

## Comparación de la cuantificación de ApoB lipoproteínas, utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante técnicas inmunoenzimáticas tipo ELISA

L. SORELL<sup>1</sup>, J. LÓPEZ<sup>1</sup>, M. CABRERA<sup>1</sup> y N. DÍAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, Calzada del Cerro No. 1551, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado 6880, La Habana, Cuba

Recibido en julio de 1988

### RESUMEN

Se realizó la determinación de los niveles de ApoB en muestras de suero obtenidas de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, empleando para ello sistemas inmunoenzimáticos ELISA tipo *sandwich*. Las variantes de ELISA evaluadas fueron: anticuerpos policlonales de captura y anticuerpos policlonales conjugados con peroxidasa en el revelado (policlonal), anticuerpo monoclonal (AcM) IA/CB-LDL.1 de captura y anticuerpos policlonales en el revelado (combinada), y AcM IA/CB-LDL.1 de captura y AcM IA/CB-VLDL.2 conjugado en el revelado (monoclonal).

La correlación entre los valores de concentración de ApoB medidos por las variantes monoclonales y policlonal, así como policlonal y combinada, fueron de  $r = 0,81$  y  $0,83$  respectivamente. La correlación entre las variantes "monoclonal" y "combinada" fue mayor, para  $r = 0,961$ . El AcM empleado en la fase sólida probablemente determina en estos dos últimos casos la especificidad del sistema.

Se encontró una ligera tendencia hacia valores más altos, en las muestras de mayor concentración de ApoB, para los sistemas que empleaban el AcM IA/CB-LDL.1 como anticuerpo de captura, lo que pudiera interpretarse como que este reconoce determinantes antigénicos presentes en variantes estructurales de esta molécula, más representados en algunos individuos, y cuya significación clínica es objeto de estudios actuales.

### SUMMARY

The levels of ApoB were determined in serum samples obtained from the umbilical cord blood of newborns, using ELISA enzyme immunoassays of the sandwich type. The tested ELISA variants were: polyclonal antibodies as capture antibodies, and peroxidase conjugated polyclonal antibodies as revealing reagents (polyclonal), the monoclonal antibody (MAb) IA/CB-LDL.1 as capture antibody, and conjugated polyclonal antibodies (combined), and the MAb IA/CB-LDL.1 as capture antibody, and conjugated MAb IA/CB-VLDL.2 (monoclonal). The correlation between the ApoB concentration values estimated with the monoclonal and polyclonal variants, as well as with the polyclonal and combined variants were  $r = 0.81$  and  $0.83$ , respectively. The correlation between the monoclonal and combined variants was higher, for  $r = 0.961$ . The MAb used in the solid phase probably determines in this last case the specificity of the system.

We found a slight tendency for higher values, in the samples with higher concentrations of ApoB, for the systems that used the MAb IA/CB-LDL.1 as capture antibody; this could be interpreted as if this MAb could recognize antigenic determinants present in structural variants of this molecule, more represented in some individuals, and with a clinical meaning now subjected to study.

## INTRODUCCION

La apoproteína B (ApoB) está presente en las lipoproteínas consideradas más aterogénicas, en particular en las de baja densidad (LDL), que transportan gran parte del colesterol hacia los tejidos, habiéndose encontrado una correlación significativa entre altos niveles de ApoB y una mayor incidencia de enfermedad cardiovascular (Avogaro *et al.*, 1979; Kukita *et al.*, 1984).

Entre los métodos inmunoquímicos más empleados para la cuantificación de ApoB en suero están el electroinmunoensayo, la inmunodifusión radial simple, el radioinmunoensayo y los ensayos inmunoenzimáticos. En ellos se han empleado antisueros o anticuerpos policlonales de diverso origen, obteniéndose valores diferentes para las cifras normales de ApoB reportadas por distintos autores (Assman, 1982).

Más recientemente se ha descrito el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) contra la ApoB para estos mismos fines, aprovechando su mayor homogeneidad y la posibilidad de obtenerlos en cantidades ilimitadas, lo que posibilita ensayos de alta reproducibilidad y el estudio de gran cantidad de muestras (Marcovina *et al.*, 1985; Slater *et al.*, 1985). La obtención de AcM contra distintas apoproteínas ha abierto también nuevas perspectivas en el estudio de las dislipoproteinemias. En particular, los AcM que identifican la ApoB han posibilitado un sustancial avance en el conocimiento de esta compleja molécula, facilitando el análisis de la interrelación estructural de la ApoB 100 y otras subespecies de ApoB, como las ApoB 48, ApoB 24 y ApoB 76 (Knott *et al.*, 1987; Hospattankar *et al.*, 1986; Cladars *et al.*, 1986; Marcel *et al.* 1982).

En cuanto a su utilidad diagnóstica, algunos autores han señalado que su empleo en la cuantificación de esta apoproteína ha permitido una mejor discriminación entre individuos con cardiopatía isquémica o sin ella, con respecto a cuando emplearon anticuerpos policlonales (Patton *et al.*, 1983). Estos resultados reflejan la posibilidad de que los AcM permitan detectar alguna(s) fracciones lipoproteicas que contienen ApoB con un marcado carácter aterogénico.

No obstante, la complejidad estructural de la ApoB, unida a la exquisita especificidad de los AcM, obliga a que la introducción de estos biorreactivos en tales procedimientos de cuantificación de ApoB deba estar precedida de estudios comparativos, donde los resultados se evalúen con respecto a aquellos obtenidos mediante antisueros policlonales contra esta molécula. Estos trabajos cobran especial importancia a causa del potencial valor diagnóstico y pronóstico de la cuantificación de ApoB en algunos estados patológicos y situaciones de riesgo. En los últimos años han aparecido algunos reportes que muestran la utilidad del empleo de AcM en los inmunoensayos para la determinación de ApoB (Riesen *et al.*, 1986; Marcel *et al.*, 1986; Ordovas *et al.*, 1987; Fievet *et al.*, 1985).

Nosotros hemos obtenido recientemente varios AcM que reaccionan con la ApoB (Sorell *et al.*, 1986). Estos anticuerpos se encuentran en proceso de evaluación para su aplicación en técnicas inmunohistoquímicas para la detección de ApoB en pared vascular, así como para la construcción de sistemas inmunoenzimáticos. En este trabajo comparamos la cuantificación de ApoB lipoproteínas mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), con el empleo de dos de nuestros AcM monoclonales, anticuerpos policlonales y la combinación de ambos.

## MATERIALES Y METODOS

### Anticuerpos monoclonales y policlonales

Los hibridomas secretores de los AcM de ratón IA/CB-LDL.1 e IA/CB-VLDL.2 de la subclase IgG1 (k), y que reconocen epitopes diferentes de la molécula de ApoB, fueron generados según se reportó en un trabajo anterior

(Sorell et al., 1986). El primero se empleó como anticuerpo de captura y el segundo fue acoplado a la enzima peroxidasa de rábano picante (Nakane y Kawaoi, 1974). Ambos AcM fueron purificados a partir de fluidos ascíticos mediante cromatografía de afinidad en proteína A Sepharosa (Pharmacia), tal como se ha descrito en otras publicaciones (Duarte, et al., 1987).

Los anticuerpos policlonales contra la ApoB fueron obtenidos del suero de un carnero hiperinmune y fueron purificados por cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa CL4B, activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia), a la cual se le acopló LDL humana purificada por ultracentrifugación y gel filtración (Sorell et al., 1986). Parte de estos anticuerpos fueron conjugados con peroxidasa siguiendo el procedimiento antes mencionado.

## Muestras y suero patrón

Las muestras de suero a analizar fueron obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical de recién nacidos vivos, conservados por no más de siete días a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La concentración de ApoB en las muestras se determinó empleando un suero patrón preparado a partir de un pool de sueros de donantes del Banco de sangre, al que se le añadió EDTA, azida sódica, gentamicina, fenilmetilsulfonilfluoruro y sacarosa, a concentraciones finales de 1 mM, 0,01%, 80 mg/l, 1 mM y 3% respectivamente. El suero fue filtrado en condiciones de esterilidad por 0,22 micras, envasado en alícuotas y liofilizado. La concentración de ApoB en este suero patrón se determinó repetidamente (20 veces) por electroinmunoensayo y por ELISA, empleando para ello un suero patrón comercial (ApoB-Standard Serum, Behring, lot. 042236F). Fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo.

## Condiciones del ELISA

Se recubrieron placas de microtitulación de poliestireno (Dynatech) con 100  $\mu\text{l}$  del AcM IA/CB-LDL1, o con el anticuerpo policlonal, a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante tres horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , o toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pozo, por duplicado o cuadruplicado, para cada dilución apropiada de las muestras (usualmente entre 1:100 y 1:200, en solución salina tamponada con fosfato < SSTF > con 1% de leche descremada) y de distintas diluciones del suero patrón (desde 1:100 hasta 1:3 200, en igual solución), incubándose durante una hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron repetidamente en agua destilada-Tween 20 al 0,05% y se añadieron a cada pozo 100  $\mu\text{l}$  del AcM IA/CB-VLDL2, o de los anticuerpos policlonales, conjugados con peroxidasa (a diluciones de 1:1 000 y 1:2 000, respectivamente, en igual solución). Luego de una incubación de una hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron como fue descrito anteriormente, y se añadieron a cada pozo 100  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato (0,05% de ortofenilendiamina, en tampón citrato-fosfato pH 5,0, con 0,05% de peróxido de hidrógeno al 30%).

La reacción se detuvo a los 15 minutos con 50  $\mu\text{l}$  por pozo de ácido sulfúrico 2,5 M, y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector automático de placas modelo Titertek Multiskan MCC-340.

## RESULTADOS

En la figura 1 se muestra un esquema representativo del ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, empleando para la cuantificación de ApoB. Como se observa, se construyeron tres variantes: un ELISA con anticuerpos policlonales, tanto para la captura como para el revelado, un ELISA combinado con el AcM IA/CB-LDL.1 como anticuerpo de captura y los anticuerpos policlonales en el revelado, y finalmente, un ELISA con AcM. Estas variantes serán denominadas desde ahora policlonal, combinada y monoclonal, respectivamente.

En la figura 2 se muestran las curvas típicas de absorbancia contra concentración de ApoB en el suero patrón, cuando se emplea el AcM IA/CB-LDL.1 como anticuerpo de captura, y los anticuerpos policlonales o el AcM IA/CB-VLDL.2, conjugados con peroxidasa, como anticuerpos de revelado. Se observa una buena linealidad para los valores entre 20 y 120 ng/ml en ambos casos, con una sensibilidad de alrededor de 10 ng/ml. En estas condiciones, la variabilidad intraensayo, para muestras por cuadruplicado arrojó un coeficiente de variación menor de 5.

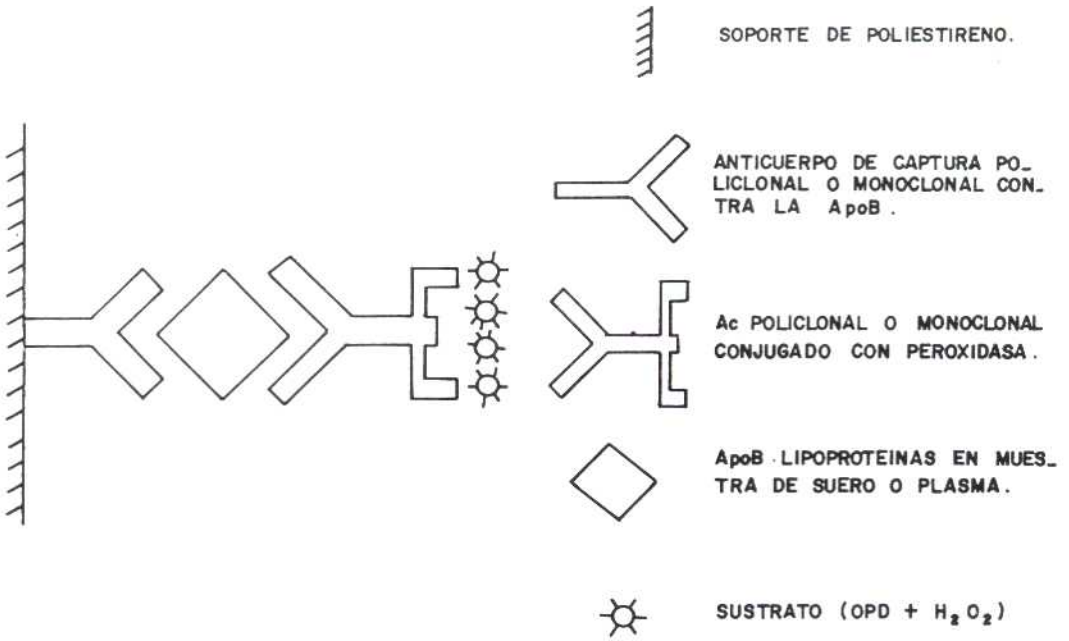


FIG. 1. Construcción básica de las diferentes variantes de ELISA para ApoB.

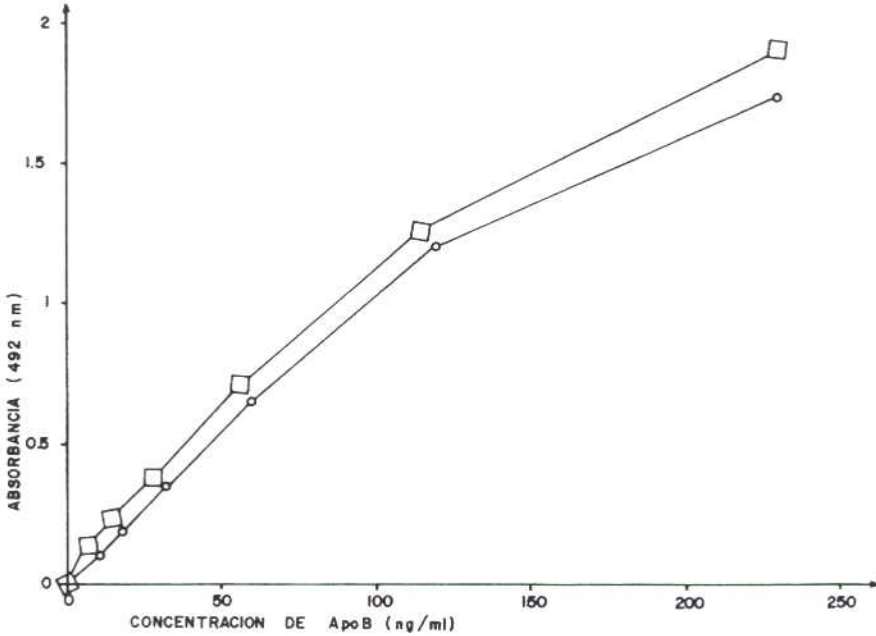


FIG. 2. Curvas estándares a partir del suero patrón, empleando en el ELISA el AcMIA/CB-LDL.1 como anticuerpo de captura y (□) los anticuerpos policlonales, o (○) el AcMIA/CB-VLDL.2, conjugados con peroxidasa. Diluciones de 1:2 000 y 1:1 000, respectivamente.

La figura 3 presenta la correlación de los valores de ApoB estimados por las variantes policlonal y monoclonal del sistema ELISA. En este caso, el coeficiente de regresión estimado fue de  $r = 0,81$ , algo inferior al calculado cuando la comparación se realizó entre la variante policlonal, y el sistema ELISA combinado ( $r = 0,83$ ), que se muestra en la figura 4.

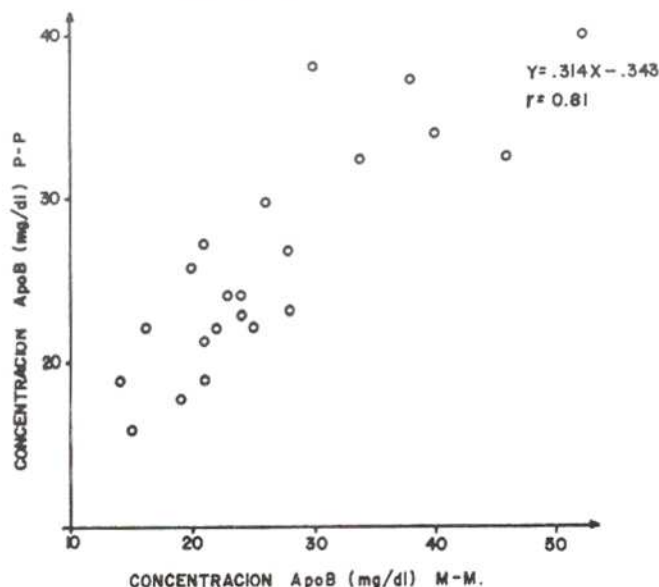


FIG. 3. Correlación entre la concentración de ApoB medida por los sistemas ELISA variante policlonal (P-P) y monoclonal (M-M).

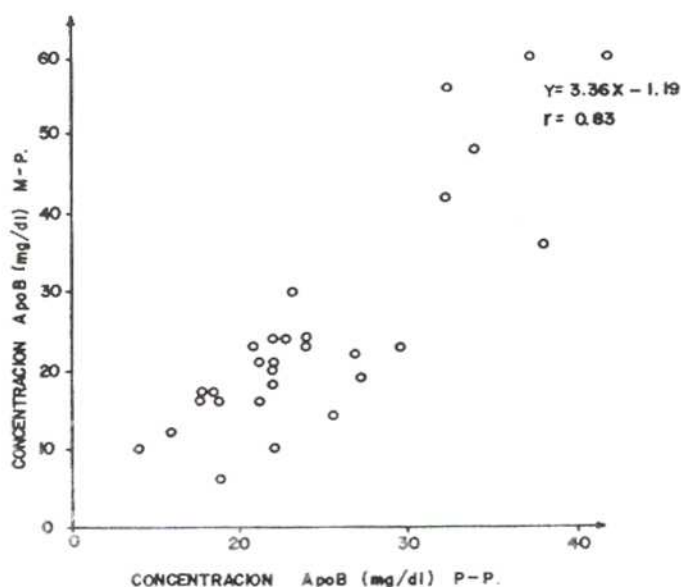


FIG. 4. Correlación entre la concentración de ApoB medida por los sistemas ELISA variante policlonal (P-P) y combinada (M-P).

Por último, la figura 5 muestra la correlación entre los valores de ApoB calculados a partir del sistema ELISA combinado y la variante monoclonal. En este caso, el valor del coeficiente de correlación fue muy alto (0,961).

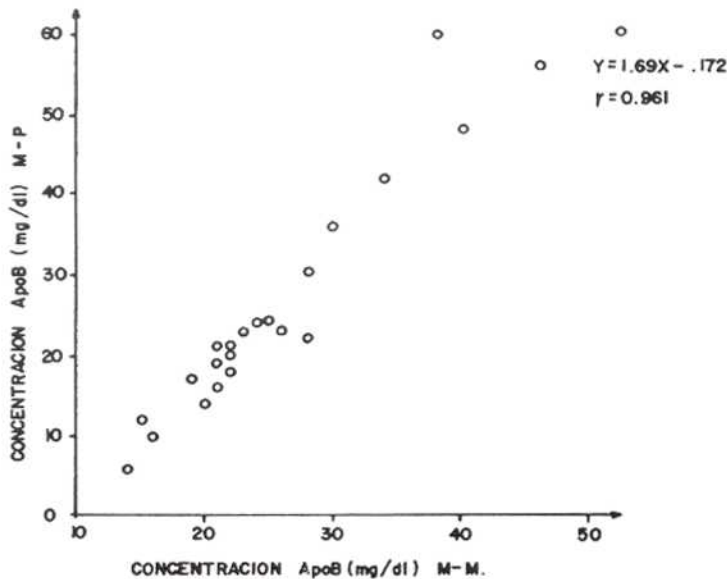


FIG. 5. Correlación entre la concentración de ApoB medida por los sistemas ELISA variante monoclonal (M-M) y combinada (M-P).

## DISCUSION

En nuestro estudio se puso en evidencia que las mediciones de ApoB mediante el sistema ELISA que empleaban diferentes anticuerpos de captura (variante monoclonal vs. variante policlonal, y variante combinada vs. variante policlonal), exhibieron correlaciones aceptables ( $r = 0,81$  y  $0,83$ , respectivamente), lo que es indicativo de que nuestros AcM pueden ser empleados para ensayos de cuantificación de ApoB en muestras de suero. La alta correlación encontrada entre los valores resultantes de las variantes monoclonal y combinada ( $r = 0,961$ ) indica que el AcM IA/CB-LDL.1, empleado en ambos casos como anticuerpo de captura, define probablemente la especificidad de reconocimiento del sistema; ello tiene un indudable valor práctico, pues ambas variantes pueden ser empleadas indistintamente para la cuantificación de la ApoB.

La ligera tendencia hacia valores mayores en los sistemas que emplean el AcM IA/CB-LDL.1 como anticuerpo de captura, para las muestras con mayor concentración de ApoB, y la ausencia de la tendencia contraria (muestras que dieran valores altos de ApoB, medidas como la variante policlonal y bajos con las otras variantes), pudiera reflejar la posibilidad de que el AcM IA/CB-LDL.1 esté reconociendo epitopes presentes en variantes estructurales de la ApoB, más representadas en algunos individuos.

En un estudio anterior (resultados no publicados), donde se evaluó la concentración sérica de ApoB con la variante ELISA monoclonal, nosotros obtuvimos una mejor discriminación entre individuos con enfermedad vascular periférica, con respecto a un grupo control, a cuando se empleó el colesterol sérico, lo que pudiera indicar que tales variantes estructurales de ApoB serían particularmente aterogénicas.

En los últimos años se ha desarrollado un especial interés por las lipoproteínas de estructura alterada, que no pueden ser adecuadamente metabolizadas por sus receptores celulares específicos. En el caso de la ApoB se ha observado que las alteraciones químicas de su estructura (acetilación, metilación, etcétera), ocasionan su no reconocimiento por receptores específicos de alta afinidad (Haberland *et al.*, 1987), facilitándose su reconocimiento por una vía independiente en estos receptores (Kesaniemi *et al.*, 1987; Firendrich *et al.*, 1986). *In vivo*, la estructura de la ApoB puede ser alterada por procesos de peroxidación (Jurgens *et al.* 1987; Steinbrecher *et al.*, 1987), glicosilación (Curtiss *et al.*, 1983) y otros que pudieran conducir a la acumulación de estas lipoproteínas en el plasma, y favorecer la vía independiente de receptores de alta afinidad, ya mencionada.

Otra posibilidad no menos importante de formación de variantes estructurales de lipoproteínas, se debe al observado polimorfismo genético existente para la ApoB (Shumaker *et al.*, 1984; Tsao *et al.*, 1982; Schlapfer *et al.*, 1987), algunas de las cuales podrían estar asociadas a un mayor riesgo de padecimiento de enfermedades cardiovasculares.

La verificación de significación clínica definitiva de nuestros resultados, requiere ahora experimentos complementarios, más aún si tomamos en consideración que en este estudio se analizaron muestras de suero de recién nacidos, donde parece existir una correlación entre los niveles de ApoB circulante y las características similares en los padres (Kukita, 1984). En el presente también están en ejecución ensayos donde se evalúan otros AcM, obtenidos a partir de inmunizaciones con ApoB extraída de aorta ateromatosa humana (artículo en preparación).

## REFERENCIAS

- ASSMAN, G. (1982). *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Ed. F. K. Schattauer, Springer Verlag GmbH, Stuttgart, p. 156.
- AVAGARO, P.; G. CAZZOLATO, G. BITTOLO BON y G. B. QUINCI (1979). *Are lipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis?* Lancet 1: 901-903.
- CLADARAS, C.; M. HADZOPOULOU-CLADARAS; R. NOLTEY; D. ATKINSON y V. IZANNIS (1986). *The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms*. EMBO Journal 5: 3495-3507.
- CURTIS, L. K. y J. L. WITZTUM (1983). *A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. Application to the identification of human glycosylated low density lipoproteins*. J. Clin. Invest. 72: 1427-1438.
- DUARTE, C.; M. E. FERNANDEZ; G. SIERRA; E. PENTON; A. AGRAZ; G. FURRAZOLA y A. AGUILERA (1987). *Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa 2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno*. Interferón y Biotecnología 4: 221-232.
- 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. Intéret de nouveaux marqueurs*. Ann. Biol. Clin. 43: 493-517.
- FRIEDRICH, E. A.; H. A. DRESELY y H. SINN (1986). *"Acetylated low density lipoprotein and maleylated bovine serum albumin uptake by sinusoidal liver cells"*. en: *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Vol. 1, Eds. A. Kim, D. L. Knook, E. Wisse, pp. 149-151.
- HABERNAMD, M. E. y A. M. FOGELMAN (1987). *The role of altered lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis*. Am. Heart. Journal 113: 573-577.
- HOSPATTANKAR, A. V.; T. FAIRWELL; M. MENG; R. RONAN y H. BRYAN (1986). *Identification of sequence homology between human plasma apolipoprotein B-100 and apolipoprotein B-48*. J. Biol. Chem. 261: 9102-9104.

- JURGENS, G.; H. F. HOFF; G. M. CHISOLM y H. ESTERBAUER (1987). "Modification of human serum low density lipoproteins by oxidation. Characterization and pathophysiological implications", en: *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol. 45, Elsevier Scientific Pub., pp. 315-336.
- KESANIEMI, Y. A.; K. KERVINEN y T. A. MIETTINEN (1987). *Acetaldehyde modification of low density lipoprotein accelerates its catabolism in man*. Eur. J. Clin. Invest. 17: 29-36.
- KNOTT, T. J.; R. J. PEASE; L. M. POWELL; S. C. WALLIS; S. C. RALL; T. L. INNERARITY; B. BLACKHAST; W. H. TAYLOR; Y. MARCEL; R. MILNES; D. JOHNSON; M. FULLER; A. J. LUSIS; B. J. McCARTHY; R. W. MAHELY; B. LEVY-WILSON y J. SCOTT (1986). *Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B*. Nature 323: 734-738.
- KUKITA, H. (1984). *Serum apolipoprotein A1, A2, and B levels, and their discriminative values in relatives of patients with coronary artery disease*. Atherosclerosis 51: 261-267.
- MARCEL, V. L.; P. K. WEECH y R. W. MILNE (1986). *Application des anticorps monoclonaux a la mesure des apolipoproteins*. Ann. Biol. Clin. 44: 536-544.
- MARCEL, Y. L.; M. HOGUE; R. THEOLIS y R. W. WILNE (1982). *Mapping antigenic determinants of human apolipoprotein B using monoclonal antibodies against low density lipoproteins*. J. Biol. Chem. 257: 13165-13168.
- MARKOVINA, S.; G. DICOLA; C. RAPETTO; C. FIEVET; V. CLAVEY y J. C. FRUCHART (1985). *Development of radial immunodiffusion technique employing monoclonal antibodies for apolipoprotein B determination in human plasma*. Cli. Chim. Acta. 147: 117-125.
- NAKANE, P. A. y A. KAWAOI (1974). *Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation*. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084-1091.
- ORDOVAS, J. M.; J. PETERSON; P. SANTANIELLO; J. S. COHN; P. WILSON y E. J. SCHAEFFER (1987). *Enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein B*. J. Lipid. Res. 28: 1216-1224.
- PATTON, J. G.; J. J. BADIMON y S. MAO (1983). *Monoclonal antibodies to human low density lipoprotein. II. Evaluation for use in radioimmunoassay for apolipoprotein B in patients with coronary artery disease*. Clin. Chem. 29: 1898-1903.
- RIESEN, W. F.; E. STURZENEGGER; C. IMHOF y R. MORDASINI (1986). *Quantitation of apolipoprotein B by polyclonal and monoclonal antibodies*. Clin. Chim. Acta 154: 29-40.
- SCHLAPFER, P.; T. NYDEGGER; E. BUTTER-BRUNNER; J. J. MORGENTHALER; R. BUTLER y K. BLASER (1987). *Two monoclonal antibodies that discriminate between allelic variants of human low density lipoprotein*. Hybridoma 6: 575-588.
- SCHUMAKER, V. N.; M. T. ROBINSON; L. CURTISS; R. BUTLER y R. S. SPARKES (1984). *Antiapoprotein B monoclonal antibodies detect human low density lipoprotein polymorphism*. J. Biol. Chem. 259: 6423-6430.
- SLATER, H. R.; R. W. TINDLE; C. J. PACKARD y J. SHEPHERD (1985). *A monoclonal antibody based immunoradiometric assay for apoprotein B in low density lipoprotein*. Clin. Chem. 37: 841-845.
- SORELL, L.; M. FERNANDEZ DE COSSIO; E. PENTON; J. LOPEZ e I. C. PEREZ (1986). *Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen apoproteína B*. Interferón y Biotecnología 3: 239-241.
- STEINBRECHER, U. P. (1987). *Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxidase decomposition products*. J. Biol. Chem. 262: 2603-3608.
- TSAO, B. P.; L. CURTISS y T. S. EDGINGTON (1982). *Immunochemical heterogeneity of human plasma apolipoprotein B*. J. Biol. Chem. 257: 15222-15228.