

Obtención, purificación y caracterización de IgG Policlonal de conejo anti-lipoproteína (a) humana

Obtainment, purification and characterization of Polyclonal IgG of rabbit human anti-lipoprotein (a)

Dra. Aidelian Jevey González; Dra. Silvia María Hernández González; Ángel Nápoles Vega; Dr. Andrés Pedrosa Amado; Dr. Roger Ramírez Zayas

Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey. Departamento de Bioquímica. Camagüey, Cuba.

RESUMEN

Las altas concentraciones séricas de Lp(a), una lipoproteína similar a la lipoproteína de baja densidad (LDL), se asocian a afecciones coronarias, cerebrovasculares y periféricas derivadas de la aterosclerosis. A esta lipoproteína se le atribuyen propiedades trombogénicas y efectos inhibitorios sobre los mecanismos fibrinolíticos. Diferentes métodos han sido utilizados para la cuantificación sérica de la Lp(a), dentro de estos se destacan los métodos inmunoenzimáticos (ELISA). En este trabajo se describe el proceso de obtención, purificación y caracterización de uno de los reactivos biológicos necesarios para el montaje de un sistema inmunoenzimático ELISA que cuantifique Lp(a) en suero humano. Este reactivo es un suero policlonal hiperinmune como fuente de IgG policlonal de conejo anti-Lp(a) humana. Utilizando Lp(a) humana comercial, se inmunizaron dos conejos hembras según esquema de inmunización propuesto, se lograron títulos de anticuerpos anti-Lp(a) humana en los dos animales. Con la utilización de métodos no cromatográficos (precipitación por salado) y métodos

cromatográficos (Gel filtración e intercambio iónico) se purificó la IgG policlonal de conejo anti-Lp(a) humana. A esta IgG purificada se le determinó el grado de pureza (SDS-PAGE) y la actividad biológica (inmunodifusión doble). La biomolécula purificada mostró el grado de pureza necesario para los fines en que será utilizada, así como reconoció el antígeno empleado en la inmunización.

DeCS: IgG/aislamiento; IgG/purificación; LIPOPROTEÍNA (a); INMUNIZACIÓN; SUEROS INMUNES; INMUNODIFUSIÓN; ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

ABSTRACT

High serum concentrations of Lp(a), a lipoprotein similar to LDL, are associated with coronary, cerebrovascular and peripheral affections derived from atherosclerosis. Thrombogenic properties and inhibitory effects on fibrinolytic mechanisms are attributed to this lipoprotein. Different methods have been used for serum quantification of Lp(a), among them, those immunoenzymatic (ELISA) are relevant. In this work, the process of obtainment, purification and characterization of one of the biologic reagents necessary for the mounting of an Immunoenzymatic System ELISA that quantifies Lp(a) in human serum is described. This reagent is a polyclonal hyperimmune serum as source of polyclonal IgG of rabbit human anti-Lp(a). Using commercial human Lp(a) two female rabbits were immunized according to immunization scheme proposed; titers of human anti-Lp(a) antibodies in both animals were obtained.

With the use of non-chromatographic methods (salt precipitation and ionic interchange) polyclonal IgG of rabbit human anti-Lp(a) was purified. To this purified IgG was determined the level of purity (SDS-PAGE) and biologic activity (double immunodiffusion). The purified biomolecule showed the level of purity necessary for the purposes in which it should be used, it also recognizes the antigen used in the immunization.

DeCS: IgG/ isolation; IgG/purification; LIPOPROTEIN (a); INMUNIZATION; IMMUNE SEPA; IMMUNODIFFUSION; POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS.

INTRODUCCIÓN

Reportes actuales asocian la severidad y la incidencia de la aterosclerosis con los altos niveles séricos de lipoproteína (a) (Lp(a)), una partícula parecida a la LDL. ^{1, 2}

Elevadas concentraciones de esta lipoproteína se asocian con un incremento de afecciones coronarias, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. ^{3, 4, 5}

Sus altos niveles en sangre se señalan como factor de riesgo importante en la recurrencia clínica de reestenosis, luego de angioplastias coronarias e injertos aortocoronarios. ⁶

A la Lp(a) se le atribuyen propiedades trombogénicas por su similitud estructural con el plasminógeno y elevados niveles séricos de esta proteína pueden tener efecto inhibitorio sobre los mecanismos fibrinolíticos. ^{7, 8}

La evaluación del riesgo cardiovascular asociado con la Lp(a) se realiza sobre la base de las concentraciones plasmáticas de dicha lipoproteína. ⁹

En un estudio realizado por Millonis et al¹⁰ en 163 pacientes de más de 70 años con diagnóstico de síndrome metabólico y accidente isquémico no embólico se encontró que los mismos presentaron altos niveles de Lp(a) al compararlos con el grupo control constituido por personas sanas de la misma edad.

Los pacientes diabéticos tipo II tienen un alto riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, los factores de riesgo tradicionales no explican completamente este exceso de mortalidad, la Lp(a) es un factor de riesgo no tradicional y al ser estudiada en estos pacientes resulta elevada, lo cual constituye un factor de riesgo cardiovascular importante en estos enfermos. Para realizar este estudio de Lp(a) se utilizó el método de ELISA y se concluyó también que estos tipos de métodos, discriminan mejor los niveles de Lp(a) que los colorimétricos. ¹¹

En un estudio de 133 mujeres de 17 a 40 años se encontró una asociación de niveles mayores de Lp(a) (más de 30 mg/dl) con aborto espontáneo al compararlas con un control en el que se encontraron cifras normales de esta lipoproteína. ¹²

También se realizó un estudio en mujeres preeclámpsicas (48 moderadas y 43 severas y 40 embarazadas sanas y normotensas con más de 32 semanas), en ninguno de los tres grupos se encontraron diferencias significativas con respecto a los niveles de Lp(a) por lo que esta lipoproteína no es un factor de riesgo para el desarrollo de la

preeclampsia. Sin embargo, altos niveles de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos pueden causar daño endotelial que conducen a la preeclampsia.¹³

Se han medido concentraciones de Lp(a) en suero o plasma mediante la inmunodifusión doble, electroinmunoensayo, inmunoelectroforesis, nefelometría, radioinmunoensayo, y ensayos inmunoenzimáticos.^{14, 15} Dentro de estos métodos los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) han tenido gran aplicación en la determinación sérica de Lp(a) debido a su alta sensibilidad y especificidad en estos fines.

Para que un sistema ELISA cumpla con los parámetros de sensibilidad y especificidad requeridos, se necesita que los anticuerpos utilizados en el montaje del sistema, ya sean policlonales o monoclonales, tengan una alta especificidad que asegure obtener resultados confiables en los estudios de laboratorio clínico.¹⁶

En este trabajo se describe todo el procedimiento de obtención de un suero hiperinmune anti-Lp(a) humana en conejo. Este suero constituye la muestra fuente de donde se purifica la IgG policlonal de conejo anti-Lp(a) a utilizar en el sistema inmunoenzimático diseñado para la cuantificación sérica de esta lipoproteína.

MÉTODO

Utilizando como fuente de antígeno Lp(a) humana comercial, se inmunizaron dos conejos hembras según esquema de inmunización propuesto, se lograron títulos de anticuerpos anti-Lp(a) humana en los dos animales. Luego de seleccionar al animal con mayor título de anticuerpo, se sacrificó y se purificó a partir de este suero hiperinmune la IgG policlonal anti-Lp(a).

La utilización de métodos cromatográficos y no cromatográficos permitieron obtener un producto final (IgG policlonal de conejo anti-Lp(a) humana) con las características que exige su utilización como anticuerpo de un sistema inmunoenzimático ELISA, nos referimos a grado de pureza (SDS-PAGE) y actividad biológica (inmunodifusión doble).

I. OBTENCIÓN DEL INMUNOSUERO

- Selección del animal:

Conejos hembras del tipo semigigante, blanco, de 2.5 Kg. de peso y de cinco meses de edad.

- Fuente de antígeno:

Lp(a) humana de fuente comercial. Reference Standard Human Lp(a). 67mg/dL. Lot. No. 36 38003. 70329002C08. Immuno AG. Vienna. Gmb H.D-6911126. Heideberg.

- Preparación del inmunógeno:

Preparación de un homogenato a partir de volúmenes iguales de la mezcla que contiene el antígeno y adyuvante de Freund (Difco Laboratories). La cantidad de antígeno por dosis es de 100 µg.

La inmunización se realizó los días 1, 7, 14 y 21 con 100 µg todas las dosis y se adicionó en la primera dosis adyuvante completo de Freund (ACF) y en el resto adyuvante incompleto de Freund (AIF)

- Vía de administración del antígeno y extracción de la muestra de sangre:

Cada dosis se administra por vía subcutánea en ocho sitios diferentes del lomo del animal, la toma de muestra de sangre se realiza por la vena marginal de la oreja, observando todas las normas de asepsia y antisepsia que exige el procedimiento.

- Titulación del suero de conejo:

Los títulos de anticuerpos se conocen mediante inmunodifusión doble bidimensional en gel de Agarosa al 1 % en Buffer Barbital 0.05M pH: 8, 6. (modelo de la roseta).

- Obtención del inmunosuero:

Selección del animal de mayor título de anticuerpos anti-Lp(a) humana según resultado de la inmunodifusión doble. Se desangra el animal.

La sangre se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Se separa el coágulo de las paredes del tubo y se centrifuga en centrífuga refrigerada (LV 418H, Germany) a 3000 r.p.m. durante 45 min y a 4 °C.

II. PURIFICACIÓN DE IgG POLICLONAL DE CONEJO ANTI-Lp(a) HUMANA

- Métodos no cromatográficos:

Precipitación del suero hiperinmune de conejo con Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄) (Merck) al 50%. Seguido de una precipitación con la misma sal pero al 35 %. Se toma el precipitado y se resuspende en Buffer Tris 0.01M pH: 8.5. La mitad del volumen de la muestra original.

- Métodos cromatográficos:

Desalado de la muestra (gel filtración) ¹⁷

Matriz: Sephadex G-25. (Farmacia)

Columna: 20/10 (Farmacia)

Volumen de muestra: 2 mL

Velocidad de flujo: 20 mL/h (Bomba peristáltica LKB)

Buffer calibración: Tris 0.01m pH: 8.5

Buffer aplicación: Tris 0.01M pH: 8.5

Buffer elución: Tris 0.01M pH: 8.5

Purificación de IgG de conejo (cromatografía de intercambio iónico)¹⁸

Matriz: DEAE-Sephacel. (Pharmacia)

Columna: 10/5 (Pharmacia)

Volumen de muestra: 12 ml de la muestra desalada en Sephadex G-25 más 12 mL de Buffer de aplicación. Volumen total a aplicar 24 ml

Velocidad de flujo: 5 mL/h (Bomba peristáltica LKB)

Buffer calibración: Tris 0.01M pH: 8.5 (200 mL)

Buffer aplicación: Tris 0.01M pH: 8.5

Buffer lavado: Tris 0.01M pH: 8.5 (100 mL)

Buffer elución: A: Tris 0.01M / NaCl 40 mM. pH :8.5 (25 mL)

B: Tris 0.01M / NaCl 250 mM. pH :8.5 (25 mL)

C: Tris 0.01M / NaCl 500 mM. pH :8.5 (25 mL)

III. MÉTODOS ANALÍTICOS

A la muestra final se le realizó determinación de concentración de proteínas, grado de pureza y actividad biológica, mediante los siguientes métodos analíticos:

- La concentración de proteínas de la muestra se determina por Lowry.¹⁹
- El grado de pureza de la muestra se determina por SDS-PAGE.²⁰

Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12 %. (LKB). Concentración de proteínas en la muestra 20 µg por pozo.

Condiciones de la corrida

Precorrida del gel 15 min a 30 mA. Se aplicaron las muestras 1:2 con Buffer de muestra más 5 µL de Bromofenol. Se ajustó la corrida a 25 mA, mientras las muestras se encontraban en el gel concentrador. Luego de entrar al gel separador la corrida continuó a 40 mA. Se detuvo la corrida cuando el frente de la misma se encontró a 1cm del final del gel. Se tiñó durante 45 min. Se destiñó hasta transparentar el gel.

La actividad biológica de la muestra se determina por inmunodifusión doble.²¹

Inmunodifusión doble bidimensional en gel de Agarosa al 1% en Buffer Barbital 0.05M pH: 8, 6 (modelo de la roseta).

RESULTADOS

Luego de aplicarse el esquema de inmunización propuesto se obtuvo como resultado títulos de anticuerpos anti-Lp(a) en los dos animales inmunizados. El animal A alcanzó títulos de 1:16 y el B de 1:4.

Se seleccionó el suero hiperinmune del animal A, por presentar los mayores títulos de anticuerpos. El volumen total de la muestra de suero fue de 50 ml con una concentración de proteínas de 60.2 mg/mL. Esta muestra fue sometida a un proceso de purificación de IgG.

Con respecto a la electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) se observó el grado de pureza de las muestras obtenidas en algunos de los pasos de purificación (Fig. 1).

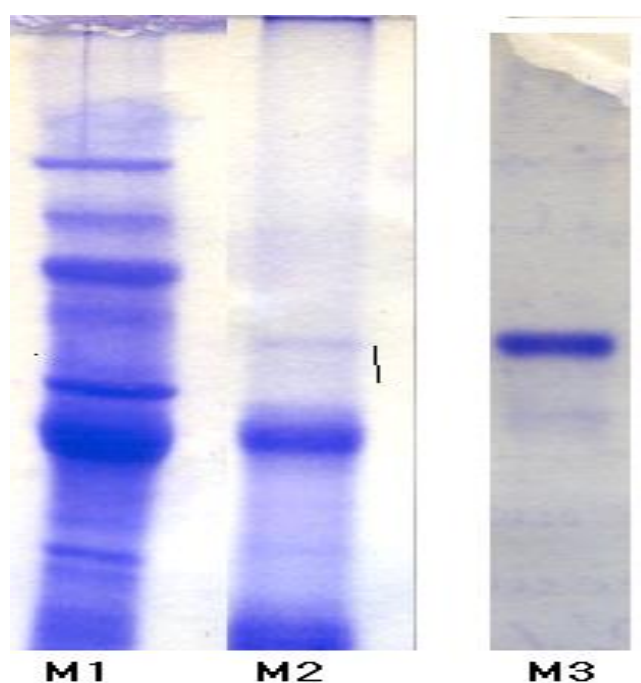


Fig. 1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida al 12 % M1. Precipitación por salado. Sulfato de Amonio al 35 % M2. Cromatografía de intercambio iónico. DEAE-Sephacel M3. Patrón de BSA

La muestra No.1 (M1) recoge el resultado de la precipitación por salado de la muestra inicial. Con este paso se ganó en rendimiento, pero se mantuvieron proteínas contaminantes en la muestra final. (Concentración de proteínas totales 35.8 mg/mL)

La muestra No.2 (M2) se correspondió con la muestra final de la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel. Este paso de purificación cromatográfico aseguró el grado de pureza que requirió la muestra final (Fig. 2).

Se observó que el pico de elución de la IgG ocurrió entre los tubos 38 y 48 (concentración de NaCl de 250 mM. La identificación de la IgG de conejo se realizó mediante un sistema ELISA que cuantificó esta inmunoglobulina.

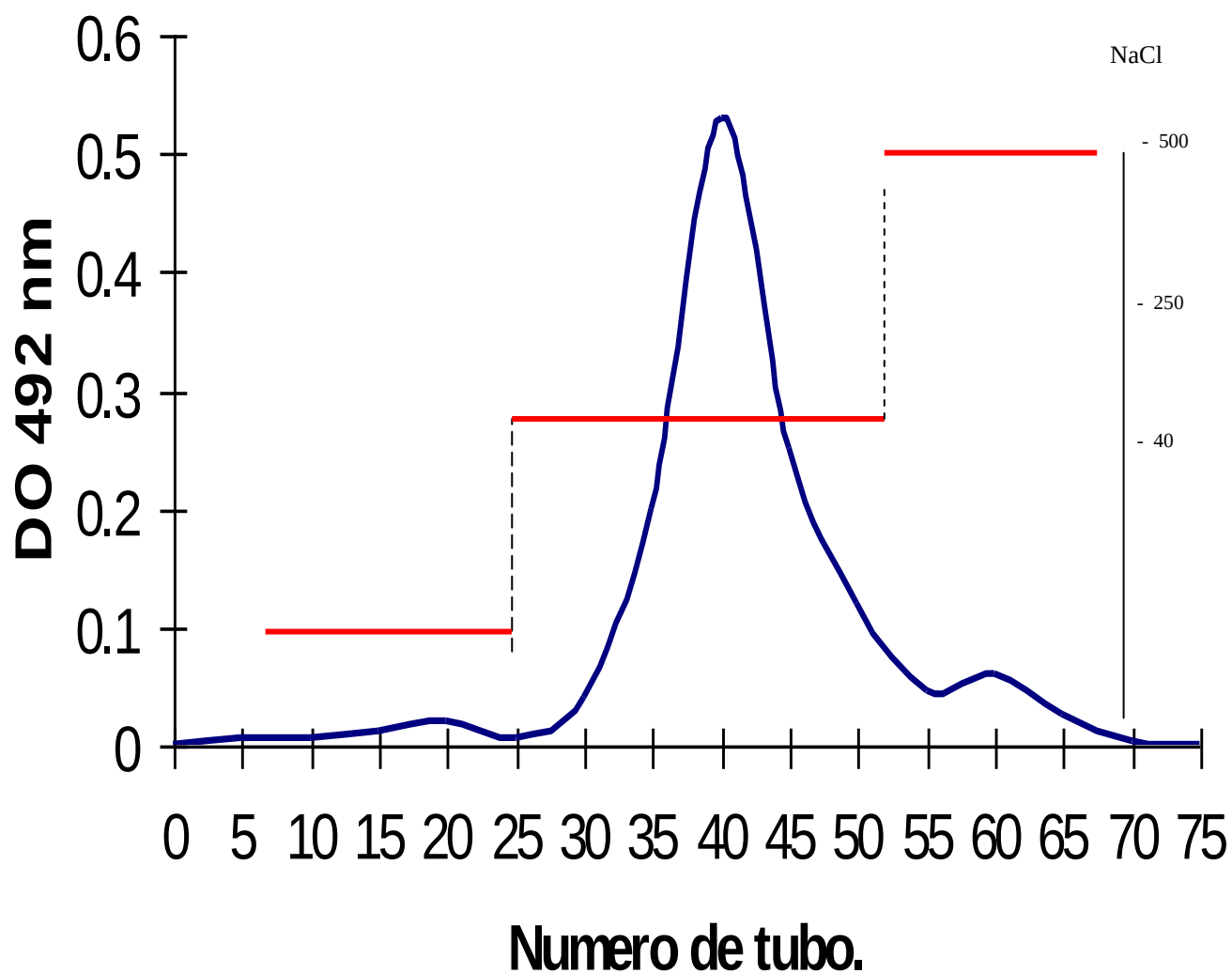


Fig. 2. Perfil cromatográfico de purificación de la IgG de conejo en DEAE-Sephacel utilizando un gradiente iónico de NaCl

Se colectaron 2 mL de muestra en cada tubo, la muestra final tuvo un volumen total de 20 mL y una concentración de proteínas de 9.6 mg/ml, a esta muestra se le realizó una inmunodifusión y se pudo comprobar que mantenía su actividad biológica al reconocer el antígeno hasta una dilución de la muestra de 1:16 luego del proceso de purificación

CONCLUSIONES

Luego de aplicar el esquema de inmunización con Lp(a) humana a dos conejos, se obtuvo un suero hiperinmune con títulos de anticuerpos anti-Lp(a) humana de 1:16. El suero hiperinmune se sometió a un proceso de purificación no cromatográfico y cromatográfico que permitió obtener una muestra final de IgG policlonal anti-Lp(a) humana, con el grado de pureza que exige su utilización como parte de un sistema inmunoenzimático ELISA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. In gel methods for immunological annalysis. Prog Allergy. 1958;5:1.
2. Berg K. Lp(a) lipoprotein: an overview. Chem Phys Lipids. 1992;67:689.
3. Dahlen GH. Lp(a) lipoprotein in cardiovascular disease. Atherosclerosis. 1994;108:11-86.
4. Karmasny I, Gruener N. Structure and possible biological roles of Lp(a). Clin Biochem. 1994;24:151-62.
5. Hearn JA, De Macio SJ, Roubin GS, Hammarstrom M, Sgoutas D. Predictive value of lipoprotein (a) and other serum lipoproteins in the angiographic diagnostic of coronary disease. Am J Cardiol. 1990;66:1176-80.
6. Nishino M, Ito T, Yasumo M, Nago N, Matsuo H, Goto T, et al. Serum lipoprotein (a) as a risk factor for thoracic atherosclerosis in subjects aged > 40 years. Am j Cardiol. 1993;24:965-69.
7. Desmarais R, Sarembuck I, Ayers C, Vernon S, Powers E, Gimple L, et al. Elevated serum lipoprotein (a). Is a risk factor for Clinical recurrence after coronary ballon angioplasty? Circulation. 1997;91:1403-09.

8. Hajjar K, Gavish D. Lipoprotein (a) modulates endothelial cell surface fibrinolysis: Potential role in atherosclerosis. *Nature*. 1989;339:302-35.
9. Leerink C, Gimpel J, Kothandt W. Kinetic analysis of Lp(a) inhibition of plasminogen activation by tissue plasminogen activator in vitro. *Fibrinolysis*. 1999;5:233-38.
10. Millonis HJ, Rizos E, Gondevenos J. Components of the metabolic syndrome and Risk for First-Ever Acute Ischemic Nonembolic Stroke in Elderly Subjects. *Stroke*. 2005;26:356-78.
11. Hernández C, Francisco G, Chacón P, Simo R. Lipoproteína (a) como un factor de riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes diabéticos tipo II. *Diabetes Care*. 2005;28(4):245-58.
12. Krause M, Sonntag B, Klamroth R. Lipoprotein(a) and other prothrombotic risk factors in Caucasian women with unexplained recurrent miscarriage. Results of a multicentre case-control study. *Thromb Haemost*. 2005;93(5):867-71.
13. Baksu B, Baksu A, Davas I, Akyol A, Gulbaba G. Lipoprotein (a) levels in women with pre-eclampsia and in normotensive pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res*. 2005;31(3):277-82.
14. Ramírez J, Mansur A, Solimone M. Effect of Gemfibrozil versus Lovastatin on increased serum lipoprotein (a) levels of patients with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol*. 1995;48:115-20.
15. Labeur C, Rosseneu M, Herdenson O. International Lp(a) Standardization. *Chem Phys Lip*. 1994;67:265-70.
16. Wong W, Eaton D, Berlovi A. A monoclonal antibody based enzymelinked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clin Chem*. 1999;36:192-97.
17. Bracho D. Manual de Inmunodiagnóstico. Fundamento y aplicaciones. La Habana: EDILVZ; 1997.
18. Pharmacia Fine Chemicals. Gel filtration in theory and practice. Sweden: Uppsala; 1983.
19. Pharmacia Fine Chemicals. Ion exchange chromatography. Principles and methods. Sweden: Uppsala; 1983.
20. Lowry OH. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem*. 1956;214:591-605.
21. Harlow E, Lane D. Antibodies. Laboratory Manual. Sweden: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.

Recibido: 17 de junio de 2003

Aceptado: 22 de septiembre de 2003

Dra. Aidelian Jevey González. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Instructor de Bioquímica. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Camagüey. Departamento de Bioquímica. Camagüey, Cuba.