

Artículos originales cortos

Cuantificación de Apo B con empleo de anticuerpos monoclonales como indicador precoz de riesgo aterogénico

L. SORELL¹, J. LÓPEZ¹, M. CABRERA¹, M.E. PÉREZ², M. RODRÍGUEZ², R. ROSQUETE², M. AGUILAR², A. CÍVICO¹, H. ALVAREZ¹, E. ZACCA¹, E. RODRÍGUEZ¹ y R. ROBAINA³

¹ Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, Calzada del Cerro 1551, Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba.

² Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

³ Centro de Inmunoensayo, calle 143 y Ave. 25, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en enero de 1989

Aprobado en marzo de 1989

RESUMEN

Niveles elevados de apolipoproteína B (Apo B) en sangre, se correlacionan con un mayor riesgo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En este trabajo se describe un método inmunoenzimático (ELISA) no competitivo tipo *sandwich*, que emplea como anticuerpo de recubrimiento el anticuerpo monoclonal IA/CB-LDL-1 y anticuerpos policlonales de carnero anti Apo B humana, purificados por afinidad y conjugados a enzimas marcadoras. Este sistema se desarrolló a escala microanalítica y ultramicroanalítica empleando en este último caso el equipo SUMA desarrollado en Cuba. La sensibilidad de ambas variantes permite detectar concentraciones de Apo B menores de 50 ng/ml.

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores de 5 y 10% respectivamente. Pacientes con infarto agudo del miocardio entre 45 y 80 años y con aterosclerosis periférica entre 60 y 80 años, mostraron niveles significativamente más altos de Apo B respecto a sujetos controles de igual rango de edad. La medición de la concentración de Apo B en muestras de suero de sangre de cordón umbilical realizada con el SUMA, permitió evidenciar valores marcadamente elevados en algunos recién nacidos. Tomando en consideración el nivel de automatización del SUMA, que posibilita analizar un gran número de muestras de manera confiable y bajo costo, se propone este método para estudios de *screening* primario de recién nacidos y adultos jóvenes, con el fin de identificar aquellos con riesgo de trastornos genéticos del metabolismo de las lipoproteínas que contienen Apo B, lo cual puede corroborarse posteriormente con técnicas más "sofisticadas" y costosas.

SUMMARY

Increased levels of apolipoprotein B (Apo B) in blood correlate with a higher risk for the development of atherosclerosis. We describe a non competitive sandwich ELISA, that uses as coating antibody the monoclonal antibody IA/CB-LDL.1, and polyclonal goat antibodies against Apo B, conjugated with marker enzymes. This system was developed at micro- and ultramicroanalytical scales, using in this latter case, the SUMA equipment produced in Cuba. The sensitivity of both systems is less than 50 ng/ml of Apo B using a standard serum. The intra- and inter-assay variation coefficients were less than 5 and 10% respectively. Patients with acute myocardial infarct between 45 and 80 years and those with peripheral atherosclerosis between 60 and 80, exhibited a high serum concentration of Apo B. The SUMA was employed for the quantitation of Apo B in the umbilical cord blood serum of newborns and in some samples we could detect an increased concentration of this apoprotein. Having in mind the levels of

automation of the SUMA system, and the high number of samples that can be screened, we are starting a program for newborns and young adults, in order to detect individuals with altered levels of Apo B, due to genetic disorders and other causes.

INTRODUCCION

La apolipoproteína B (Apo B) se encuentra formando parte de la estructura de distintas fracciones lipoproteicas relacionadas con el transporte del colesterol hacia los tejidos. Es prácticamente la única proteína que forma parte de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), muy relacionadas con este transporte, por lo que se ha encontrado que niveles elevados de Apo B se correlacionan muy bien con niveles altos del colesterol ligado a las LDL (LDL-colesterol) y, consecuentemente, con un mayor riesgo al padecimiento de la enfermedad aterosclerótica. Algunos estudios realizados han encontrado incluso que la Apo B resulta un mejor indicador de riesgo aterogénico que otros parámetros lipídicos (Avogaro, 1979; Riesen *et al.*, 1980).

Distintos métodos han sido diseñados para la cuantificación de la Apo B, fundamentalmente inmunoquímicos, empleando antisueros y anticuerpos policlonales de diverso origen, así como sueros patrones de distintas fuentes. Esta diversidad puede ser la causa de los diferentes valores de referencia reportados para la Apo B (Assman, 1982).

Recientemente, algunos investigadores han señalado la posible utilidad del empleo de anticuerpos monoclonales (AcMs) contra la Apo B en técnicas reproducibles para la cuantificación de esta apoproteína (Riesen *et al.*, 1986; Marcovina *et al.*, 1985; Slater *et al.*, 1985), teniendo en cuenta su mayor homogeneidad y la posibilidad de poder producirlos en cantidades ilimitadas.

En un trabajo anterior (Sorell *et al.*, 1988) reportamos el empleo de AcMs en sistemas inmunoenzimáticos (ELISA) tipo *sandwich* para la cuantificación de Apo B y comparamos los resultados con respecto a cuando se emplearon anticuerpos policlonales para los mismos fines, o un sistema combinado que emplea como anticuerpo de atrapamiento el AcM IA/CB-LDL 1, y como conjugado anticuerpos de carnero anti Apo B purificados por afinidad unidos a la peroxidasa.

En este estudio exponemos los resultados de la utilización de este último sistema en la cuantificación de la Apo B en pacientes con distintas manifestaciones de la enfermedad aterosclerótica, en un grupo de sujetos sanos de igual rango de edad y en un grupo de muestras de suero de sangre de cordón umbilical de recién nacidos.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones de los ELISA

El AcM IA/CB-LDL 1 empleado para el recubrimiento de las placas es de clase IgG1 y fue obtenido según fue descrito en un trabajo anterior (Sorell *et al.*, 1986). Fue purificado a partir de líquido ascítico por cromatografía de afinidad por proteína-A Sepharosa 4B.

La cuantificación de la Apo B en muestra de suero, mediante un ELISA en placas de microtitulación, se realizó siguiendo las condiciones descritas en un reporte anterior para el sistema combinado (Sorell *et al.*, 1988). Brevemente, se recubrieron placas de poliestireno con el AcM IA/CB-LDL 1 a una concentración de 10 µg/ml durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron las muestras convenientemente diluidas, usualmente 1:1000, y distintas diluciones de un suero patrón preparado según fue descrito en el trabajo referido. Se incubó una hora a temperatura ambiente y después de lavar las placas se añadió el anticuerpo conjugado diluido 1:2000, dejándolo una hora a temperatura ambiente.

Se lavaron las placas repetidamente y se añadió el sustrato (5 mg de ortofenilendiamina en 10 ml de tampón citrato pH 5,0 con 5 µl de peróxido de hidrógeno al 30%). La reacción de color se detuvo a los

20 minutos con 50 μ l de ácido sulfúrico 2,5 M, midiéndose la absorbancia de los pocillos a 492 nm en un lector de placas (MULTISKAN MCC 340).

Con este sistema microanalítico (SMA) se estudiaron un grupo de pacientes con enfermedad arterial periférica, pacientes con infarto agudo del miocardio y un grupo de sujetos sin antecedentes de enfermedades cardiovasculares que tuvieron todos los pulsos arteriales presentes en un chequeo vascular periférico.

El sistema fue llevado a escala ultramicroanalítica, aprovechando las posibilidades del equipo SUMA desarrollado en el país, utilizando placas de ultramicrotitulación que solo requieren 10 μ l de cada uno de los componentes del sistema (anticuerpo de recubrimiento, muestras, conjugado, etcétera). El anticuerpo conjugado fue preparado en este caso empleando la enzima β -galactosidasa producida por vía recombinante en *E. coli* en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, y un sustrato fluorogénico (4-metil umberiferil β -D galactósido) para medir la intensidad de la reacción enzimática. Con este sistema se midió la concentración de Apo B en muestras de suero obtenidas de sangre de cordón umbilical de recién nacidos.

Los coeficientes de variación intra e interensayo de ambas variantes se determinaron midiendo repetidamente la concentración de Apo B de un pool de suero en un mismo día y durante siete días respectivamente. Para la variación día a día, el pool se conservó a -20°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los sistemas ELISA descritos, un esquema de los cuales se muestra en la figura 1, permiten detectar menos de 50 ng/ml de Apo B a partir del suero patrón (figura 2). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores del 5 y del 10% respectivamente, por lo que pueden ser empleados en la cuantificación de la Apo B a partir de muestras de suero con fines diagnósticos.

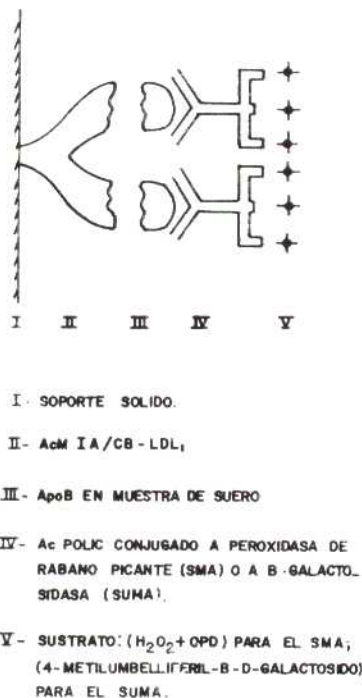


FIG. 1. Esquema del ELISA empleado para la cuantificación de la Apo B en muestras de suero.

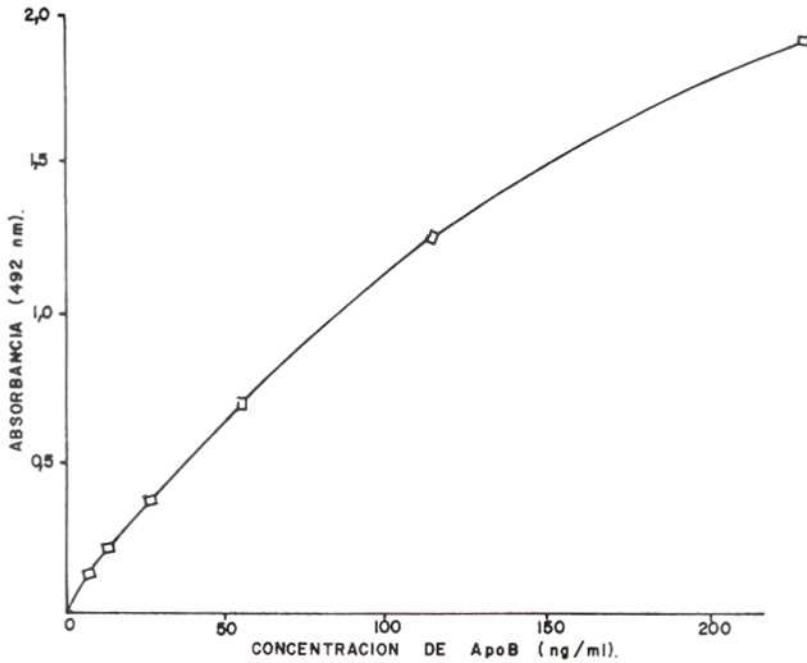


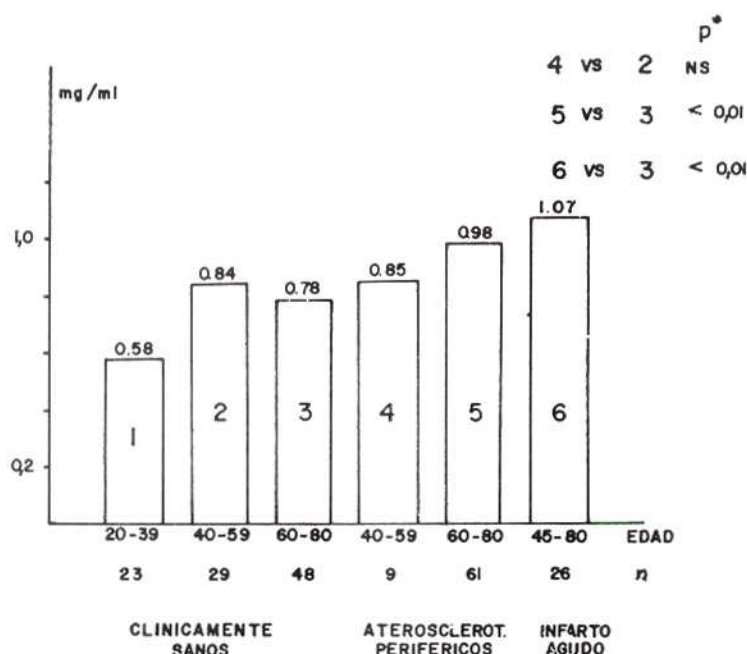
FIG. 2. Valores de densidad óptica para distintas diluciones del suero patrón de concentración conocida de Apo B.

En particular, la variante ultramicroanalítica con empleo del equipo SUMA permite el análisis de un gran número de muestras con un bajo costo a causa de las reducidas cantidades de reactivos que emplea y con una alta confiabilidad por su elevada automatización, que incluye programas de *software* para el análisis de los resultados y el control de la calidad de los mismos.

Esto representa una ventaja respecto a otros sistemas descritos para la cuantificación de la Apo B con empleo de AcMs (Marcovina *et al.*, 1985), y con relación a sistemas similares desarrollados con anticuerpos policlonales (Riesen *et al.*, 1986; Fievet *et al.*, 1985; Fievet *et al.*, 1986).

La figura 3 muestra los resultados de la cuantificación de la Apo B con el SMA en muestras de pacientes con distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad aterosclerótica y en individuos controles. La concentración más alta de Apo B en los pacientes infartados corrobora los resultados de otros investigadores y confirman su importancia como factor de riesgo en la cardiopatía isquémica (Marcel *et al.*, 1986; Patton *et al.*, 1983; Fievet *et al.*, 1985a).

Con respecto a los pacientes con enfermedad arterial periférica, resultó interesante que solo aquellos de mayor edad (entre 60 y 80 años), tuvieran valores de Apo B significativamente elevados con relación a sujetos clínicamente sanos de igual rango de edad, mientras que entre los más jóvenes (entre 40 y 59 años), los valores de la concentración de Apo B no fue significativamente diferente del grupo control respectivo. Esto sugiere que los trastornos del metabolismo lipídico, asociados a la aparición de las arteriopatías periféricas, pueden comportarse de manera diferente en sujetos de distinta edad.



* SIGNIFICACION ESTADISTICA, TEST T - STUDENT.

FIG. 3. Resultados de la cuantificación de la Apo B en muestras de pacientes y controles.

En un estudio realizado en esta misma población para determinar los niveles de apolipoproteína A1 (Apo A1), se encontró que estos estuvieron significativamente disminuidos en los enfermos con aterosclerosis periférica más jóvenes y no entre los de más edad (publicación en preparación). Como se sabe, los niveles bajos de Apo A1 se han correlacionado con un mayor riesgo al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

Estos resultados, que requieren estudios confirmatorios con una muestra mayor, sugieren que entre los pacientes más jóvenes con arteriopatía periférica, los trastornos lipídicos se encuentran más asociados al metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), donde la Apo A1 está muy representada, mientras que entre los pacientes de mayor edad, estas alteraciones se relacionan más con el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que contienen a la Apo B como prácticamente su única apoproteína.

El estudio realizado en muestras de suero de sangre de cordón umbilical con el SUMA, permitió evidenciar algunos recién nacidos con valores de concentración de Apo B muy elevados (figura 4). En trabajos recientes se han reportado niveles de Apo B significativamente aumentados en pacientes jóvenes con cardiopatía isquémica (Durrington *et al.*, 1988; Richard *et al.*, 1986) y en niños de padres con manifestaciones tempranas de la enfermedad aterosclerótica (Freedman *et al.*, 1986; Van Stiphout, Hoffman, 1987). Esto hace pensar en la utilidad de la cuantificación de la Apo B en el SUMA como un método rápido, confiable y económicamente aceptable para el pesquiasaje

masivo de recién nacidos y adultos jóvenes, que permita identificar a aquellos con riesgo a padecer trastornos genéticos del metabolismo de las lipoproteínas que contienen Apo B, como por ejemplo un déficit genético de receptores celulares para la Apo B (Goldstein y Brown, 1987), o la aparición de variantes estructurales de Apo B que tienden a acumularse en el plasma (Weisgraber *et al.*, 1988). Estos trastornos genéticos podrían confirmarse más tarde con el uso de métodos más "sofisticados" y costosos.

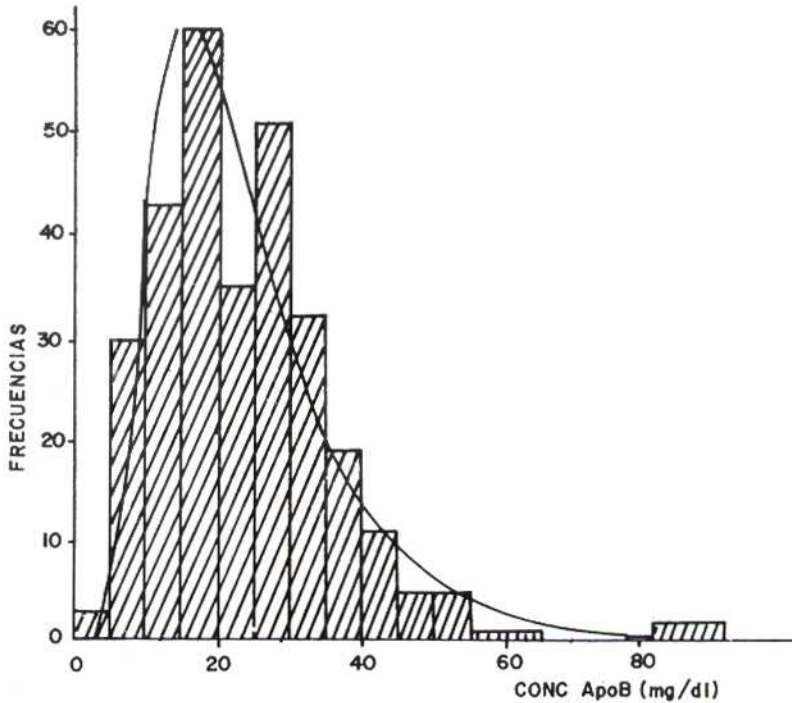


FIG. 4. Histograma de frecuencias para la concentración de Apo B a partir de la muestra de recién nacidos analizada por el SUMA.

REFERENCIAS

- ASSMANN, G. (1982). *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Ed F. K. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart, Germany, p. 156.
- AVOGARO, P.; G. CAZZOLATO; G. BITTOLO y G.B. QUINCI (1979). *Are lipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis?* Lancet i: 901-903.
- DURRINGTON, P.N.; M. ISHOLA; L. HUNT y S. ARROL (1988). *Apolipoproteins(a), A1 and B and parental history in men with early onset ischaemic heart disease*. Lancet i: 1070-1073.
- FIEVET, C.; A. DEDIERU; A. KANDOUSSI; I. LUYEYE y J.C. FRUCHART (1986). *Quantitation of human serum apolipoprotein B by enzyme immunoassay in excess of antigen*. Clin. Chim. Acta 159: 269-278.
- FIEVET, C.; C. DEMARQUILLY; I. LUYEYE; P. FIEVET; Y. MOSCHETTO y J.C. FRUCHART (1985). *Utilisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux pour le dépistage de l'athérosclérose. Intérêt de nouveaux marqueurs*. Ann. Biol. Clin. 43: 493-517.
- FIEVET, C.; H. PARRA; I. LUYEYE; C. DEMARQUILLY; P. FIEVET; J.C. FRUCHART; M. BERTRAND; J.M. LABLANCHE; P. DROUIN y P.GROSS (1985a). *Mapping of lipoprotein particles with monoclonal antibodies in diabetes and atherosclerosis*. Monogr. Atheroscler. 13: 134-141.

- FREEDMAN, D.S.; S.R. SRINIVASAN; C.L. SHEAR; F.A. FRANKLIN; L.S. WERBER y G.S. BERENSON (1986). *The relation of apolipoproteins A1 and B in children to parental myocardial infarction*. N. Engl. J. Med. **315**: 721-726.
- GOLDSTEIN, J.L. y M.S. BROWN (1987). *Regulation of low-density lipoprotein receptors: Implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis*. Circulation **76**: 504-507.
- MARCEL, Y.L.; P.K. WEECH y R.W. MILNE (1986). *Application des anticorps monoclonaux à la mesure des apolipoprotéines*. Ann. Biol. Clin. **44**: 536-544.
- MARCOVINA, S.; G. DICOLA; C. RAPETTO; C. FIEVET; V. CLAVEY y J.C. FRUCHART (1985). *Development of a radial immunodiffusion technique employing monoclonal antibodies for apolipoprotein B determinations in human plasma*. Clin. Chim. Acta **147**: 117-125.
- PATTON, J.G.; J.J. BADIMON y S.M.T. MAO (1983). *Monoclonal antibodies to human plasma low-density lipoproteins. Evaluation for use in radioimmunoassay for apolipoprotein B in patients with coronary artery disease*. Clin. Chem. **29**: 898-902.
- RICHARD, P.D.; T.J. ORCHARD; E.A. STEIN y L.H. KULLER (1986). *Apolipoproteins A1, A2 and B in young adults: Association with CHD risk factors. The Beaver County Experience*. J. Chron. Dis. **39**: 823-830.
- RIESEN, W.F.; E. STRUZENEGGER; C. IMHOF y R. MORDASINI (1986). *Quantitation of apolipoprotein B by polyclonal and monoclonal antibodies*. Clin. Chim. Acta **154**: 20-40.
- RIESEN, W.F.; R. MORDASINI; C. SALZMAN; A. THELER y H.P. GURTNER (1980). *Apoproteins and lipids as discriminators of severity of coronary heart disease*. Atherosclerosis **37**: 157-162.
- SLATER, H.R.; R.W. TINDLE; C.J. PACKARD y J. SHEPHERD (1985). *A monoclonal antibody based immunoradiometric assay for apolipoprotein B in low density lipoprotein*. Clin. Chem. **31**: 841-845.
- SORELL, G.L.; M.E. FERNANDEZ; E. PENTON; J. LOPEZ y I.C. PEREZ (1986). *Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen apolipoproteína B*. Interferón y Biotecnología **3**, No. 3: 239-241.
- SORELL, G.L.; J. LOPEZ; M. CABRERA y N. DIAZ (1988). *Comparación de la cuantificación de apoB-lipoproteínas utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA*. Interferón y Biotecnología **5**, No. 3: 278-285.
- VAN STIPHOUT, W. y A. HOFFMAN (1987). *The relation of apolipoproteins A1 and B in children to myocardial infarction in parents*. N. Engl. J. Med. **316**: 548-549.
- WEISGRABER, K.; T. INNERARITY; Y. NEWHOUSE; S. YOUNG; K. ARNOLD; R. KRAUSS; G. VEGA y S. GRUNDY (1988). *Familial defective apolipoprotein B-100: Enhanced binding of monoclonal antibody MB-47 to abnormal low density lipoproteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 9758-9762.