

## Cartas al editor

### **Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen apolipoproteína-B**

Al editor:

La apolipoproteína-B (apoB) es el principal componente proteico de las lipoproteínas de baja densidad (LDL); está presente también en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y en las de densidad intermedia (IDL). Se ha señalado que estas fracciones lipoproteicas son potencialmente aterogénicas, por lo que la determinación de altas concentraciones de apoB sérica se considera como un indicador de riesgo al padecimiento de la enfermedad aterosclerótica (Avogaro, 1979; Sniderman y col., 1982).

La cuantificación de apoB se ha realizado esencialmente por métodos inmunoquímicos, empleando anticuerpos policlonales cuya conocida heterogeneidad ha originado diferencias importantes con relación a los valores normales reportados por diferentes autores (Assmann, 1982).

Por otra parte, el estudio de la estructura de la molécula de apoB ha encontrado numerosas dificultades, motivadas por sus características físicoquímicas (Kane y col., 1983).

El desarrollo de las técnicas para la obtención de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975), ha permitido en los últimos años la producción de estos contra la apoB, habiéndose reportado resultados prometedores, tanto desde el punto de vista del diagnóstico (Patton y col., 1983; Fievet y col., 1985) como del análisis estructural de esta apoproteína (Milne y Marcel, 1984).

En este reporte se describe la obtención y la caracterización de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen apolipoproteína-B.

Para la purificación de las lipoproteínas, se tomó como punto de partida plasma obtenido de sangre citratada de pacientes con distintos grados de aterosclerosis periférica, atendidos en el Instituto de Angiología. Las lipoproteínas se obtuvieron mediante ultracentrifugación durante 24 h, a 105 000 g y a 15°C, utilizándose KBr sólido para ajustar la densidad del plasma a 1,21 g/ml. Las diferentes fracciones de lipoproteínas se separaron por gel-filtración en Sepharosa 6B (*Pharmacia Fine Chemical*) empleando una columna de 2 • 100 cm y eluyendo con buffer Tris-HCl pH 7,4 al que se añadió EDTA 1mM y azida sódica al 0,02%. Las fracciones correspondientes a LDL y VLDL se identificaron por inmunoelectroforesis y electroforesis en gel de poliacrilamida. Se comprobó la presencia de apoB y la ausencia de proteínas contaminantes utilizando anticuerpos específicos contra la apoB y contra suero humano total. A cada fracción se le determinó la concentración proteica (Lowry y col., 1951).

Para la obtención de los anticuerpos monoclonales se inmunizaron dos grupos de ratones BALB/C, uno de ellos con LDL y el otro con VLDL. Cada animal recibió una primera dosis de 100 µg de lipoproteína mezclada con adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea. Se repitió la dosis a los 14 días por vía intraperitoneal empleando adyuvante incompleto, y siete días después se probó el título de anticuerpos de cada animal por ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA). Este se realizó en placas de microtitulación de polivinilo, recubiertas con LDL o VLDL a una concentración de 40 µg/ml. Posteriormente se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% en PBS, se añadieron las muestras y se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de lavar las placas, se colocaron en cada pocillo 100 µl de anticuerpos de chivo, anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Biochemicals, Inc.*) y los resultados fueron revelados con una solución que contenía 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 40 mg de ortofenilendiamina en 100 ml de solución tamponada de fosfato-citrato, pH 5,1. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5M y las lecturas de densidad óptica se realizaron en un lector de placas (Titertek, Multiskan MCC/340, Flow Lab.).

Los animales que mostraron un mayor título de anticuerpos recibieron una dosis de 50 µg de LDL o VLDL por vía intravenosa y fueron sacrificados para la fusión cuatro días después. Esta se realizó empleando células de mieloma murino de la línea no secretora P3/X63 Ag8.6.5.3. y los linfocitos aislados del bazo de los animales seleccionados. Ambas células se mezclaron en relación 1:5 linfocitos/mieloma, empleando polietilenglicol (PM:1000, Merck) como agente promotor de la fusión. Se colocaron un total de 1 • 10<sup>5</sup> células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. De la fusión correspondiente a las LDL se obtuvieron seis placas, y ocho placas de la correspondiente a las VLDL. Las células se cultivaron en medio selectivo HAT (hipoxantina-timidina-aminopterina) suplementado con suero fetal de ternero al 10% y "sobrenadante metabolizado" (medio condicionado) al 3%. Se tomaron muestras de sobrenadantes de los pocillos en que los híbridos formados alcanzaban subconfluencia (a partir del décimo día de la fusión), y se analizó la presencia de anticuerpos antilipoproteínas por la técnica de ELISA ya descrita. Se empleó como control negativo sobrenadante de hibridomas irrelevantes, y como control positivo antisuero policlonal murino contra lipoproteínas de baja y de muy baja densidad.

Se obtuvo un total de 85 híbridos positivos de la fusión de VLDL y 36 de la fusión de LDL, los cuales se expandieron y se conservaron células a -70°C, y en nitrógeno líquido. El porcentaje de híbridos obtenidos en la fusión de LDL fue mayor que en la de VLDL, sin embargo, el número de estos que resultaron secretores de anticuerpos contra lipoproteínas fue significativamente mayor en esta última (ver cuadro 1).

Cuadro 1

<i>Fusión</i>	<i>Eficiencia de fusión</i>	<i>Híbridos positivos</i>	<i>AcM caracterizados clases y subclases</i>
LDL	58%	11%	IgG <sub>1</sub> k: L2E6E8, L2E6D11 L6G1G6, L4A1C1
VLDL	17%	64%	IgG <sub>1</sub> k: V4B11G11, V4B11F4, V2F6F3, V2F6C10, V1D10D9, V1D10H3, V4C12A4 IgG <sub>2b</sub> k: V3A2A4

AcM: Anticuerpos monoclonales

De los híbridos positivos se seleccionaron seis de VLDL y cuatro de LDL para su clonaje y reclonaje por dilución limitante en placas de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones más positivos según el mismo proceder de ensayo inmunoenzimático en fase sólida, expandiéndose tanto para la conservación de células como para la producción de anticuerpos a partir de sobrenadantes de cultivo y de ascitis en ratones BALB/C.

Para la determinación de las clases y subclases de los anticuerpos monoclonales producidos, se empleó la técnica de doble inmunodifusión en gel y un ELISA por competencia (Marcovina y col., 1984), utilizándose antisueros comerciales (*Miles Lab.*). Del total de anticuerpos producidos se clasificaron 11 como IgG<sub>1</sub>k y uno como IgG<sub>2b</sub>k. Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en el cuadro 1.

## REFERENCIAS

- ASSMANN, G. (1982). *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Ed. F. K. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart, Germany, p. 156.
- AVOGARO, P.; G. CAZZOLATO; G. BITTOLO BON y G. B. QUINCI (1979). *Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis?* *Lancet* 1: 901-903.
- 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: 493-597.
- KANE, J. P. (1983). *Apolipoprotein B: Structural and metabolic heterogeneity*. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 637-650.
- KOHLER, G. y C. MILSTEIN (1975). *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 256: 495-497.
- LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGH; A. L. FARR y R. J. RANDALL (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARCOVINA, S.; L. CREMONESI; P. J. PRICE y J. S. McDOUGAL (1984). *Production and immunochemical study of monoclonal antibodies directed against human low density lipoprotein*. *Develop. Biol. Standard* 57: 399-407.
- MILNE, R. W. y Y. L. MARCEL (1985). *The use of monoclonal antibodies to prove human apolipoprotein B structure and function*. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 63: 906-912.
- PATTON, J. G.; J. J. BADIMON y S. J. T. MAO (1983). *Monoclonal antibodies to human plasma low-density lipoprotein. II. Evaluation for use in radioimmunoassay for apolipoprotein B in patients with coronary artery disease*. *Clin. Chem.* 29: 1898-1903.
- SNIDERMAN, A. D.; C. WOLFSON; B. TEN; F. A. FRANKLIN; P. S. BACHORIK y P. O. KWITEROVICH (1982). *Association of hyperapobetalipoproteinemia with endogenous hypertriglyceridemia and atherosclerosis*. *Ann. Intern. Med.* 97: 833-839.

Luis Sorell Gómez<sup>1</sup>, María Elena Fernández de Cossío<sup>2</sup>,  
Eduardo Pentón Arias<sup>2</sup>, Justo López Ruiz<sup>3</sup> e Isabel Cristina Pérez Rodríguez<sup>3</sup>

1) Instituto de Angiología y Cirugía Vasculard,  
Calzada del Cerro 1551, Ciudad de La Habana, Cuba

2) Centro de Investigaciones Biológicas,  
Apdo. 6996, Ciudad de La Habana, Cuba

3) Centro Nacional de Investigaciones Científicas,  
Ave. 25 y calle 158, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba