

INMUNOENSAYO ENZIMATICO TIPO ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LIPOPROTEINAS HUMANAS

B.L. Rodríguez, V. Sánchez, G. Falero, M. Zayas, A. Otero y J. Ilnait.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 27 de febrero de 1992.

RESUMEN. Las técnicas inmunológicas, por su alta especificidad, han ido tomando cada vez mayor auge en la detección de proteínas. Una de las más utilizadas ha sido el ensayo inmunoenzimático tipo ELISA por su elevada sensibilidad, especificidad y por la posibilidad de analizar un gran número de muestras en corto tiempo, requisito de vital importancia en la detección de anticuerpos monoclonales (AcM). En este trabajo se describe la puesta a punto de un ELISA para detectar anticuerpos monoclonales contra las tres principales lipoproteínas del plasma humano (lipoproteínas de alta densidad, lipoproteína de baja densidad y lipoproteína de muy baja densidad) el cual permite hacer la evaluación simultánea de diferentes AcM, demostrándose en cada ensayo su especificidad. Es de destacar que en ningún caso se requirió la utilización de apolipoproteínas purificadas para demostrar la positividad de cada AcM.

ABSTRACT. The choice of immunochemical techniques to detect proteins has significantly increased during the last years, due to their specificity and sensitivity. Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) has proved to be sensitive enough to quantify proteins and it can be implemented as a multisample system to analyze several products, including monoclonal antibodies (Mab). In this paper an ELISA type test has been set up for detecting monoclonal against the main plasma lipoproteins (HDL, LDL and VLDL) which allow to test several Mab simultaneously showing its specificity in each case. This assay does not require pure apolipoproteins, to obtain positive results with any of them.

INTRODUCCION

La importancia de las lipoproteínas, por su papel en el desarrollo de enfermedades ateroscleróticas, ha sido un tema ampliamente estudiado.^{1,2} Por ello, se ha hecho necesario la búsqueda de técnicas sensibles y específicas que permitan conocer su concentración en el plasma.³

En este sentido, mediante ensayos inmunoenzimáticos con anticuerpos mono-específicos, se han reportado muy buenos resultados en el estudio, detección y cuantificación de apolipoproteínas.^{4,5,6}

El surgimiento de la tecnología de hibridomas ha permitido la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) que por su alta especificidad se han convertido en una poderosa herramienta tecnológica.^{7,8}

En el proceso de obtención de los AcM es imprescindible disponer de una técnica sensible y rápida para la detección de éstos en cultivos de híbridos recién generados.

Una de las técnicas más utilizadas es el ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, por su elevada especificidad, sensibilidad y por la posibilidad de analizar un gran número de muestras en corto tiempo.^{9,10}

Es importante destacar que para la detección de AcM específicos contra las lipoproteínas humanas han sido reportados ensayos que utilizan cada una de las apolipoproteínas purificadas de forma independiente.

En este trabajo se describe la puesta a punto de un ELISA para detectar AcM contra las tres principales lipoproteínas del plasma humano [lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)], sin la necesidad de emplear apolipoproteínas purificadas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de lipoproteínas

Las lipoproteínas se obtuvieron por flotación a partir de una mezcla de suero humano normal ($d=1,24$ g/mL) sometida a ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de amortiguador Tris-HCL 0,01 mol/L, pH 7,4, EDTA al 0,01% y Na_3a_3 al 0,02 % ($d=1,21$ g/mL) ajustados ambos con KBr. La centrifugación se realizó empleando una ultracentrífuga MSE 75 a $105\,000 \times g$. La fracción de lipoproteínas totales fue cromatografiada mediante filtración en una matriz de Sepharose-6B¹¹ (Pharmacia-LKB).

Ensayo inmunoenzimático

Se recubrieron placas de poliestireno (NUNC) de 96 pocillos con 100 μL de las tres principales lipoproteínas del plasma humano (20 $\mu\text{g/mL}$) en amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato 0,01 mol/L, pH 9,6) y se incubaron toda la noche a 4°C . Cada pozo se bloqueó con 150 μL de una solución de albúmina bovina sérica (ABS) al 1 % con solución salina amortiguada con fosfato (SSTF) durante 1 h a 37°C , con el objetivo de minimizar las interacciones inespecíficas. Posteriormente, se añadieron 100 μL de las muestras y controles (suero de ratones Balb/c o sobrenadantes de hibridomas en cultivo, diluidos 1/1000 y 1/2 respectivamente), durante 2 h a 37°C . Se añadió a cada pocillo 100 μL de conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa y se incubó durante 1 h a 37°C . El conjugado unido se detectó con 100 μL de sustrato (ortofenilendiamina 0,4 mg/mL, H_2O_2 0,04 % en amortiguador fosfato-citrato de sodio 0,2-0,1 mol/L, pH 5,5).

La reacción se detuvo añadiendo 50 μL de H_2SO_4 2,5 N y la medición colorimétrica se realizó, empleando un lector de microplacas MULTISKAN-PLUS (TITERTEK) a una longitud de onda de 492 nm. Todos los pozos se lavaron extensi-

vamente con SSTB-Tween 20 (0,05 %) entre cada paso de incubación. Los reactivos empleados fueron en todos los casos grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 puede observarse que, tanto en el caso de los sueros de ratón como en los sobrenadantes de cultivo utilizados como controles negativos, no aparece reacción positiva con ninguna de las tres lipoproteínas empleadas como recubrimiento. Por otra parte, el suero del ratón Balb/c inmunizado con apolipoproteína AI (Apo AI) sólo reacciona con HDL, mientras que los obtenidos a partir de la inmunización con VLDL, muestran reacción positiva frente a VLDL y LDL debido a que ambas partículas contienen apolipoproteína B (Apo B) en su estructura.¹²

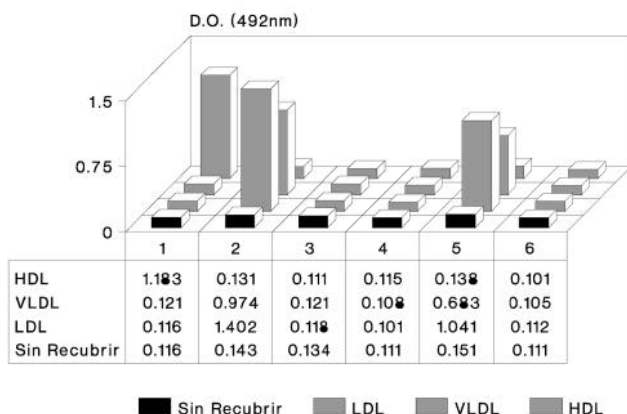


Fig 1. Demostración de la especificidad del ELISA, empleando como controles las muestras siguientes: 1.- Suero de ratón Balb/c inmunizado con Apo AI; 2.- Suero de ratón Balb/c inmunizado con VLDL; 3.- Suero de ratón Balb/c sin inmunizar; 4.- Sobrenadante de P3 X63 Ag8. 653.; 5.- AcM2 (anti Apo B); 6.- Sobrenadante de 1C4G9 (anti-antígeno de superficie de la hepatitis B).

El suero del ratón Balb/c sin inmunizar, así como el AcM no relacionado (1C4G9, anti-antígeno de superficie de la hepatitis B) no producen una reactividad en el sistema que revele interferencia de otros anticuerpos y finalmente el AcM2 (anti-ApoB) responde acorde a su especificidad.

El criterio de positividad asumido en todos los ensayos fue el doble de la actividad mostrada por el suero del ratón Balb/c sin inmunizar o el sobrenadante de la línea de plasmacitoma de ratón P3 X63 Ag8 653 según el caso.

En la figura 2 es posible diferenciar cuatro tipos de sobrenadantes proveniente de los hibridomas obtenidos en las fusiones realizadas. En primer lugar, aquellos que reconocen a las HDL solamente (hibridoma 1B6H2). En segundo lugar, los que reconocen a las VLDL y LDL, demostrando presencia de anticuerpos contra Apo B (hibridomas 1E9E5 y 1E9G1). Es de destacar que los sobrenadantes que reconocen a la VLDL solamente, resultan particularmente interesantes, ya que su especificidad apunta fuertemente a proteínas presentes en la VLDL que no se encuentran de forma mayoritaria en las otras lipoproteínas como son las apolipoproteínas E y C (hibridomas 3D10y 2G2).^{13,14}

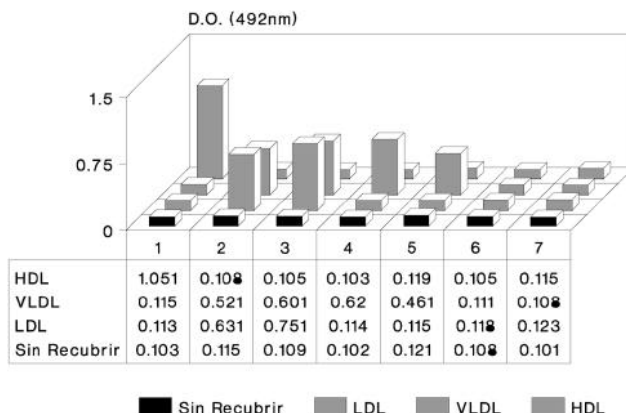


Fig. 2. ELISA indirecto para detectar AcM específicos en sobrenadantes de híbridos en cultivo, empleando las muestras (sobrenadantes) siguientes: 1.- 1B6H2; 2.- 1E9G1; 3.- 1E9E5; 4.- 2G2; 5.- 3D10; 6.- 1H4; 7.- 1C8.

Se muestran además, dos sobrenadantes de híbridos que no resultaron positivos con ninguna de las tres fracciones lipoproteicas (1H4 y 1C8). Todos estos resultados indican la alta especificidad del sistema utilizado, el cual permitió la detección de AcM específicos contra las lipoproteínas humanas sin la necesidad de emplear apolipoproteínas purificadas, las cuales sólo fueron necesarias entonces para definir la especificidad exacta de cada uno de los AcM generados.

CONCLUSIONES

Se diseñó un ensayo inmunoenzimático que permite detectar anticuerpos monoclonales específicos contra las tres principales lipoproteínas del plasma humano.

El ensayo propuesto brinda la posibilidad de detectar anticuerpos monoclonales específicos contra las lipoproteínas humanas, sin la necesidad de emplear apolipoproteínas purificadas.

BIBLIOGRAFIA

- Lawrence C. and Hans D. **Lab. Invest.**, **62**, 522, 1990.
- Matti J. and Tikkanen M.D. **Amer. J. Obst. Gyn.**, **163**, 296, 1990.
- Bojanovski M., Gregg R.E., Wilson D.M. and Brewrr H.B. **Clin. Chim. Acta**, **170**, 271, 1987.
- Doreen M., Richard S. and Curtiss L.K. **J. Lipid Res.**, **29**, 1221, 1988.
- Bury J., Rosseneu M. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, **23**, 63, 1985.
- Kamboh M.I., Ferrell R.E. **Hum. Hered.**, **40**, 193, 1990.
- Kohler G. and Milstein C. **Nature**, **256**, 495, 1975.
- Curtiss L.K. **Hybridoma Technology in the Bioscience and Medicine**, Plenum Press, New York and London, 291-308, 1985.
- Gosling J.P. **Clin. Chem.**, **36**, 1408, 1990.
- Engvall E. and Perlman P. **Immunochimistry**, **8**, 874, 1971.
- Mills G.L., Lane P.A. and Weech P.K. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, Elsevier, Amsterdam, New York and Oxford, 20-89, 1984.
- Assmann G. **Lipid Metabolism and Atherosclerosis**, Verlag GmbH Stuttgart, 14-44, 1982.
- Haase R., Menke-Mollers I. and Oette K. **Electrophoresis**, **9**, 569, 1988.
- Davignon J., Gregg R.E. and Sing F.Ch. **Arteriosclerosis**, **8**, 1, 1988.