



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA E INMUNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE FOSFOLIPASA A2 ASOCIADA A
LIPOPROTEÍNA**



POR

NATALY ANDREA GUTIÉRREZ SALAMANCA

**Trabajo de fin de carrera presentado a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Químico
Farmacéutico**

**Profesor Guía / Patrocinante: Alejandra María Paulina Bustos Araya
Profesor Co-guía: Daniela Andrea Castillo Vidal
Comisión Examinadora: Berta Elena Schulz Bañares, Daniel Andrés Durán
Sandoval**

**marzo, 2020
Concepción, Chile**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	ii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos epidemiológicos	1
1.2. Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína	4
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. HIPÓTESIS	7
2.2. OBJETIVO GENERAL.....	7
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-Lp-PLA2	8
3.1.1. Preparación de medio de cultivo	8
3.1.2. Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2	9
3.2. Clonación por dilución límite.....	10
3.2.1 Expansión de clones seleccionados	10
3.3. Caracterización de sobrenadantes de hibridomas productores de anticuerpo anti-Lp-PLA2	11
3.3.1 Reactividad anti-Lp-PLA2	11
3.3.2. Reactividad anti albúmina humana.....	13
3.3.3. Determinación de isotipos.....	13
3.3.4. Análisis por Western Blot.....	14

3.4.	Almacenamiento de los clones en nitrógeno líquido	16
3.5.	Producción de fluido ascítico.....	16
3.6.	Purificación de anticuerpos.....	17
3.6.1.	Precipitación de anticuerpos con sulfato de amonio	17
3.6.2.	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad .	18
3.6.3.	Concentración de anticuerpo purificado	18
3.6.4.	Cuantificación de proteínas totales.....	19
3.6.5.	Titulación del anticuerpo purificado.....	19
3.6.6.	ELISA del anticuerpo monoclonal purificado y distintas concentraciones de Lp-PLA2.....	20
3.7.	ELISA para la cuantificación de Lp-PLA2.....	21
3.7.1.	Conjugación del anticuerpo con biotina	21
3.7.2.	Titulación del anticuerpo biotinilado	21
3.7.3.	Técnica de ELISA sandwich.....	22
3.7.4.	Técnica de ELISA por inhibición competitiva.....	23
3.7.5.	Utilización de kit comercial Quantikine® ELISA Human PLAG7/PAF-AH/Lp-PLA2 immunoassay	24
4.	RESULTADOS.....	25
4.1.	DESARROLLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1.....	25
4.1.1.	Cultivo y clonación de hibridomas productores de anticuerpo anti-LpPLA2	25
4.1.2.	Ensayos de caracterización de los sobrenadantes de hibridoma	27
4.1.2.1.	Reactividad anti-Lp-PLA2	27
4.1.2.2.	Reactividad contra albúmina humana	30
4.1.2.3.	Determinación de isotipo y análisis por Western blot	30
4.1.3.	Selección de hibridoma productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2	31
4.1.4.	Clonación por dilución límite del hibridoma 2A7-I productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2.....	31

4.1.5.	Ensayos de reactividad de los sobrenadantes 2A7-I.....	33
4.1.6.	Selección de subclones 2A7-I y expansión en cultivos	33
4.1.7.	Electroforesis en gel SDS-PAGE y evaluación de la reactividad del anticuerpo 2A7G6 mediante western blot	35
4.1.8.	Almacenamiento de los clones en nitrógeno líquido	37
4.2.	DESARROLLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2.....	37
4.2.1.	Producción de fluido ascítico	37
4.2.2.	Precipitación de globulinas con sulfato de amonio y cuantificación de proteínas	38
4.2.3.	Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.	39
4.2.4.	Concentración y cuantificación del anticuerpo 2A7G6 anti-Lp-PLA2	41
4.2.5.	ELISA del anticuerpo monoclonal purificado y distintas concentraciones de Lp-PLA2	42
4.3.	DESARROLLO OBJETIVO ESPECÍFICO 3.....	44
4.3.1.	Técnica de ELISA sandwinch	44
4.3.2.	Conjugación del anticuerpo 2A7G6 con biotina	45
4.3.3.	ELISA por inhibición competitiva	47
4.3.4.	Kit comercial Quantikine® ELISA Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA2 Immunoassay.....	49
5.	DISCUSIÓN	51
6.	CONCLUSIONES	59
7.	GLOSARIO	60
8.	BIBLIOGRAFÍA	62
9.	ANEXO.....	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 4-1. Subclones de 6A1A2 evaluados para reactividad anti-Lp-PLA2.	28
Tabla 4-2. Subclones de 2A7-I evaluados para reactividad anti-Lp-PLA2.	34
Tabla 4-3. Hibridomas almacenados en nitrógeno líquido.....	38



INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 4-1. Reactividad de los clones anti-Lp-PLA2 seleccionados como positivos.	29
Figura 4-2. Reactividad de los anticuerpos 2A7-I y 6A1A2H1 mediante Western blot.	32
Figura 4-3. Reactividad de los anticuerpos anti-Lp-PLA2 producidos por los subclones de 2A7-I.	34
Figura 4-4. Electroforesis SDS-PAGE y evaluación de la reactividad del anticuerpo 2A7G6, mediante Western blot.	36
Figura 4-5. Perfil de elución de las globulinas del anticuerpo 2A7G6 por cromatografía de afinidad con agarosa-proteína A	40
Figura 4-6. Reactividad del anticuerpo monoclonal 2A7G6 con distintas concentraciones de Lp-PLA2 recombinante.	43
Figura 4-7. ELISA de inhibición competitiva	48
Figura 4-8. Curva de calibración de kit Quantikine® ELISA <i>Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay</i>.	50

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son las enfermedades con mayor tasa de mortalidad a nivel internacional y en Chile. La mayoría de las ECVs son causados por la aterosclerosis, por lo que se utilizan modelos de predicción para evaluar el riesgo cardiovascular; sin embargo, existen sobreestimaciones y subestimaciones en cada tabla de estratificación dado que son desarrolladas en poblaciones específicas.

La fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2) es un biomarcador que aumenta en la aterosclerosis, pudiendo ser una herramienta de evaluación complementaria para la predicción del riesgo cardiovascular; no obstante, los kits comerciales para cuantificar Lp-PLA2 poseen un alto costo, por lo que es un marcador de segunda línea.

En este trabajo se cultivaron hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2, fueron caracterizados mediante ELISA indirecto y se produjo fluido ascítico en ratones para la obtención de un anticuerpo monoclonal purificado y específico para Lp-PLA2 recombinante.

En conclusión, la obtención del anticuerpo monoclonal 2A7G6 específico para Lp-PLA2 recombinante podría contribuir a la estandarización de un inmunoensayo para su cuantificación plasmática.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) have the highest mortality rate in Chile and worldwide. Most CVDs are originated by atherosclerosis, therefore risk prediction models are used to assess cardiovascular risk; however, there are overestimations and underestimations in every risk stratification tool, since they are developed in specific populations.

Lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) is a biomarker that increases in atherosclerosis, and can be a complementary evaluation tool for the cardiovascular risk prediction; nevertheless, commercial kits to quantify Lp-PLA2 are high-priced, therefore it is a second line marker.

In this paper, hybridomas producing anti-Lp-PLA2 antibodies were cultured, then characterized by indirect ELISA, and ascitic fluid was produced in mice to obtain a purified and specific monoclonal antibody for the recombinant Lp-PLA2.

In conclusion, the obtained specific monoclonal antibody, 2A7G6 anti recombinant Lp-PLA2, may contribute to the standardization of an immunoassay for its plasma quantification.

1. INTRODUCCIÓN

1.1) Aspectos epidemiológicos

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son las enfermedades con mayor tasa de mortalidad a nivel internacional y en Chile. Además, contribuyen a una reducción en la calidad de vida y a grandes costos en atención de salud.



Durante el 2016, se estima que hubo 41 millones de muertes por enfermedades no transmisibles (ENT), aproximadamente el 71% del total general de decesos, donde se registraron 17,9 millones de muertes debido a las enfermedades cardiovasculares (44% del total de muertes por ENT) (WHO, 2018a). En particular, la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular ocasionaron 15,2 millones de defunciones en el año 2016 y han sido las principales causas de mortalidad durante los últimos 15 años (OMS, 2018). En Chile, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares fueron las que lideraron las defunciones el 2016 siendo un 27% de las muertes totales (WHO, 2018b).

Las ECVs comprenden una serie de trastornos que afectan al corazón y los vasos sanguíneos (OMS, 2017), entre los cuales se encuentran: enfermedad coronaria (infarto agudo al miocardio, angina estable/inestable, antecedentes de angioplastia o cirugía de revascularización miocárdica), enfermedad cerebrovascular (accidente cerebrovascular o ataque cerebral isquémico transitorio), enfermedad arterial periférica, enfermedad aórtica aterosclerótica, enfermedad renovascular y enfermedad carotídea (MINSAL, 2017,P:7).

La base patogénica común a la mayoría de las ECVs es la aterosclerosis. Éste es un proceso crónico, de carácter inflamatorio, donde existe una acumulación de lípidos, células y elementos fibrosos en el endotelio arterial que obstruyen el flujo de sangre a los tejidos siendo el resultado de complejas interacciones entre las células pertenecientes a la pared vascular y células del sistema inmune (Le borne, Caliguiri, Nicoletti, 2015; Llapur, González, 2017).

La formación de la placa aterosclerótica es de origen multifactorial, de progreso lento y silencioso. Con frecuencia, las placas suelen desarrollarse desde la niñez, durante muchos años sin una manifestación clínica evidente (Llapur, González, 2017). No obstante, la mayoría de las manifestaciones agudas de la aterosclerosis son producto de la ruptura de la placa aterosclerótica (Van der wal, Becker, 1999) donde, habitualmente, es tarde para prevenir o evitar el

infarto o la muerte, siendo la mayoría de los tratamientos paliativos y no curativos.

Existen diversas herramientas para evaluar el riesgo cardiovascular. Las más utilizadas, debido a su simpleza y valor predictivo, son las tablas de estratificación o modelos predictivos. Éstas evalúan la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular en los próximos 5 ó 10 años, según la presencia de factores de riesgos modificables o no modificables (Naylor, Vasan, 2016). Existen variados modelos predictivos a nivel internacional, sin embargo, como estas estratificaciones han sido desarrolladas en grupos de poblaciones específicos, se hallan diferencias entre cada modelo y muchas veces no se llega a un consenso terapéutico, lo que se puede llevar a sobreestimaciones o subestimaciones del riesgo cardiovascular, dependiendo de las características de la población estudiada (Naylor, Vasan, 2016; Kunstmann, Gainza, 2018; Siontis *et al*, 2012; Sarré-Álvarez *et al*, 2018).

En Chile, principalmente se aplica la tabla de estratificación adaptada de Framingham. Si bien esta estratificación estima de manera adecuada el riesgo global nacional, es más exacta en la población masculina que en la femenina, ya que suele haber una subestimación del riesgo cardiovascular en las mujeres, en especial en los casos pertenecientes a los extremos de la curva de riesgo

(bajo riesgo y alto riesgo) (Kunstmann, Gainza, 2018; Kunstmann *et al*, 2012)

1.2) Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína

Con el fin de refinar los modelos de predicción de riesgo se da paso a los biomarcadores. Uno de ellos es la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína (Lp-PLA2).

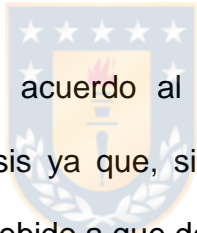


La Lp-PLA2, también denominado PAF-acetil hidrolasa (PAF-AH), es una enzima que consta de 441 aminoácidos y un peso molecular de 45.4 kDa. Pertenece a la familia GVII de las enzimas PLA2 y difiere de las otras fosfolipasas ya que es independiente de Ca^{+2} y su sitio activo se compone de una triada catalítica de serina, ácido aspártico e histidina (Stafforini, 2015; Castillo, 2011).

Circula en plasma en su forma activa, formando complejos con lipoproteínas. Aproximadamente 70-80% de la Lp-PLA2 se asocia a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en un 20-30% a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Stafforini, 2015), siendo sólo una pequeña cantidad la que se une a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y a la lipoproteína (a).

PAF-AH tiene una profunda preferencia por las partículas más densas y electronegativas de LDL, ya que se une a los dominios electronegativos presentes en la apoproteína B (apoB) de estas partículas (Castillo, 2011).

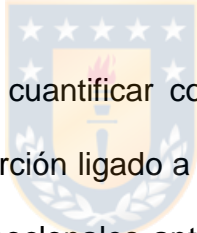
Es producida y secretada por células hematopoyéticas (monocitos/macrófagos, mastocitos, linfocitos T, plaquetas) (Tellis & Tselepis, 2009) pero, *in vivo*, es producida mayoritariamente por macrófagos y células espumosas que se encuentran dentro de las placas ateroscleróticas (Castillo, 2011; Krishnankutty, 2005).



Existe una controversia de acuerdo al rol que cumple la Lp-PLA2 en el desarrollo de la aterosclerosis ya que, si bien esta enzima podría tener una función anti-aterosclerótica debido a que detiene a PAF de producir compuestos pro-inflamatorios (Tellis & Tselepis, 2009) Lp-PLA2 al hidrolizar fosfolípidos oxidados genera productos pro-inflamatorios que están involucrados en la disfunción endotelial, inflamación y formación del núcleo necrótico en la placa (Silva *et al*, 2011; The Lancet, 2010). Además, numerosos estudios indican que niveles altos de Lp-PLA2, tanto en actividad como concentración, están relacionados significativamente a eventos cardiovasculares (The Lancet, 2010; Li *et al*, 2017; Regence, 2018) y esta elevación plasmática contribuye con un riesgo de aproximadamente 2 veces para accidentes cerebrovasculares o enfermedad de la arteria coronaria (Wang *et al*, 2018), siendo un marcador de

riesgo independiente a los factores de riesgos tradicionales (Packard *et al*, 2000).

Sin embargo, solo es considerado como un posible marcador de inflamación en la aterosclerosis, puesto que en investigaciones con inhibidores de Lp-PLA2 no se obtuvieron resultados significativos en disminuir el riesgo de un evento cardiovascular (Choi WG *et al*, 2018). Aun así puede ser una herramienta de evaluación complementaria de riesgo cardiovascular clásico (Li, D. *et al*, 2017).



Los actuales métodos para cuantificar concentración plasmática de Lp-PLA2 son ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) tipo sandwich. Éstos utilizan dos anticuerpos monoclonales anti-Lp-PLA2. El primer anticuerpo anti-Lp-PLA2 es de captura y se encuentra inmovilizado en una microplaca; el segundo anticuerpo es de revelado y está marcado, generalmente, con peroxidasa de rábano. Luego, se realiza una curva estándar con Lp-PLA2 recombinante en la cual se interpolan las muestras a cuantificar (R&D Systems, Inc, 2016).

A pesar del gran potencial que tiene la Lp-PLA2 como biomarcador, los actuales métodos de cuantificación poseen un alto costo, dejando a esta enzima como un marcador de segunda línea (Kunstmann, Gainza, 2018; Regence, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1) Hipótesis

La caracterización de anticuerpos monoclonales, producidos por hibridomas, permite la estandarización de un ELISA para la cuantificación de Lp-PLA2 plasmático.

2.2) Objetivo general

Caracterizar anticuerpos monoclonales específicos para Lp-PLA2 y estandarizar un ELISA para su cuantificación.

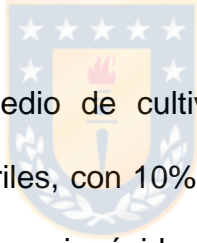
2.3) Objetivos específicos

- 1.- Clonar hibridomas y caracterizar los anticuerpos producidos anti Lp-PLA2.
- 2.- Purificar los anticuerpos seleccionados desde fluido ascítico obtenido en ratones.
- 3.- Estandarizar un ELISA con los anticuerpos monoclonales purificados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1) Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-Lp-PLA2

3.1.1) Preparación de medio de cultivo para hibridomas:



Para la preparación del medio de cultivo para hibridomas se suplementó DMEM, en condiciones estériles, con 10% (v/v) de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 0,5 nM de 2-mercaptoetanol, HEPES, 100 U/mL penicilina y 100µg/mL estreptomycin.

Para la elaboración de *feeder*, se utilizó un ratón BALB/c, proveniente del Centro Regional para Estudios Avanzados para la Vida (CREAV, Universidad de Concepción). El ratón BALB/c fue sacrificado mediante dislocación cervical y se extirpó su bazo en condiciones estériles. El bazo fue lavado y perfundido con 15 mL de DMEM sin suplementar y la suspensión celular resultante fue transferida a un tubo cónico de 15 mL. La suspensión fue centrifugada durante

10 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células (*pellet*) fueron resuspendidas en 7 mL de DMEM suplementado.

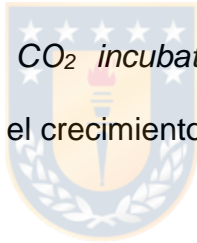
3.1.2) Cultivo de hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2:

Se utilizaron clones de hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2 originados en una investigación anterior (Soto, 2015). Estos hibridomas se retiraron desde nitrógeno líquido (-195,8 °C), se descongelaron a baño maría y, posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* resultante fue resuspendido en 1 mL de DMEM suplementado.

Luego, los hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2 fueron traspasados a botellas de cultivo T25, donde se añadió DMEM suplementado junto con 1 mL de *feeder*. Se incubaron con la tapa semi-abierta en cámara de cultivo *SANYO CO₂ incubator* (ARQUIMED) a 37°C, 10% CO₂. (Schelling, 1995; Soto, 2015).

3.2. Clonación por dilución límite

Se prepararon diluciones seriadas de los hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2. Para ello, primero se obtuvo una suspensión celular de 160 células/mL en DMEM suplementado. A continuación, se realizó una dilución seriada para obtener suspensiones de 40 células/mL y 10 células/mL en DMEM suplementado. Se sembraron en microplacas *Nunclon™* de 96 pocillos 100 μ L de cada suspensión celular, sobre 50 μ L de *feeder* sembrado previamente en cada pocillo. Las placas se incubaron a 37°C y 10% de CO₂ en cámara de cultivo *SANYO CO₂ incubator* (ARQUIMED) y se mantuvieron alrededor de 7-10 días hasta el crecimiento de los clones.



3.2.1) Expansión de clones seleccionados

Cuando se seleccionó un clon como productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2, se hizo traspaso de éste a una placa de pocillos de mayor tamaño. Se traspasó el clon desde una placa de 96 pocillos a una de 24 pocillos (*Nunclon™*). Se adicionaron 150 μ L de *feeder* en el pocillo a utilizar y se retiró en un volumen aproximado de 200 μ L del clon seleccionado, arrastrando todas las células desde el fondo del pocillo de la placa de 96. Se rellenó el pocillo con más DMEM suplementado.

Posterior a días de incubación y al crecimiento de los clones seleccionados, se traspasaron a botellas de cultivo T25 y, subsiguientemente, a botellas de cultivo T175, sin la utilización de *feeder*, solo con DMEM suplementado (Hamilton, Davis, 1995; Soto, 2015).

3.3. Caracterización de sobrenadantes de hibridomas productores de anticuerpo anti-Lp-PLA2



Para determinar la presencia de anticuerpos anti-Lp-PLA2 producidos por los hibridomas, se utilizó la técnica de ELISA indirecto.

3.3.1) Reactividad anti-Lp-PLA2

Para determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales (AcMos) presentes en los sobrenadantes de cultivo, se utilizó como antígeno la proteína Lp-PLA2 recombinante producida y purificada en una investigación precedente (Soto D., 2015).

Se sensibilizó una placa ELISA *Maxisorp*[™] con 100 μ L de la proteína recombinante Lp-PLA2 (10 μ g/mL) en cada pocillo. Se dejó incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Se bloqueó la placa con 150 μ L de ovoalbúmina (OVA) al 1% (p/v) y se incubó en cámara húmeda a 37°C por una hora. Se utilizó como anticuerpo primario 100 μ L, por pocillo, de los sobrenadantes de los hibridomas productores de anticuerpo anti-Lp-PLA2. Como anticuerpo secundario fue utilizado 100 μ L de anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, dilución 1:25.000). En ambas etapas, cada anticuerpo fue incubado en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora. Finalmente, se reveló con 100 μ L de ortofenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno al 30% (v/v) en 0,15 M buffer citrato-fosfato, pH 5.0 (buffer sustrato), por 10 a 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. La reacción fue detenida mediante la adición de aproximadamente 50 μ L de H₂SO₄ al 20% (v/v). El material no adsorbido después de cada etapa se eliminó lavando la placa tres veces con el buffer PBS-tween (0,05%) durante 3 minutos cada lavado. Se midió la densidad óptica mediante espectrofotometría en el lector de microplacas *SYNERGY-HTX* (Biotek) a 490 nm.

3.3.2) Reactividad anti albúmina humana

Se realizó ELISA indirecto para determinar la posible reactividad cruzada con albúmina humana. Se procedió como en el punto 3.1) pero la sensibilización de la placa ELISA *Maxisorp*[™] se ejecutó con 100 μ L de albúmina humana (10 μ g/mL) en cada pocillo y se dejó incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

3.3.3) Determinación de isotipos



Se sensibilizó una placa ELISA *Maxisorp*[™] con 100 μ L de la proteína recombinante Lp-PLA2 (10 μ g/mL) en cada pocillo. Se dejó incubar durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Se agregaron 100 μ L a cada pocillo de los sobrenadantes de cultivo en estudio y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente, durante 2 horas. Como anticuerpos isotipificadores se utilizaron anticuerpos contra las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas de ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA; Sigma-Aldrich, dilución 1:1.000). Se incubaron en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti IgG de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:2.500), que se incubó durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente, se

reveló con 100 μL de OPD y peróxido de hidrógeno al 30% (v/v) en 0.15 M buffer citrato-fosfato, pH 5.0, por 10 a 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. La reacción fue detenida mediante la adición de 50 μL de H_2SO_4 al 20% (v/v) en cada pocillo. Se lavó la placa tres veces con el buffer PBS-tween (0,05%) durante 3 minutos cada lavado, entre cada una de las distintas etapas. Se midió la densidad óptica mediante espectrofotometría en el lector de microplacas *SYNERGY-HTX* (Biotek) a 490 nm (Sigma-Aldrich, 2011).

3.3.4) Análisis por *Western blot*

Se preparó un gel de 12% (p/v) poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones denaturantes. Las muestras fueron tratadas con tampón Laemmli 5X (0,5 M Tris HCl pH 6,8, 20% glicerol, 10% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) azul de bromo fenol, y 5% 2-mercaptoetanol), en una proporción 4:1 (muestra: tampón) y fueron calentadas a 95°C durante 10 minutos. Se cargó 3 μL de marcador de peso molecular *prestained protein ladder-extra broad molecular weight ab11602* (Abcam) y 20 μL de proteínas por carril equivalente a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína recombinante Lp-PLA2, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína recombinante ultra-purificada (gel) Lp-PLA2, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina humana y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de suero humano. Se separaron durante 2 horas a 120 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF (previamente activada con metanol), en cámara de

transferencia húmeda. La transferencia se realizó por 2 horas a 250 mA. Las membranas se lavaron con PBS 1X, tres veces por 5 minutos y fueron bloqueadas con 5% (p/v) de PBS-leche descremada por una hora a temperatura ambiente, en agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el sobrenadante de cultivo del hibridoma seleccionado, a temperatura ambiente. Luego, la membrana fue lavada 3 veces con PBS-Tween 0,05%, por 5 minutos. A continuación, la membrana fue incubada con el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa, diluido en PBS-Tween 0,05% (1:3.000) y leche descremada 1%, por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, la membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween 0,05% y se reveló con el kit de quimioluminiscencia *Pierce ECL Western Blotting substrate*.

Además, después de realizar la separación proteica por electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 0,1% durante 15 minutos en agitación y, posteriormente, lavados con solución decolorante conteniendo metanol, ácido acético y agua (4:3:4) hasta evidenciar las bandas proteicas (Radojkovic, 2011).

3.4) Almacenamiento de los clones en nitrógeno líquido

Se alicuotó $2,5 \times 10^6$ células/mL de los clones seleccionados por cada criotubo. Se centrifugaron los criotubos durante 5 minutos a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante fue resuspendido y homogeneizado suavemente en 1 mL de solución para congelar (suero bovino fetal 95% + dimetilsulfóxido (DMSO) 5%). Posteriormente, se dispusieron los criotubos en el recipiente de congelación *Mr. Frosty™* (Nalgene) y fueron almacenados a -80°C para ser congelados de manera gradual. Luego, los criotubos fueron almacenados en un tanque con nitrógeno líquido (Soto, 2015).



3.5) Producción de fluido ascítico

Se utilizaron 8 ratones hembras BALB/c, de 8 a 9 meses de edad, provenientes del Centro Regional para Estudios Avanzados para la Vida (CREAV, Universidad de Concepción), que tuvieron libre acceso a comida y agua. Se inoculó a las ratonas con 0,5 mL de pristano intraperitoneal. Transcurrido 10 días, se inmunizaron con una inyección intraperitoneal de 3×10^6 células del hibridoma seleccionado en 0,5 mL de suero fisiológico estéril. Aproximadamente entre 10 a 15 días después, se extrajo el fluido ascítico desde la cavidad peritoneal de las ratonas inyectadas. Previa a la extracción,

las ratonas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, se determinó el momento de sacrificio según el protocolo de supervisión adjuntado en anexo I.

El fluido ascítico obtenido se incubó a temperatura ambiente por 60 minutos, se centrifugó a 5200 rpm por 10 minutos y se almacenó a -20°C para su uso posterior (Canadian Council on Animal Care, 2002).

3.6) Purificación de anticuerpos



3.6.1) Precipitación de globulinas con sulfato de amonio

Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), pH 7,0. Se determinó el volumen de fluido ascítico y se calculó el volumen de la solución de sulfato de amonio a utilizar para obtener una saturación del 45%. El volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se agregó gota a gota, y se dejó en agitación suave durante 2 horas en hielo. Posteriormente, se dejó toda la noche a 4°C . Se centrifugó a 3000 g por 30 minutos a 4°C , se descartó sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en un mínimo de volumen de PBS 1X.

Las globulinas precipitadas se dializaron 3 veces contra 1L de PBS 1X por 24 horas a 4°C , en agitación constante (González, 1995a).

3.6.2) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.

Se utilizó una columna agarosa-proteína A. Se equilibró la columna con buffer de unión manteniendo un flujo de 1 gota cada 10 segundos. Se sembró en la columna las globulinas obtenidas por precipitación por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, considerando la capacidad de retención de la columna. Luego, se realizó la elución de la muestra agregando buffer de unión a pH 7,0, recolectando fracciones de 1 mL y se les determinó la densidad óptica (D.O) a 280 nm en el espectrofotómetro *UV-1601 (SHIMADZU)*. Una vez que el valor de D.O llegó a ser menor a 0,005 se realizó la elución de las IgG unidas a la agarosa-proteína A con buffer glicina 0,1 M; pH 3.0. Las fracciones obtenidas se neutralizaron mediante la adición de 2 gotas de TRIS 1M, pH 8.0 (González, 1995b).

3.6.3) Concentración anticuerpo purificado

Se hizo un *pool* con las fracciones neutralizadas y se procedió a concentrar el AcMo purificado mediante centrifugación con *Centricon® Plus-70* (Millipore). Se colocó el recipiente del filtro en la copa de colección del filtrado, se adicionó el *pool* de las fracciones de AcMo purificado en el recipiente del filtro y se centrifugó por 40 minutos a 5500 rpm, a 4°C. Se retiró cuidadosamente el concentrado del filtro y se traspasó la solución con el AcMo concentrado a un tubo cónico de 15 mL. Posteriormente, se dializó 3 veces el concentrado

obtenido contra 1 L de PBS 1X, durante 24 horas a 4 °C. Luego, fue almacenado a -20°C (Soto, 2015).

3.6.4) Cuantificación proteínas totales

Las proteínas fueron cuantificadas con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo scientific®) basado en el método modificado de Lowry. Siguiendo las instrucciones de dicho kit, la determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, a cada pocillo se le agregaron 25 µL de muestra o estándar y 200 µL de la mezcla reactivo A + reactivo B (proporción 50:1). Se dejó incubar la placa por 30 minutos a 37°C, en oscuridad. Se midió absorbancia a 562 nm en el equipo lector de microplacas *SYNERGY-HTX* (Biotek). La curva de calibración se realizó utilizando un estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) de concentración 2000 µg/mL.

3.6.5) Titulación del anticuerpo purificado

La titulación del anticuerpo se realizó mediante la técnica de ELISA indirecto, para lo cual se sensibilizó una placa de ELISA *Maxisorp™*, con la proteína recombinante Lp-PLA2, (10 µg/mL), durante toda la noche a 4°C. Se realizó el lavado de la placa con PBS-Tween 0,05% 3 veces por 3 minutos cada lavado,

proceso que se repitió después de cada incubación. Se bloqueó la placa con 150 μL de OVA 1%. Se realizaron diluciones seriadas del anticuerpo monoclonal a titular y se dispuso 100 μL de cada dilución por pocillo; se dejó incubar durante 1h a 37°C. Se adicionó 100 μL anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000) y se dejó incubar durante 1h a 37°C. Finalmente, se reveló con 100 μL TMB/H₂O₂ en cada pocillo y se esperó de 5 a 30 min. Se detuvo la reacción con 50 μL de H₂SO₄ 20% (v/v) y se midió la D.O a 450nm en el lector de microplacas SYNERGY-HTX (Biotek).

El título del anticuerpo correspondió a la dilución del mismo que produjo un 50% de la máxima absorbancia registrada (Soto, 2015).

3.6.6) ELISA del anticuerpo monoclonal purificado y distintas concentraciones de Lp-PLA2

Se realizó ELISA indirecto para conocer la relación entre la concentración de Lp-PLA2 y el AcMo purificado. Se dejó sensibilizando una placa de ELISA *Maxisorp*[™] de 96 pocillos con diluciones seriadas de proteína recombinante Lp-PLA2, en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Luego, se procedió como en el punto 3.1), sin embargo, como anticuerpo primario se utilizó 100 μL de anticuerpo monoclonal purificado y como agente de revelado se utilizó TMB/H₂O₂.

3.7) ELISA para la cuantificación de Lp-PLA2

3.7.1) Conjugación del anticuerpo con biotina

Se dispusieron 2 mg/mL de anticuerpo monoclonal en una membrana de diálisis en 1L de 0,1M NaHCO₃, durante 24 h, en agitación constante a 4°C. Transcurridas las 24 h, se traspasó el contenido a un microtubo y se agregaron 10 µL de 0,1M biotina disuelto en DMSO. El microtubo se protegió de la luz con aluminio y se dejó en agitación durante 1 hora. Luego, se dispuso el contenido en membrana de diálisis y se dializó el anticuerpo monoclonal-biotinilado 3 veces en 1L de PBS 1x, durante 24 horas a 4°C, con agitación constante. Se agregó glicerol en proporción 1:1 y se almacenó a -20°C (Hauglang, You, 1995).

3.7.2) Titulación del anticuerpo biotinilado

La titulación de los anticuerpos biotinilados se realizó como en el punto 6.5) mediante la técnica de ELISA indirecto, sensibilizando una placa ELISA *Maxisorp*[™] con la proteína Lp-PLA2, (10 µg/mL), se bloqueó la placa y se realizaron diluciones seriadas de los conjugados biotinilados a titular. Sin

embargo, en este caso, para el revelado se agregó avidina conjugada a peroxidasa en PBS-Tween 0,05% (1:1.000) y se incubó a 37°C, por una hora. Luego, se agregó TMB/H₂O₂ y, posteriormente, se detuvo la reacción con 50 µL de H₂SO₄ 20%. Se midió D.O a 450nm en el lector de microplacas *SYNERGY-HTX* (Biotek).

3.7.3) Técnica de ELISA sándwich

Se dejó sensibilizando placa ELISA *Maxisorp*[™] con 5 a 10 µg/mL de anticuerpo monoclonal de captura (no biotinilado) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Se lavó placa con PBS-Tween 0,05%, 3 veces de 3 minutos cada lavado, lo cual se repitió después de cada incubación. Se bloqueó la placa con 150 µL de agente bloqueante (ovoalbúmina, caseína u otro) y se incubó durante 1 h a 37°C. Se agregaron diluciones seriadas de proteína recombinante Lp-PLA₂ y se dejó incubando en cámara húmeda durante 1 hora a 37°C. Se utilizó como anticuerpo de revelado un anticuerpo monoclonal anti-Lp-PLA₂ biotinilado, y se incubó en cámara húmeda durante 1 h a 37°C. Se agregó el conjugado avidina-peroxidasa diluida 1:1.000 en PBS-Tween 0,05% y se dejó incubar durante 1 h a 37°C. Finalmente, se reveló con 100 µL de TMB/H₂O₂ y se esperó de 5 a 30 min. Se detuvo reacción con 50 µL de H₂SO₄ 20% y se midió la densidad óptica a 450nm en el lector de microplacas *SYNERGY-HTX*.

3.7.4) Técnica de ELISA por inhibición competitiva

Se dejó sensibilizando una placa de ELISA *Maxisorp*[™] con 5 µg/mL de proteína recombinante Lp-PLA2 en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Se hicieron diluciones seriadas de Lp-PLA2 con el anticuerpo biotinilado en su título (vol/vol) y se dejaron en PBS-Tween 0,05%, resguardados de la luz durante toda la noche. Se hizo lavado de placa con PBS-Tween 0,05% 3 veces, de 3 minutos cada uno, lo cual se repitió después de cada incubación. Se bloqueó la placa con 150 µL de caseína 1% y se incubó durante 1 h a 37°C. Se agregaron las diluciones seriadas de Lp-PLA2 + anticuerpo biotinilado y se dejó incubar durante 1 h a 37°C. Se agregó el conjugado de avidina-peroxidasa diluida (1:1.000) en PBS-Tween 0,05% y se dejó incubar 1 h a 37°C. Posterior al lavado, se reveló con TMB/H₂O₂, se detuvo la reacción con 50 µL H₂SO₄ y se midió la absorbancia en el lector de microplacas *SYNERGY-2* (Biotek) a 450 nm (Boster Biological Technology, P: 10-11/16-18.).

3.7.5) Utilización de kit comercial Quantikine® ELISA *Human PLA2G7/PAF-*

AH/Lp-PLA₂ Immunoassay

Se hizo uso del kit comercial Quantikine® ELISA *Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay*, siguiendo las instrucciones de dicho kit (R&D Systems, Inc., 2016). Además, se hizo una comparación de los reactivos de Quantikine® ELISA kit con la proteína Lp-PLA2 recombinante y el anticuerpo biotinilado utilizados en esta investigación, igualmente siguiendo las instrucciones del producto comercial, con excepción del anticuerpo biotinilado, donde se agregó la etapa de incubación con avidina-peroxidasa como en el punto 7.3) antes del revelado con los reactivos de Quantikine® ELISA kit.

4. RESULTADOS

4.1) DESARROLLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°1

4.1.1) Cultivo y clonación de hibridomas productores de anticuerpo anti-Lp-PLA2:

Se descongelaron y cultivaron los hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2 denominados: 3G4, 5F6, 2A7-I y 6A1A2 en medio de cultivo (DMEM suplementado + *feeder*). Transcurridos unos días de cultivo, se logró el crecimiento de los clones 5F6, 2A7-I y 6A1A2. Aunque se descongeló más de un vial del clon 3G4 no se observó crecimiento celular.

Se decidió avanzar con el clon 6A1A2 (producido en trabajo de tesis de Soto D., 2015), ya que poseía una mayor reactividad contra la proteína recombinante Lp-PLA2.

Se realizó el procedimiento de clonación por dilución límite del hibridoma 6A1A2, para lo cual se prepararon suspensiones celulares de 160, 40 y 10 células/mL, las cuales fueron sembradas en 2 placas de 96 pocillos.

En la placa número uno, fueron sembrados 100 μ L por pocillo de las suspensiones de 160 y 40 células/mL, ocupándose 4 filas para cada suspensión (48 pocillos para cada suspensión celular). La placa número dos fue sembrada totalmente con la suspensión celular de 10 células/mL, siendo 100 μ L de suspensión celular por cada pocillo.



Aproximadamente 10 días después de la clonación, se logró observar macroscópicamente el crecimiento celular en los pocillos. Como resultado, se obtuvo el crecimiento de un total de 44 subclones en las dos placas sembradas; 23 subclones en los pocillos donde se sembró la suspensión de 160 células/mL, 13 subclones en los pocillos con 40 células/mL y 10 subclones en la placa de 10 células/mL. Si se considera el total de pocillos sembrados para cada suspensión celular, el crecimiento de clones representa un 48%, 27,1% y 10,4%, respectivamente.

4.1.2) Ensayos de caracterización de los sobrenadantes de hibridomas

4.1.2.1) Reactividad anti-Lp-PLA2

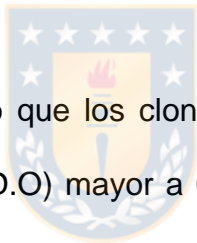
Para determinar la presencia de los anticuerpos anti-Lp-PLA2 producidos por los hibridomas, se utilizó la técnica de ELISA indirecto.

El cambio de color en el medio de cultivo (de rojo a amarillo) fue indicador de la proliferación de los hibridomas y, por ende, de la secreción y presencia de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo. Cada clon fue evaluado para determinar su reactividad contra la proteína Lp-PLA2 y contra la albúmina humana, una vez que el color del sobrenadante estaba virado a amarillo.

Para seleccionar los subclones en el ensayo de clonamiento, se evaluó la reactividad anti-Lp-PLA2 de un total de 23 subclones: 13 subclones correspondientes a los cultivos con 160 células/mL; 4 al cultivo con 40 células/mL y 6 subclones pertenecientes a la placa con 10 células/mL (tabla 4-1). Además, se corroboró la reactividad de los anticuerpos anti Lp-PLA2 de los hibridomas 5F6 y 2A7-I.

Tabla 4-1: Subclones de 6A1A2 evaluados para reactividad anti-LpPLA2

Cultivo (células/mL)	Subclones 6A1A2
160	1A10, 1B1, 1B7, 1B11, 1C2, 1C3, 1C8, 1C9, 1C11, 1D8, 1D9, 1D10, 1D12
40	1E2, 1E5, 1F2, 1F6
10	2A8, 2B2, 2E3, 2D7, 2F11, 2H1



Como resultado, se observó que los clones poseían reactividad positiva para Lp-PLA2 (densidad óptica (D.O) mayor a 0,5), siendo las D.O de un promedio de 1,32 para los subclones de 6A1A2, en un rango entre 0,93 y 1,68. Para los hibridomas 5F6 y 2A7-I sus D.O fueron de 0,135 y 0,845, respectivamente. Debido a su baja reactividad contra Lp-PLA2 (D.O < 0,5), el hibridoma 5F6 fue descartado (Figura 4-1).

Finalmente, del total de los subclones que crecieron, se descartaron aquellos que: poseían más de un cúmulo de células (observados de manera tanto macroscópica como microscópicamente), aquellos que no mostraron cambio de color en el medio de cultivo o los que crecieron lentamente.

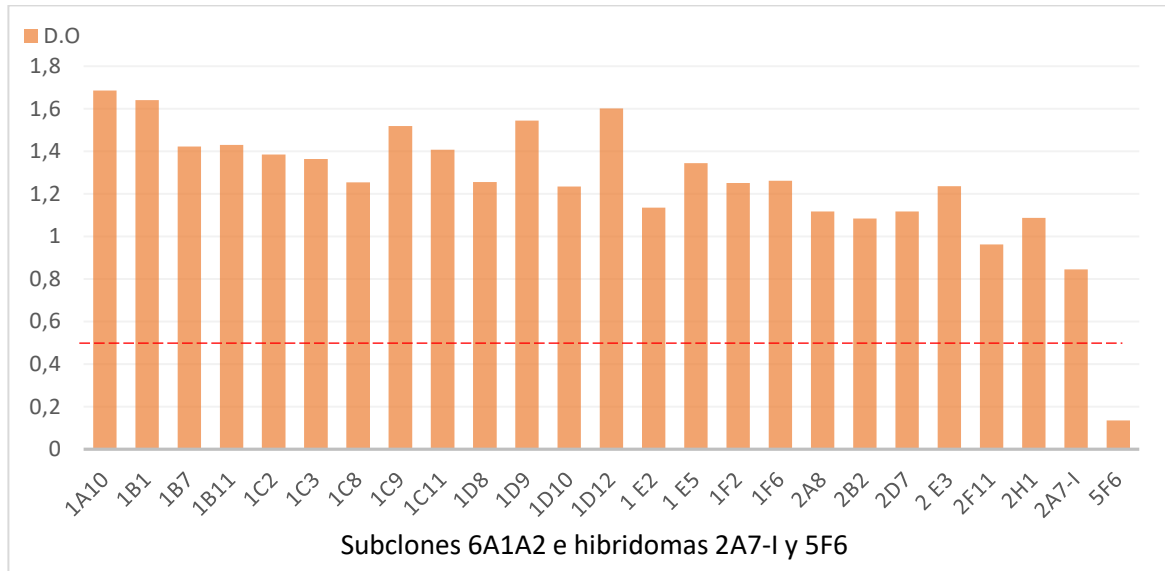


Figura 4-1: Reactividad de los clones anti-Lp-PLA2 seleccionados como positivos. Se consideraron como positivos aquellos clones que presentaron D.O mayores a 0,5. El ensayo fue realizado por ELISA Indirecto y se evaluó la reactividad de los sobrenadantes recogidos de las placas de 96 pocillos contra la proteína Lp-PLA2 recombinante (10 µg/mL).

Se seleccionaron los subclones de la placa 2 (10 células/mL): 2A8, 2B2, 2D7, 2E3, 2H1 y el subclon 1E5 (40 células/mL) para ser expandidos a placas de cultivo de 24 pocillos, debido a su reactividad positiva a Lp-PLA2 y su probabilidad de origen desde una única célula.

4.1.2.2) Reactividad contra albúmina humana

Para comprobar si los anticuerpos poseían reactividad cruzada con albúmina humana, se evaluó el clon 2A7-I y los 6 subclones de 6A1A2 seleccionados y cultivados en placa de 24 pocillos, mediante el método ELISA indirecto. Se observó que ninguno de los clones testeados poseía reacción cruzada con albúmina humana ($D.O < 0,1$). Debido a este resultado y a que los subclones de 6A1A2 poseían una D.O similar, se eligieron los clones 2A8 (6A1A2A8) y 2H1 (6A1A2H1) para ser expandidos a frascos de cultivo T25, basándose en su rapidez de crecimiento y elevada viabilidad en cultivo.



4.1.2.3) Determinación de isotipo y análisis por *Western blot*

Se realizó un ensayo de isotipificación para los clones 6A1A2A8, 6A1A2H1 y 2A7-I. Como resultado, se vio que los dos subclones de 6A1A2 poseían una mezcla de isotipos: IgG1 e IgG2a; mientras que el anticuerpo del clon 2A7-I solo correspondía a anticuerpos de subclase IgG2b.

Además, se realizó un análisis por *Western blot* con los sobrenadantes de los clones 6A1A2H1 y 2A7-I, que confirmó la reactividad positiva para Lp-PLA2 y que no presentaban reactividad cruzada con la albúmina humana (Figura 4-2).

4.1.3) Selección de hibridoma productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2

Se decidió continuar este trabajo de investigación con el hibridoma 2A7-I, ya que, a pesar que 6A1A2 fue clonado en dos ocasiones (en una investigación anterior y en el presente trabajo) no se logró la monoclonalidad del hibridoma, pues se detectó la presencia de anticuerpos de 2 isotipos diferentes.



4.1.4) Clonación por dilución límite del hibridoma 2A7-I, productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2

Se prosiguió con el hibridoma 2A7-I, realizándose el mismo proceso descrito anteriormente, es decir, clonación por dilución límite y evaluación de la reactividad de los sobrenadantes de sus respectivos subclones.

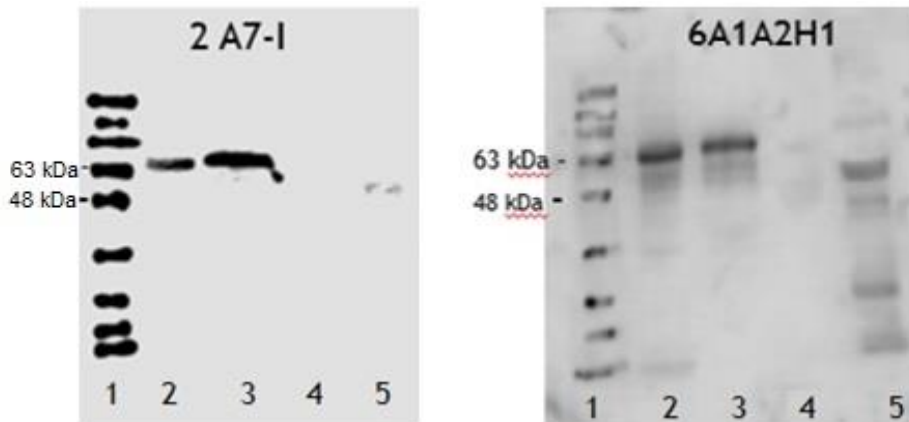


Figura 4-2: Reactividad de los anticuerpos 2A7-I y 6A1A2H1, mediante *Western blot*.

Fueron sembrados en cada gel: 3 μ L marcador de peso (carril 1); 25 μ g/mL de proteína recombinante Lp-PLA2 (carril 2); 10 μ g/mL proteína recombinante ultra-purificada (gel) Lp-PLA2 (carril 3); 50 μ g/mL albúmina humana (carril 4); 50 μ g/mL suero (carril 5).

En la clonación, se obtuvo un total de 30 subclones: 18 de la suspensión 160 células/mL, 9 subclones originados desde la suspensión de 40 células/mL y 3 subclones derivados de la suspensión celular de 10 células/mL. Si se considera el total de pocillos sembrados para cada suspensión celular, el crecimiento de clones representa un 37,5%, 18,5% y 3,12%, respectivamente.

4.1.5) Ensayos de reactividad de los sobrenadantes de los subclones 2A7-I

Para los ensayos de reactividad anti-Lp-PLA2, se testearon 26 de los subclones totales (Tabla 4-2). Se confirmó que la mayoría de los subclones poseía una reactividad positiva anti-Lp-PLA2 con densidades ópticas que variaban entre los 0,5 a 0,8. Se descartaron los subclones 1C4, 1C5 y 1C9 (pertenecientes al cultivo de 160 cél/mL) por no poseer reactividad positiva anti-Lp-PLA2 (D.O <0,5) (Figura 4-3).



4.1.6) Selección de subclones 2A7-I y expansión en cultivo.

Basándose en las condiciones de cultivo, proliferación de las células de hibridoma y presencia de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo, se seleccionaron los subclones 1C7, 1F4, 1G10, 2E3 y 2G6 para ser expandidos a placas de cultivo de 24 pocillos. Finalmente, se escogieron los clones 2A7-I2G6 (2A7G6) y 2A7-I1C7 (2A7C7) para ser expandidos a botellas de cultivo T25.

Tabla 4-2: Subclones de 2A7-I evaluados para reactividad anti-LpPLA2

Cultivo (células/mL)	Subclones 2A7-I
160	1A4, 1A5, 1B4, 1B5, 1B7, 1B9, 1C4, 1C5, 1C6, 1C7, 1C8, 1C9, 1C11, 1D3, 1D11
40	1E2, 1E6, 1F2, 1F4, 1G7, 1G9, 1G10, 1H5
10	2E2, 2E3, 2G6

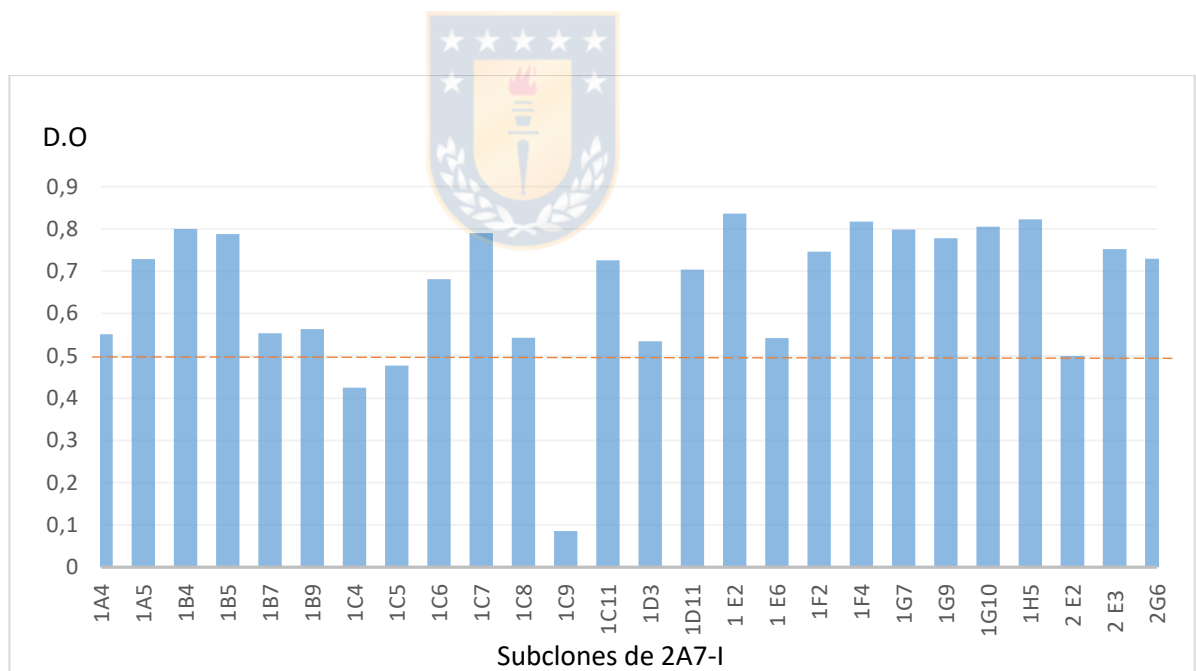


Figura 4-3: Reactividad de los anticuerpos anti-Lp-PLA2 producidos por los subclones de 2A7-I. Se consideraron positivos aquellos clones que presentaron densidad óptica mayor a 0,5. El ensayo fue realizado por ELISA Indirecto y se evaluó la reactividad de los sobrenadantes recogidos de las placas de 96 pocillos con la proteína Lp-PLA2 recombinante (10 μ g/mL).

Aunque ambos clones, 2A7G6 y 2A7C7, poseían características muy similares, se consideró que el clon 2A7G6 era el mejor candidato para ser expandido a una botella de cultivo de mayor tamaño. En otras palabras, el hibridoma 2A7G6 fue seleccionado para la obtención de mayor cantidad de anticuerpos mediante la producción de fluido ascítico en ratones.

4.1.7) Electroforesis en gel SDS-PAGE y evaluación de la reactividad del anticuerpo 2A7G6 mediante *Western blot*.

Se verificó la reactividad anti-Lp-PLA2 y reacción cruzada contra albúmina humana del anticuerpo producido por el clon 2A7G6 mediante *Western blot*; además, se realizó una electroforesis SDS-PAGE y se tiñó el gel con azul de coomassie. Para esto, se utilizó 25 $\mu\text{g/mL}$ de proteína recombinante Lp-PLA2, 10 $\mu\text{g/mL}$ Lp-PLA2 recombinante ultra-purificada (gel); 50 $\mu\text{g/mL}$ albúmina humana y 50 $\mu\text{g/mL}$ suero humano (Figura 4-4).

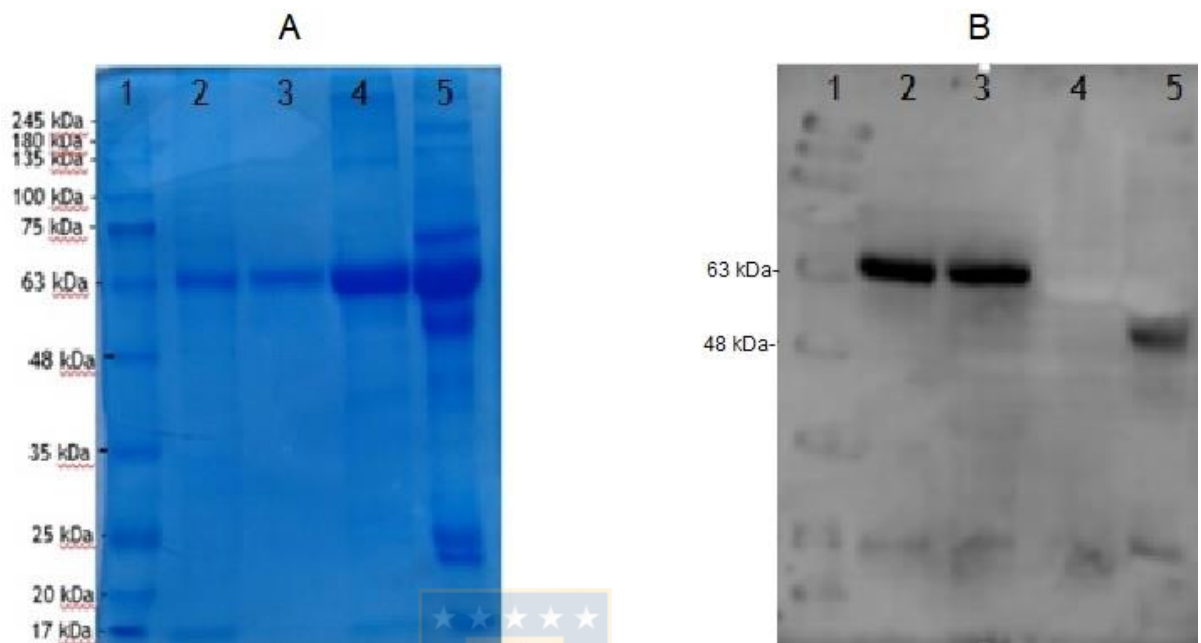


Figura 4-4: Electroforesis SDS-PAGE teñido con azul de coomassie (A) y evaluación de la reactividad del anticuerpo 2A7G6, mediante *Western blot* (B). Se cargó: 3 μ L marcador de peso (carril 1); 25 μ g/mL de proteína recombinante Lp-PLA2 (carril 2); 10 μ g/mL Lp-PLA2 recombinante ultra-purificada (gel) (carril 3); 50 μ g/mL albúmina humana (carril 4); 50 μ g/mL suero humano (carril 5).

Se pudo apreciar la separación de los componentes del suero humano y la similitud de peso entre las diferentes proteínas utilizadas en cada carril. Además, se observó que el anticuerpo reconoció las 2 preparaciones de Lp-PLA2 recombinante como también se observó una banda en el carril del suero humano.

4.1.8) Almacenamiento de los clones en nitrógeno líquido

A medida que se avanzó en la investigación, fueron congeladas $2,5 \times 10^6$ células/mL de los subclones preseleccionados en 1 mL de solución para congelar (95% suero bovino fetal + 5% dimetilsulfóxido (DMSO)), con el fin de mantener un stock para futuras investigaciones (tabla 4-3).

4.2 DESARROLLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°2



4.2.1) Producción de fluido ascítico

Se utilizaron 8 ratones BALB/c, hembras, entre 8 y 9 meses de edad con libre acceso a comida y agua. Fueron tratadas con 500 μ L de pristano intraperitoneal y transcurridos 10 días se inocularon por vía intraperitoneal con aproximadamente 3×10^6 células del hibridoma 2A7G6. Dentro de los 15 días posteriores, las ratonas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se obtuvo el fluido ascítico.

En total, se logró un volumen de 14,7 mL de fluido ascítico.

Tabla 4-3: Hibridomas almacenados en nitrógeno líquido

Clon	Nº crioviales almacenados
2A7-I	8
5F6	3
6A1A2	3
6A1A2A8	2
6A1A2H1	4
2A7G6	4
2A7C7	3
(2A7-I)2E3	3

4.2.2) Precipitación de globulinas con sulfato de amonio y cuantificación de proteínas.

Se precipitaron las globulinas del fluido ascítico obtenido con una solución saturada (45%) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posteriormente, se centrifugaron las globulinas y se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X.

Se dializó 3 veces la solución, contra 1 L de PBS 1X, con el fin de eliminar todo el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de las globulinas.

Las proteínas fueron cuantificadas por método de Lowry modificado, obteniéndose una concentración de 22 mg/mL de proteínas. Finalmente, las globulinas se almacenaron a -20°C .

4.2.3) Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

Se purificaron 2 mL de globulinas mediante cromatografía de afinidad, donde se utilizó una columna con agarosa-proteína A. Se realizó la purificación del anticuerpo en 4 etapas, sembrando 500 μL de globulinas cada vez en la columna, considerando la capacidad de retención ésta. Se realizó elución con buffer de unión a pH 7,0 recolectando fracciones de 1 mL que se les determinó D.O a 280 nm. Cuando el valor D.O fue menor a 0,005 se realizó la elución de los anticuerpos de clase IgG con buffer 0,1 M glicina pH 3.0 (Figura 4-5).

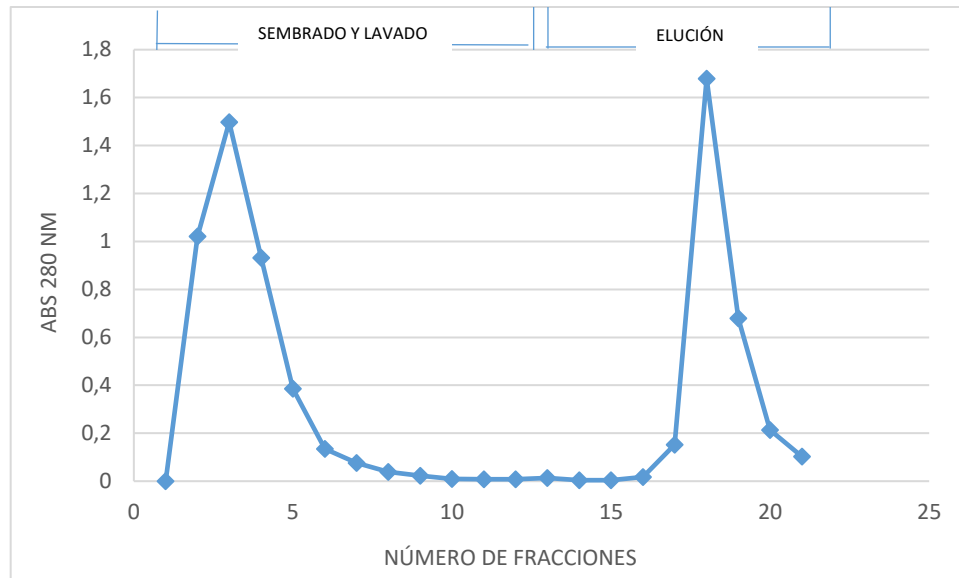


Figura 4-5: Perfil de elución de las globulinas del anticuerpo 2A7G6 por cromatografía de afinidad con agarosa-proteína A. Primera etapa, sembrado y elución con buffer de unión a pH 7,0, y segunda etapa, elución de los anticuerpos de clase IgG con buffer glicina 0,1 M pH 3.0.

Finalmente, se recolectaron 9 fracciones de aproximadamente 1 mL del anticuerpo 2A7G6 anti-Lp-PLA2, las que se neutralizaron mediante la adición de 2 gotas de TRIS 1M, pH 8,0.

4.2.4) Concentración y cuantificación del anticuerpo 2A7G6 anti-Lp-PLA2 purificado

Se realizó un *pool* con las fracciones neutralizadas y se concentraron las proteínas obtenidas de la purificación mediante centrifugación, obteniendo un volumen de 2 mL de anticuerpo concentrado. Posteriormente, el anticuerpo concentrado fue dializado 3 veces contra 1L de PBS 1X.

Al cuantificar las proteínas con el método modificado de Lowry, se obtuvo una concentración de 5,1 mg/mL de anticuerpo monoclonal 2A7G6 anti-Lp-PLA2.

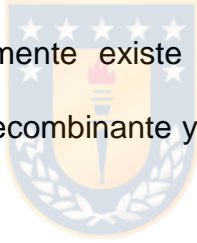
El AcMo 2A7G6 fue alicuotado y almacenado, a -20°C , tanto en la concentración original de 5,1 mg/mL, como diluido en una concentración de 1,5 mg/mL.

El título del anticuerpo 2A7G6 anti-Lp-PLA2 purificado, en su concentración original, correspondió a 1/500.

4.2.5) ELISA del anticuerpo monoclonal purificado y distintas concentraciones de Lp-PLA2

Para determinar la reactividad diferencial del anticuerpo 2A7G6 con Lp-PLA2, se realizó un ELISA indirecto con diluciones seriadas de la proteína recombinante Lp-PLA2, desde los 10 $\mu\text{g/mL}$ a los 0,01 ng/mL . Se utilizó como anticuerpo primario 2A7G6 en dilución 1/500, caseína al 1% (p/v) como proteína de bloqueo y como anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000).

Se demostró que efectivamente existe una relación proporcional entre la concentración de Lp-PLA2 recombinante y la reacción con el anticuerpo 2A7G6 (Figura 4-6).



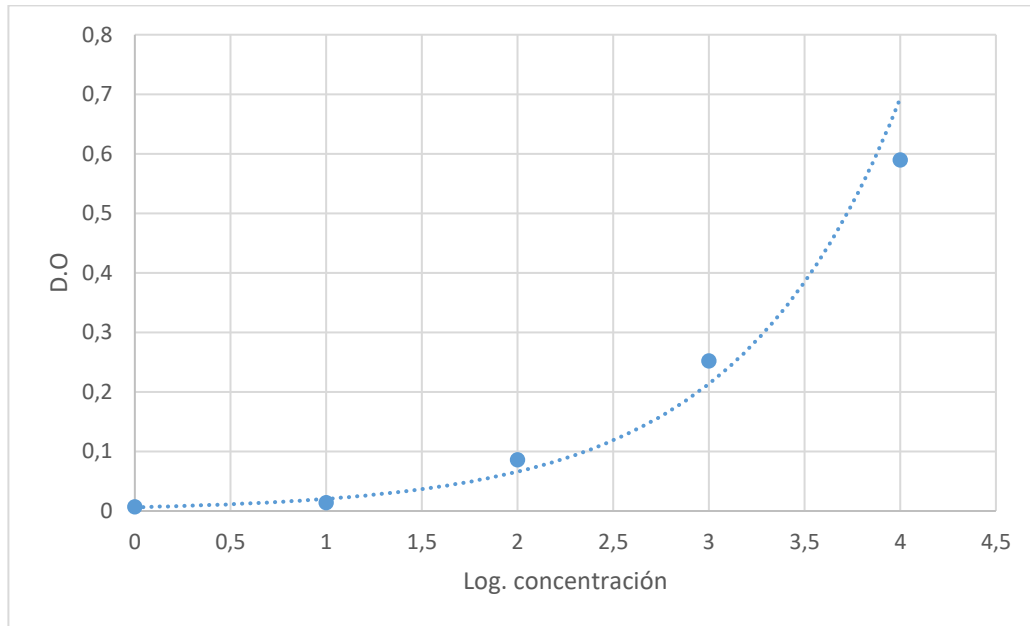


Figura 4-6. Reactividad del anticuerpo monoclonal 2A7G6 con distintas concentraciones de LpPLA2 recombinante. Logaritmo de las concentraciones de Lp-PLA2 (desde 10 $\mu\text{g/mL}$ a 0,01 ng/mL) y su respectiva D.O. Agente de bloqueo caseína 1%. Anticuerpo de revelado anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:20.000). Sustrato TMB/ H_2O_2 .

4.3 DESARROLLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO N°3

4.3.1) Técnica de ELISA sándwich

Inicialmente, se utilizó el anticuerpo 2A7G6 como anticuerpo de captura en 2 concentraciones: 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó el ensayo sin y con proteína de bloqueo (OVA al 1% (p/v)). Como anticuerpo de revelado fue utilizado el anticuerpo monoclonal 4E4E7 biotinilado (originado de una investigación anterior) en título de 1/16.000. El antígeno fue la proteína recombinante Lp-PLA2 en distintas concentraciones. Sin embargo, bajo estas condiciones no se obtuvo una curva de calibración y la D.O, a la concentración de 0 ng/mL de Lp-PLA2 recombinante, fue alta (D.O >0,5). Se obtuvieron valores de D.O parejas, tanto para los controles como para las distintas concentraciones del anticuerpo de captura 2A7G6 (5 y 10 $\mu\text{g/mL}$), con o sin utilizar proteína de bloqueo.

Se ensayaron distintos agentes de bloqueo en el ELISA sandwich, tales como, caseína 1%, albúmina de suero bovino (BSA) 1%, ovoalbúmina 1% y eBioscience™ ELISA/ELISPOT Diluent solution (5X). Además, se evaluaron dos anticuerpos de revelado biotinilados (provenientes desde la investigación

de Soto D. (2015)): 4E4E7 y 7D2CII en títulos de 1/3.500 y 1/9.000, respectivamente, utilizando el anticuerpo de captura 2A7G6 en concentración 10 µg/mL.

Sin embargo, bajo todas estas distintas condiciones, la D.O se mantuvo alta en los pocillos sin proteína recombinante Lp-PLA2.

Cabe destacar que los anticuerpos biotinilados 4E4E7 y 7D2CII, junto con el anticuerpo sin biotinilar 2A7G6, presentaron una reacción cruzada con la proteína de bloqueo BSA 1%; además, se determinó que con la caseína se encontraba una menor señal de densidad óptica en los controles que con los otros agentes de bloqueo.

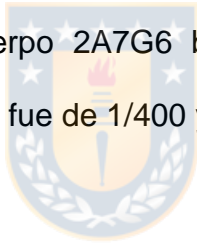
4.3.2) Conjugación del anticuerpo 2A7G6 con biotina

Con el fin de obtener una curva de calibración y así estandarizar un ELISA sandwich para la cuantificación de Lp-PLA2, se decidió invertir el orden de los anticuerpos utilizados, es decir, como anticuerpo de captura se utilizaron los anticuerpos 4E4E7 y 7D2CII, sin conjugar a biotina, en distintas

concentraciones. Como anticuerpo de revelado se decidió utilizar 2A7G6. Para ello, se debió conjugar dicho anticuerpo con biotina.

Se utilizaron 2 mg/mL del AcMo 2A7G6 para ser conjugado a biotina, se dejó en un medio básico (NaHCO_3) durante 24 horas; posteriormente, se le agregó DMSO y biotina, dejándose 24 horas en diálisis.

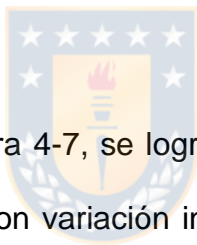
Se obtuvo 1mL del anticuerpo 2A7G6 biotinilado, que se diluyó con igual volumen de glicerol. Su título fue de 1/400 y se almacenó a -20°C .



Se realizó nuevamente un ELISA tipo sandwich, con distintas concentraciones de Lp-PLA2 recombinante y con los anticuerpos de captura 4E4E5 y 7D2CII en concentraciones de 2; 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ cada uno. Sin embargo, no se logró corregir los elevados valores de densidad óptica a concentración cero de Lp-PLA2.

4.3.3) ELISA por inhibición competitiva

Se ensayó la técnica de ELISA por inhibición competitiva, utilizando como antígeno 5 $\mu\text{g/mL}$ de Lp-PLA2 recombinante unida a la placa. Se hizo competir el antígeno en la placa con diluciones seriadas de la proteína recombinante Lp-PLA2 (desde los 100 a los 0,0001 $\mu\text{g/mL}$) con el anticuerpo 2A7G6 conjugado a biotina en su título (1/400) y utilizando como agente de bloqueo caseína 1%(p/v).



Como se muestra en la figura 4-7, se logró una inhibición máxima de un 62%, pero estas curvas presentaron variación interensayo. Además, los coeficientes de determinación (R^2) de los ensayos no fueron lo suficientemente altos para justificar una linealidad experimental ($> 0,995$).

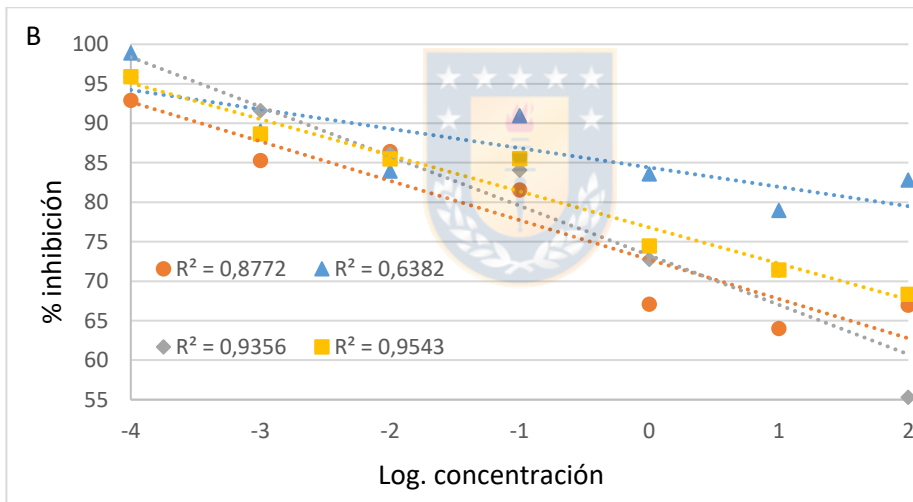
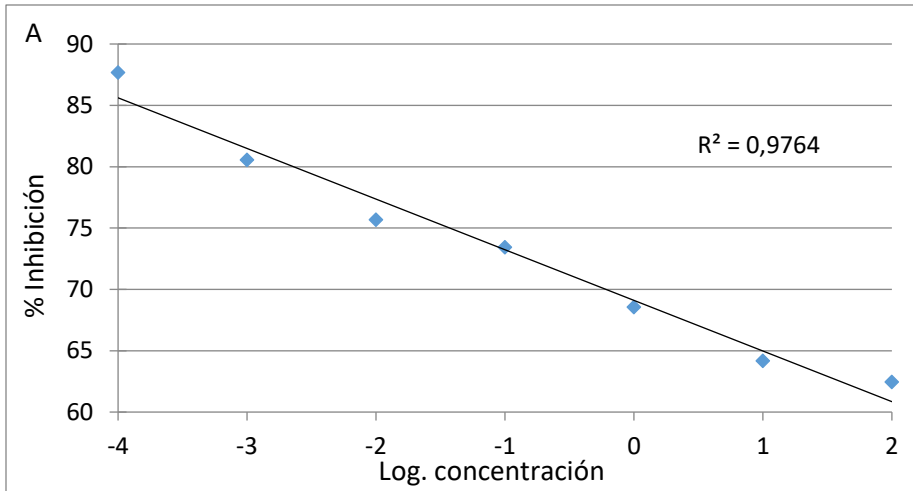
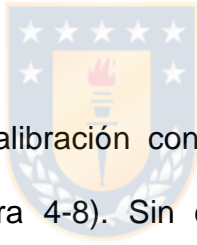


Figura 4-7. ELISA de inhibición competitiva. Porcentajes de inhibición con el anticuerpo 2A7G6 conjugado a biotina (dilución 1/400) con diluciones seriadas de Lp-PLA2 (100 a los 0,0001 $\mu\text{g}/\text{mL}$) vs Lp-PLA2 adosado a la placa (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El gráfico A es correspondiente al primer ensayo; el gráfico B muestra los ensayos posteriores en las mismas condiciones.

4.3.4) Kit comercial *Quantikine® ELISA Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay*

Finalmente, para comparar, se utilizó el kit comercial *Quantikine® ELISA Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay*. Se ensayó tanto con los materiales del kit comercial como con el anticuerpo 2A7G6 conjugado a biotina y la Lp-PLA2 recombinante utilizada en esta investigación, siguiendo las instrucciones del kit comercial.



Se obtuvo una curva de calibración con la proteína Lp-PLA2 recombinante correspondiente al kit (figura 4-8). Sin embargo, no se pudo obtener una linealidad con el anticuerpo 2A7G6 conjugado a biotina, debido a una reacción cruzada. Además, los anticuerpos del kit comercial no reconocieron la Lp-PLA2 recombinante utilizada en esta investigación.

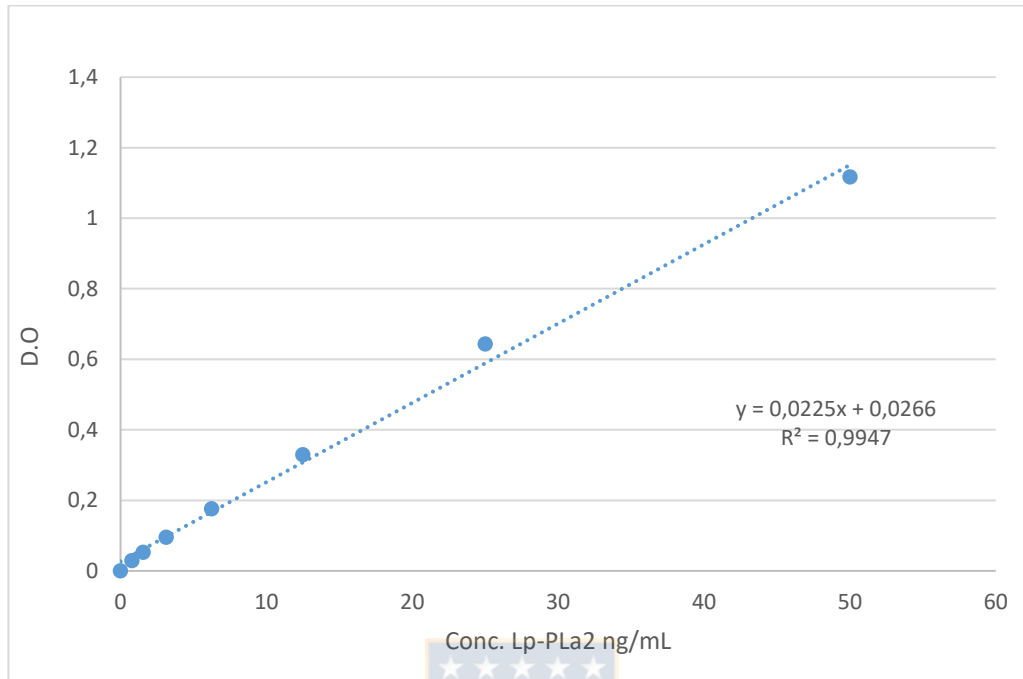


Figura 4-8: Curva de calibración de kit Quantikine® ELISA *Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay*. Se utilizó Lp-PLA₂ recombinante reconstituida perteneciente al kit comercial en concentraciones de 0 a 50 ng/mL. Absorbancia a 450nm.

5. DISCUSIÓN

Con el fin de perfeccionar los modelos de predicción de riesgo cardiovascular, se ha propuesto la determinación de los llamados biomarcadores, entre los cuales se encuentra la Lp-PLA2. Esta proteína aumenta con el desarrollo de aterosclerosis y se considera como un factor de riesgo independiente a los factores de riesgo tradicionales. Sin embargo, los actuales inmunoensayos para la determinación de la concentración plasmática de Lp-PLA2 poseen un alto costo, lo que determina que sea considerado como un biomarcador de segunda línea.

Con el fin de estandarizar un inmunoensayo, se cultivaron 4 hibridomas productores de anticuerpos anti-Lp-PLA2 recombinante. Luego, para asegurar la monoclonalidad, se realizó el procedimiento de clonación por dilución límite del hibridoma 6A1A2, ya que poseía una mayor reactividad contra la proteína recombinante que los otros hibridomas que se cultivaron (5F6 y 2A7-I).

Así se demuestra en la figura 4-1, todos los anticuerpos de los sobrenadantes de los subclones de 6A1A2 poseen una reacción positiva con Lp-PLA2 recombinante (D.O >0,5) y una elevada reactividad, con una D.O. en un rango de 0,93 a 1,68, en comparación a los hibridomas 2A7-I y 5F6 que presentaron una D.O de 0,845 y 0,135, respectivamente. Es por ello que, considerando probabilidad de origen desde un cúmulo celular, reactividad anti-Lp-PLA2 y que no presentaban reacción cruzada con albúmina humana, se eligieron y expandieron los subclones denominados 6A1A2A8 y 6A1A2H1. Sin embargo, ambos subclones presentaron 2 isotipos: IgG1 e IgG2a, lo cual indicaría que estos hibridomas presentaban más de un clon productor (o no productor) de anticuerpos anti-Lp-PLA2. Por el contrario, el anticuerpo del clon 2A7-I correspondía sólo a una subclase: IgG2b, indicando que probablemente tenía origen desde una única célula.

Como se muestra en la figura 4-3, los subclones de 2A7-I resultaron tener una menor reactividad contra Lp-PLA2, con valores de D.O en el rango de 0,5 a 0,8; mientras que los subclones de 6A1A2, 0,93 -1,68 (figura 4-1). La diferencia de reactividad entre ambos clones podría deberse a la presencia de 2 isotipos distintos de los subclones 6A1A2, o bien por una mayor concentración de anticuerpos en los sobrenadantes de cultivo.

Finalmente, se consideró que el subclon 2A7-I2G6 (2A7G6) era el mejor candidato para la producción de anticuerpos en mayor concentración a través de la obtención de fluido ascítico en ratones BALB/c.

En la figura 4-4 se confirmó, con el análisis de *Western blot*, la reactividad positiva para Lp-PLA2 del anticuerpo 2A7G6, que no se presentaba reactividad cruzada con la albúmina humana y que aproximadamente a los 55 kDa se observaba una banda en el carril de suero humano. En la electroforesis con azul de coomassie, se pudo observar la separación de las proteínas del suero humano y la similitud de peso molecular de la albúmina humana (67 kDa) y Lp-PLA2 recombinante (aprox. 65 kDa).

La diferencia del peso molecular entre la Lp-PLA2 recombinante (\approx 65 kDa) con la Lp-PLA2 humana descrita en bibliografía (45,5 kDa) (Burke, Dennis, 2009) y con el peso de la Lp-PLA2 establecido en el banco de proteínas Uniprot (50 kDa), se debe principalmente a que la proteína recombinante utilizada fue generada con una cola de histidina y con un péptido señal de la IL-2 (Soto, 2015). Además se han descrito modificaciones postraduccionales como glicosilaciones en la asparragina 423 y 433 (Uniprot, Q13093).

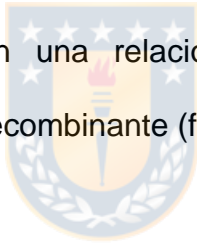
Si nos referimos a la diferencia encontrada en el análisis por *Western blot* del peso molecular de la Lp-PLA2 encontrada en el suero (aprox. 55 kDa) con la Lp-PLA2 humana (45 kDa/50 kDa (Uniprot, Q13093)), puede deberse a la existencia de polimorfismos (Balta *et al*, 2001; Wang *et al*, 2010; Widodo *et al*, 2018), puesto se utilizó un *pool* de sueros para el análisis. Estos polimorfismos han sido detectados en otras poblaciones y no se tiene registro de las posibles variaciones en Chile.

Al comparar la electroforesis con el *Western blot*, en ambos análisis se observa una banda alrededor de los 55 kDa en el carril de suero. No obstante, cada técnica tiene distintos límites de detección; el rango de sensibilidad de la tinción con azul de coomassie es de 0,5 µg y 2 µg (Yábar, 2003), mientras que el *Western blot* puede llegar a detectar picogramos (Ghosh, Gilda, Gomes, 2014). Entonces, la banda en la electroforesis no corresponde a Lp-PLA2 humana ya que su concentración en plasma está en el orden de nanogramos (Regence, 2018).

Para la producción de fluido ascítico fueron utilizados ratones BALB/c hembras, debido a que los hibridomas provienen de una fusión celular con mielomas de la misma cepa y así se evita un posible problema de histocompatibilidad al

producir el líquido ascítico (Schelling, 1995; Soto, 2015). Además, es recomendable el uso de hembras puesto que los machos suelen pelear entre ellos (Schelling, 1995).

Para la purificación por cromatografía del anticuerpo 2A7G6, se utilizó una columna con agarosa-proteína A por poseer una gran afinidad por el fragmento Fc de los anticuerpos de isotipo IgG2b (González, 1995b; InvivoGen, 2011) y se obtuvo el anticuerpo monoclonal 2A7G6 anti-Lp-PLA2 de concentración 5,1 mg/mL y título 1/500, con una relación directamente proporcional a la concentración de Lp-PLA2 recombinante (figura 4-6).



Posteriormente, se realizaron 2 tipos de inmunoensayos: ELISA sandwich y ELISA competitivo.

Para la estandarización del ELISA sandwich, se ensayó con distintos anticuerpos biotinilados: 4E4E7, 7D2CII y 2A7G6. Asimismo, se intentó con diferentes agentes de bloqueo, sin embargo, no se logró corregir la alta señal ($D.O > 0.5$) de los pocillos donde no se encontraba la Lp-PLA2. Por lo tanto, no se logró estandarizar una curva de calibración para el ELISA sándwich.

Además, se determinó que los hibridomas utilizados en esta etapa poseían reacción cruzada con BSA, cuyo peso molecular es 66,4 kDa muy similar al peso molecular de la Lp-PLA2 recombinante (\approx 65 kDa).

Así, se prosiguió con un ensayo de ELISA por inhibición competitiva, donde los ensayos no fueron reproducibles (figura 4-7). Además los coeficientes de determinación (R^2) no fueron lo suficientemente altos para justificar una linealidad experimental ($> 0,995$) (AGQ Labs Chile S.A, 2017), aunque para hacer un análisis de linealidad debe ser evaluado en condiciones de repetibilidad (SERNAPESCA, 2018).



Finalmente, a modo de comparación, se utilizó el kit comercial desarrollado por R&D systems: *Quantikine® ELISA Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay*, que corresponde a un ELISA tipo sandwich, donde se ensayó tanto con los materiales del kit comercial como con el anticuerpo 2A7G6 conjugado a biotina y la Lp-PLA2 recombinante utilizada en esta investigación.

Se obtuvo una curva de calibración con la proteína Lp-PLA2 recombinante del kit (figura 4-8). Sin embargo, no se pudo obtener una curva con el anticuerpo

2A7G6 conjugado a biotina, debido a una reacción cruzada. Esta reacción cruzada pudo ser porque los componentes del kit se reconstituyen con un buffer que contiene proteína; no está detallado en el protocolo del kit de qué proteína se trata y qué contienen los diluyentes (R&D Systems, Inc.,2016), pero es probable que se trate de BSA, ya que R&D systems (2018a) indica en su página web que suele utilizarse BSA como proteína *carrier* para mejorar la estabilidad de las proteínas recombinantes desarrolladas por esta marca y, como se mencionó anteriormente, el anticuerpo 2A7G6 posee una reactividad cruzada con BSA.



Por otro lado, el anticuerpo del kit comercial Quantikine® ELISA no reconoció la Lp-PLA2 recombinante utilizada en esta investigación. Esto puede deberse al origen de cada proteína recombinante, aunque ambas proteínas recombinantes son derivadas de *E. coli* (R&D Systems, Inc., 2016; Soto, 2015). Existen variaciones espontáneas propias de los productos biológicos que producen isoformas o microheterogeneidad (Josan, 2017), variaciones que pueden producirse durante la biosíntesis (modificaciones post-traduccionales), purificación o almacenamiento (Twomey *et al*, 2015; Beyer *et al* 2018). Las Lp-PLA2 recombinantes utilizadas tienen procesos de producción distintos, en primera instancia porque no provienen del mismo clon y, por lo tanto, van a presentar diferencias una de la otra, siendo un ejemplo de ello la diferencia

entre los pesos moleculares en condiciones denaturantes: Lp-PLA2 del kit: 42-45 kDa (R&D Systems, Inc., 2018b); Lp-PLA2 utilizada \approx 65 kDa. Así, puede que existiera un impedimento estérico para reconocer el epítipo de la Lp-PLA2 de esta investigación.

Si bien se podría tratar de estandarizar otros tipos de inmunoensayos, se recomienda que se analice primero cada componente y etapa de los inmunoensayos, puesto que otro tipo de ensayos podría encarecer el proceso.



6. Conclusiones

- Se cultivó y clonó el hibridoma 2A7-I productor de anticuerpos anti-Lp-PLA2.
- Se cultivaron, propagaron y almacenaron 5 hibridomas, para posteriores investigaciones que permitan el desarrollo y validación de un inmunoensayo de cuantificación para Lp-PLA2.
- Se obtuvo en total 10,2 mg del anticuerpo monoclonal 2A7G6 específico para Lp-PLA2 recombinante, y se dejó almacenado un total de 4 mL de globulinas sin purificar.
- A pesar de no lograr la estandarización de un ELISA, la obtención del anticuerpo monoclonal 2A7G6 específico para Lp-PLA2 y, además, su conjugación a biotina, podría contribuir a la estandarización de un inmunoensayo validado para la cuantificación plasmática de Lp-PLA2.

7. Glosario

AcMo: Anticuerpo monoclonal, anticuerpo producido por un solo clon de linfocito

B.

Anticuerpo: Molécula (proteína) responsable del reconocimiento y eliminación (neutralización) específica de antígenos.

Antígeno: Sustancia que al introducirse en el organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

ApoB: Apolipoproteína B-100.

Aterosclerosis: Síndrome caracterizado por el depósito de sustancias lipídicas en la íntima de las paredes arteriales.

Biomarcador: Indicador de interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la cual es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular y además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad.

BSA: Suero fetal bovino.

Dilución seriada: Reducción progresiva de la concentración de una sustancia en disolución, con el fin de amplificar rápidamente la dilución.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

D.O: Densidad óptica.

ECVs: Enfermedades cardiovasculares.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ENT: Enfermedad no transmisible.

Especificidad: Capacidad de un compuesto para detectar una única sustancia concreta.

Feeder: Células que proporcionan factores secretados, matriz extracelular y contacto celular para ayudar al crecimiento celular en el medio de cultivo.

Fosfolipasa: Tipo de enzima que cataliza la hidrólisis de distintos componentes en los fosfolípidos.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

Hibridoma: Línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B productor de anticuerpo, con una línea celular de mieloma (linfocito B canceroso) que no produce una inmunoglobulina propia.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

Lp(a): Lipoproteína a.

Lp-PLA2/ PAF-AH: Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína.

Microheterogeneidad: Variación en la estructura química de una sustancia (como la secuencia amino acídica de una proteína) que no produce un mayor cambio en sus propiedades.

OPD: Ortofenilendiamina.

OVA: Ovoalbúmina.

PAF: Factor activador de plaqueta.

PBS: Tampón fosfato Salino.

Pellet: Pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido.

Proteína recombinante: Proteína que se obtiene al expresar un gen clonado en una especie o línea celular distinta a la célula original.

Reactividad cruzada: Reacción que se establece entre un determinante antigénico y el anticuerpo específico para otro antígeno.

Sensibilidad: capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración de un analito.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad



8. Bibliografía

AGQ Labs Chile S.A (2017). Análisis químico, medir es comparar. Artículo técnico. Área Salud y Seguridad. Chile.

Balta G. *et al* (2001). Evidence for the Existence of the PAF Acetylhydrolase Mutation (Val279Phe) in Non-Japanese Populations: A Preliminary Study in Turkey, Azerbaijan, and Kyrgyzstan. *Thrombosis Research*. Vol. 101. P: 231-234. doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00394-7.

Beyer B. *et al* (2018). Microheterogeneity of Recombinant Antibodies: Analytics and Functional Impact. *Biotechnol. J.* 13(1). doi: 10.1002/biot.201700476.

Boster Biological Technology. ELISA Handbook [internet]. Disponible en: https://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf. P: 10-11.

Boster Biological Technology. ELISA Handbook [internet]. Disponible en: https://www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf. P: 16-18.

Burke E., Dennis E. (2009). Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res*. doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200.

Canadian Council on Animal Care (2002). Guidelines on: antibody production. Canadá.

Castillo Y. (2011). Fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂): Nuevo biomarcador de aterosclerosis y riesgo cardiovascular. *Rev. ALAD*. Vol 1. N°2: p. 61-66.

Choi WG *et al.*, (2018). Long-term darapladib use does not affect coronary plaque composition assessed using multimodality intravascular imaging modalities: a randomized-controlled study. *Coron. Artery Dis*. doi: 10.1097/MCA.000000000000057

Ghosh R., Gilda J., Gomes A. (2014). The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 11(5): 549–560. doi: 10.1586/14789450.2014.939635.

González M. (1995a). Precipitación de globulinas con sulfato de amonio. En: *Manual de técnicas inmunológicas*. Facultad de farmacia. Univ. Concepción: 24-25.

González M. (1995b). Cromatografía de afinidad. En: *Manual de técnicas inmunológicas*. Facultad de farmacia. Univ. Concepción: 27-34.

Hamilton MJ, Davis WC (1995). Culture Conditions that Optimize Outgrowth of Hybridomas. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 45. Monoclonal Antibody Protocols. W. O Davis Humana Press Inc, Totowa, NJ. P: 17-27

Hauglang R. You W. (1995). Coupling of Monoclonal Antibodies with Biotin. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 45. Monoclonal Antibody Protocols. W. O Davis Humana Press Inc, Totowa, NJ. P: 223-233.

InvivoGen (2011). Review InvivoGen: Inmmunoglobulin G [internet]. Disponible en:
<https://www.invivogen.com/sites/default/files/invivogen/old/docs/reviews/review-ImmunglobulinG-invivogen.pdf>

Josan J. (2017). Medicamentos biológicos [internet]. Micro-heterogeneidad, biológicos y seguridad para el paciente [acceso 29/11/2019]. Disponible en: <http://medicamentosbiologicos.org/micro-heterogeneidad-biologicos-y-seguridad-para-el-paciente/>

Krishnankutty S (2005). Clinical review: Lipoprotein-associated phospholipase A2, a novel inflammatory biomarker and Independent risk predictor for cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90(5):3100–3105.

Kunstmann S, *et al.* (2012). Estratificación de riesgo cardiovascular en la población Chilena. *Rev. Med. Clin. Condes*; 23(6) 657-665

Kunstmann S., Gainza F. (2018). Herramientas para la estimación del riesgo cardiovascular. *Rev. Med. Clin. Condes*; 29(1) 6-11.

Le Borgne M., Caligiuri G., Nicoletti A (2015). Once Upon a Time: The Adaptive Immune Response in Atherosclerosis a Fairy Tale No More. *Mol. med.* doi: 10.2119/molmed.2015.00027.

Li, D. *et al* (2017). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risks of coronary heart disease and ischemic stroke in the general population: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 471, 38–45. doi: 10.1016/j.cca.2017.05.017

Llapur R., González R. (2017). La enfermedad aterosclerótica desde la niñez a la adultez. *Rev. Cubana ped.* 89(3).

Ministerio de salud, Gobierno de Chile (2017). Orientación técnica, Programa de salud cardiovascular.P:7.

Naylor M., Vasan R (2016). Una comparación de Guías para el tratamiento del colesterol. American Heart Association. *Circulation*, 133:1795-1806.

Organización mundial de la Salud (2018). Las 10 principales causas de defunción [Internet]. 24 mayo, 2018. OMS, notas descriptivas [acceso 11/6/2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Organización mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares (ECV) [Internet].17 mayo, 2017. OMS, notas descriptivas [acceso 11/6/2018]. Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Packard C. *et al.*, (2000). LipoproteinAssociated Phospholipase A₂ as an Independent Predictor of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med.*343:1148-1155, DOI: 10.1056/NEJM200010193431603

Radojkovic C. (2011). Protocolo de Western Blot. GIFE. Facultad de farmacia. Univ. Concepción.

Regence (2018). Measurement of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) in the assessment of cardiovascular risk. Medical policy manual. Lab63: Washington.

R&D Systems, Inc. (2016). Quatikine ELISA Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA₂ Immunoassay. Datasheet [internet]. Disponible en: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dplg70.pdf>

R&D Systems, Inc. (2018a). Products [internet]. Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA2.[acceso 21/11/2019]. Disponible en: https://www.rndsystems.com/products/human-pla2g7-paf-ah-lp-pla2-quantikine-elisa-kit_dplg70

R&D Systems, Inc. (2018b). Recombinant Human PLA2G7/PAF-AH/Lp-PLA2 Protein, CF. datasheet. Catalog Number: 5106-PL

Sarre-Álvarez D. et al (2018). Enfermedad cardiovascular aterosclerótica: revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Med Int Méx*; 34(6):910-923.

Schelling M. (1995). Methods of Immunization to Enhance the Immune Response to Specific Antigens In Vitro. En: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 45. Monoclonal Antibody Protocols. W. O Davis Humana Press Inc , Totowa, NJ. P: 9-15.

SERNAPESCA (2018). Manual de inocuidad y certificación. Ministerio de economía, fomento y turismo, Gobierno de Chile.

Sigma-Aldrich Co. LLC (2011). Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents. Technical Bulletin (Cat. Number ISO2): USA.

Silva I., Mello A., Damasceno N. (2011). Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): A review. *Lipids in health and disease*, 10:170.

Siontis, G. C., Tzoulaki, I., Siontis, K. C., & Ioannidis, J. P. (2012). Comparisons of established risk prediction models for cardiovascular disease: Systematic review. *Bmj*, 344(May24 1). doi:10.1136/bmj.e3318.

Soto D. (2015). Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la fosfolipasa A2 asociada a lipoproteína. Tesis de pregrado, Facultad de farmacia. Univ. Concepción, Licenciada en bioquímica.

Stafforini, D.M. (2015). Plasma PAF-AH (PLA2G7): Biochemical Properties, Association with LDLs and HDLs, and Regulation of Expression. *Enzymes*.38: p. 71-93.

Tellis, C. C., & Tselepis, A. D. (2009). The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(5), 327–338. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.02.015

The Lancet (2010). The Lp-PLA2 Studies Collaboration: Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *The Lancet*; 375:1536-1544

Twomey A. *et al* (2015). Microheterogeneity in frozen protein solutions. *Int J Pharm.* 20;487(1-2):91-100. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.032.

Van der Wal AC, Becker AE (1999). Atherosclerotic plaque rupture- pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res.*, 41:334-344

Wang Y. *et al*, (2018). Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 mass with asymptomatic cerebral artery stenosis. *J Cell mol med.* doi: 10.1111/jcmm.13521

Wang Q. *et al* (2010). *PLA2G7* gene polymorphisms and coronary heart disease risk: A meta-analysis. *Thrombosis Research.* Vol. 126. P: 498-503. doi.org/10.1016/j.thromres.2010.09.009

Widodo N. *et al* (2018). The V279F polymorphism might change protein character and immunogenicity in Lp-PLA2 protein. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* Vol. 19.P: 107-112. doi.org/10.1016/j.ejmhg.2017.08.001

World health statistics 2018 (2018a): monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva. Pág 7. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

World Health Organization (2018b). Noncommunicable diseases country profiles 2018. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Yábar C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas; 38. Instituto Nacional de Salud, Perú. P: 16.

9. ANEXO I:

PROTOCOLO DE SUPERVISION DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION

VARIABLES A CONSIDERAR Y PUNTUACION		
ASPECTO (de 0 a 3)	Normal (piel normal, ojos vivases, erguido en sus cuatro patas)	0
	Piel enrojecida, inflamación en áreas del sitio de inoculación	1
	Inflamación y lesiones cutáneas en áreas del sitio de inoculación	2
	Lesiones cutáneas múltiples	3
	Animal de cubito lateral con respiración bucal	
COMPORTAMIENTO ESPONTANEO (de 0 a 3)	Normal (erguido, atento al medio interactúa con sus pares)	0
	Inactividad o agresividad manifiesta contra otros animales	2
	Automutilación, animales muy inquietos o inmóviles	3
COMPORTAMIENTO FRENTE A ESTIMULOS SIGNOS NEUROLOGICOS (de 0 a 3)	Normal, atento al medio responde inmediatamente frente al estímulo de abrir la jaula, se mueve sin dificultad en sus cuatro miembros.	0
	Cambios pequeños conductuales, perdida coordinación, ataxia.	1
	Cambios moderados, conducta y movimientos inusuales, ataxia, el animal al desplazarse se tambalea pierde el equilibrio y cae.	2
	Letargia, al fondo de la jaula, evita o presenta inactividad al fondo de la jaula, abúlico, dificultad para moverse, inapetente.	3

PUNTUACION TOTAL: _____ de 0 a 12

NOTA:

Cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro, todos los "3" pasan a "4"

Las medidas paliativas sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

- De 0-3 Normal
- De 4-7 Supervisar cuidadosamente
- De 8-12 Eutanasia