*Biotecnología aplicada, Vol. 7, No. 1, 58-65 (1990)*

# Anticuerpos monoclonales para la cuantificación de apolipoproteína A1

**L. SORELL,[1] M. E. PÉREZ,[2] M. RODRÍGUEZ,[2] M. CABRERA,[2] M. B. TORRES,[3] A. CÍVICO,[1] H. ALVAREZ,[1] E. ZACCA[1] y E. RODRÍGUEZ[1]**

**[1] Instituto de Angiología y Cirugía Vascular, Calzada del Cerro 1551, Cerro, La Habana, Cuba**

**[2] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba**

**[3] Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, 17 y A, Vedado, La Habana, Cuba**

*Recibido en junio de 1989*
*Aprobado en julio de 1989*

## RESUMEN

Se describe la producción de anticuerpos monoclonales (AcMs) de ratón contra la apolipoproteína A1 (APO A1), a partir de la inmunización de ratones BALB/c con APO A1 purificada de plasma humano. Los anticuerpos obtenidos son de la clase IgG1 y fueron purificados a partir de líquido ascítico mediante cromatografía de afinidad con Proteína A Sepharosa. Dos de ellos, que reconocen sitios diferentes de la molécula de APO A1, fueron empleados en un sistema ELISA tipo *sandwich* para la cuantificación de la APO A1 en muestras de suero. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3,4 y 10% respectivamente. Con este sistema se detectaron niveles disminuidos de APO A1 en pacientes con infarto agudo del miocardio entre 45 y 80 años, y en un grupo con aterosclerosis periférica entre 40 y 49 años, con relación a sujetos controles de igual rango de edad. En los pacientes con aterosclerosis periférica de mayor edad (entre 60 y 80 años), aunque se encontraron valores de APO A1 más bajos que el grupo control respectivo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

## SUMMARY

Monoclonal antibodies (Mabs) against APO A1 were produced immunizing BALB/c mice with APO A1 isolated from human plasma. They were IgG1 class. Three of them were purified from ascitic fluid by affinity chromatography using Protein A Sepharose. Two Mabs recognizing different antigenic determinant in APO A1 were selected for a sandwich ELISA. The intra and inter assay coefficients of variation were 3,4 and 10% respectively. This system was used for APO A1 determination in serum samples. Patients with acute myocardial infarction between 45 and 80 years and those with peripheral atherosclerosis between 40 and 59, showed significant lower values for APO A1 respect to healthy controls. Older patients with peripheral atherosclerosis (between 60 and 80 years) did not show significant decreased levels of APO A1.

## INTRODUCCION

En los últimos años ha alcanzado gran interés el estudio de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), tomando en consideración que se ha observado una correlación inversa entre los niveles de estas lipoproteínas y el riesgo a la enfermedad aterosclerótica (Miller *et al.*, 1975; Gordon *et al.*, 1977; Riesen *et al.*, 1980).

La apolipoproteína A1 (APO A1) es el mayor constituyente proteico de las HDL y ha sido demostrado que bajas concentraciones de ella están relacionadas con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Albers *et al.*, 1976; Vergain *et al.*, 1978).

Esto ha motivado el desarrollo de diferentes métodos, principalmente

**Copyright © 1990, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud. Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba**

### Condiciones del ELISA para la cuantificación de la APO A1

Para el desarrollo de un ELISA tipo *sandwich* para la cuantificación de APO A1 en muestras de suero, se seleccionaron el AcM Apo A1.2 como anticuerpo de recubrimiento y el Apo A1.1, que fue conjugado a la enzima peroxidasa por el método del peryodato (Nakane, Kawaoi, 1974), como anticuerpo de revelado.

Se recubren placas de poliestireno con 100 $\mu$l del AcM Apo A1.2 a una concentración de 10 $\mu$g/ml en tampón bicarbonato 0,1 M pH 9,6 durante toda la noche, a temperatura ambiente o tres horas a 37°C. Se lava dos veces con agua destilada con Tween 20 al 0,05% y se añaden por duplicado 100 $\mu$l de las muestras de suero diluidas apropiadamente (usualmente 1:2000-1:4000) en tampón fosfato salino con suero de carnero al 5%, y distintas diluciones de un suero patrón de concentración de APO A1 conocida. En nuestro caso, este suero patrón se preparó como fue descrito anteriormente (Sorell *et al.*, 1988) y en él la concentración de APO A1 fue estimada previamente empleando como referencia un suero patrón comercial (Apolipoprotein A Standard Serum, lot.041212, Behring).

Se incuban las muestras durante una hora a temperatura ambiente, se lavan las placas tres veces y se añade 100 $\mu$l por pozo del anticuerpo conjugado diluido 1:2000 en la misma solución en que se diluyen las muestras, incubándose durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se revela como fue descrito anteriormente para la selección de los híbridos secretores de AcMs.

La concentración de la APO A1 en las muestras es estimada a partir de una curva de titulación construida a partir de las concentraciones de APO A1 conocidas para las distintas diluciones del suero patrón y los valores de absorbancia correspondientes.

### Muestras

Los sujetos estudiados fueron un grupo de pacientes con aterosclerosis periférica, un grupo con infarto agudo del miocardio y un grupo control de individuos de rango de edad y distribución por sexo similar a la de los pacientes, sin antecedentes de enfermedad cardiovascular y en los que no se detectaron alteraciones en un chequeo vascular periférico.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Distintos investigadores han reportado recientemente el empleo de AcMs para la cuantificación de la APO A1 en muestras de suero. Marcovina y colaboradores (Marcovina *et al.*, 1986), describen un proceder de inmunodifusión radial simple para estos fines, mientras Ayrault-Jarrier y su grupo reportan, en 1988, un electroinmunoensayo con los mismos objetivos. Ambos procederes inmunoquímicos se fundamentan en el empleo de mezclas de AcMs para medir la concentración de la APO A1 a partir de su inmunoprecipitación en un medio semisólido.

Se han descrito sistemas inmunoenzimáticos tipo *sandwich* con empleo de anticuerpos policlonales para la cuantificación de la APO A1 (Dubois *et al.*, 1987) y más recientemente un sistema similar con AcMs (Doreen *et al.*, 1988).

En este estudio reportamos la producción de AcMs contra la APO A1 y el empleo de dos de ellos en un sistema ELISA tipo *sandwich* para la cuantificación de esta apoproteína en muestras de suero.

Se seleccionaron tres híbridos de la clase IgG1. La competencia de epitopes mostró que reconocían sitios diferentes de la molécula de APO A1. Como puede observarse en la figura 1, la combinación de dos cualesquiera de ellos, para una cantidad constante de APO A1 fijada a una placa de poliestireno y en condiciones de saturación de los anticuerpos (exceso de anticuerpos), arrojaron valores de densidad óptica (absorbancia) superiores a la de cualquiera de ellos por separado. Estos resultados solo se alcanzan si los AcMs reconocen sitios diferentes en la molécula de la APO A1.

A partir de este resultado se seleccionaron los AcMs Apo A1.1 y Apo A1.2 para el diseño de un ELISA tipo *sandwich* para la cuantificación de la APO A1 en muestras de suero descrito en Materiales y Métodos.

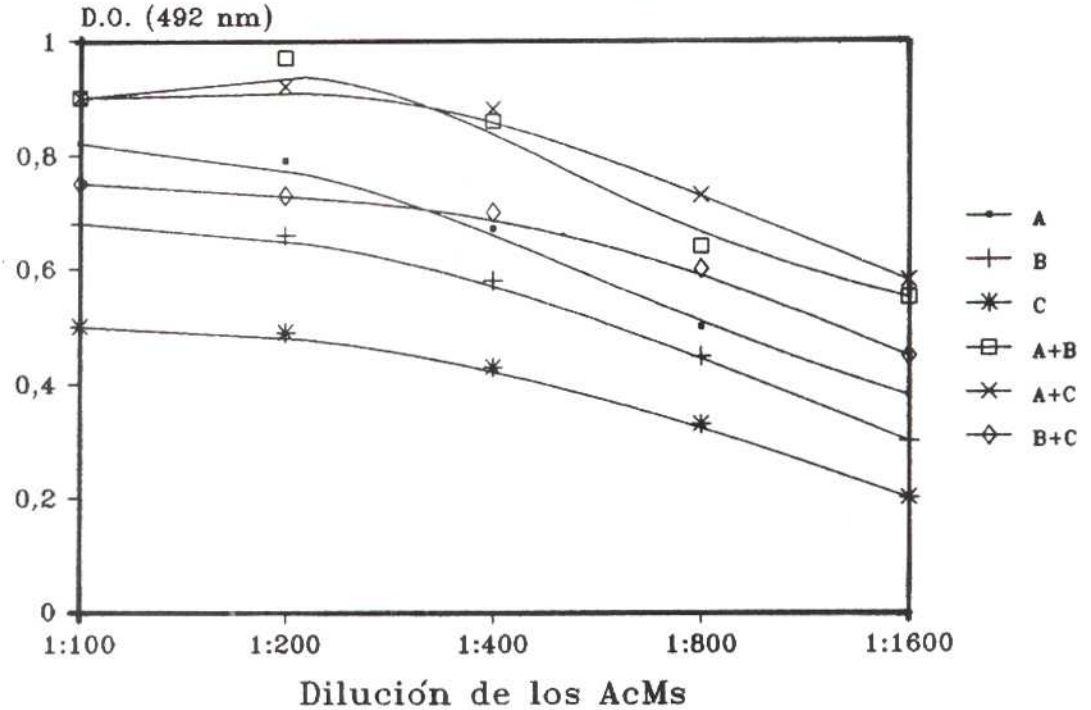



FIG. 1. Ensayo inmunoenzimático de competencia para el análisis del reconocimiento de epitopes en la molécula de la APO A1. Para ello se recubrieron placas de poliestireno a una concentración fija de APO A1 (5 $\mu$g/ml) y se emplearon distintas diluciones de los diferentes AcMs, solos o combinados. Se observa que reconocen epitopes diferentes, pues la suma de la respuesta (valores de absorbancia) de cada pareja formada por dos cualesquiera de ellos, es superior a la respuesta individual de cada uno por separado en la zona de saturación. *A* = AcM ApoA1.1 *B* = AcM Apo A1.2 *C* = AcM Apo A1.3

La sensibilidad de este sistema permitió la detección de la APO A1 hasta una concentración de 40 ng/ml, a partir del suero patrón (figura 2). Los coeficientes de variación intra e interensayo de este sistema, calculados a partir de la estimación de la concentración de la APO A1 en una misma muestra de manera repetida el mismo día y en días sucesivos, fueron de 3,4 y 10 % respectivamente. Este resultado indica una repetibilidad y reproducibilidad dentro de los límites aceptados para estos métodos.

Las figuras 3a y 3b muestran el "atrapamiento" de los AcMs Apo A1.1 y Apo A1.2 al ser incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente, con distintas concentraciones de HDL purificadas de plasma humano y con distintas diluciones de un suero humano fresco, antes de ser añadidos a una placa recubierta con APO A1 purificada, a una concentración de 5 $\mu$g/ml. Esto señala la capacidad de estos anticuerpos de reconocer la APO A1, no solo aislada, sino también en las HDL y en muestras de suero.

La figura 4 nos muestra los resultados de la cuantificación de la APO A1 con el sistema descrito, en muestras de suero de pacientes con distintas manifestaciones de la enfermedad aterosclerótica.

Los valores significativamente disminuidos de la APO A1 en los pacientes con infarto agudo del miocardio están en

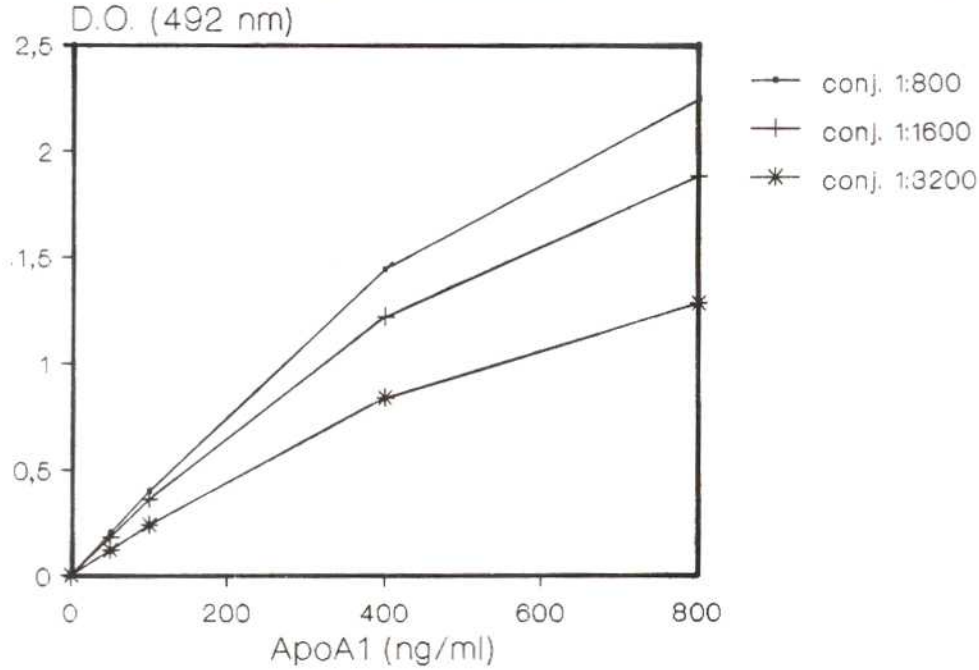
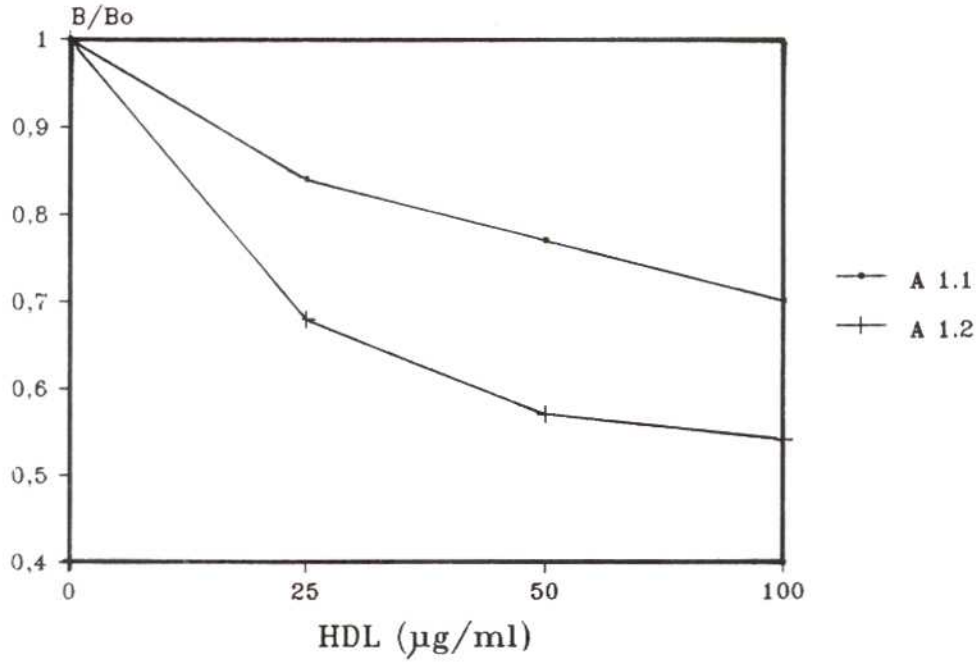



FIG. 2. Sensibilidad del sistema ELISA para la cuantificación de la APO A1, empleando una concentración fija de los anticuerpos de recubrimiento (10 $\mu$g/ml) y distintas diluciones del conjugado.

concordancia con los reportados por otros investigadores en pacientes con cardiopatía isquémica (Albers *et al.*, 1978; Vergain *et al.*, 1978). Particular interés tienen los resultados de los pacientes con aterosclerosis periférica. En nuestro estudio, aquellos con manifestaciones clínicas de la enfermedad en edades más tempranas, fueron los que tuvieron la disminución más marcada de los niveles de APO A1, mientras que en aquellos de edad más avanzada, la disminución observada no fue significativa.

En un estudio complementario a esta investigación (Sorell *et al.*, 1988), encontramos que para la apoproteína B (APO B), cuya alta concentración en sangre se correlaciona con un mayor riesgo a la aterosclerosis, los resultados fueron diferentes, en el sentido de la discriminación entre pacientes y controles. En ese caso, el nivel de la APO B estuvo significativamente elevado entre los pacientes con aterosclerosis periférica de mayor edad (entre 60 y 80 años), no así entre los más jóvenes (entre 40 y 59 años), con relación a los sujetos controles respectivos.

En conjunto estos resultados pueden sustentar la hipótesis de que los pacientes con aterosclerosis periférica más jóvenes presentan mayormente alteraciones lipídicas a nivel del metabolismo de las HDL, donde la APO A1 es la proteína mayoritaria, mientras que los pacientes de mayor edad las tienen a nivel del metabolismo de las LDL, en las cuales la APO B es prácticamente su único constituyente proteico. Se requiere un estudio con una muestra mayor para corroborar esta hipótesis.



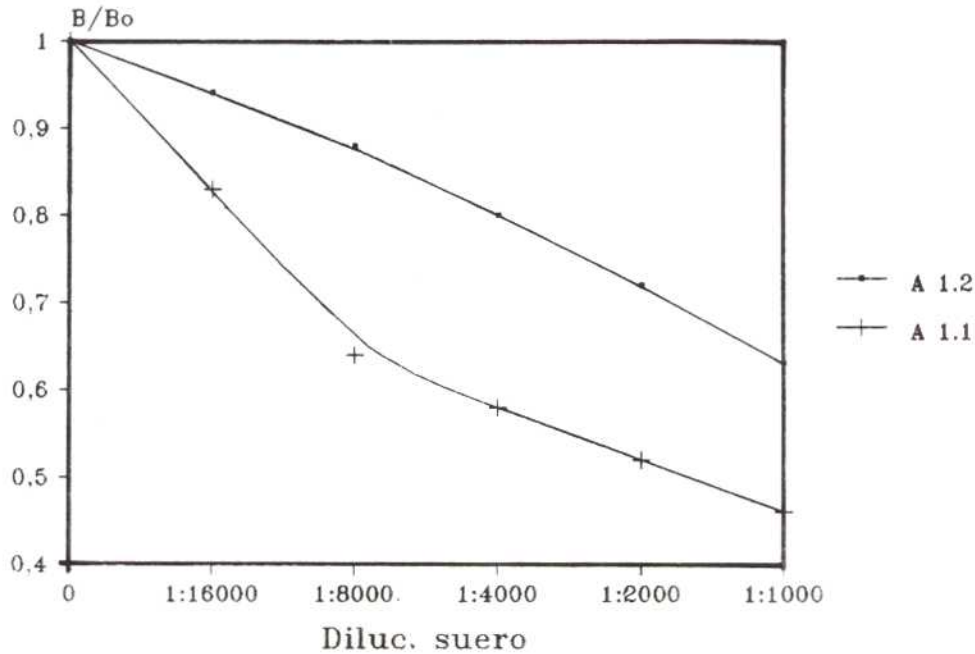




FIG. 3. Atrapamiento de los AcMs Apo A1.1 y Apo A1.2 incubados con HDL purificadas (3a) y con un suero humano fresco (3b), antes de ser añadidos a una placa recubierta con APO A1 purificada (5 $\mu$g/ml). Bo representa el valor de densidad óptica (D.O.) para los AcMs solos y B el valor de D.O. para los AcMs pre-incubados con distintas concentraciones de HDL o diluciones del suero.

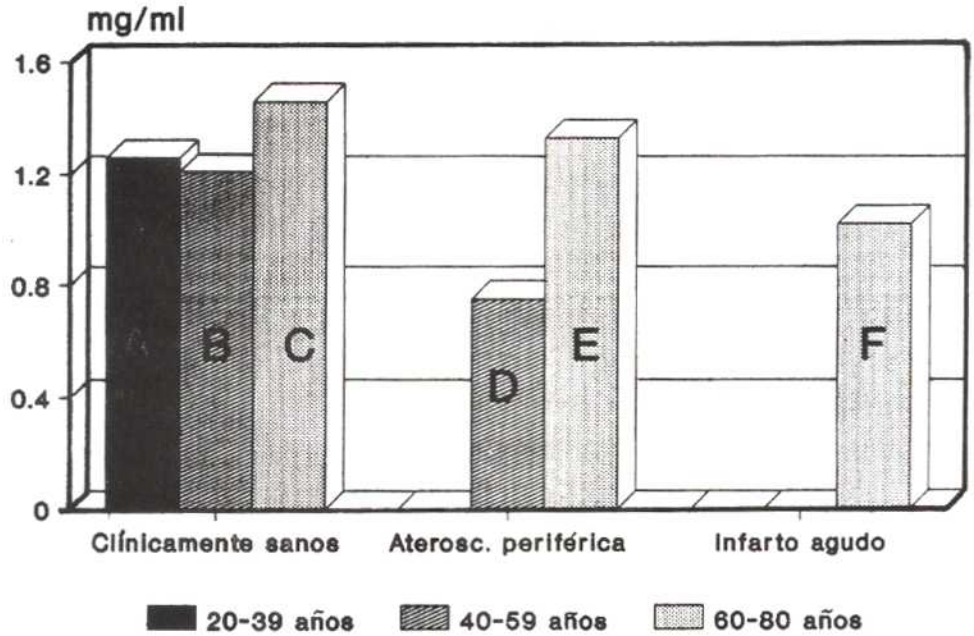



FIG. 4. Cuantificación de la APO A1 en muestras de suero de pacientes con infarto agudo del miocardio, con aterosclerosis periférica y en sujetos clínicamente sanos desde el punto de vista de enfermedades cardiovasculares. Se observa una disminución significativa de los niveles de la APO A1 en los pacientes con aterosclerosis periférica más jóvenes con relación a su grupo control (D vs B, $p<0,01$) y en los pacientes con infarto agudo del miocardio (F vs C, $p<0,01$), no así entre los pacientes de mayor edad con aterosclerosis periférica, cuyos niveles de Apo A1, aunque más bajos, no se diferenciaron significativamente de los de su grupo control respectivo (E vs C). Test t-student.

## REFERENCIAS


ALBERS, J.; P. WHAL y V. CABANA (1976). *Quantitation of apolipoprotein A1 of human plasma high density lipoprotein.* Metabolism **25**: 633-644.

AYRAULT-JARRIER, M.; E. PETIT; E. D. BEKAERT; H. ROBIN; D. PASTIER; I. BEUCLER; J. POLONOVSKY; E. HERVAUD y B. PAU (1988). *Electroimmunoassay of human serum lipoprotein containing Apo A1 by monoclonal antibodies.* Clin. Chem. Acta **172**: 149-160.

DUBOIS, D. Y.; F. CANTRAINE y C. L. MALMENDIER (1987). *Comparison of different sandwich enzyme immunoassays for the quantitation of human apolipoproteins A1 and A2.* J. Immunol. Methods **96**: 115-120.

GORDON, T.; W. P. CASTELLI; M. C. HJORTLAND; W. B. KANNEL y T. R. DAWBER (1977). *High density lipoprotein as a protective factor against heart disease.* Am. J. Med. **62**: 707-714.

HOGLE, M. D.; R. SMITH y L. CURTISS (1988). *Quantitation of plasma apolipoprotein A1 using two monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay.* J. Lipid Res. **29**: 1221-1229.

LAEMMLI, N. K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly by bacterophage T4.* Nature **227**: 680-685.

LIPPI, U.; M. E. GRAZIANI; F. MARGOTO y M. SCHINELLI (1986). *A new chemical procedure for selective sequential separation of serum lipoproteins.* Clin. Lab. **16**: 549-553.

MARCOVINA, S.; L. CREMONESI; 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.

MARCOVINA, S.; G. DICOLA y A. CATAPANO (1986). *Radial immunodiffusion assay of human Apolipoprotein A1 with the use of two monoclonal antibodies.* Clin. Chem. **32**: 2155-2159.

MILLER, G. J. y N. E. MILLER (1975). *Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart disease.* Lancet **1**: 16-20.

NAKANE, P. A. y A. KAWAOI (1974). *Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation.* J. Histochem. Cytochem. **22**: 1084-1091.

OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). *Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.* Handbook of Experimental Immunology, Ed. D. M: Weir, Blackwell Scientific Publications, p. 196.

PETIT, E.; M. AYRAULT-JARRIER y D. PASTIER (1987). *Monoclonal antibodies to human apolipoprotein A1: characterization and application as structural probes for apolipoprotein A1 and high density lipoprotein.* Biochem et Biophys Acta **919**: 287-296.

RIESEN, W. F.; R. MORDASINI; C. SALZMAN; A. THELERLY y H. P. GURTNER (1980). *Apoproteins and lipids as discriminators of severety of coronary heart disease.* Atherosclerosis **37**: 157-162.

SORELL, L.; M. E. FERNANDEZ DE COSSIO; E. PENTON; J. LOPEZ e I. C. PEREZ (1986). *Producción y características de anticuerpos monoclonales contra lipoproteínas que contienen ApoB.* Interferón y Biotecnología **3**: 329-241.

SORELL, 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**: 278-285.

STEINBERG, K. K.; G. R. COOPER; S. R. GRAISER y M. ROSSENEU (1977). *Some considerations of methodology and standardization of Apo A1 immunoassays.* Clin. Chem. **29**: 415-426.

VERGANI, C.; G. TROVATO y N. DIGUARDI (1978). *Serum total lipids, lipoprotein cholesterol, apoproteins A and B in cardiovascular disease.* Clin. Chim Acta **87**: 127-133.

WEECH, P. K.; R. W. MILNE; P. WILTHORP y J. L. MARCEL (1985). *Apolipoprotein A1 from normal human plasma: definition of three distinct antigenic determinant.* Biochem et Biophys Acta **835**: 402-407.