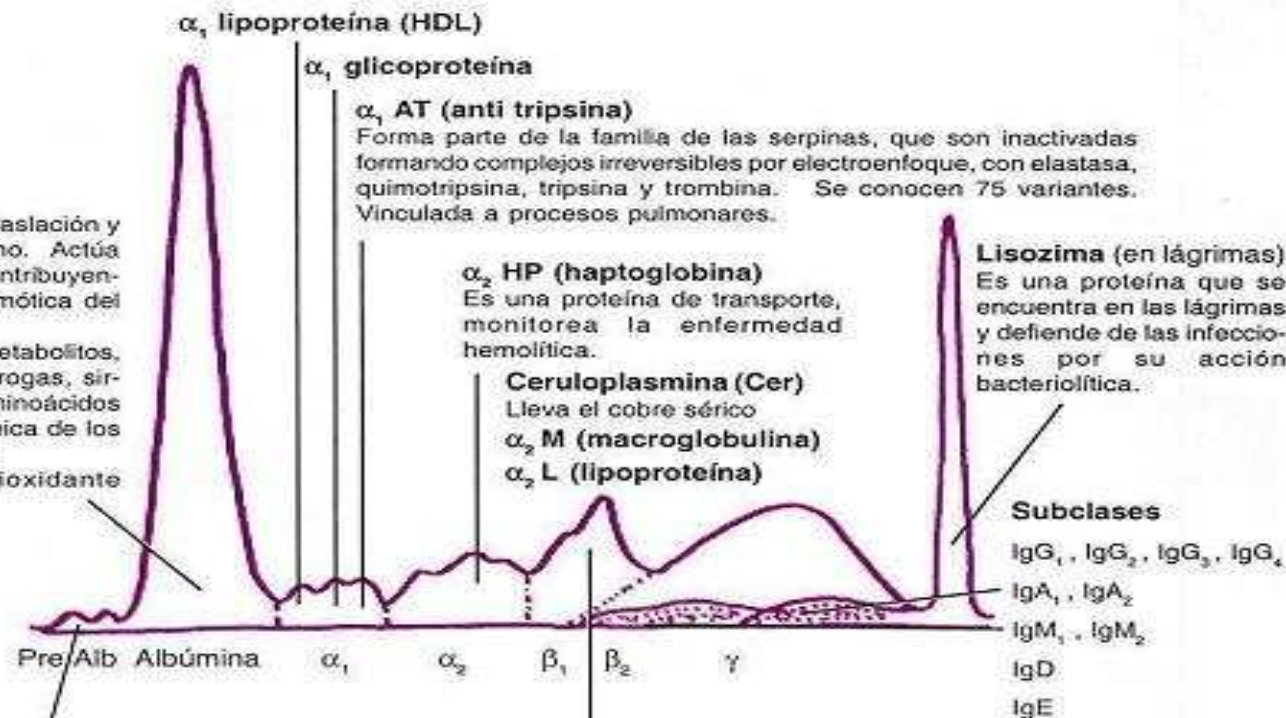
Lisozima (en lágrimas)
 Es una proteína que se encuentra en las lágrimas y defiende de las infecciones por su acción bacteriolítica.

Albúmina

Es la proteína de traslación y unión del organismo. Actúa como el mayor contribuyente a la presión osmótica del plasma. Une y transporta metabolitos, iones metálicos, drogas, sirve como pool de aminoácidos en la síntesis proteica de los tejidos periféricos. Es el mayor antioxidante plasmático.

Prealbúmina

También llamada trans-eritrina. Pueden aparecer dos fracciones. Pueden formar con metabolitos de drogas (ej. ácido salicílico) uniones muy firmes, modificando su migración.



α_1 lipoproteína (HDL)

α_1 glicoproteína

α_1 AT (anti tripsina)

Forma parte de la familia de las serpinas, que son inactivadas formando complejos irreversibles por electroenfoque, con elastasa, quimotripsina, tripsina y trombina. Se conocen 75 variantes. Vinculada a procesos pulmonares.

α_2 HP (haptoglobina)

Es una proteína de transporte, monitorea la enfermedad hemolítica.

Ceruloplasmina (Cer)

Lleva el cobre sérico

α_2 M (macroglobulina)

α_2 L (lipoproteína)

Lisozima (en lágrimas)

Es una proteína que se encuentra en las lágrimas y defiende de las infecciones por su acción bacteriolítica.

Subclases

IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄
IgA₁, IgA₂
IgM₁, IgM₂
IgD
IgE

Están orientadas en orden decreciente de concentración.

Están vinculadas al sistema inmunocompetente actuando como respuesta a la defensa de infecciones.

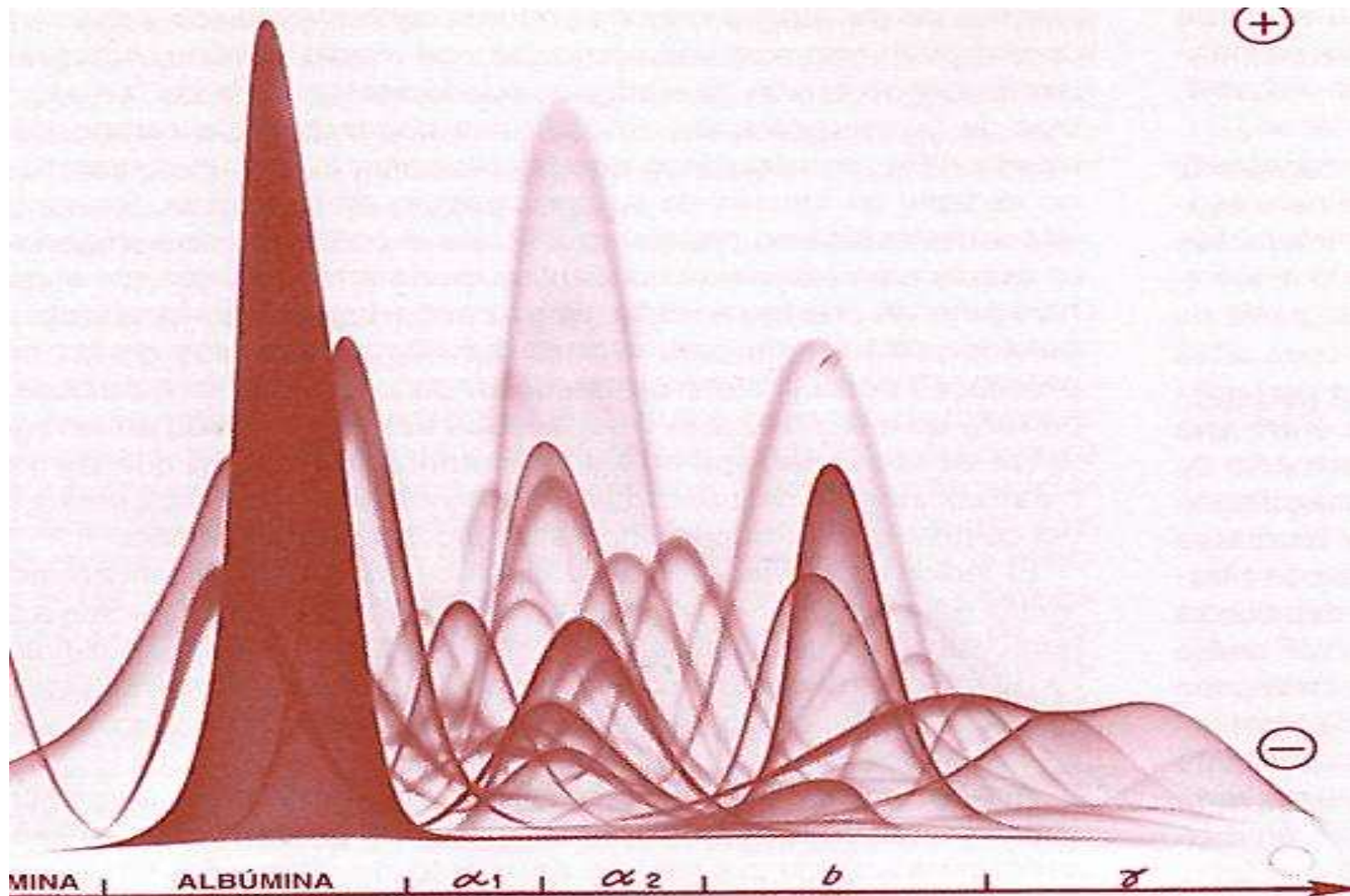
B2

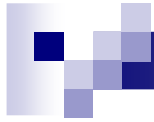
B2-Macroglobulina.
B2-Glicoproteína III
B2-Glicoproteína I
Fibrinogeno
Factor XI (PTA)
Factor XII (Hageman)
Factor XIII (FSF)
C3, C6, C7.
Activador C3(B2II)

B1

Hemopexina
B-Globulina fijadora de esteroides
transferrina
B1-glicoproteína del embarazo.
globulina insoluble en frío
factor V (acelerina)
factor VII (preconvertina)
factor IX (Christmas)
Plasminogeno
Proactivador C3
Transcobalamina II
B1-Lipoproteínas
C1r, C2

Inmunoelectroforesis cruzada bidimensional sobre un gel que contiene antisuero humano.





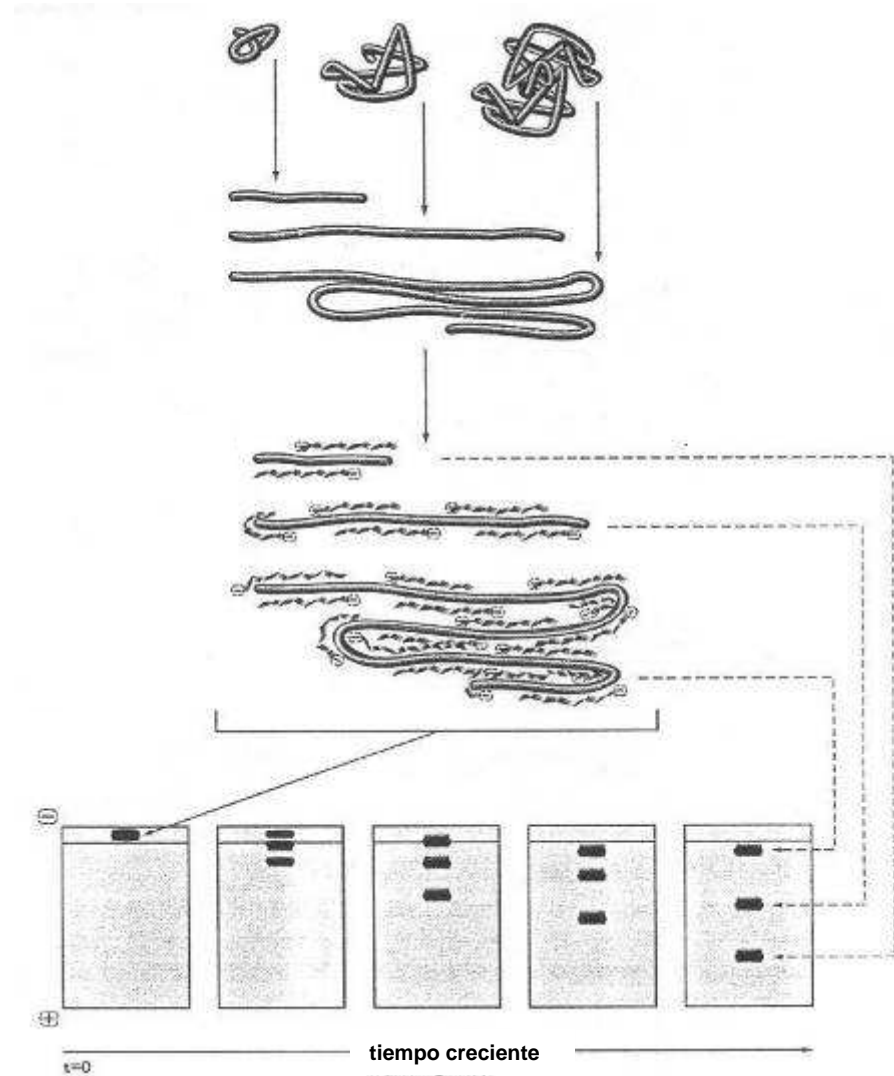
Últimos avances en Electroforesis Capilar

ELECTROFORESIS EN GEL ^{1D}

REDUCCIÓN, DESNATURALIZACIÓN
(β -ME, DTT)

INTERACCIÓN CON DETERGENTE
(SDS)

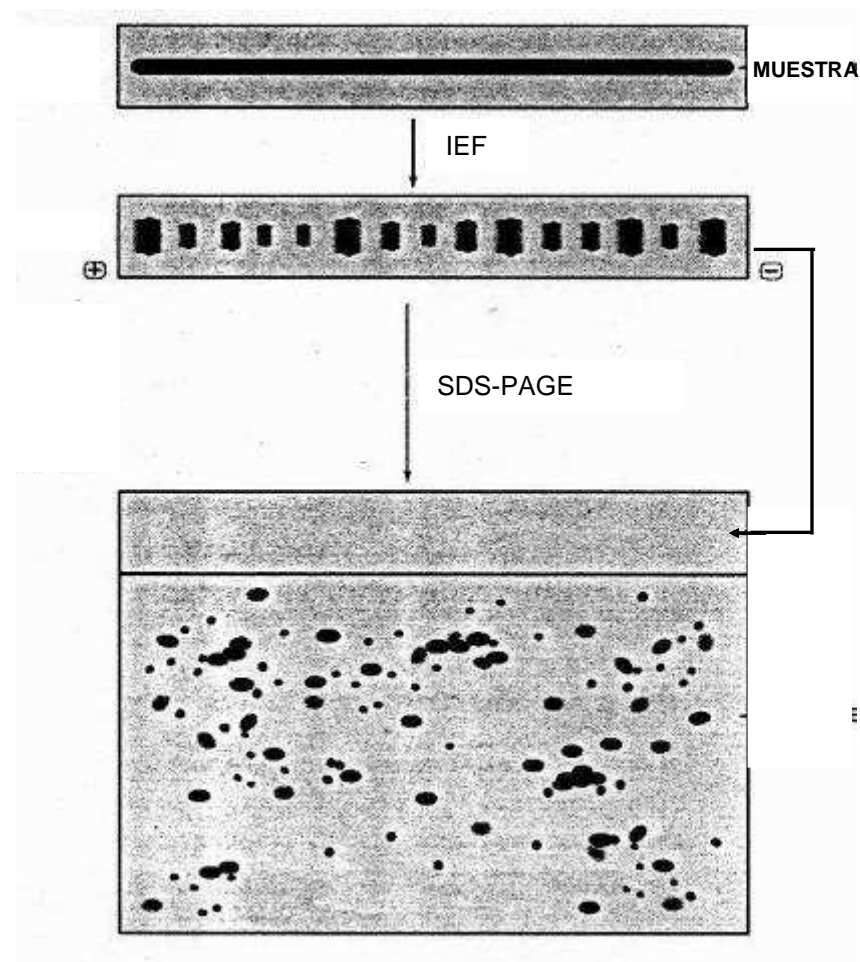
ELECTROFORESIS SDS-PAGE
(Acrilamida 5 - 15 %)



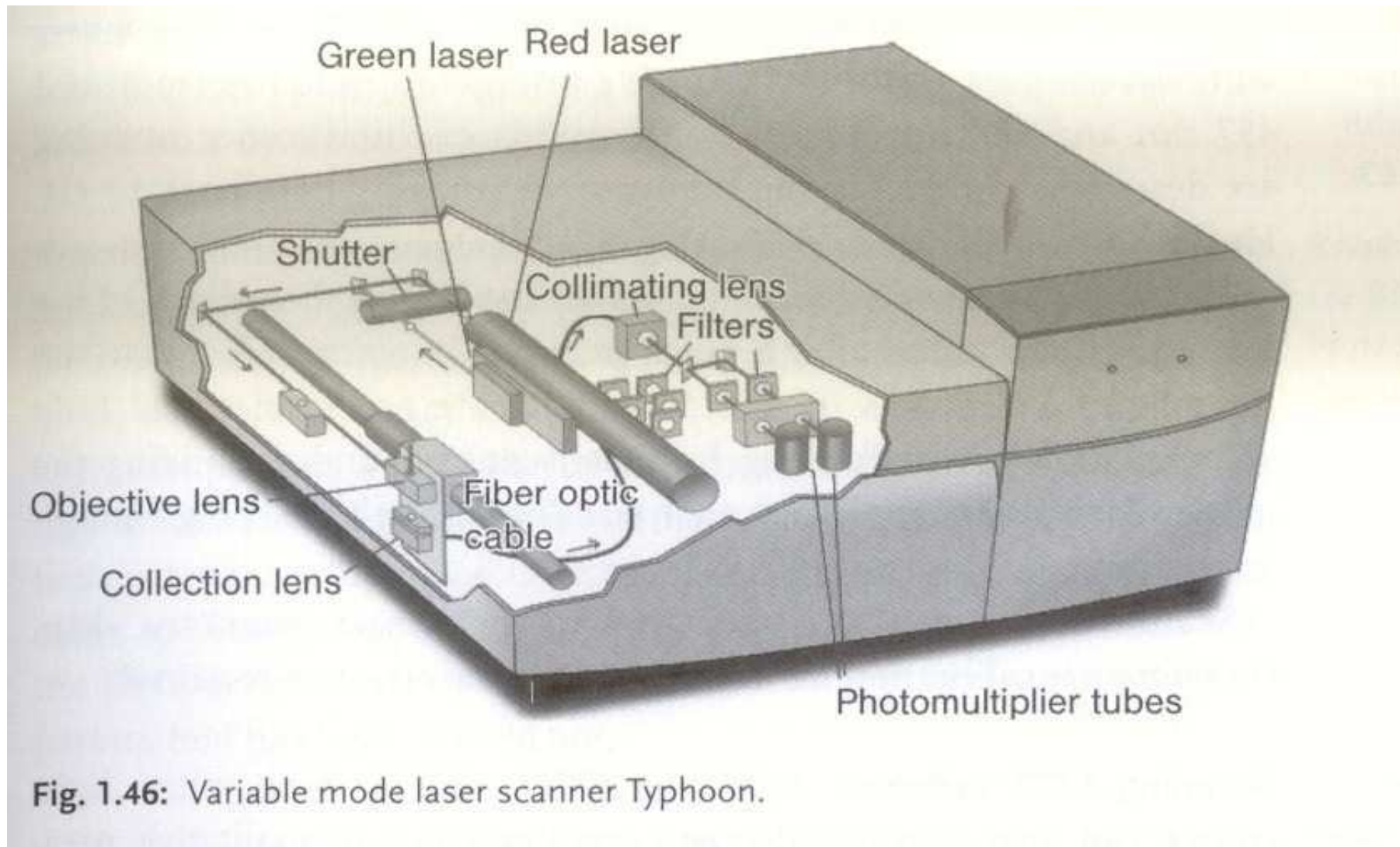
ELECTROFORESIS EN GEL ^{2D}

ISOELECTROENFOQUE
(separación por PI)

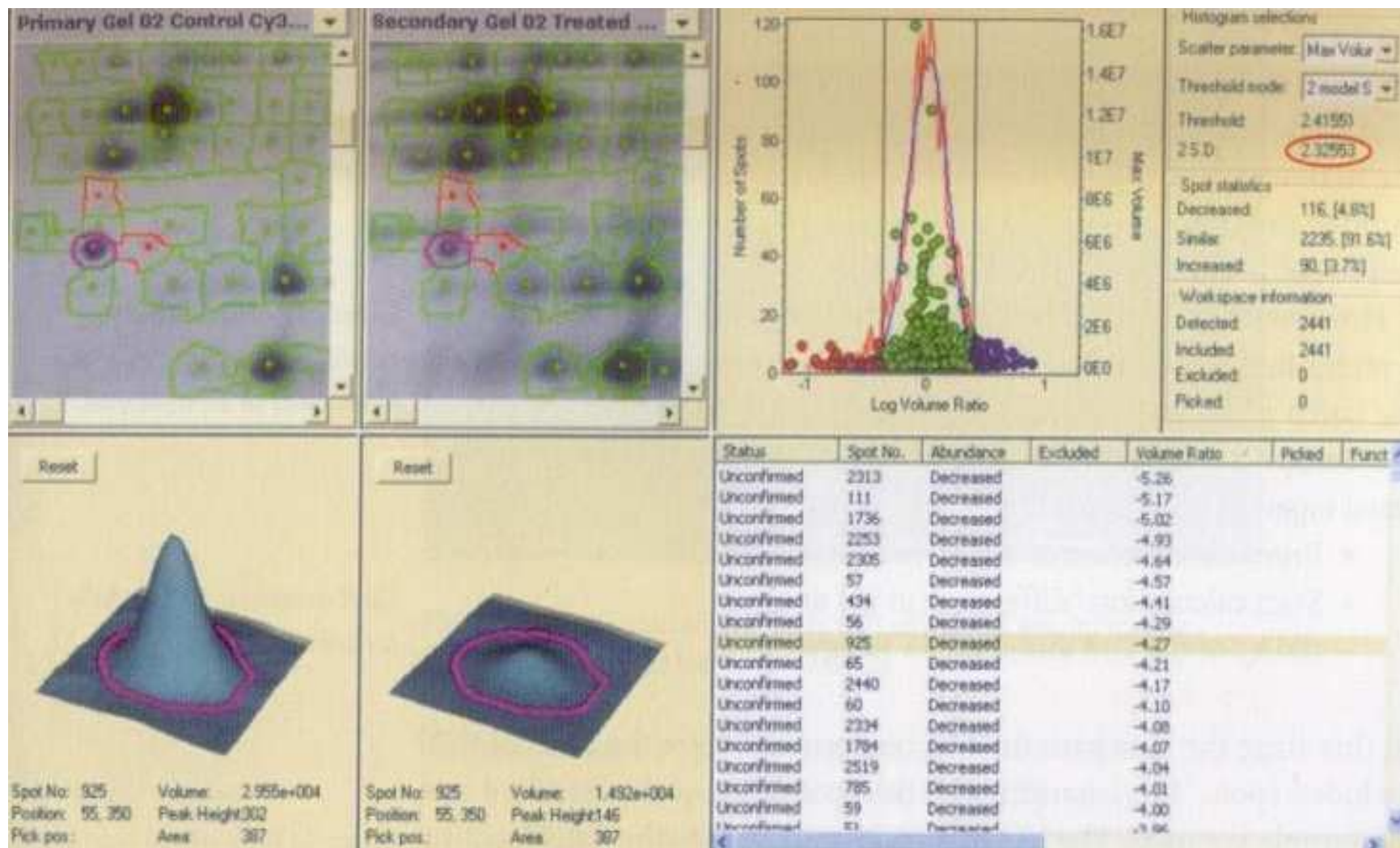
ELECTROFORESIS SDS-PAGE
(separación por PM)



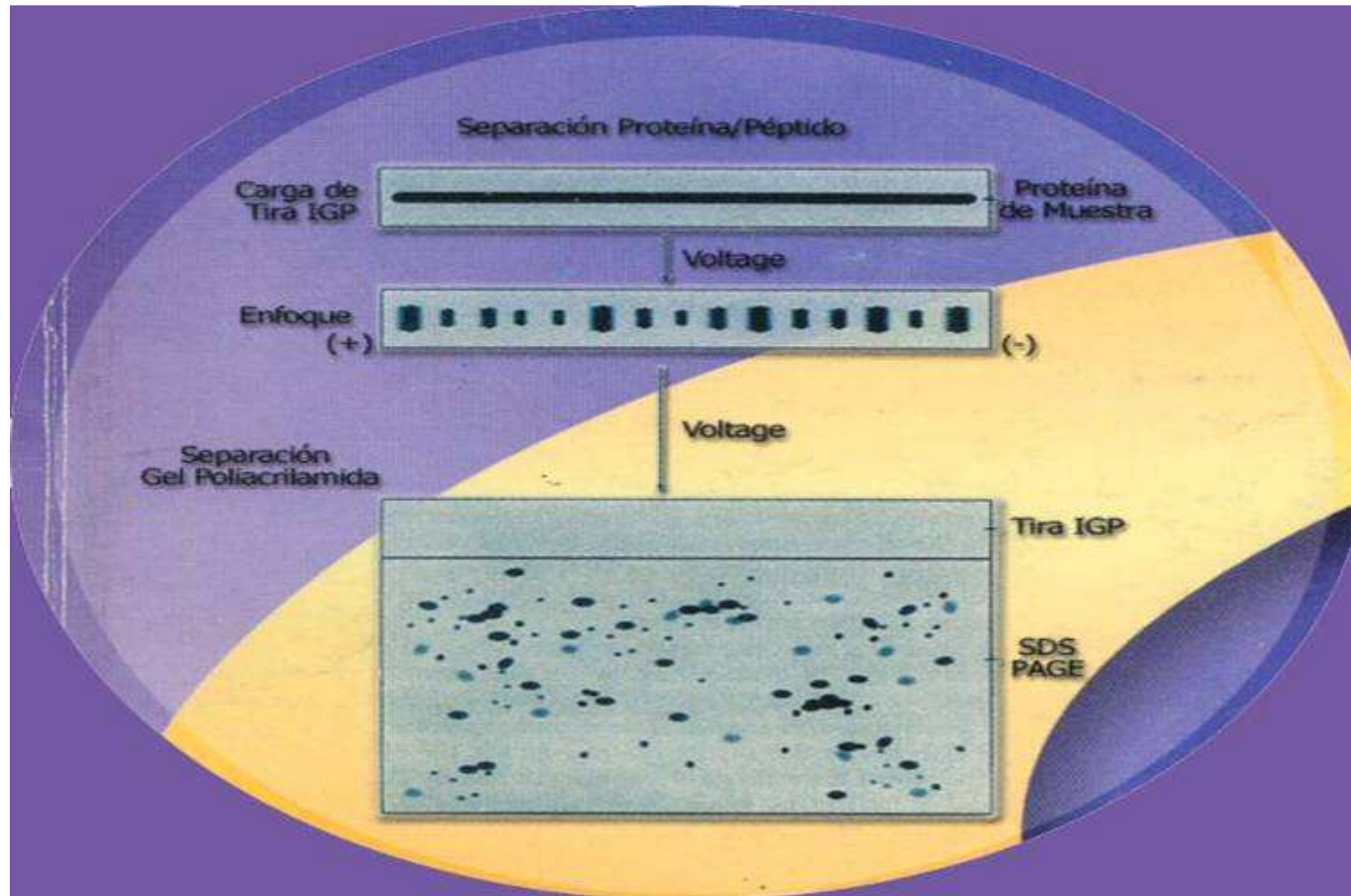
Scanner Lázer



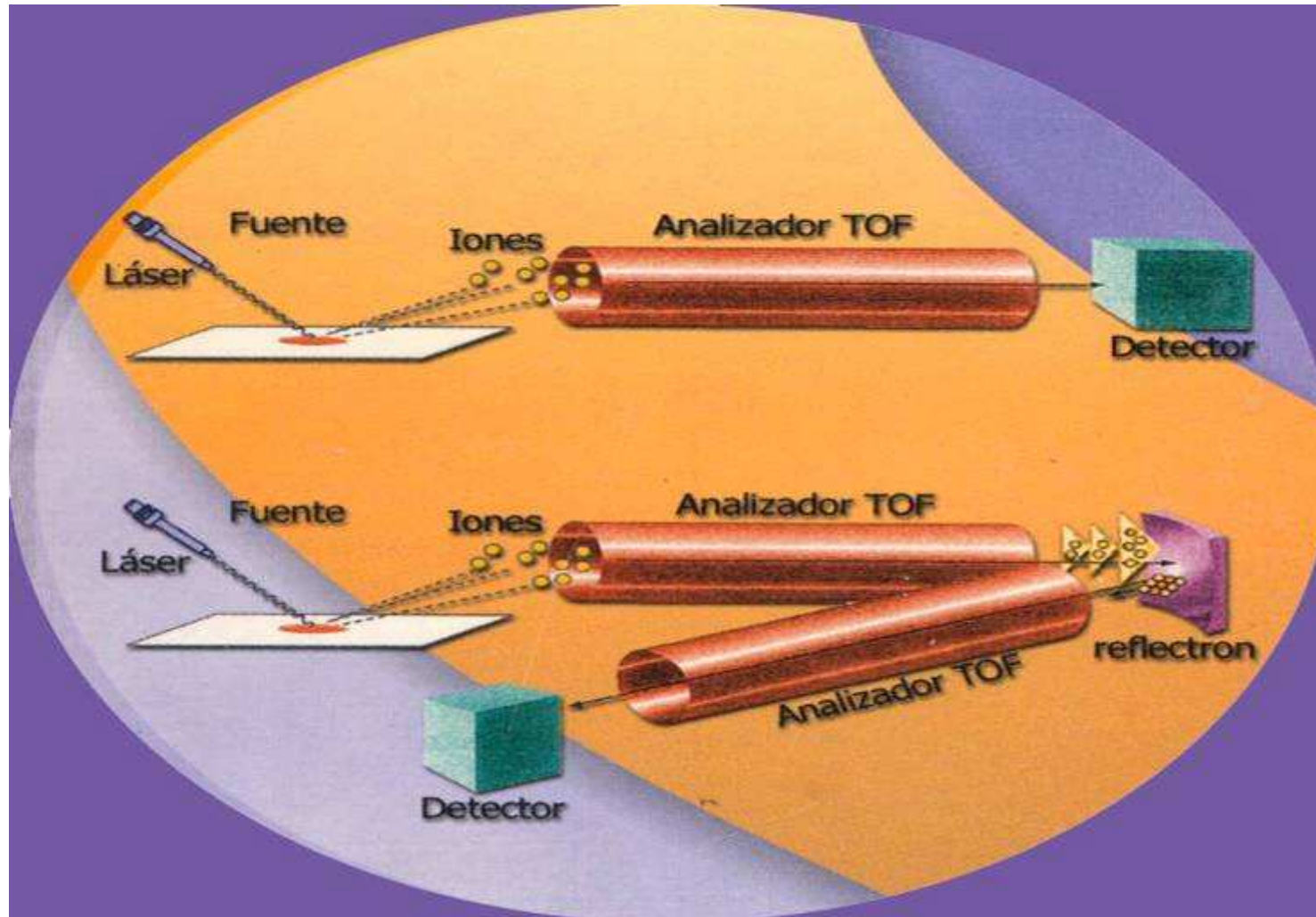
Desarrollo Y Análisis de imagen



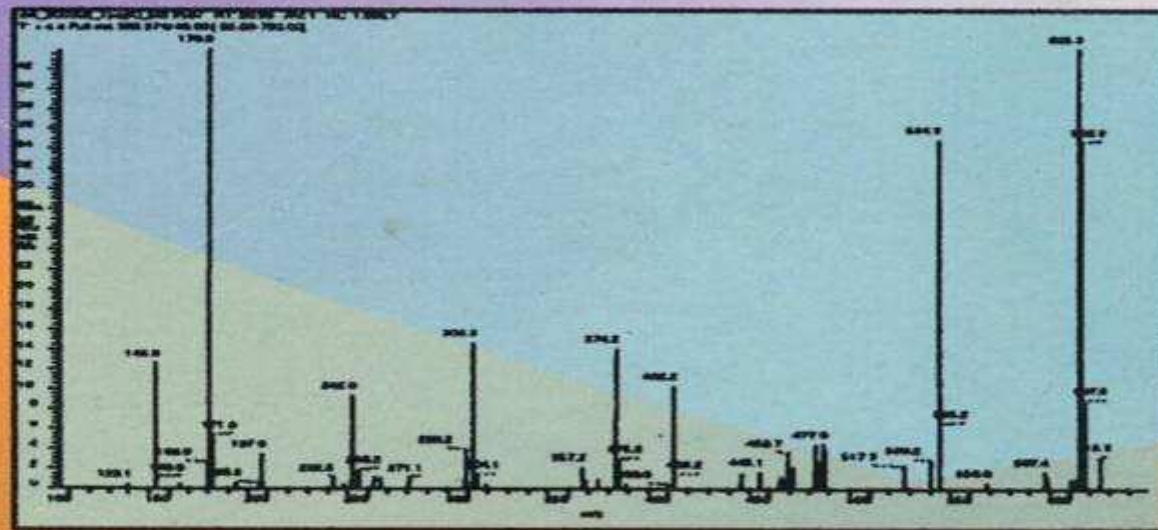
Electroforesis Bidimensional (DIGE)



Proceso de Ionización MALDI



Espectroscopía de masa





Programa Swiss-Prot – Búsqueda de proteínas

Información general de entrada	
Nombre de entrada	RB-HUMAN
Número primario de acceso	P06400
Número secundario de acceso	78499
Fecha de entrada de la proteína	Publicado 6 de enero de 1988
Fecha de la última modificación	Publicado 13 de enero 1990
Anotaciones sobre ultimas modificaciones	Publicado 12 septiembre 2003

Origen y Nombre de la Proteína	
Nombre de la Proteína	Proteína asociada al Retinoblastoma
Sinónimos	PP110 / P105-RB /RB/ RB1
Nombre del Gen	RB1
Desde	Homo Sapiens (Humanos)
Taxonomía	Eucariota, Metazoa ...



Reiner Westermeier, Tom Naven,
Hans-Rudolf Höpker

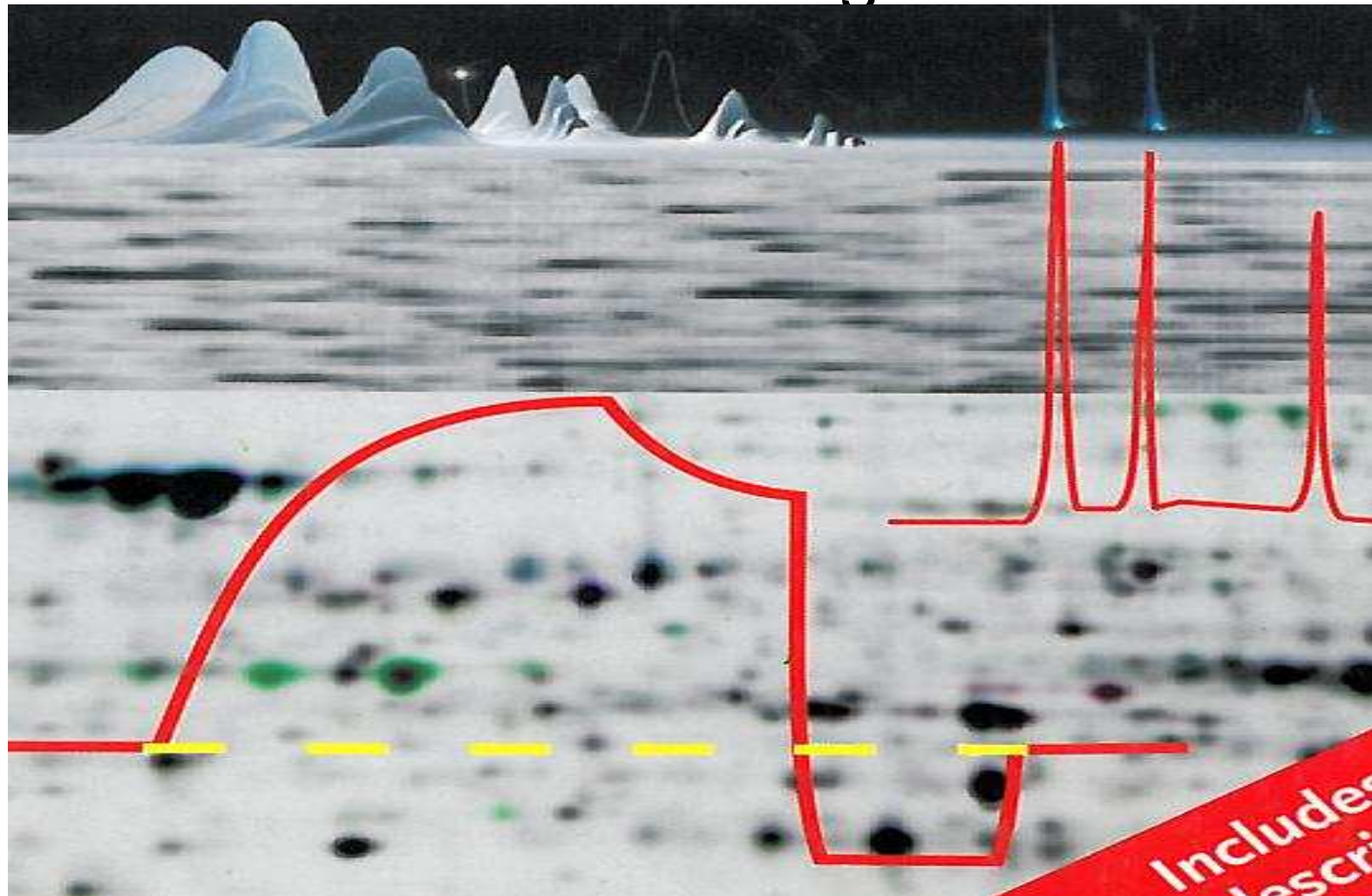
 WILEY-VCH

Proteomics in Practice

A Guide to Successful Experimental Design

Second, Completely Revised Edition

El estudio proteómico de avanzada a través de la Electroforesis Bidimensional en gel - DIGE



Electroforesis Capilar Bidimensional

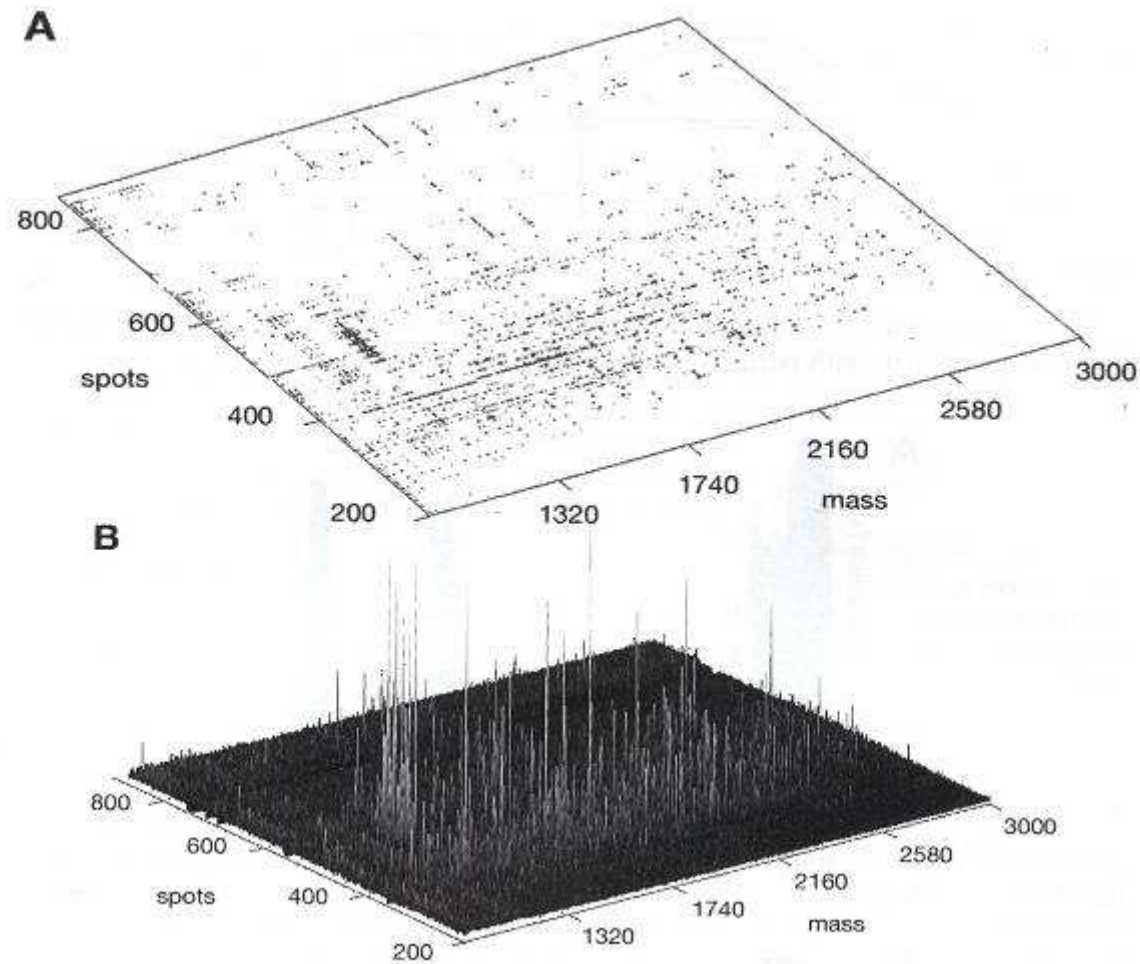
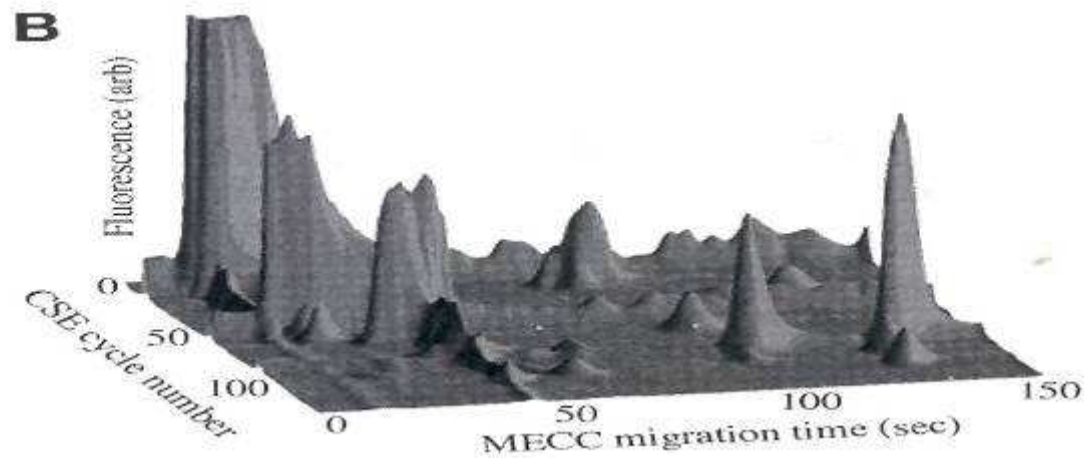
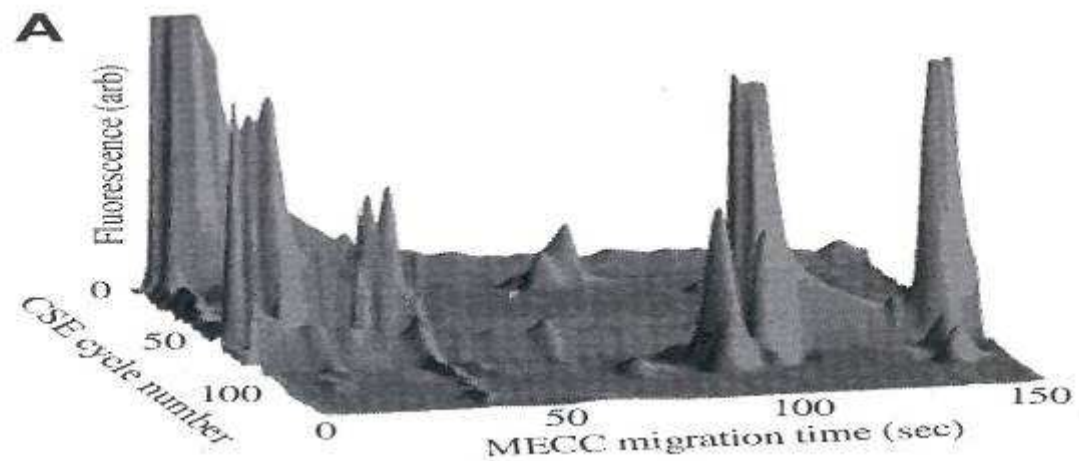
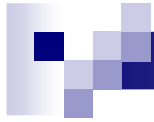


Imagen tridimensional del proteoma de células tumorales de pulmón





Metales pesados y Radioactivos

Así llega el polonio al tabaco

El polonio 210 es uno de los productos de desintegración del uranio. Este último se encuentra de forma natural en la tierra, pero su concentración es mucho mayor en las fosforitas empleadas en la fabricación de abonos. Se ha descubierto que el uranio introduce polonio en el tabaco a través del aire y las raíces.

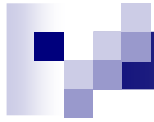




Soluciones

Los estudios realizados por las compañías tabaqueras han demostrado que las siguientes medidas eliminarían el polonio 210 del humo de los cigarrillos:

- Añadir al tabaco sustancias que eviten que el polonio 210 se volatilice y pase al humo
- Emplear abonos con bajo contenido en uranio
- Lavar las hojas tras la recolección
- Emplear filtros de intercambio de iones para bloquear el polonio de los cigarrillos
- Modificar genéticamente la planta del tabaco para obtener hojas carentes de los filamentos donde se deposita el polonio



**Muchas Gracias por su
atención**