



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI
ORNITINA DESCARBOXILASA POR INMUNIZACION
INTRA ESPLENICA

T E S I S

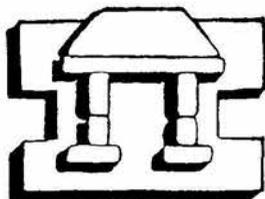
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

GUSTAVO MARTINEZ DELGADO

DIRECTORES DE TESIS: DR. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO
M. en C. JOSE RAFAEL JIMENEZ FLORES



IZTACALA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, IRENE Y ABRAHAM

A MIS HERMANOS, HERMAN Y ABRAHAM

AL SER, DE LA VIDA

AGRADEZCO

A MI FAMILIA

DR. CARLOS TREVIÑO BECERRA

A LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

M. en C. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES

DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO

DR. EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

LAB. INMUNOLOGÍA UMF FES IZTACALA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS

LAB. 1 DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR CINVESTAV

JURADO ASIGNADO

AMIGAS, AMIGOS, COMPAÑERAS

Y PROFESORES.

*Cuando se sabe hacer una suma,
se saben hacer todas las sumas?*

ÍNDICE

IZT.

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
▪ Sistema Inmune.....	2
▪ Respuesta Inmune.....	2
▪ Anticuerpos.....	5
▪ Anticuerpos policlonales y monoclonales	11
▪ Poliaminas.....	12
▪ Ornitina Descarboxilasa	20
▪ Inhibidores.....	23
OBJETIVOS.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	25
MATERIALY MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	45

REFERENCIAS.....	47
APÉNDICE A.....	49
APÉNDICE B.....	52
RECONOCIMIENTO.....	55

RESUMEN

Las poliaminas: espermidina, espermina y el precursor de ambas la putrescina, son aminas alifáticas que se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos, aunque su concentración puede variar de una especie a otra. Las funciones que han sido atribuidas a las poliaminas son variadas y en algunos casos controversiales. Sin embargo, es un hecho que estas moléculas son indispensables para el control del ciclo celular, la diferenciación y en general para regular el metabolismo de la célula.

El control en la biosíntesis de las poliaminas en mamíferos y hongos, se realiza por dos enzimas la s-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMD) y la ornitina descarboxilasa (ODC), siendo la ODC, la que regula el paso inicial y limitante en su biosíntesis.

Dada la importancia que se les ha atribuido a las poliaminas en las funciones biológicas, en los últimos años se han desarrollado diferentes metodologías para su estudio Méndez⁴¹, Schipper⁵⁷⁻⁵⁹, Coffino^{5,16}. Aún falta un conocimiento exacto en la localización celular y subcelular de la ODC y/o el sistema de poliaminas. De tal manera que constituye una limitante para precisar la función biológica de estas moléculas en el estado fisiológico y en las condiciones con alteraciones funcionales.

El presente trabajo muestra una metodología para la obtención de anticuerpos policlonales anti ODC, mediante la inmunización intra-esplénica por laparotomía, a conejos y ratas. Se purificó la fracción IgG del antisuero obtenido, con una columna de afinidad. La reactividad de las fracciones obtenidas se comprobó por precipitación en medio líquido, contraelectroforesis, inmunodetección en cortes de tejidos y extractos de páncreas, hígado y riñón de rata, utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot. Los resultados muestran que la inmunización intra esplénica constituye una alternativa para esquemas de inmunización de corta duración y obtención de anticuerpos policlonales. Sin embargo la reactividad del anticuerpo por IHQ no fue demostrada.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmune

El sistema inmune de los mamíferos, realiza múltiples funciones celulares y humorales que permite a los individuos: eliminar agentes infecciosos (virus, bacterias, parásitos y hongos), destruye células que han concluido sus funciones (apoptosis), identifica y elimina a células malignas, además de que participa en la etiología de las enfermedades por hipersensibilidad, autoinmunidad y por inmunodeficiencia.

Este sistema está constituido por órganos linfoides: primarios (timo y médula ósea), secundarios (bazo, ganglios y nódulos) y por leucocitos que son las células efectoras. Dichas células se originan en la médula ósea y maduran en los órganos linfoides primarios. Son mononucleares: los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB), las células NK, los monocitos, macrófagos tisulares y células presentadoras de antígenos (APC) y polimorfonucleares o granulocitos: neutrófilos, basófilos y eosinófilos²⁹.

Respuesta Inmune

El mecanismo de respuesta inmune, es la capacidad de un organismo vivo para responder mediante factores humorales y celulares contra un elemento extraño. Es decir, les permite identificar lo propio de lo no propio. Una sustancia extraña de naturaleza protéica, lipídica, hidrocarbonada e inclusive grandes complejos o mezclas constituidas por organelos y hasta células completas, se consideran antígenos. Respecto a los antígenos proteicos, están constituidos por diferentes determinantes antigénicos (secuencias de 5-15 residuos de aminoácidos), asumiendo que un determinante antigénico puede ser secuencial si consideramos la estructura primaria o conformacional si tomamos en cuenta la configuración tridimensional, estos aspectos están relacionados directamente a la complejidad de la proteína. Conviene destacar que los determinantes antigénicos pueden ser poco o altamente inmunógenos. Los términos de "buenos" o "malos" se refieren a la capacidad particular de un organismo vivo de responder en contra de un antígeno. Por ejemplo, la defensa frente a los microorganismos es consecuencia de las reacciones precoces de inmunidad innata y por las respuestas elaboradas de la inmunidad

adoptiva. La inmunidad innata es el conjunto de mecanismos que incluyen barreras físicas, reacciones químicas, procesos mecánicos, de competencia biológica y fagocitosis que tradicionalmente se habían considerado como inespecíficos, pero que en la actualidad se está logrando demostrar lo contrario, además de participar en la activación de la inmunidad adoptiva, particularmente contra estructuras comunes de microorganismos^{1, 28,33}.

Con relación a la respuesta inmunitaria adaptativa o adoptiva: clásicamente se subdivide en celular y humoral, en realidad incluye a diferentes clonas de células, que disponen de un código genético que le permite expresar receptores específicos y funciones especializadas, estas células tienen la capacidad de hacer un reconocimiento específico de diferentes determinantes antigénicos, de estructuras celulares propias y extrañas. Son capaces de realizar mecanismos de cooperación celular para expresar genes que codifican para numerosas moléculas efectoras conocidas como citocinas. Estas proteínas participan retroalimentando diferentes poblaciones celulares, en procesos de inflamación, restauración tisular, eliminación de antígenos y todos aquellos procesos biológicos que garantizan la homeostasis. En la denominada inmunidad celular participan diferentes subpoblaciones de LT y sus moléculas efectoras (citocinas) además de macrófagos y polimorfonucleares. Respecto a la inmunidad humoral, consideramos a los LB como precursores de células plasmáticas y las proteínas que estas células secretan conocidos como anticuerpos, con diferentes propiedades biológicas y físico-químicas, fundamentalmente contra microorganismos extracelulares.

Para comprender el proceso biológico de respuesta inmune adoptiva, conviene comenzar por el mecanismo de reconocimiento y presentación de los antígenos. En este proceso participan los macrófagos tisulares, algunos LB y las células dendríticas, todas ellas conocidas genéricamente como células presentadoras del antígeno (CPA). Inicialmente estas células deben tener la capacidad de endocitar el antígeno, para que posteriormente sea procesado en el citoplasma de las células, es decir, los antígenos deben ser fragmentados mediante sistemas enzimáticos, habitualmente dentro de vesículas endosómicas y posteriormente transportados hasta el retículo endoplásmico rugoso en

donde serán “acoplados” a las nascentes proteínas que tienen la capacidad de funcionar como presentadoras de antígeno (Figura 1).

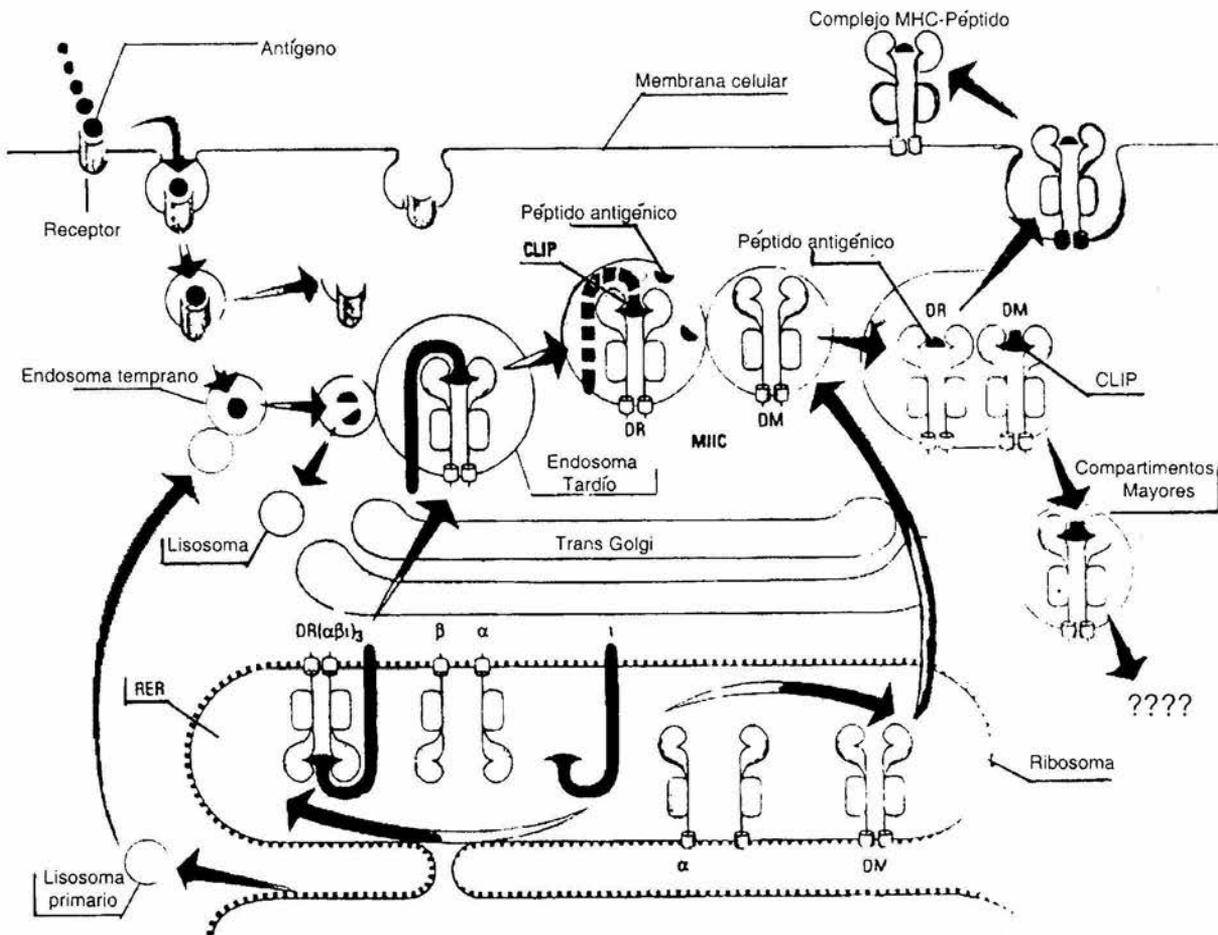


Figura 1. Mecanismo de presentación de antígenos exógenos en MHC II³⁴.

Es importante destacar que la composición del antígeno determina la selección de la molécula que será responsable de su presentación, de tal manera que los antígenos proteicos son presentados dentro de un contexto genético restringido al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Mientras que los compuestos por lípidos o carbohidratos, se presentan dentro de una molécula no polimórfica llamada CD1 (*por sus siglas en inglés cluster of differentiation 1*), una vez realizado este acoplamiento, participan un grupo de

proteínas con función de “chaperonas” que acompañan hasta la membrana citoplasmática a la molécula presentadora y su antígeno. Este es el proceso biológico que realizan las CPA.

La siguiente fase requiere, el reconocimiento del antígeno por un linfocito T, en este mecanismo participa el linfocito T y su receptor (TCR) constituido por dos juegos de proteínas heterodiméricas conocidas como α - β y γ - δ , además de un complejo pentamolecular llamado CD3. El primer heterodímero ($\alpha\beta$) se haya en aproximadamente el 90% de los LT circulantes y el segundo se encuentra más ampliamente distribuido sobre LT tisulares. El reconocimiento del antígeno por el LT se realiza por la interacción entre secuencias del TCR sobre las moléculas del MHC o de CD1 dejando al descubierto determinantes antigénicos reconocibles para LT (Figura 1). Se requiere también la participación de otras moléculas denominadas genéricamente coligandos, por ejemplo: CD4, CD8, CD40, CD40L, CD80, CD86, CD28, ICAM. La armónica acción de estos componentes permite la activación del LT y la consecuente expresión de citocinas IL-2, TNF, IFN α , β y γ si nos referimos a la actividad de LTh1 ó IL-4, 6, 10 y 13 si consideramos LTh2. Recordemos que en el primero de los casos se propicia la actividad de la llamada inmunidad celular y la humoral con la acción de h2. Se mencionan sólo algunas de las citocinas, porque son las directamente involucradas en la activación del linfocitos B (LB) para que puedan reconocer el antígeno utilizando su receptor (BCR) e iniciar el proceso de transformación hasta célula plasmática, con la capacidad de comenzar la producción de los distintos tipos e isotipos de anticuerpos.

Cuando proteínas extrañas se inyectan dentro de los vertebrados se induce la biosíntesis de anticuerpos que reaccionan específicamente con los determinantes antigénicos. A pesar de que tales proteínas son frecuentemente referidas como antígenos, es común distinguir la inducción de anticuerpos y su reacción de anticuerpos por el uso del concepto de inmunógeno, cuando se considera la inducción de una respuesta inmune^{29,34}.

Así, el término de inmunogenicidad, describe la capacidad de una proteína a estimular la producción de anticuerpos, mientras antigenicidad expresa la capacidad de interactuar con el anticuerpo. Todas las proteínas probablemente son inmunogénicas, pero

estas difieren marcadamente en su antigenicidad. De igual forma pueden inducir la síntesis de respuesta inmune humoral y celular, pero la distribución relativa de estas respuestas varía considerablemente con cada proteína⁶⁰. La función fisiológica preferente del sistema inmune es la defensa frente a mecanismos de agresión. No obstante, las sustancias extrañas de naturaleza no infecciosa e inclusive sustancias propias, también provocan respuestas inmunitarias y en ciertas circunstancias esta respuesta es capaz de producir por sí misma, alteraciones tisulares¹.

Anticuerpos

Los anticuerpos también llamados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas solubles, sintetizadas y secretadas de manera exclusiva por células plasmáticas. Las moléculas de anticuerpos han sido encontradas, virtualmente, en todos los fluidos y cavidades corporales. En mamíferos se han descrito cinco clases de Ig a saber M, G, A, D y E. Cada una de ellas posee, además de un metabolismo y fisiología característicos, rasgos estructurales y funcionales particulares. Sin embargo, todas comparten una estructura básica común ejemplificada por la molécula IgG (Figura 2).

Básicamente, la molécula de anticuerpo consta de dos tipos de cadenas polipeptídicas, denominadas: ligera y pesada. Se han identificado dos tipos de cadena ligera, kappa (κ) y lambda (λ), y cinco clases de cadenas pesadas: mu (μ), gamma (γ), alfa (α), delta (δ) y epsilon (ϵ). Cada monómero de Ig, independientemente de la clase, consta de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Las cadenas pesadas establecen abundantes interacciones no covalentes y cierto número de enlaces covalentes (del tipo puente disulfuro) entre los propios aminoácidos (intracatenarios) y con las cadenas ligeras o entre las pesadas en la región de la "bisagra" (intercadenarios). Filogenéticamente la característica estructural más importante de los genes de Ig es que se expresan como "dominio". Este concepto se relaciona con un gen ancestral que codifica para una secuencia polipeptídica de unos 100-110 residuos de aminoácidos y de manera muy conservada evolutivamente. Se localizan dos residuos de cisteína hacia los extremos opuestos de la secuencia que permite la formación de un puente disulfuro intracatenario, de esta manera, se estabiliza la estructura terciaria del dominio y consecuentemente de la molécula.

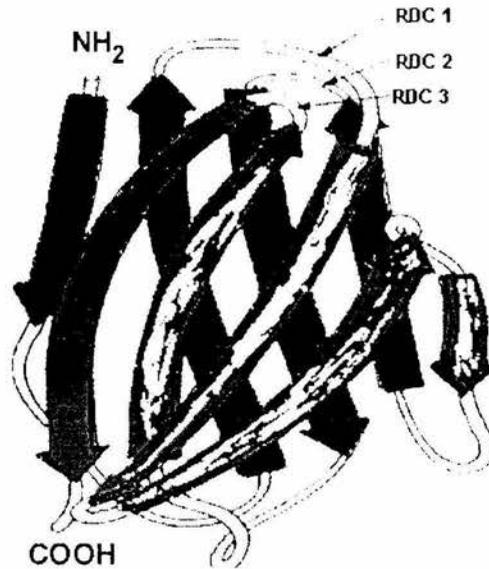


Figura 3. RDC (Región Determinante de Complementariedad en sus siglas en inglés) ³⁴.

Estudios comparativos de la secuencia primaria de aminoácidos en un número importante de moléculas de anticuerpos, han permitido la identificación de dos tipos de dominio en las cadenas Ig: el dominio variable (V) y el dominio constante (C). Esta denominación obedece a la variabilidad encontrada en cada posición de la secuencia primaria. Tanto la cadena ligera como la pesada poseen un dominio variable designados V_L y V_H, respectivamente. La cadena ligera posee un único dominio constante (C_L), mientras la cadena pesada posee tres o cuatro dominios constantes (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}), dependiendo de la clase de Ig (Figura 2).

El dominio de la molécula de Ig tiene implicaciones importantes para su funcionalidad. Por ejemplo, los dominios V_L y V_H se orientan en un módulo funcional denominado Fab, en el cual se encuentra el sitio de reconocimiento del antígeno o paratopo (Figura 2). Hacia el extremo contrario de la molécula se ubica el fragmento cristalizante o Fc constituido únicamente por los dominios C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}.

Mediante la comparación de secuencias de aminoácidos disponibles para numerosos dominios V_L y V_H , ha sido posible identificar tres sitios en cada dominio V , denominados regiones hipervariables, por la elevada variabilidad en la secuencia primaria de aminoácidos. Estas regiones contienen los residuos que conforman el paratopo, también conocido con el nombre de región determinante de complementariedad (RDC). Las RDC corresponden al sitio específico de unión al antígeno (Figura 4).

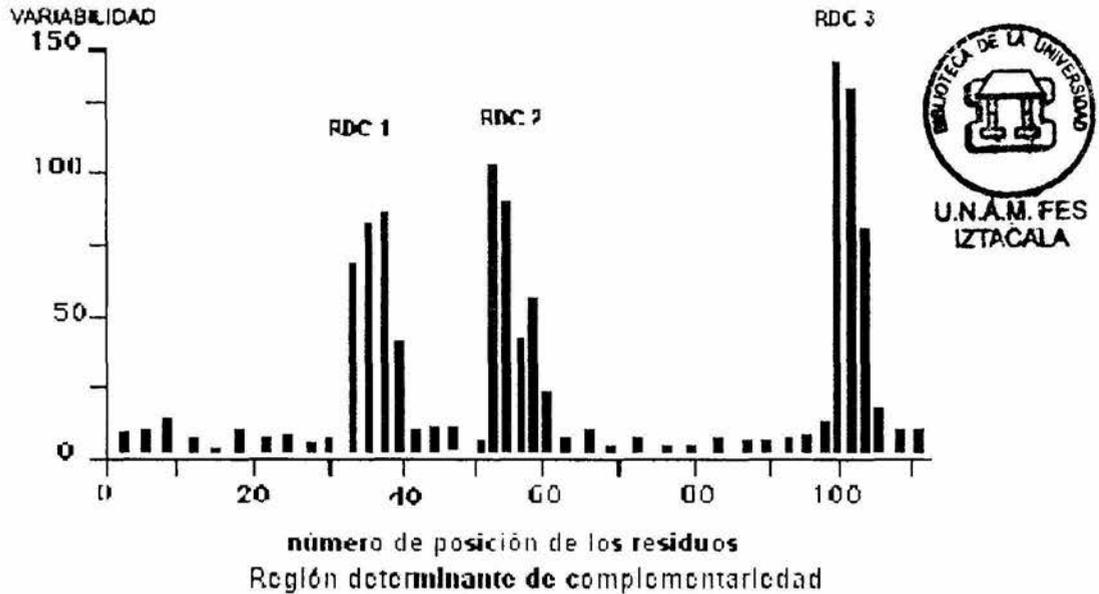


Figura 4. El grado de variabilidad de cada posición diferente, es gráficamente representado por la región V de la cadena IgH³⁴.

I.Z.T.

Los genes que codifican para las Ig están organizados en tres complejos genéticos o *cluster*. En uno de estos complejos genéticos se encuentran los elementos codificantes de todas las cadenas pesadas (complejo H) y dos complejos para las cadenas ligeras, uno para la cadena κ (complejo κ) y otro para la cadena λ (complejo λ). El complejo H se encuentra localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 14 q32 en el humano y está formado por 138 segmentos. Cerca del 40% de estos genes son NO codificantes y el resto se expresan como genes de variabilidad, de diversidad, de unión y para los dominios constantes V_H , D_H , J_H , y C_H (Figura 5).

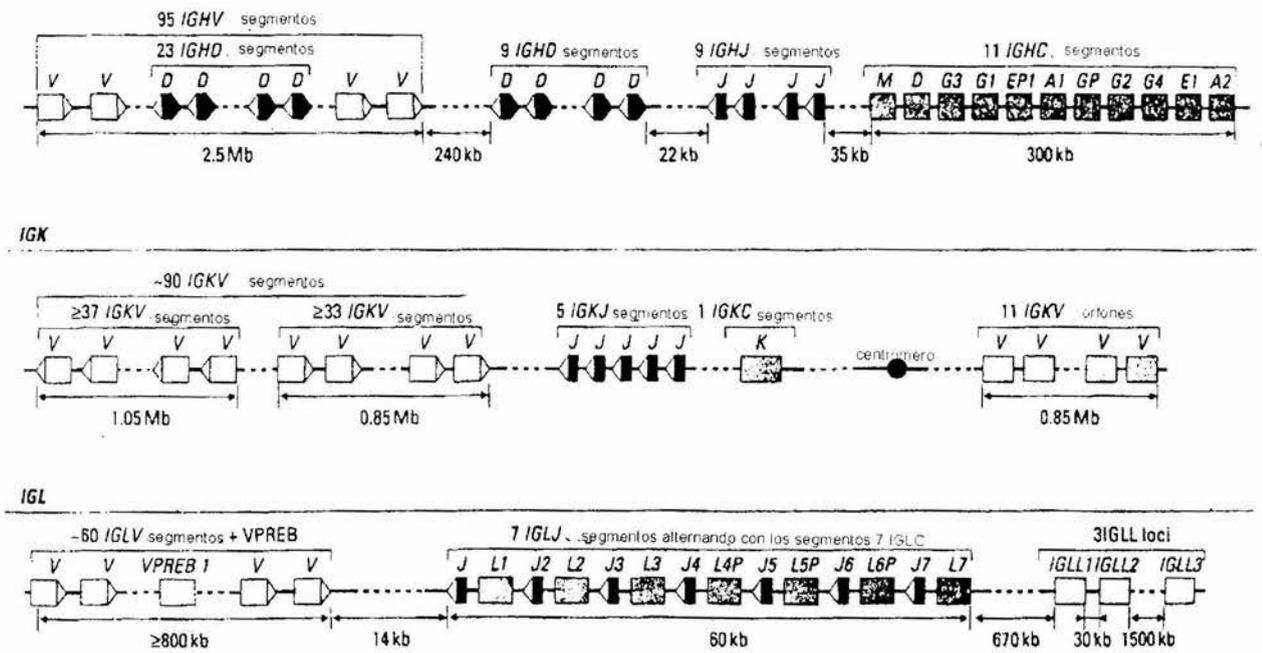


Figura 5. Organización del loci de las inmunoglobulinas³⁴.

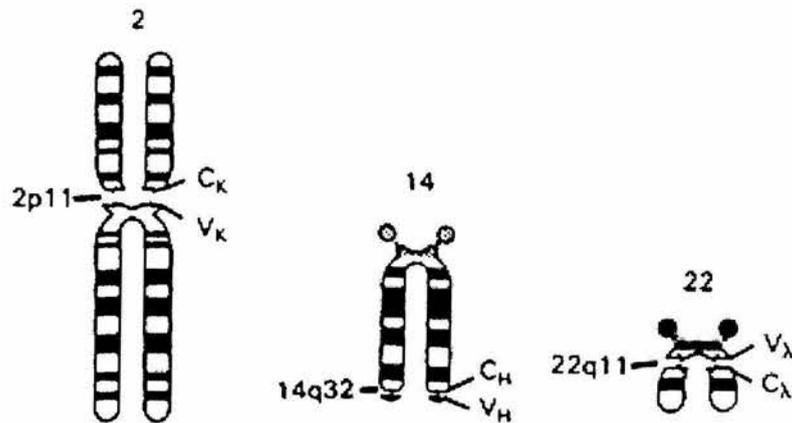


Figura 6. Localización del loci funcional de las inmunoglobulinas en los cromosomas humanos³⁴.

En forma similar, los complejos κ y λ contienen aproximadamente 107 y 98 segmentos genéticos respectivamente, a semejanza del complejo H un porcentaje de estos elementos no se expresan. También se arreglan como genes de variabilidad, de unión y

para los dominios constantes de cada una de las cadenas κ y λ y se les denomina: V_L , J_L y C_L , pero no poseen segmentos D y están ubicados en los cromosomas 2 p12-p11 para la cadena κ y 22q11 para la cadena λ refiriéndose a humanos. (Figura 6).

Cada complejo posee un número significativo de elementos V, D y J además de los genes codificantes para los dominios constantes C que constituyen exones completos y disponen de la información estructural para la síntesis de la región de la bisagra. El número de estas regiones es variable en diferentes especies si comparamos humanos y ratones como se muestra en la Tabla I.

Tabla I³⁴.

Locus	Número de segmentos* (humano/ratón)			
	V	D	J	C
IGH	95/110	23/12	9/4	11/8
IGK	90/100	0	5/4	1/1
IGL	60/2	0	7/4	7/4

*El número de los segmentos de genes en los loci de inmunoglobulina para humano y ratón.

Por otro lado, los dominios V son producidos a partir de la combinación de los elementos V, D y J. Durante la ontogenia del linfocito B estos complejos génicos sufren un interesante proceso de reordenamiento, o rearreglo, cuyos detalles mecánicos continúan en estudio. Un sofisticado sistema de recombinación somática³⁴ actúa sobre los elementos V, D y J, permitiendo en cada linfocito B el rearreglo funcional de un segmento V_L con un segmento J_L , para así generar un exón V_L , el cual codifica el dominio V_L de la cadena ligera. Algo similar ocurre con los segmentos V_H , D_H , y J_H del complejo H. Luego de que, en un linfocito B particular, ocurre el rearreglo funcional de estos segmentos y se genera un exón V_L y uno V_H , el proceso se detiene de manera que cada linfocito B despliega una única

especificidad y es capaz de producir, luego de la estimulación antigénica, únicamente anticuerpos con esa especificidad. En humanos, se ha estimado que el proceso de rearreglo génico de los segmentos V, D, y J, en el cual se ven además involucrados fenómenos de adición de nuevos nucleótidos, inversión y uso simultáneo de varios segmentos D, tiene la potencialidad de generar 104 dominios V_L y 10^8 dominios V_H diferentes, pudiendo combinarse aleatoriamente para generar hasta 10^{12} moléculas de anticuerpo con especificidades diferentes. Este gigantesco repertorio permite al sistema inmune humoral disponer de la capacidad para reconocer y responder prácticamente ante cualquier reto antigénico^{1,29,34}.

Anticuerpos policlonales y monoclonales

Los anticuerpos policlonales, son poblaciones complejas, formadas por distintas clases de Ig en las que está presente una variedad de especificidades, es decir cada inmunoglobulina es capaz de reconocer el mismo o diferente determinante de un mismo antígeno. Por el contrario, el término anticuerpo monoclonal (AbMo) se usa para referirse a una población de moléculas de anticuerpo, todas idénticas, las cuales consecuentemente, poseen todas la misma especificidad. (De lo anterior se desprende que, en una prueba analítica, es posible obtener un cruce antigénico, fenómeno más frecuente cuando se emplean anticuerpos policlonales).

En 1975, en un trabajo que posteriormente les valió el premio Nobel, G. Kohler y C. Milstein demostraron la posibilidad de producir AbMo mediante la fusión de linfocitos B con células de mielomas, estas últimas se caracterizan por ser células linfoides tumorales inmortalizadas. Ellos demostraron que los híbridos resultantes de tal fusión heredan la capacidad para crecer indefinidamente en cultivo y para producir anticuerpos, y que, además, es posible aislar del producto heterogéneo de fusión aquellos híbridos secretores del anticuerpo en el cual se está interesado^{1,34}. Así nacieron los AbMo, posteriormente denominados de primera generación, para distinguirlos de los anticuerpos producidos mediante técnicas de biología molecular y DNA recombinante, que han sido llamados de segunda generación.

Poliaminas

Las poliaminas alifáticas putrescina, espermidina y espermina son constituyentes normales de la célula, que juegan un papel importante en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento, multiplicación y diferenciación celular^{24,41,63}.

A pesar de que han recibido poca atención en libros de bioquímica y fisiología, las poliaminas tienen una larga historia y existe amplia información⁴⁴. La presencia de poliaminas en materiales biológicos se señaló hace más de 300 años. En 1678 Antoni van Leeuwenhoek describió cristales que se formaban en muestras de semen humano que habían sido expuestos al frío. Está claro ahora que esos cristales eran fosfato de espermina. El fenómeno fue redescubierto varias veces en los siguientes 200 años. Finalmente en 1926, Otto Rosenheim determinó la estructura química correcta de la espermina, sintetizando después otra base identificada como fosfato de espermidina⁴¹.

La estructura de las tres poliaminas más comunes, en la naturaleza, putrescina, espermidina y espermina junto con 1,3-diaminopropano y cadaverina (1,5-diaminopentano), se muestran en la Figura 7.

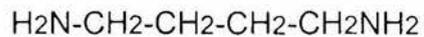
Uno o más de estos compuestos están presentes en cada célula viva^{16,50,30,49,18}. En general, los procariotes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina; por su parte los eucariotes tienen más bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina^{41,68}.

Muchas células tienen la capacidad de sintetizar poliaminas en mayor o menor grado e históricamente se ha creído que la biosíntesis de *novo* era el suministro principal de poliaminas en las células. Sin embargo, se ha demostrado que pueden interconvertirse unas con otras¹⁰. La dieta es una rica fuente de poliaminas como lo es, potencialmente la flora intestinal que produce y excreta una variedad de poliaminas. Las poliaminas de la dieta son absorbidas, aunque estas moléculas también son formadas *in situ*. Sin embargo, esas fuentes alternativas de poliaminas son importantes para el organismo en su estado fisiológico normal y en estados patológicos.



Diaminopropano

(3)



Putrescina

(4)



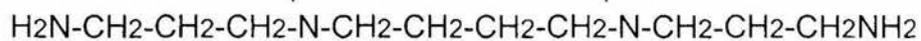
Cadaverina

(5)



Espermidina

(3-4)



Espermina

(3-4-3)

Figura 7. Estructura de putrescina, espermidina y espermina junto con diaminopropano y cadaverina^{41,44}.

La tabla II muestra algunos de los metabolitos identificados en orina de rata y humano.

Tabla II. ALGUNOS METABOLITOS DE POLIAMINAS IDENTIFICADOS EN ORINA DE HUMANO Y RATA⁴⁴.

Diaminopropano
N-Acetildiaminopropano
 β -alanina*
 γ -ácido gama *
cadaverina
N-acetilcadaverina
 δ - ácido aminovalerico
isoptreanina (N-(aminopropil)-4- ácido amino butírico
putreanin (N-(4-aminobutil)3-ácido amino propiónico
ácido espérmico (N-(2-carboxietil)-4- ácido amino butírico
ácido espérmico-1 N-(3-aminopropil)-N-(2-carboxietil)-1,4-diaminobutano)
ácido espérmico-2 (N,N-bis(2-carboxietil)-1,4-diaminobutano)

* También pueden surgir por fuentes no poliamínicas⁴⁴. El origen de poliaminas de estos metabolitos, fueron confirmados por el uso de precursores con isótopos radiactivos.

Como policationes, las poliaminas naturales interactúan electroestáticamente con cargas negativas de varias moléculas tales como, ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos estabilizando sus estructuras.

Por medio de modelos de difracción de rayos X, se demostró que las poliaminas estabilizan la estructura α hélice y Z del ADN. Estas policationes también participan en el superenrollamiento y condensación del ADN²¹.

La interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos se lleva a cabo por un enlace iónico entre los grupos amino de las poliaminas y los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (las poliaminas a pH fisiológico se comportan como policationes), dando como resultado la neutralización de cargas y la estabilidad de estructuras secundarias del ADN. Siendo esta estabilización un factor importante en la manipulación de oligonucleótidos, enzimas y construcciones genéticas que pueden ser utilizadas en terapia génica³.

Hay evidencia que demuestra que las poliaminas regulan la replicación del ADN y la transcripción del ARNm^{3,14,22}. Muchos de los efectos que se han mencionado sobre

el ARNt dan una posible explicación para la regulación de la síntesis de proteínas por medio de las poliaminas¹⁴.

La carga de las poliaminas difiere de cationes inorgánicos tal como Ca^{+2} o Mg^{+2} y Zn^{+2} . Esto, debido a que las poliaminas son flexibles y tienen distribuida su carga a lo largo de toda la molécula, facilitando la interacción mediante los grupos amino, en particular con la carga negativa del ADN⁴⁰.

Por otra parte, esta carga juega un papel importante en la interacción de poliaminas con receptores específicos como el N-metil-D-aspartato (NMDA) y con canales iónicos como los de potasio (K^+).

El hallazgo de que las poliaminas están involucradas en la actividad de canales iónicos ha generado un renovado interés en la función celular, por todos los procesos biológicos en los que están implicados.

El enorme interés en la regulación de los canales iónicos, involucra el conocimiento biológico puro en las áreas de la biología aplicada y la industria farmacéutica.^{37,45}

Los canales de K^+ recientemente estudiados por cristalografía, han demostrado que estas proteínas integrales de membrana mantienen la actividad en células excitables y contráctiles. La rectificación interior de los canales de K^+ (como su nombre lo sugiere, cationes de dirección interior), son importantes en la regulación de propiedades eléctricas de la célula, como lo demuestran los trabajos de Lopatin³⁶, en la que no solo las poliaminas causan una rectificación interior por el bloqueo de los canales de potasio dependiente de voltaje, sino también el vaciamiento intracelular de poliaminas previene la rectificación interior.

A este respecto se ha sugerido que la regulación fisiológica de las células excitables puede ocurrir a través de la modulación del contenido de poliaminas y de $\text{Ca}^{++62,63}$. En la tabla III se resumen las funciones biológicas reportadas en las que participan las poliaminas.

Tabla III. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS POLIAMINAS ⁴¹.

Poliaminas como factores de crecimiento

- en microorganismos
- en células de mamífero

Estabilización de membranas celulares

Estabilización de partículas subcelulares

Asociación con ácidos nucleicos

- estabilización del ADN contra la desnaturalización del ADN.
- asociación con tARN
- estabilización de la forma super-enrollada
- empacamiento del ADN en bacteriófagos
- estimulación de la síntesis de ADN
- estimulación de la síntesis de ARN
- modificación de la actividad de ribonucleasas
- estabilización del RNA recién sintetizado

Efectos sobre la síntesis de proteínas

- fijación de moléculas de tARN a ribosomas
- estimulación de metilación de tARN
- reemplazamiento de Mg⁺⁺ en la reacción de aminocil tRNA sintetasa
- asociación con ribosomas
- biogénesis de partículas ribosomales
- fidelidad de la traducción
- iniciación de la traducción
- estimulación de la nucleotidiltransferasa de tARN

Efectos sobre varias reacciones metabólicas

- estimulación de nucleótido cinasas
- modificación de las actividades de proteínas cinasas
- incremento de la ADP-ribosilación de proteínas nucleares
- activación de fosforilasas
- estimulación de lipólisis
- activación de colina cinasa
- incremento en la utilización de fructosa en espermatozoides (epidídimo)

- inhibición de ATPasa
 - modificación de la actividad de acetil colin esterasa
 - inhibición de la agregación de plaquetas
 - estimulación del metabolismo de estradiol en microsomas de hígado
-

Con excepción de la producción de líneas celulares mutantes en laboratorio, todas las células tienen la habilidad de sintetizar putrescina y espermina^{39,40}.

En mamíferos y hongos el paso inicial y de control regulador en la biosíntesis de poliaminas es ejercido por dos principales enzimas: la ODC y la SAMD. La ODC cataliza la descarboxilación de ornitina a putrescina. La subsecuente adición de grupos amino propílicos convierten la putrescina a espermidina y así a espermina⁴. En esta vía la fuente del material de inicio (ornitina), no está por completo clara.

En los animales la ornitina está presente en el plasma sanguíneo (siendo la concentración en humanos de 85 $\mu\text{mol/l}$ aproximadamente)⁴⁴, de esta cantidad, alguna proviene de la dieta diaria. La ornitina es también producto del ciclo de la urea y parece probable que un poco de esta molécula se destine a la biosíntesis de poliaminas. La segunda enzima, la SAMD introduce S-adenosilmetionina en la vía para ser usada en su forma descarboxilada como un donador amino propilo.

La vía de las poliaminas y sus variantes en mamíferos, hongos, bacterias, y plantas, se describe en la Figura 8.

Como observamos en la Figura 8A, en los mamíferos existe una serie de reacciones las cuales por acetilación y oxidación convierten espermina (Spm) a espermidina (Spd) y Spd a putrescina (Put).

La vía acetil-poliamicina permite a las células ajustar el exceso de Spd y Spm (ambas prominentes en mamíferos). En contraste, los hongos tienen una vía acetil-poliamicina casi no detectable (Figura 8B). En mamíferos la arginasa participa en la biosíntesis de poliaminas elaborando ornitina a partir de arginina proveniente de la dieta. De aquí que el control en la formación de ornitina es muy importante en células

animales, ya que la ornitina solo puede ser formada por la acción de arginasa sobre la arginina exógena derivada principalmente de la comida.

Las bacterias difieren significativamente de los hongos y mamíferos en el metabolismo de poliaminas (Figura 8C) y se parece al de las plantas en algunos aspectos. En bacterias y plantas (Figura 8C,D) las dos vías conducen a la formación de putrescina. Una es la reacción de ODC y la otra envuelve la descarboxilación de ARG por la ADC. En bacterias la agmatina (producto de la reacción de ADC), es convertida directamente a putrescina por la AGO, con la eliminación de urea (Figura 8C). En plantas la agmatina es primero convertida a NCPasa por AIH (Figura 8D).

A) MAMÍFEROS

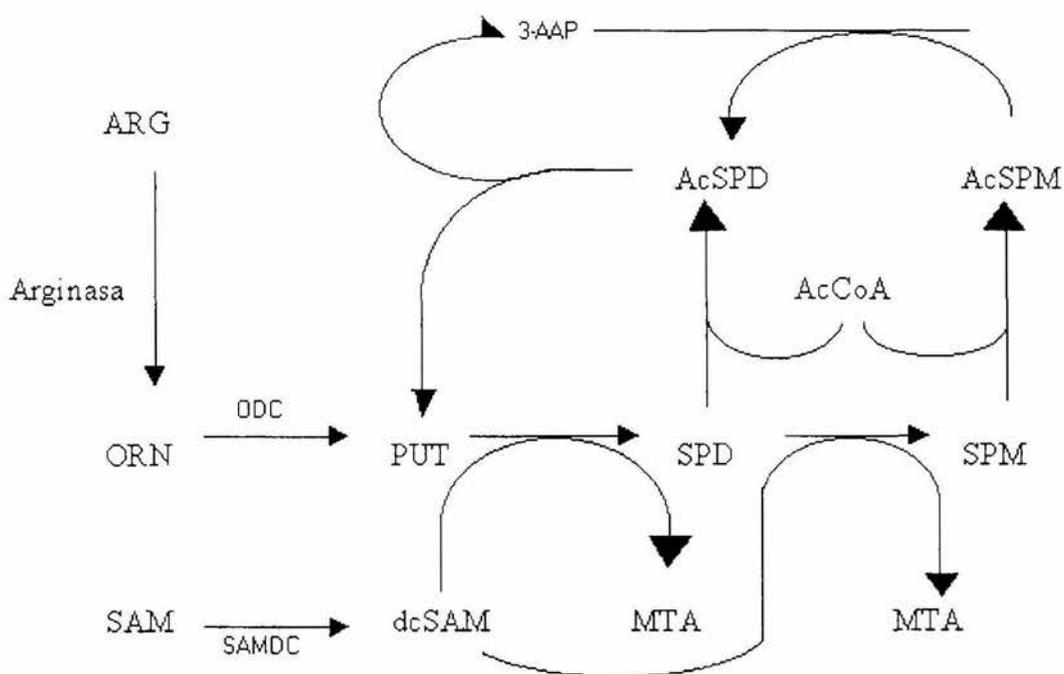


Figura 8A. En los mamíferos existe una serie de reacciones las cuales por acetilación y oxidación convierten espermina (Spm) a espermidina (Spd) y Spd a putrescina (Put).

La vía acetil-poliamínica permite a las células ajustar el exceso de Spd y Spm (ambas prominentes en mamíferos).

B) HONGOS

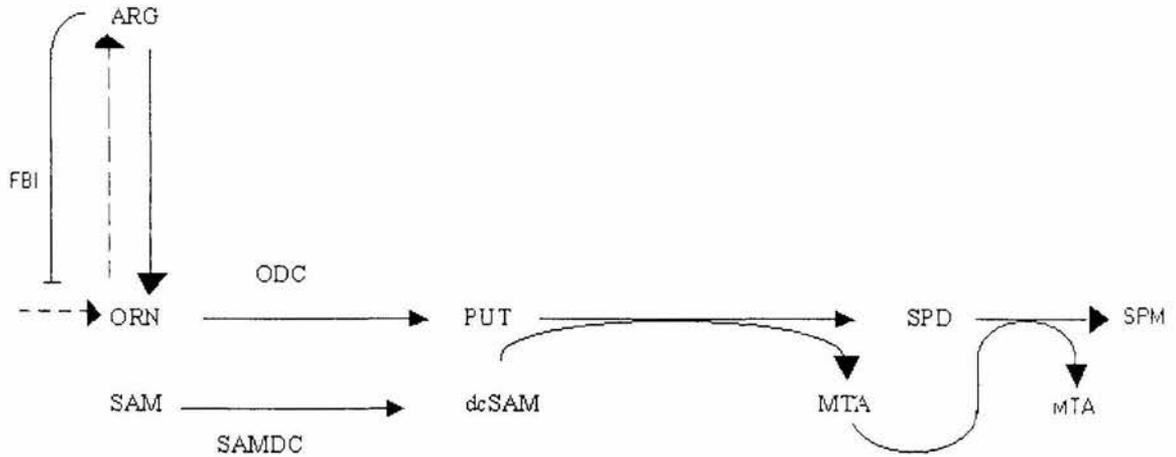


Figura 8B. En contraste con la vía de los mamíferos, los hongos tienen una vía acetil-poliamina casi no detectable.

C) BACTERIAS

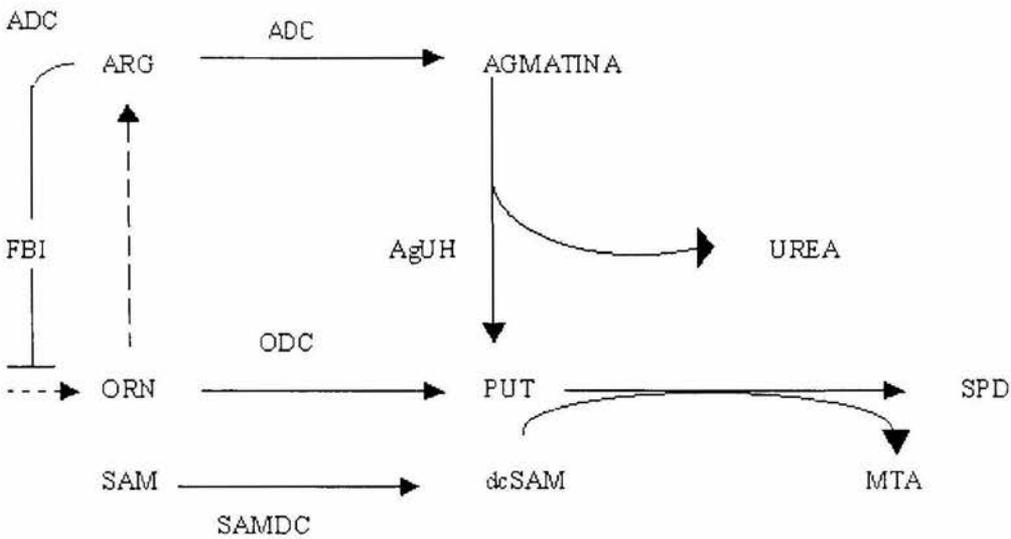


Figura 8C. En bacterias la agmatina (producto de la reacción de ADC), es convertida directamente a putrescina por la AGO, con la eliminación de urea.

D) PLANTAS

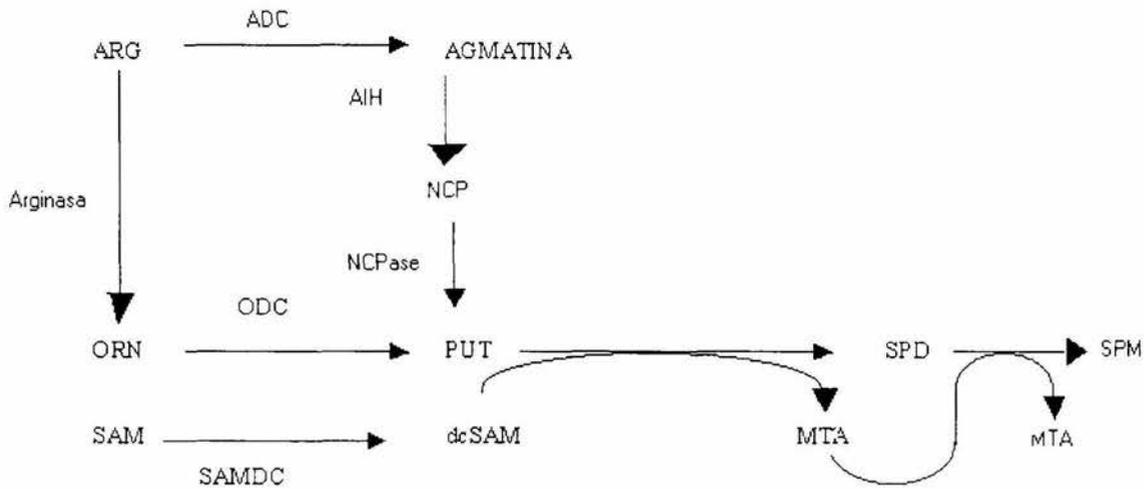


Figura 8D. Representación esquemática de la ruta biosintética de las poliaminas y sus variantes en mamíferos (A), hongos (B), Bacterias (C) y plantas. En A y B las líneas cortadas representan la biosíntesis endógena de ornitina y arginina. En A la ornitina utilizada para la biosíntesis de poliaminas viene de la dieta.

Abreviaturas: ARG, arginina; 3-AAP, 3-acetamidopropanal; AcCoA, acetylcoenzima A; AcSPD, acetyl spermidina; AcSPM, acetyl spermina; ADC, arginina descarboxilasa; AGO, agmatina urohidrolasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; dcSAM, S-adenosilmetionina descarboxilada; FBI, inhibición retroalimentada (de arginina a la biosíntesis de ornitina); MTA, metil-tioadenosina; NCPasa, N-carbomilputrescina aminohidrolasa; ORN, ornitina; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa.

Ornitina descarboxilasa

La ODC ha recibido más atención que ninguna otra enzima de la biosíntesis de poliaminas. Esto, debido a que ha sido considerada como la enzima clave en la ruta biosintética de las poliaminas por encima de la SAMDC^{24,41,44,39,45}.

La ODC es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal. La forma activa en mamíferos es un homodímero consistente en dos subunidades monoméricas de 51-53 KDa cada una^{31,35}.

La ODC puede existir en formas múltiples, pero aún no está claro si esas distintas formas son isoenzimas, proteínas químicamente modificadas o proteínas mutadas de ODC⁵⁷, como se ha podido ver en los trabajos de Reddy⁵⁵, Atmar⁵, Obenrader⁴⁹, Coffino¹⁵.

La actividad de la ODC es modulada por tres mecanismos: 1º regulación transcripcional de la ODC, 2º modificación postraduccional de la ODC y 3º un control negativo de la estabilidad de la ODC por retroalimentación, regulado por los productos de la biosíntesis de poliaminas^{53,61}. También, la actividad enzimática de la ODC es firmemente controlada y muestra una inducción bifásica durante la fase tardía de G₁ y en G₂/M⁷.

La secuencia de clones recombinantes genómicos del gen de la ODC contenidas en levadura, *Trypanosoma sp.*, ratón, rata y humano han sido descritos²⁵. La secuencia genómica de la levadura y tripanosoma carece de intrones, mientras 11 de ellos se encuentran en los mamíferos. La posición de los 12 exones de los genes de mamíferos fueron inferidos, comparando las secuencias nucleotídicas del cDNA y DNA genómico de la ODC.

Por otra parte, la secuencia completa de amino ácidos de la ODC de ratón, rata y humano han sido deducidas de la secuencia de nucleótidos de los DNAs y cDNAs genómicos contenidos en la región completa de los mRNAs de ODC. Las proteínas codificadas contienen 461 residuos de amino ácidos y poseen una masa molecular aproximada de 51 kDa que representa la subunidad del homodímero de la enzima nativa²⁵.

La producción de ODC es extremadamente rápida con una vida media promedio menor de 1 hora y en algunos casos solo unos minutos (dependiendo de la especie). Esta producción de la ODC es también influenciada por las poliaminas. La exposición de células a altas concentraciones de poliaminas provoca un incremento en la degradación de la ODC (en células normales, la actividad de la ODC es muy baja y se ha estimado que puede haber sólo de 100-200 moléculas de la enzima en una célula quiescente⁴⁴).

Esta regulación mediada por poliaminas, es dependiente de la síntesis de una proteína con una rápida producción de una enzima llamada antienzima^{69,15}. Ésta, es inducida por la exposición de un exceso de poliaminas, resultando en la unión e inhibición de la ODC con una alta afinidad. En la figura 9 podemos observar en (a) la orientación de los dímeros y en (b) una vista perpendicular de éstos.

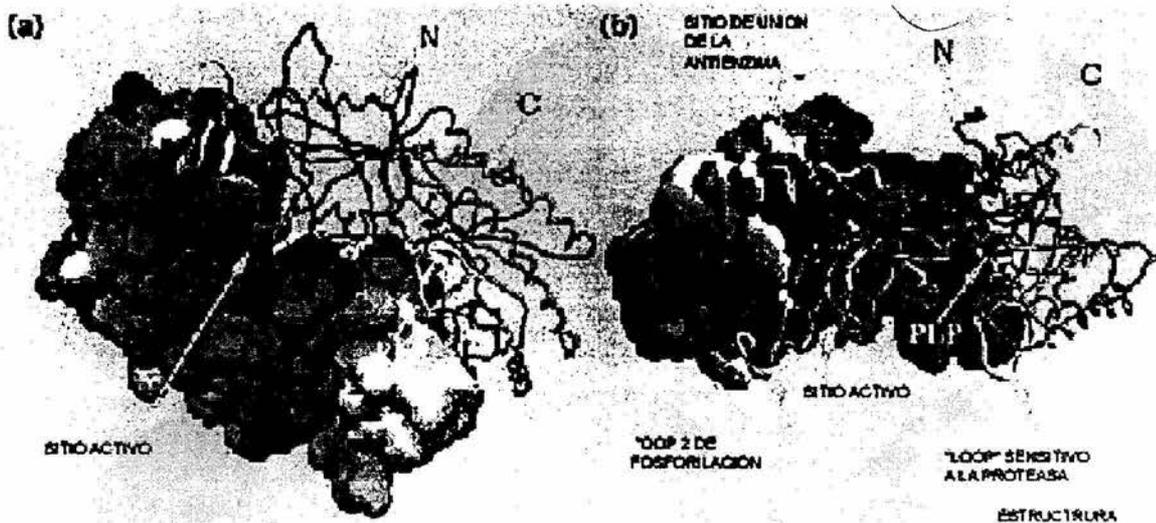


Figura 9. Monómero de la ODC de ratón. Un gran parche electropositivo, localizado a la orilla del bordo del tonel, en el que se incluyen residuos de 117-140 aminoácidos y los cuales han sido implicados en la interacción de la antienzima³¹.

La clonación molecular de la antienzima a permitido mostrar la función de esta proteína en la degradación de la ODC. Así mismo Coffino¹⁶, sugiere que los vertebrados tienen al menos 3 isoformas de la antienzima independientemente conservadas. Mientras que AZ1 y AZ2 tienen una amplia distribución en los tejidos, AZ3 es específica en testículo y se restringe a un estado tardío en la producción de esperma. También diversos estudios han dilucidado los mecanismos por los cuáles las poliaminas inducen la producción de la antienzima y han mostrado cuales dominios de la molécula de la ODC son importantes para una rápida producción de la proteína así como la unión a la antienzima. Así, está claro que la parte carboxilo-terminal es

importante para la corta vida media de la ODC. La antienzima se une a la parte amino terminal de la ODC y así, esta unión parece inducir un cambio conformacional que expone la parte carboxilo terminal para el proceso degradativo^{61,68}.

Inhibidores

La actividad de la ODC y sus productos, las poliaminas; han mostrado ser esenciales para los procesos de diferenciación celular. Resulta ser fácil y rápidamente inducible⁶⁷. Por ejemplo, en alteraciones neoplásicas la concentración de poliaminas se incrementa considerablemente^{32,50,39} y los niveles de expresión de la ODC se elevan principalmente por factores de crecimiento, activándose constitutivamente cuando las células son transformadas por carcinógenos, virus y oncogenes⁴. Por este hecho la inhibición de poliaminas se ha propuesto como una herramienta terapéutica^{39,41,44}.

La inhibición de la ODC por α -difluorometilornitina (DFMO), compromete el crecimiento y transformación de la célula e induce la detención del ciclo de la célula en G₁^{50,55}. Así mismo, se ha reportado que la reducción crónica en los niveles de poliaminas conduce a la apoptosis, especialmente seguido de una exposición a estrés oxidativo²⁰. Paradójicamente, la sobreexpresión de la ODC puede también disparar el programa apoptótico⁵⁰. En general, estos hallazgos apoyan firmemente el concepto de que la propia homeostasis de las reservas de poliaminas es un determinante crítico para el destino de la célula.

OBJETIVOS

General

- Obtención de anticuerpos policlonales anti-ODC en ratas Wistar y conejos Nueva Zelanda por inmunización intra esplénica.

Particulares

- Verificación en la obtención y reactividad de anticuerpos anti-ODC en suero total inmune de ratas y conejos.
- Purificación de la fracción IgG de suero inmune de conejo.
- Verificación en la obtención de la fracción IgG anti-ODC de suero inmune de conejo.
- Inmunolocalización de ODC en páncreas, hígado y riñón de rata.

JUSTIFICACIÓN

Si tomamos en consideración las funciones biológicas en donde participan las poliaminas que están enunciadas en la Tabla III, podemos suponer que estas poliaminas son importantes en numerosas enfermedades que afectan a los seres vivos. En los humanos por ejemplo, en las enfermedades infecciosas, crónicas degenerativas, autoinmunes y lógicamente en las neoplásicas. El estudio realizado de estas poliaminas *in situ* es complejo. Sin embargo, la identificación de la enzima que realiza la descarboxilación de la putrescina resulta una alternativa viable que puede permitir citolocalizar la enzima y por lo tanto registrar aumento o disminución en su expresión en diferentes enfermedades.

De aquí que, por medio de la obtención de anticuerpos policlonales anti ODC, se pretende contribuir al estudio de la ODC y el sistema de las poliaminas, que permita citolocalizar la ODC para la comprensión de la función biológica y sus posibles alteraciones. Por otra parte, la estrategia de inmunización directa del antígeno dentro del bazo (inmunización intra esplénica), resulta un método eficaz para la producción de anticuerpos poli y monoclonales^{17,47,48,65}.

Entre las ventajas teóricas que representa este tipo de inmunización sobre las convencionales se incluye, 1) la obtención de anticuerpos específicos en un tiempo relativamente corto^{17,45,47,65,69}, 2) requiriendo para ello cantidades muy pequeñas del antígeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelos experimentales. Cuatro ratas macho Wistar con un peso promedio de 300 g y 3 meses de edad, cuatro ratas machos Wistar neonatas (3 días), con peso promedio de 12 g. Dos conejos macho Nueva Zelanda con un peso promedio de 2.5 kg y 3 meses de edad. Obtenidos de los bioterios de la FES Iztacala y del C.M.N. S. XXI.

Antígeno. La enzima ODC (Sigma No. 0-1502) fue el antígeno utilizado para la obtención de anticuerpos anti ODC.

La preparación del inmunógeno se realizó en buffer fosfato- salino (PBS por sus siglas en inglés) pH 7.4. De tal manera que la ODC se solubilizó en PBS para obtener una concentración final de 2 mg / ml. De esta concentración la cantidad inoculada en la inmunización fue de 400 µl / kg .

En la tabla IV se muestra el esquema de trabajo seguido para la inmunización intra esplénica⁶³.

Inmunización intra esplénica. Para el proceso de inmunización intra esplénica, los animales fueron anestesiados por medio de una inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina a razón de 2mg/kg. El animal se colocó en una tabla de propileno, se limpió con jabón quirúrgico y se trasquiló el pelo en donde se llevó al cabo una laparotomía subcostal izquierda. Después de abrir la cavidad abdominal el bazo se exteriorizó y cuidadosamente se inoculó el antígeno (Figura 10 sección resultados).

Posteriormente el bazo fue colocado en la cavidad abdominal, se verificó que no hubiera sangrado y se procedió a cerrar el peritoneo y la capa de músculo en un solo plano con catgut simple 00. La piel se cerró con puntos simples utilizando hilo nylon 00 (dermalon).

El sangrado de los animales en los días marcados como cero y nueve se realizó por medio de punzocat (Equipos Médicos Vízcarra lot. 3114), en arteria periférica de la oreja en conejos y por punción cardíaca en ratas.

El sangrado al blanco se llevó al cabo por punción de la arteria aorta con el sistema vacutainer (Becton Dickinson) en ambos modelos experimentales.

Tabla IV. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN INTRA ESPLÉNICA
PARA AMBOS MODELOS EXPERIMENTALES.

DÍA	DOSIS.
0	SANGRADO (CONTROL INICIAL).
1	1 ^{er} INOCULACIÓN (400µl/Kg)
9	SANGRADO (1 ^{er} Título de Anticuerpos)
10	2 ^a INOCULACIÓN (400µl/Kg).
13	SANGRADO AL BLANCO.

Se realizó la titulación del antisuero contra ODC, tomando como control negativo el suero obtenido el día 0. Para este propósito utilizamos dos metodologías: precipitación en capilar y contraelectroforesis.

Precipitación en capilar. La prueba de precipitación en medio líquido en capilar (ver apéndice B), se llevó al cabo haciendo diluciones seriadas del anticuerpo con solución salina estéril (0.85% pH 7.4) y utilizando el antígeno a una concentración de 2 mg / ml. Llenados los capilares con el antígeno y antisuero se incubó a 4 °C por 24 horas. Los

resultados se muestran en las Tablas V, VI para el suero total α -ODC y la Tabla VII para la IgG α -ODC (sección resultados).

Contrainmunolectroforesis. La contraimmunoelectroforesis (ver apéndice B), se llevó al cabo en una preparación de agarosa al 1 % en regulador de Tris 37 mM – Glicina 0.1M, pH 8.8, haciendo diluciones seriadas del anticuerpo con solución salina estéril (0.85% pH 7.4) y utilizando el antígeno a una concentración de 2 mg / ml . Todos los pozos fueron llenados con 5 μ l de muestra cada uno. Los pozos más cercanos al ánodo (+) fueron llenados con antisuero. Los resultados para el antisuero se muestran en la Figura 11y en la Figura 12 para la IgG α -ODC (sección resultados).

Purificación IgG. La purificación de la fracción IgG del antisuero anti ODC obtenido de conejo, se realizó mediante una columna de afinidad (Bio-Rad Econo Pac 10DG MAPS II PROTEIN A KIT cat. 7322020). La columna se equilibró con buffer de unión (MAPS II PROTEIN A KIT), se hizo pasar el suero de conejo anti ODC por la columna a temperatura ambiente. Posteriormente se eluyó con buffer de elusión (MAPS II PROTEIN A KIT), colectando fracciones de 1 ml. Finalmente se equilibra la columna con PBS para reutilizarla. Se almacenó la inmunoglobulina en alícuotas de 1 ml para su congelación.

La comprobación de la presencia del anticuerpo anti ODC de las fracciones de la elusión se comprobaron por contraimmunoelectroforesis (Figura 12 sección resultados) y precipitación en capilar (Tabla VII sección de resultados). La determinación de la concentración de proteínas se llevo al cabo por el método de Bradford³⁸, los resultados se muestran en la Figura 13 (sección resultados).

Concentración fracción IgG Los picos obtenidos en la medición de concentración de proteínas se colocaron en tubos centrífuga (Sartorius viva-spin 2) y se centrifugaron a 2000 g, para su concentración. Se hicieron alícuotas del concentrado y se almacenaron a -70° C .

Inmunohistoquímica. Comprobada la reactividad del antisuero total y de la fracción IgG purificada α -ODC de conejo, se realizó la inmunodetección de la ODC por IHQ en

tejidos de ratas (páncreas, riñón e hígado), de 3 meses y neonatas. Así mismo, por Western Blot en extractos de páncreas, hígado y riñón de ratas neonatas. Para la IHQ se utilizaron dos estrategias: en tejidos congelados con nitrógeno líquido y en tejidos fijados con paraformaldehído e incluidos en parafina²⁸.

Se extrajeron los órganos de ratas neonatas macho de 3 días y de dos meses de edad. El 50 % de las muestras obtenidas se destinaron para inclusión en parafina y el otro 50 % fue colocado sobre un soporte de plástico con unas gotas de una resina sintética para inclusión de tejidos "tissue-teck (SIGMA), inmediatamente después en un criotubo para su congelación en nitrógeno líquido.

Las muestras destinadas para inclusión en parafina se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS, se deshidrataron en alcoholes para finalmente incluirse en parafina (SIGMA).

Mediante el uso de un microtómo se hicieron cortes de 5µm de cada bloque y se colocaron en portaobjetos previamente desengrasados y tratados con 3-aminopropiltriethoxysilano al 0.1 %.

Las pruebas de IHQ se realizaron:

- 1) De la forma habitual²⁹; es decir, con los tejidos incluidos en parafina. Se desparafinaron, hidrataron, permeabilizaron, bloquearon. Posteriormente se incubó con el 1^{er} anticuerpo (Ab), el 2^o Ab, sistema de amplificación SAV/POX y el cromógeno diaminobenzidina (DAB).
- 2) Se probaron a diferentes concentraciones del 1^{er} Ab al igual que el 2^o Ab y se adiciona un amplificador del cromógeno (DAB enhancer).
- 3) Utilizando técnicas de recuperación del antígeno³⁴ con:
 - a) citrato de sodio
 - b) EDTA

- 4) Para la IHQ con tejidos congelados se emplearon dos métodos de fijación:
- Con paraformaldehído inmediatamente después del corte y realizando la IHQ igual que en el número 1. Y realizando el mismo procedimiento pero fijando con acetona para continuar la IHQ como en el número 1
 - Hecho el corte se agregó el 1^{er} Ab después se fijó (con paraformaldehído), y se continuó con la IHQ como en el número 1

Para llevar al cabo la IHQ las muestras se incubaron a 37 ° C para quitar el exceso de agua por 24 horas y a 60° C por 24 horas para ser desparafinadas finalmente.

Se hidrataron los tejidos en alcoholes hasta llegar a PBS, se realizó recuperación del antígeno utilizando 2 metodologías: a) buffer de EDTA pH 9, b) ácido cítrico. En ambos casos utilizando autoclave por 5 minutos a 10 atmósferas, se ambientaron en PBS durante 10 minutos y se procedió a colocarlos en una cámara húmeda para permeabilizar con Tritón 100x 0.25 % en PBS por 60 minutos, posteriormente se lavaron con PBS 3 veces 10 minutos cada vez en agitación suave.

El bloqueo de peroxidasas endógenas a los tejidos se realizó con H₂O₂ al 5 % en PBS y 0.1 % de azida de sodio por 30 minutos en cámara húmeda, se lavaron y realiza bloqueo inespecífico con BSA al 10 % durante 30 minutos, después bloqueo de biotina con clara de huevo al 20 % , Tritón X-100 al 0.10% en PBS 1x por 30 minutos y un bloqueo con suero total de rata por 30 minutos todos ellos en cámara húmeda.

Finalmente se incubó el primer anticuerpo (IgG anti ODC y antisuero total anti ODC) por 24 horas a 4 °C. (Todas las IHQ realizadas contaron con un control negativo e isotipo.) Las diluciones de la IgG α -ODC y suero total α -ODC, fueron hechas con Tritón x 100 al 0.1 % en PBS y éstas se trabajaron de 1:500 hasta 1:20 . Después de la incubación se lavó con Tween 20 0.1 % en PBS 3 veces en agitación suave por 10 minutos en cada lavado. Se incubó con el segundo anticuerpo α - conejo (goat-anti-rabbit IgG –B cat SC-2040 lot 1 C161 biotinilado), en una cámara húmeda y posteriormente se lavó con PBS 3 veces por 10 minutos cada vez, y se colocó a los tejidos estreptavidina peroxidasa (SAV/POX; DAKO DO- 365) y se incubó en cámara

húmeda por 30 minutos, se lavó y reveló con DAB. Finalmente se agregó un intensificador (DAB Enhancer), para aumentar la resolución del cromógeno.

Se hizo contratinción con dos colorantes diferentes: hematoxilina y verde de malaquita al 5 %. En la contratinción solo se tiñó a uno de los dos tejidos que se hallaban en los portaobjetos virando el color con H₂O₂ destilada y desionizada. Se deshidrató con alcoholes al 60%, 80%, 90%, absoluto, xilol 1 y xilol 2, por 10 minutos en el caso de hematoxilina cada caso y finalmente se montó con resina sintética para su observación al microscopio. Las laminillas contrateñidas con verde de malaquita solo fueron montadas en medio acuoso.

Las muestras almacenadas en nitrógeno fueron colocadas en el soporte del criotomo sobre "Tissueteck" e hicieron cortes de 5 µm a una temperatura constante de -20 °C.

Los cortes se colocaron sobre portaobjetos que previamente se desengrasaron y trataron con silano al 0.1%, los cuales hasta su procesamiento, se mantuvieron en un congelador de -20 °C o sobre hielo seco para su transporte.

Las muestras inicialmente se mantuvieron a temperatura ambiente 10 minutos para eliminar el exceso de humedad del congelador, después se procedió a fijar con paraformaldehído 4 % durante 5 minutos y se lavó con PBS, posteriormente se secó a 37 °C 10 minutos y se mantuvieron en PBS 15 minutos antes de proceder a permeabilizar y continuar con el protocolo de IHQ descrito para las muestras embebidas en parafina.

Western blot. Se realizaron extractos totales (ver apéndice B), de páncreas, hígado y riñón de una rata macho neonata siguiendo la metodología previamente descrita y modificada por Dignam¹⁸.

Los órganos son extraídos, disgregados y colocados en RIPA frío 3ml/g (ver apéndice B). Se homogenizaron las muestras por sonicación (Sonifier Branson 450VWR Scientific), durante 2 ciclos de 15 seg de duración para páncreas y 30 seg para hígado y riñón respectivamente.

Posteriormente se adicionaron 10 μ l de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), por cada ml de RIPA. Se incubó 30 minutos en hielo y se centrifugó a 10,000 g a 4 °C 10 minutos. El sobrenadante se centrifugó nuevamente y posteriormente se cuantificó y dividió en alícuotas almacenandolas a – 70 °C. La cuantificación de proteínas (ver apéndice B), se realizó mediante el uso de un kit (Bio-Rad DC Protein Assay).

Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron corridas por electroforesis utilizando un gel separador de acrilamida al 10% y un gel concentrador (ver apéndice A). Las muestras se prepararon a una concentración final de 5.3 μ g / 1 μ l, a éstas se les adicionó 1 μ l buffer de muestra por cada μ l de extracto. Se hirvieron las muestras por 3 minutos para desnaturalizar, se cargaron los carriles (ver apéndice B). El corrimiento se llevó al cabo a 22.5 mA con buffer de corrimiento.

El gel posteriormente se equilibró con buffer de transferencia, lo mismo que el cassette de transferencia y la transferencia se realizó a 95 volts, durante 1 hora a 4 °C con agitación constante utilizando una barra magnética.

La membrana (conteniendo la impresión del corrimiento de las proteínas) se colocó en una charola con PBS y leche descremada en polvo al 5 % Sveltees por una hora para bloquear sitios de unión inespecífica, (la eficiencia de la transferencia se verificó al teñir el gel con azul de Coomassie).

Después de bloquear la membrana, se lavó con PBS-Tween 20 al 0.2% y se procedió a incubar con el anticuerpo primario (IgG anti ODC y antisuero total anti ODC) a una dilución de 1:500 en PBS-Tween 20 al 0.2% a 4 °C por 24 horas. Posteriormente la membrana se lavó con PBS-Tween 20 al 0.2% por 10 minutos en agitación suave 3 veces. Después incubó con el anticuerpo secundario (anti-rabbit peroxidado) 1:15000 en PBS-Tween20 al 0.2% 1 hora a temperatura ambiente.

Después de la incubación se lavó 3 veces con PBS –Tween al 0.2% por 10 minutos cada vez y por último con PBS y se procedió a revelar con el kit de ECL (cat. RPN 2209 de Amersham Pharmacia Biotech04 1).

RESULTADOS

La inmunización intra esplénica ha sido propuesta por varios autores como una alternativa para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales.^{11,26,45,64}

El esquema de inmunización intra esplénica resultó ser satisfactoria en ambos modelos experimentales, solo observamos una leve fibrosis en el tejido adyacente a las incisiones. No se presentaron sangrados trans-operatorios ni infecciones posteriores en ambas intervenciones practicadas a cada modelo experimental.

En la figura 10 se muestra el proceso quirúrgico de la inoculación del antígeno directamente al bazo.



Figura 10. Proceso de inmunización intra esplénica.

Los resultados de la prueba de reactividad de los antisueros obtenidos en ratas y conejos por precipitación en capilar y contrainmunolectroforesis, se mostraron con bastante similitud como se muestra en las tablas V y VI .

CAPILAR	DILUCIÓN DEL ANTIGENO	REACTIVIDAD*
1	1:1	+
2	1:2	+
3	1:4	+
4	1:8	+
5	1:16	+
6	1:32	+
7	1:64	-

Tabla V. Reactividad en capilares de antisuero anti ODC de conejos ,obtenido al sangrar al blanco.

CAPILAR	DILUCIÓN DEL ANTIGENO	REACTIVIDAD*
1	1:1	+
2	1:2	+
3	1:4	+
4	1:8	+
5	1:16	+
6	1:32	+
7	1:64	+
8	1:128	-

Tabla VI. Reactividad en capilares de antisuero anti ODC de ratas, obtenido al sangrar al blanco.

*En los capilares que presentaron precipitado la reactividad fue tomada como (+) positiva, (-) nula.

Las pruebas de precipitación se realizaron por triplicado y con testigos de antígeno y anticuerpo, con la finalidad de evidenciar algún tipo de lectura falsa positiva.

Las pruebas de reactividad por medio de contrainmunolectroforesis dieron datos similares a los de precipitación. En la Figura 11 se muestra los datos obtenidos para el antisuero de conejo.

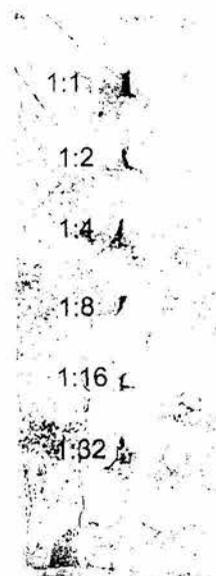


Figura 11. Contrainmunolectroforesis de antisuero anti ODC de conejos al sangrar al blanco.

La purificación de la fracción IgG del antisuero de conejo realizada por una columna de intercambio iónico (MAPS II PROTEIN A KIT), se muestra en la figura 12 con el perfil de elusión obtenido.

La cuantificación de proteínas de la fracción IgG obtenida de la elusión en la columna se realizó a una longitud de 280 nm con 3 repeticiones y con un valor 0.005 en la desviación estándar. La cuantificación se hizo mediante el método de Bradford (ver apéndice B), los datos muestran que la mayor concentración de proteínas obtenido se encuentra en la fracciones 9-15 (Figura 12), por lo que estas fracciones después de ser homogenizadas se colocaron en un centrífugo (Sartorius viva-spin 2) para obtener un

concentrado final homogéneo, que dio una lectura en la cuantificación de proteínas totales de 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

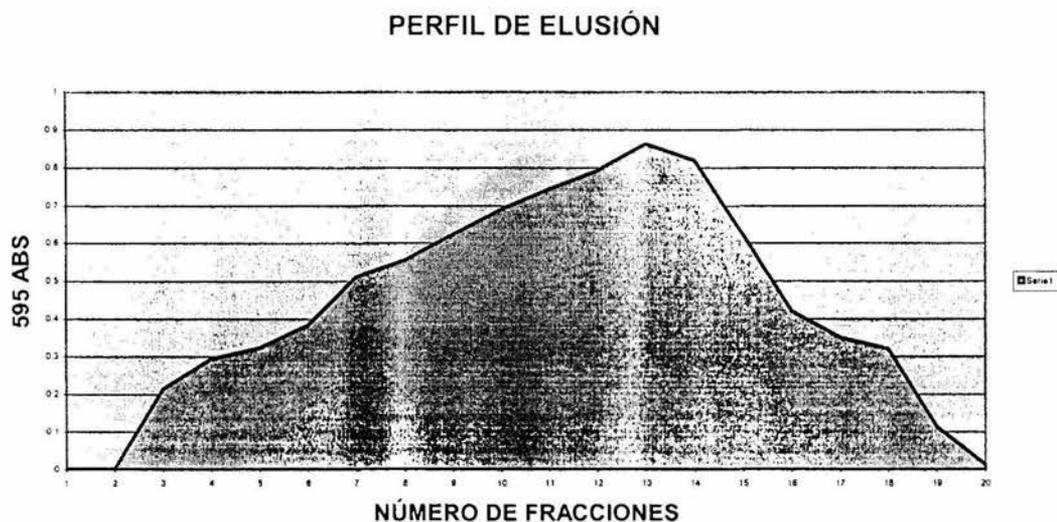


Figura 12. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford a 595nm.

Para evidenciar la reactividad de la fracción IgG α -ODC se hicieron ensayos de precipitación en capilar y contraelectroforesis (Tabla VII y Figura 13)

CAPILAR	DILUCIÓN DEL ANTIGENO	REACTIVIDAD*
1	1:1	+
2	1:2	+
3	1:4	+
4	1:8	+
5	1:16	-
6	1:32	-

Tabla VII. Reactividad en capilares de IgG α -ODC de conejos.

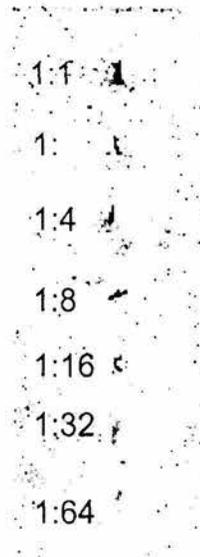


Figura 13. Contrainmunelectroforesis de IgG α -ODC de conejos.

Para la inmunocitlocalización de la ODC se realizaron ensayos de IHQ, con el suero inmune total de conejo así como con las fracciones obtenidas de la IgG purificada y no se observó ninguna marca visible en los tejidos trabajados, inclusive empleando la técnica de recuperación de antígeno, en tejidos de ratas de 3 meses, como en tejidos de ratas neonatas (3 días) Figuras 14-16.



BLANCO



ISOTIPO



EXPERIMENTAL

Figura 14. IHQ de hígado 40X. Sin marca evidente.

IZT.



ISOTIPO



BLANCO



EXPERIMENTAL

Figura 15. IHQ de riñón. 40x. Sin marca.

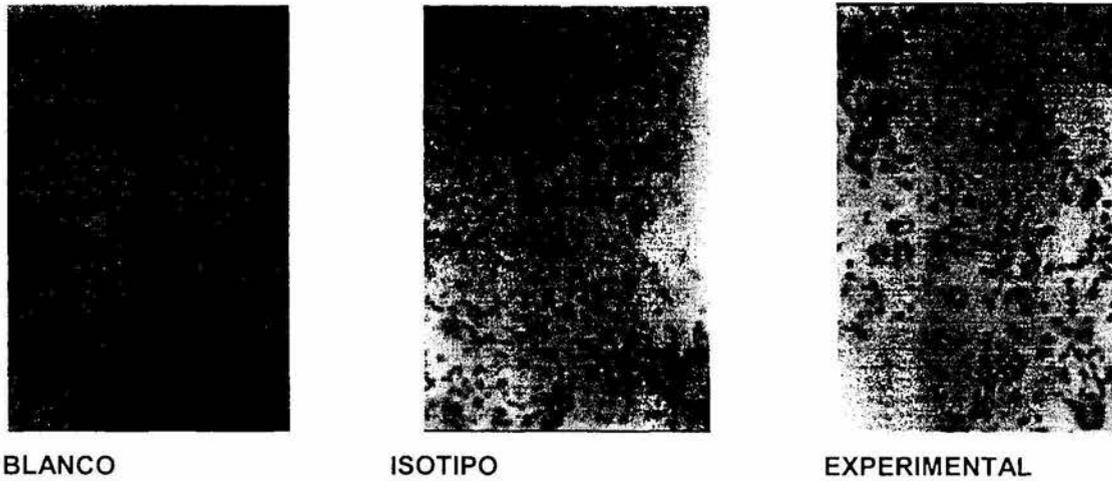


Figura 16. IHQ de páncreas. 40X. Sin marca.

Para la realización del Western Blot, se requirieron extractos de páncreas, riñón e hígado de una rata macho de 3 días. La figura 17 muestra la cuantificación de proteínas de estos extractos. En la figura 18 se muestra la reactividad observada por Western Blot con el antisuero total y la IgG α -ODC.

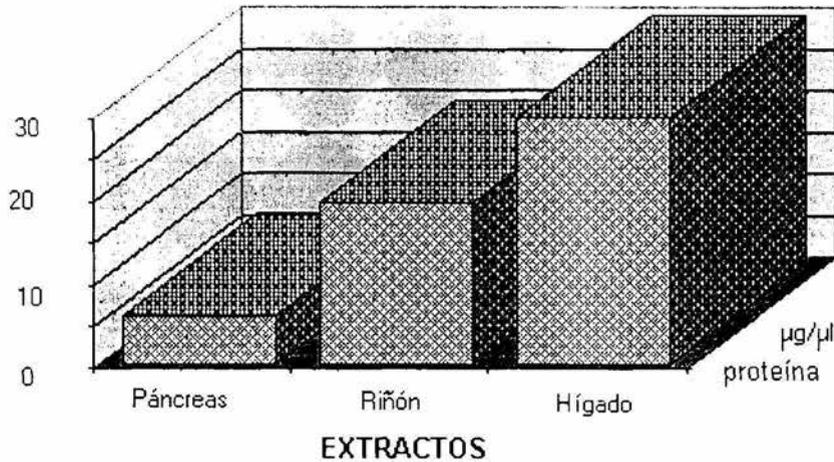


Figura 17. La cuantificación de proteínas se hizo con el kit Bio-Rad DC protein assay 655 nm. Con 0.014 de desviación estándar.

La lectura en la cuantificación de proteínas de los extractos, sugiere una correlación acorde al tamaño y peso de cada uno de los órganos, como se muestra en la figura 17.

En los resultados de los ensayos de Western Blot, se llevó al cabo la incubación del 1^{er} Ab a una dilución 1:500. Los ensayos contaron con control de IgG y antisuero total (resultados no mostrados).

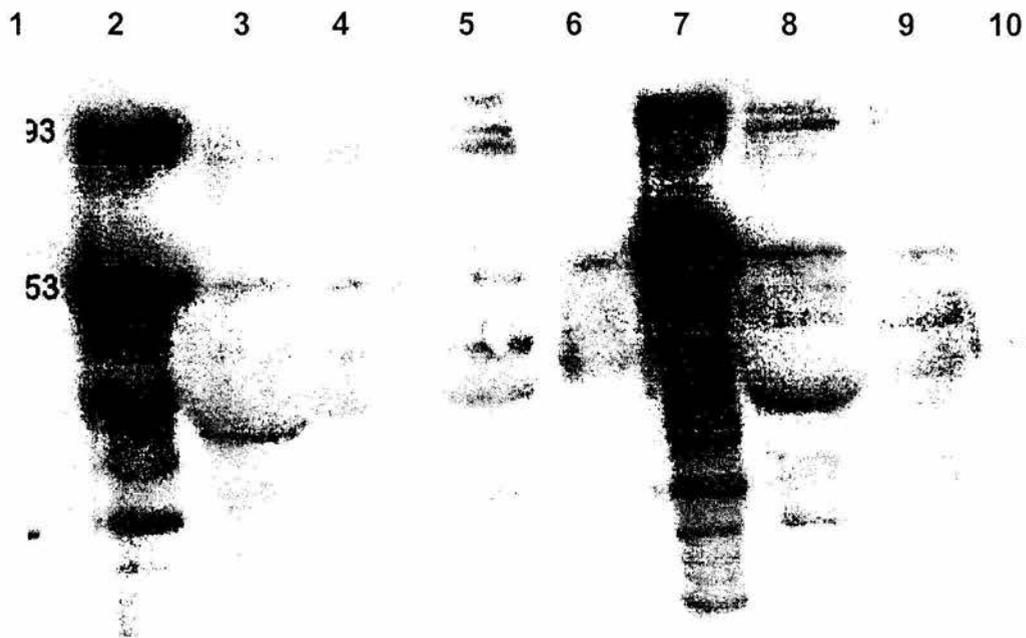


Figura 18. Los resultados del Western Blot muestran una alta reactividad, con las proteínas marcadas con pesos moleculares de 53 y 93 kDa aproximadamente.

Los carriles del 1-5 fueron incubados con IgG α -ODC, y los correspondientes del 6-10 se incubaron con suero total α -ODC.

Carriles 1 y 6 marcadores de peso molecular

2-7 ODC

3-8 páncreas

4-9 riñón

5-10 hígado

DISCUSIÓN

Debido a que los procedimientos clásicos de inmunización no son siempre eficientes y con el fin de evitar inconvenientes, se han venido desarrollando e implementando diferentes metodologías para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales. En lo que respecta a los monoclonales, existen dos alternativas:

1.- Inmunización *in vitro*; en la cual el antígeno es presentado directamente a células en cultivo.

2.- La inmunización intra esplénica, una técnica en la cual el antígeno es depositado en el bazo⁷. Esta última también se ha empleado para la obtención de anticuerpos no solo monoclonales sino también policlonales^{45,26,64}. Este tipo de inmunización requiere menos trabajo de laboratorio y el riesgo de contaminación frecuente en los cultivos *in vitro*, se reduce¹¹.

Con este fundamento, el propósito de este estudio fue aplicar esta metodología alterna de inmunización, para la obtención de anticuerpos policlonales y comprobar por diferentes métodos, la presencia de anticuerpos contra el antígeno inoculado.

La producción de anticuerpos policlonales contra la ODC aislada de diferentes fuentes ha sido descrita por diversos autores⁵⁹. Ellos han recurrido a esquemas de inmunización convencionales y los ensayos de especificidad de los antiseros obtenidos, se reportan como funcionales. Sin embargo, debe hacerse notar que debido a la homogeneidad de la ODC utilizada como antígeno para la inmunización, los resultados de estos ensayos no siempre están garantizados⁵⁷.

En el presente trabajo, procuramos inducir una óptima respuesta inmune contra ODC, para este propósito utilizamos dos modelos animales de experimentación: rata Wistar y conejos Nueva Zelanda. Ambos modelos mostraron inmunocompetencia contra ODC y la respuesta resultó ser muy similar (Tablas V y VI).

Conviene destacar que una de las características particulares de la ODC, es que se trata de una proteína con una gran homología en los sistemas vivos (plantas, bacterias, hongos y animales de diferentes especies).

Por lo que podemos suponer que a pesar de esta alta homogeneidad (90%), la inmunización intra esplénica resultó ser efectiva para la obtención de anticuerpos anti ODC. Como se demuestra en las pruebas de reactividad de antígeno-anticuerpo (Tablas 5 y 6 y Figura 11 de la sección de resultados).

En la inmunización intra esplénica el antígeno es directamente aplicado al órgano linfoide periférico de mayor tamaño y obviamente se pone en contacto directo con las células efectoras de la respuesta inmune LB, LT, macrófagos y las CPA, donde se inicia la respuesta inmune. El buen resultado obtenido en este tipo de inmunización es consecuencia en gran parte, a la inoculación del antígeno, así como, a la naturaleza y número de las CPA del hospedero que realizan sus funciones junto con las células T, estas condiciones son determinantes en la inmunogenicidad del antígeno¹². Así como también es importante el microambiente esplénico, porque apoya la preparación de las células T y hace muy eficientes a las CPA y macrófagos.

Demostramos reactividad del anticuerpo obtenido en ambos modelos experimentales, mediante diferentes estrategias:

- a) Precipitación en capilar. Esta reacción fue evidentemente positiva por la precipitación de los complejos inmunes en el tubo capilar, inclusive en diluciones 1:32 y 1:64 con los antisueros de conejo y rata respectivamente. Así mismo, se demostró la reactividad Ag-Ab de la fracción IgG α -ODC (Tabla VII y Figura 13 sección de resultados). Como puede observarse en la Tabla VII el antisuero total tiene un título más elevado, precisamente por la mayor cantidad de proteínas existentes en el suero a diferencia de solo la IgG en la fracción purificada.
- b) Otro ensayo con el que verificamos la reacción Ag-Ab fue por contaimunoelectroforesis. Reacción en la que se demostró la presencia de anticuerpos α -ODC de suero total de conejo, así como de la fracción IgG α -ODC (Figuras 11 y 13 respectivamente. Sección de resultados). Observándose en el ensayo con la fracción IgG una precipitación evidente en todas las concentraciones de Ab's probados.

Finalmente utilizamos el Western-blot por ser el método más sensible para comprobar la reactividad del suero total y de la fracción IgG en contra de la ODC. Con esta herramienta, observamos tanto para extractos de tejidos como con el antígeno usado para inmunizar, la presencia de bandas de un peso molecular de 53 kDa y 93 kDa compatibles con los anticuerpos reportados (Tobias y Kahana⁶²), en el que la ODC existe en equilibrio entre dímeros activos y monómeros inactivos, con un peso de 93 y 53 kDa respectivamente. Los resultados de estos ensayos sugieren una correlación con la literatura reportada^{31,35}. En esta línea, la literatura reporta a la forma activa de la ODC en mamíferos como un homodímero consistente en dos subunidades monoméricas de 51-53 Kda cada una. Por lo que la inmunodetección de la ODC en extractos de páncreas, riñón e hígado de rata neonata por anticuerpos policlonales α -ODC de conejo es concluyente; tanto para la fracción IgG como para el antisuero total.

Tanto más aún, Reddy⁵⁶, en su trabajo mostró diferentes formas iónicas de la ODC y sugiere que son debidas a fosforilación. De tal manera que la forma fosforilada y no fosforilada de la ODC pueden formar heterodímeros, con dos consecuencias; 1) la forma fosforilada es más resistente a la proteólisis *in situ* que la forma no fosforilada y 2) la forma fosforilada y purificada de la ODC tiene una mayor capacidad catalítica que la forma no fosforilada. Pero debe tomarse en cuenta, como Reddy lo sugiere que la fosforilación intracelular de la ODC no puede ser generalizada en todo tipo de células. Así como, las posibilidades de variaciones biológicas de la enzima dadas sus funciones biológicas: proliferación, diferenciación, apoptosis. Incluso el inicio de la expresión de la ODC, podría complicar su localización, como se ha encontrado en células en estado quiescente, en donde se hayan cantidades más altas de poliaminas.

Nuestros resultados son similares a los publicados por Reddy, nosotros mostramos una alta reactividad del anticuerpo α -ODC de suero total y de la fracción IgG α -ODC con moléculas de pesos moleculares de 93 y 53kDa (Figura 18).

Cabe mencionar que en los Western Blot, se observó una mayor afinidad de la fracción IgG α -ODC en los tres extractos de tejido (páncreas, riñón e hígado), no así el presentado con el suero total α -ODC. Esto es debido principalmente, a la mayor afinidad presentada por la fracción IgG en comparación con el antisuero total.

Ya comentamos que la inmunodetección de la ODC por IHQ en diferentes tejidos fueron negativos, lo cual nos obligó a ensayar múltiples estrategias: permeabilización, tiempos y temperaturas de incubación tanto para el primero como para el segundo anticuerpo, diferentes fijadores y medios de preservación del tejido e implementar técnicas de recuperación del antígeno³⁴. Todas estas alternativas ensayadas con el suero total y con la fracción IgG del suero. Lamentablemente no permitieron evidenciar la reacción del anticuerpo con la ODC. Sin embargo, tenemos la certeza de que el proceso de inmunización generó un adecuado título de anticuerpos y que estos se hayan presentes tanto en el suero total de ambos modelos experimentales, así como en la fracción IgG del conejo.

Por último, solo cabe recordar que la importancia atribuida a la ODC y/o el sistema de poliaminas a permitido el desarrollo de diferentes metodologías para su estudio. Resulta ser el presente trabajo, un ejemplo más para tratar de aclarar sus funciones biológicas. Aún quedan muchas interrogantes al respecto de estas moléculas como Coffino⁴⁴ lo ha expresado; y que textualmente citamos: *"polyamines are doing some important things, but we do not know what they are"*.

CONCLUSIONES

- La inmunización intra esplénica a pesar de tener dificultades técnicas en pequeñas especies, resulta un procedimiento que garantiza elevada eficiencia en la producción de anticuerpos policlonales con cantidades mínimas de antígeno y tiempo breve de inmunización.
- El antígeno ODC, de bajo peso molecular y alta homología que podría ser considerado teóricamente como poco inmunogénico, resulta ser eficiente cuando se aplica por vía intra esplénica omitiendo el uso de adyuvantes.
- Utilizando diferentes métodos para medir la reacción antígeno anticuerpo, se comprobó con seguridad haber logrado inducir la producción de anticuerpos específicos contra el antígeno inoculado, sin embargo, no garantiza que puedan ser evidentes *in situ* por técnicas de inmunohistoquímica.

REFERENCIAS

1. Abbas, K. et al. 2001 *Cellular and Molecular Immunology*. 3th Ed. WB.
2. Antony, T., et al. (1999) *Biochem.* 38, 10775-10784
3. Alfonsina, M., et al. (1999) *FEBBS LETTERS* 455, 149-153.
4. Almrud, J., et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 295, 7-16
5. Atmar, V. and Kuehn, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 9, 5518-5522
6. Auvinen, M. et al. (1992) *Nature* 360, 355-358
7. Balasundaram, D. And Tyagi., A. (1991) *Moll. Cell Biochem.* 100, 129-140.
8. Bancroft, J., Stevens, A. and Turner, A. 1990. *Theory and practice of Histological Techniques*. 3^d Ed. Churchill Livingstone
9. Basu, H., et al (1997) *Eur. J. Biochem.* 243, 2478-2492.
10. Bardocz, S. (1993) *Eur. J. Clin. Nutri.* 47, 683-690
11. Cardillo, F., et al (1995) *J. Immunol. Methods*. 188, 43-49
12. Cayeux S., et al., (2001) *Eur. J. Immunol* 31, 1392-1399)
13. Chang, B., et al.(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 264-270
14. Choudhury, I., et al. (1984) *Biol. Neonate* 46, 209-214.
15. Coffino, P. (2001) *Biochemie* 83, 319-323
16. Coffino P. (2001) *Mol. Cell Biol.* 2, 188-194
17. Damasceno, N.R. Lindoso, Abdalla, J.A. D.S. Goto, H. (1996) *J. Med. Biol. Res.* 29, 1625-1628.
18. Dignam, J. :Preparation of Extract from Higher Eukaryotes. *Guide to protein Purification*. (1990) *Methods Enzimol.vol* 182 Dentsuher, M. Prentice Hall N.Y. U.S.A 194-202
19. Donnato, N., et al. (1986) *Biochimica et Biophysyca Acta* 884, 370-382
20. Dypbukt, J., et al (1994) *J. Biol.. Chem.* 269, 30553-30560
21. Feurstain, B. (1990) *J. Cel. Bioche.* 46, 37-47
22. Geall, A., et al. (1999) *FEBBS LETTERS* 459, 337-342.
23. Haimeur A. et al (1999) *Mol. Microbiol.* 34, 726-737
24. Heby, O. (1981) *Differentiation.* 14, 1-20
25. Heby, O. and Persson, L. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 153-158
26. Hurpin, C., Rotarioa, C., et al. (1998) *Vaccine* 16, 208-215.
27. Igarashi, K. and Kashiwagi, K (2000) *Bioche. Biophy. Res. Commun.* 271, 559-564.
28. Janeway, C. and Medzhitov, R. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216
29. Jiménez, R. 1998. *Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y II por inmunohistoquímica en mujeres con lesiones cervicales precancerosas y cancerosas asociadas a infección por papiloma virus humano (HPV) 16 y 18. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN. México, D.F.*
30. Kabat, E., and Mayer, M. 1968. *Inmunoquímica Experimental* 2ª edición Editorial Fournier, S.A. México, D.F.
31. Kern, A. et al. (1999) *Structure* 7, 567-581
32. Kingsnorth, A., et al. (1984) *Br. J. Surg.* 71, 791-794.
33. Kitani, T. and Fujisawa, H. (1988) *J. Biochem.* 103, 547-553
34. Klein, J and Horejsi, V. 1997. *Immunology* 2ª Ed. Blackwell Science.
35. Krenacs, L., Krenacs, T. And Raffeld, M.: *Anmtigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. Immunocytochemical Methods and Protocols.* (1998). Javois, L. *Methods in Mol. Biol.* Totowa, N.J. 115, 85-93.
36. Lopatin, A., Makhina, E. and Nichols, C. (1994) *Nature.* 372, 366-369.
37. Loprinzi, C., Messing, M. (1992) *J. Cell Biochem. Suppl.* 161, 153-155.
38. Maniatis, T., Frisch, E. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning.* New York Coldspring Harbor Laboratory.
39. Marton, L. and Pegg, A. (1995) *Annu.Rev.Pharmacol. Toxicol.* 35, 55-91
40. Matthews, HR. (1993) *Bioessays.* 15, 561-567.
41. Méndez, J.: *Poliaminas. Bioquímica e Inmunología* (1989) Diaz-Zagoya, J. y Hicks, J. *Facultad de Medicina. UNAM. México.* 1, 365-385.
42. Meijer A. and Henseleit, K. (1990) *Physiol. Chem.* 210, 33-66
43. Milord, F., Pépin., J., et al (1992) *Lancet* 340, 625-655.
44. Morgan, D. (1998) *Methods Mol. Biol.* 79, 3-30
45. Moonsom, S., P. Khunkeawla, W. Kasinrer. (2001) *Immunol. Letters.* 76, 25-30
46. Murakami, Y., et al (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3340-3342
47. Nelsson, B.O. Svalander, P.C. Larson, A. (1988) *J. Immunol. Methods* 27, 305-343.
48. Nelsson, B.O. and Larson, A. (1990) *Inmunol. Today* 11, 10-12
49. Obenrader, M., et al. (1977) *J. Biol.. Chem.* 9, 2860-2864
50. Packham, G., Porter, W., and Cleveland, L. (1996) *Oncogene.* 13, 461-469. Pegg, A. (1988) *Cancer Res.* 48, 759-774.
51. Packman, G., and Cleveland, L. (1994) *Mol Cell Biol.* 14, 5741-5747
52. Pegg, A. (1980) *Cancer Res.* 48, 759-774
53. Persson, L., Wallstrom, S., et al (1998) *Biochem. Soc. Trans* 26, 575-579.

54. Pussinen, R. Sirvio, J et. al. (1998) *Synapse* 28 288-293
55. Ray, R., Viar, J., et al (2000) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278, C480-C489.
56. Reddy, S., et al. (1996) *J. Biol Chem.* 271, 24945-24953
57. Schipper, R., et al (2002) *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1143-1160
58. Schipper, R., et al (1999) *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1395-1404
59. Schipper, R., et al (1993) *J. Immunol. Methods* 161, 205-215
60. Sela, M. 1974 *The Antigens Vol.II Academic Press N.Y.*
61. Shantz, L. and Pegg A. (1999) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 107-122
62. Shyng, S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12014-12019.
63. Sjöholm, A. (1993) *Ame. Physiol. Soc.* C501-C518.
64. Spitz, M. (1986) *Methods Enzimol.* 121, 33-41.
65. Spitz, L. Spitz, M. Thorpe R., Eugui, E. (1984) *J. Immunol. Methods* 70, 39-43.
66. Takiguchi, M. and Mori, M. (1995) *Biochem. J.* 312, 649-659
67. Tobias, K. And Kahanma C. (1993) *Biochem. J.* 32, 5842-5847.
68. Tiburcio, A., Altabella, T., et al. (1997) *Phys Plant.* 100, 664-674
69. Wolf, Hermann M., Eibl, Martha M., et al (1999) *Br. J. Haematol.* 107, 55-68
70. Zhu, C. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 37, 26425-26430

APÉNDICE A

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA SALINA –FOSFATOS 10X (PBS)

80 g de NaCl (Sigma)

2 g de KCl (Sigma)

14.4 g de Na₂HPO₄ (Sigma)

2.4 g de KH₂PO₄. (Sigma)

Se agrega H₂O destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1000 mL. Se filtra y se guarda a temperatura ambiente.

PARAFORMALDEHIDO 4 % (10 ML)

Paraformaldehido (Sigma)

0.4 gr de paraformaldehido

6 mL de PBS 1X , se lleva a 60 °C para homogenizar con barra magnética

Se afora a 10 mL con PBS 1X .

REGULADOR TRIS-GLICINA

Tris- 37 mM

Glicina 0.1 M

Ambos reactivos se aforan en H₂O, se ajusta el pH con NaOH 2N y se almacena a 4° C.

DAB (10 ml)

6 µgr de DAB).

10 mL de Tris HCl pH 7.4

10 µl de H₂O₂.

(Preparar 30 minutos antes de ser utilizado).

SOLUCIÓN RGB 4X (100ml)

18.17 g de Tris-base

4ml de SDS al 10%

Ajustar pH 8.8 con 12 N de HCl

adicionar H₂O hasta los 100 ml, almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SGB 4X

6.06 g de Tris -base

4 ml de SDS al 10%

Ajustar pH 6.8 12 N HCl

H₂O hasta 100 ml, almacenar a temperatura ambiente.

BUFFER DE MUESTRA 2X (10 ml)

2 ml de glicerol

2ml de SDS 10%

0.25 mg de azul de bromofenol

2.5 ml de SGB 4X

aforar a 9.5 ml y agregar el β-mercaptoetanol antes de usar

0.5 ml de β-mercaptoetanol.

BUFFER DE CORRIIMIENTO 10X (1000 ml)

30 g de Tris -Base

144 g de glicina

100 ml de SDS 10%.

GEL SEPARADOR 10 %

H₂O 3.1 ml

30 % acrilamida 2.4 ml

RGB 4X 1.9 ml

APS 10% 112 μl

TEMED 5 μl.

GEL CONCENTRADOR

H ₂ O	1ml
30% acrilamida	0.3 ml
SGB 4X	444 µl
APS 10%	28 µl
TEMED	5 µl.

BUFFER DE TRANSFERENCIA

18.2 g de tris-base

86.2 g de glicina

disolver en 4 l de H₂O, adicionar 1200 ml de metanol y aforar a 6 litros.

RIPA

PBS 1x

NP40 1%

Desoxicolato .5%

SDS .1 %

Aforar a 25ml con PBS 1x.

APÉNDICE B

PRECIPITACIÓN EN CAPILARES

Los capilares son divididos en tres partes iguales con un marcador

Se absorbió con un tubo capilar la solución de antígeno correspondiente hasta la primera marca del tubo, la parte externa del tubo se limpió con papel absorbente

Se giró el capilar 180° y se hizo descender el líquido hasta el otro extremo

Se absorbió de forma similar el antisuero específico hasta llegar a la segunda marca

Se repitió el mismo procedimiento para llenar los siguiente tubos capilares hasta una dilución de 1: 1024

Se mezcló por inversión repetida y dejó que el líquido quede centrado en el tubo

Se introdujo en una gradilla e incubó a 4 ° C por 24 horas.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

Cuando el agar gelificó se hicieron oradaciones cercanas al ánodo (+), en las que se colocó 5 µl del antisuero, llenando el resto de las oradaciones de manera similar.

Llenados todos los pozos colocó la placa en la cámara de electroforesis (Bio- Rad Mini-Sub Cell cat. 170-4307), con regulador tris-glicina pH 8.8 se colocó en una fuente de poder (Bio-Rad 200/ 2.0 Power Supply) y corrió a 30mA por 15 minutos

Posteriormente se hicieron las oradaciones cercanas al cátodo (-) y llenaron los pozos con el antígeno (ODC), el cual se utilizó a una concentración de 2 mg / ml en solución salina y se volvió a colocar la placa en la cámara de electroforesis y corrió por una hora a 30 mA.

Una de las muestras de antígeno estuvo coloreada con azul de bromofenol para que sirviera como indicador de corrimiento.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR BRADFORD

	Blanco	1	2	3	4	Muestras
Buffer PBS 1X	100	98	96	92	88	90
Bradford	900	900	900	900	900	900
Albúmina (BSA)*	-	2	4	8	12	-
Sol. Problema	-	-	-	-	-	10

*BSA concentración 1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$

**Todos los valores en μl

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Extraído el tejido lavar con PBS 1X hasta eliminar restos de sangre

Pesar el tejido

Cortarlo en pequeños fragmentos con una navaja limpia

Colocarlo en un tubo con 3 ml/gr RIPA frío.

Homogenizar con sonicador cuidando que se mantenga frío.

Adicionar 10 μl de PMSF (stock 10 mg / ml) por cada ml de RIPA

Incubar 30 minutos en hielo

Transferir a tubos de microfuga y centrifugar a 10, 000 g 10 minutos a 4 ° C

Recuperar el sobrenadante y centrifugar de nuevo

Recuperar el sobrenadante restante y mezclarlo con el anterior

Si es necesario recentrifugar

Cuantificar proteínas y almacenar en alícuotas

Congelar y almacenar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se coloca en hielo seco unos minutos antes de llevar al rev-co a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)

CUANTIFICACIÓN PROTEÍNAS (KIT DC- PROTEÍN ASSAY -Bio-Rad)

CURVA DE ALBÚMINA EN RIPA

BSA (mg / ml)	RIPA
0	25
1	20
5	20
10	15
15	10
20	5
25	0

Se trabajó con una dilución de la muestra 1:10 en RIPA.

En cada pozo de la placa se colocó 5 μ l de la muestra y se le adicionó 25 μ l de la solución A (kit DC) + 200 μ l de la solución B y dejó incubando por 20 minutos para posteriormente hacerla lectura a 655 nm.

PROTOCOLO WESTERN BLOT

	MARCADOR DE PESO MOLECULAR	*ODC	PÁNCREAS	RIÑÓN	HÍGADO	MARCADOR DE PESO MOLECULAR	*ODC	PÁNCREAS	RIÑÓN	HÍGADO
	2	1	15	15	15	2	1	15	15	15
LB	10	15	15	15	15	10	15	15	15	15

*concentración 1mg / ml

**Todos los valores mostrados en μ l
concentración de extractos 5.3 μ g / μ l

RECONOCIMIENTO

Quiero agradecer a Julia (*UMF. Lab. de Inmunología, FES Iztacala-UNAM*), su ayuda para la realización de las pruebas de reacción Ag-Ab, sugerencias y apoyo durante el proyecto; a Oscar (*UMF. Lab. de Inmunología, FES Iztacala-UNAM*), por sus consejos en las IHQ y apoyo en la conclusión del trabajo; a Roberto (*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas CMN S. XXI*), por las muestras y bloques concedidos. Agradezco las sugerencias hechas por Mónica y Rosario (*UMF. Lab. de Histología, FES Iztacala-UNAM*), en la realización de los cortes histológicos. Deseo expresar mi gratitud a Araceli y Adolfo (*Departamento de Genética Lab. 1 CINVESTAV-IPN*), por su apoyo con el kit de cuantificación y concentración de la IgG; a Miguel y Pancho (*Departamento de Genética Lab. 1 CINVESTAV-IPN*), por la ayuda proporcionada para la realización de los Western. Y al jurado por sus sugerencias y preparación final del manuscrito.

Finalmente, estoy particularmente agradecido con el Dr. Garrido (*Departamento de Genética Lab. 1 CINVESTAV-IPN*), el Dr. Méndez (*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas CMN S. XXI*) y el M en C Jiménez, (*UMF. Lab. de Inmunología, FES Iztacala-UNAM; Departamento de Patología Experimental Lab. de Inmunología Celular, CINVESTAV-IPN*), por el soporte técnico proporcionado, consejos y gran disponibilidad para la realización del proyecto.