



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud

“Producción de un anticuerpo policlonal de conejo contra la isoforma endotelial de Sintetasa de Óxido Nítrico”

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

Jonatan Benítez Beltrán

Comité de Tutores

Tutor Académico:

Dr. F. Bernardo Pliego-Rivero

Tutor Interno:

Dr. Rigoberto Oros Pantoja

Tutor Externo:

Dra. Anaid Antaramián Salas

INDICE

		No. página
Resumen y Summary		
1.	Antecedentes	
	1.1. <i>Introducción</i>	4
	1.2. <i>Isoformas</i>	4
	1.3. <i>Dominios</i>	5
	1.3.1. <i>Dominio (hemo) oxidativo</i>	6
	1.3.2. <i>Dominio reductasa</i>	6
	1.4. <i>Importancia biológica</i>	6
	1.5. <i>Generación anticuerpos policlonales</i>	8
	1.5.1. <i>Hipermutación somática</i>	9
	1.5.2. <i>Cambio de clase</i>	9
	1.6. Selección de inmunógeno	10
	1.6.1. Péptido	10
	1.6.2. <i>Acarreador</i>	10
	1.6.3. <i>Entrecruzador</i>	10
2.	Planteamiento del Problema	12
3.	Hipótesis	13
4.	Objetivos	13
5.	Justificación	14
6.	Material y Métodos	17
	6.1. Diseño de estudio	17
	6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	17
	6.3. Procedimientos	17
	6.3.1. Péptido	17
	6.3.2. Inmunización	18
	6.3.3. Purificación de inmunoglobulinas	19
	6.3.3.1. Solución saturada de sulfato de amonio	19
	6.3.3.2. Precipitación de inmunoglobulinas	19
	6.3.5. Inmunofluorescencia	20
	6.3.6. <i>Western blotting</i>	20

- 6.4. Variables de Estudio
- 6.5. Implicaciones Bioéticas
- 6.6. Recolección de Datos
- 6.7. Análisis Estadístico
- 7. Resultados
 - 7.1. Título corto del artículo enviado
 - 7.1.1 Página frontal del manuscrito
 - 7.1.2 Carta de envío o aceptación
 - 7.1.3 Resumen
 - 7.1.4 Resumen en Inglés - *Abstract*
 - 7.1.5 Introducción
 - 7.1.6 Agregar cada uno de los apartados del artículo
 - 7.2. *Título corto de resultados adicionales no incluidos en el artículo enviado u otro artículo enviado en mismo formato anterior*
- 8. Conclusiones Generales
 - 8.1. Conclusiones
 - 8.2. Limitaciones
 - 8.3. Recomendaciones
- 9. Referencias Bibliográficas
- 10. Anexos
 - 10.1.

1. Antecedentes:

1.1 Introducción

La producción de NO (óxido nítrico) se lleva a cabo por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) la cual sintetiza la producción del gas utilizando el aminoácido L-arginina como sustrato y en paralelo generando citrulina (Micheal, 1993, Therry et al., 1999, Marek et al., 2016). El NO participa en diversos procesos celulares, teniendo un papel importante en el control del tono vascular y el flujo sanguíneo (Corsete-Krott et al., 2014). NO juega varios papeles fisiológicos. Actúa como neurotransmisor, como efector inmune mediado por macrófagos (Inada et al., 2010), inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión leucocitaria (Yang et al., 2013), niveles elevados del gas se asocian a hipotensión, estos también asociados a choque endotóxico, daño tisular y mutagénesis. En tejidos donde se regula el tono vascular, la disminución de este gas se relaciona con hipotensión pulmonar (Marletta, 1993).

Existen tres isoformas conocidas de NOS. Una inducible o iNOS, que se encuentra presente en leucocitos, y dos constitutivas. Entre las dos últimas tenemos nNOS, que se encuentra presente en células neuronales y eNOS, presente en células endoteliales. Una diferencia importante entre ellas es que las isoformas constitutivas son reguladas por Ca^{2+} y calmodulina (Marletta, 1994).

Todas las isoformas de NOS comparten regiones estructurales y cofactores en común, incluyendo un dominio con función oxidasa y otro con acción de catalasa. El dominio oxidasa presenta un grupo hemo (Raman et al., 1998), sitios de unión a tetra-hidrobiopterina (BH_4) y a calmodulina. Por otra parte, el dominio reductasa, que presenta homología a citocromo P-450 (Raman et al., 1998), puede generar uniones con el grupo flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN) y realiza la oxidación de nicotinadenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) (Sangwon, 2014).

1.2 Isoformas

El NO es producido en prácticamente todos los tejidos por las diferentes isoformas de NOS (Marletta, 1993) y en mamíferos cada isoforma está codificadas por un gene diferente (Corsete-Krott et al., 2014). Además de que cuentan con diferente localización tisular, todas las isoformas presentan una regulación bioquímica muy similar y en humanos se presenta una homología del 51-57% entre las tres (Alderton et al., 2001). De una manera simple se pueden clasificar como constitutivas aquellas isoformas que son dependientes de Ca^{2+} /calmodulina, y la no dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, como inducible (Marletta, 1994).

La forma inducible iNOS (NOS2), presente en células del sistema inmune se produce por actividad iniciada a partir de ciertos estímulos como citocinas (Raman et al., 1998). Al interior celular se encuentra presente en el compartimiento citosólico (Marletta, 1993) donde produce gran cantidad de NO. Esta molécula, además de ser un gas es un radical libre que participa en procesos de defensa celular e inflamatorios (Corsete-Krott et al., 2014). En humanos está codificada en el cromosoma 12 y presenta una longitud de 1153 aminoácidos (aa) (Alderton et al., 2001).

Las dos isoformas constitutivas, la neuronal (nNOS, NOS1) y la endotelial (eNOS, NOS3), producen una menor cantidad de NO cuya función se inclina más hacia la señalización celular. Por ejemplo, la nNOS es crucial en la neurotransmisión glutamatérgica, mientras que la eNOS participa muy importantemente en la regulación de la vasodilatación y el control de la presión sanguínea (Marletta, 1993; Raman et al., 1998; Corsete-Krott et al., 2014). En el caso de la forma neuronal, el gen que la codifica igualmente se localiza en el cromosoma 12 con información para una cadena de 1434 aminoácidos (aa) (161 KDa). Por otro lado la forma endotelial presenta 1203 aa (133 KDa) y se encuentra codificada en el cromosoma 7 (Alderton, 2001).

1.2.1 Enzima en eritrocitos

En los estudios realizados por Kang et al. (2000), se logró determinar la presencia de la proteína perteneciente a la familia de NOS en eritrocitos, sin embargo, no lograron determinar actividad enzimática en cuanto a síntesis de NO. Se ha reportado que bajo condiciones de hipoxia los eritrocitos son capaces de inducir vasodilatación dependiente de NO. En estudios realizados en eritrocitos humanos y de rata se observó que, en condiciones anaerobias y pH bajo, los nitritos eran reducidos para producir NO, evento que se relacionó con la expresión de eNOS en dichas células (Webb et al., 2008).

Kleinbongard et al., (2006) puso de manifiesto la presencia de eNOS en la parte interna de la membrana de eritrocitos y en mucha menor proporción en citoplasma. Asimismo, sugirieron que la enzima se encuentra activa. Se ha postulado que la presencia de arginasa en eritrocitos pudiera modular la capacidad efectora de eNOS en eritrocitos al utilizar el mismo sustrato de manera competitiva y asimismo actuando como un regulador de eNOS (Jiangning et al., 2013).

1.3 Dominios

En forma muy general, las isoformas de NOS presentan una estructura con dos grandes dominios, uno hemooxigenasa que se encuentra hacia el extremo amino terminal. Esta región presenta dos sitios de anclaje, uno a BH_4 y otro al sustrato L-arginina. El otro dominio se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal y tiene función reductasa. Es en este dominio también se encuentran los sitios de unión a FAD, FMN y NADPH (Alderton et al., 2001). Ambos dominios se encuentran muy bien delimitados por una región gozne o bisagra de estructura puramente primaria.

Es requisito molecular para que la NOS presente actividad enzimática que se encuentre en forma dimerica (Marletta, 1993; Raman et al., 1998; Alderton et al., 2001). Hasta ahora, aunque se han cristalizado algunas regiones para su determinación estructural por difracción de rayos X, no se ha dilucidado enteramente su estructura. Sobre todo se tiene conocimiento de la forma monomérica de iNOS y se intuye que la formación del dímero le proporciona a la enzima la capacidad de presentar una unión estable a BH_4 (Raman et al., 1998).

1.3.1 Dominio tipo hemo oxidativo

Se caracteriza por ser un dominio en forma de dímero, al cual Zn^{2+} se asocia a residuos de cisteína por medio de un enlace iónico tetraédrico. Es importante señalar que los residuos Cys de unión Cys-(X)-Cys, se encuentran altamente conservados, punto común entre todas las isoformas de NOS (Raman et al., 1998; Alderton et al., 2001). La importancia bioquímica de este dominio radica en que presenta similitudes con el complejo enzimático del citocromo P-450, compartiendo ambos la capacidad de generar un potencial Red-Ox tal que puede promover la reacción de catálisis con el sustrato L-Arg (Alderton et al., 2001) y por lo tanto la producción de NO y citrulina.

1.3.2 Dominio tipo reductasa

Este dominio se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal. En esta región se encuentra el sitio de unión a Ca^{2+} /calmodulina, así como aquellos sitios que se unen a los cofactores FAD, FMN y NADPH (Alderton et al., 2001). Tanto FAD como FMN aceptan electrones de NADPH, los cuales son transportados hacia el dominio hemo. Es la acción de calmodulina (de ahí su dependencia de Ca^{+2}) la que aparentemente regula el flujo de electrones (Alderton et al., 2001).

1.4 Importancia biológica

El óxido nítrico es un compuesto de bajo peso molecular, alta lipofilicidad y altamente reactivo ya que es un radical libre. Tiene una vida media extremadamente corta (< 5 s) y los nitratos y nitritos derivados de NO producen complejos proteicos S- o N- (nitroso-proteína) y complejos con hierro. Estos en sí mismos constituyen depósitos corporales (*pools*) alternos de NO. A partir de los compuestos nitrosilados, por ejemplo S-nitrosohemoglobina, entonces se puede generar nuevamente NO libre de manera no enzimática. Es decir, sin la participación de NOS. De esta manera tales compuestos nitrosilados, hemoglobina por ejemplo, pueden viajar a otros tejidos donde se produce y libera NO (Bradley et al., 2012). Evaluar experimentalmente, el impacto de cada pool de NO producido por separado (enzimático y no enzimático) ha sido extremadamente complicado de evaluar.

El NO media procesos de señalización, por tres mecanismos: activación de guanilato ciclasa, por S-nitrosilación y activando cascadas de señalización celular dependientes de proteínas cinasas (MAPKs) (Bradley et al., 2012). De esta manera, presenta una gran importancia en funciones endoteliales, metabólicas, protección vascular, efectos sobre el sistema inmune y neurotransmisión. Las concentraciones determinadas en la realización de su función varían entre picomoles y nanomoles y la vida media activa del gas y radical libre NO se ha evaluado entre 1-2 s (Bradley et al., 2012).

Funciones del óxido nítrico	
Nivel de efecto	Función
Mitocondria	Une a los complejos Citocromos I y IV Activación del transporte de electrones Reducción del metabolismo oxidativo mitocondrial Regulación en la producción de ROS*
Protección celular	Protección células endoteliales y del miocardio vía NO-cGMP
Muerte celular	Nitrosilación de tirosina en componentes mitocondriales importante para apoptosis. Daño a ADN llevando a muerte celular por vía mitocondrial y por apoptosis o necrosis.
Músculo esquelético	Metabolismo del músculo Excitación y contracción Función inmune Crecimiento celular
Glucosa	Potencia la acción de insulina vía NO/cGMP/cGK Inhibe la sensibilidad de miocitos a insulina Estimula oxidación de glucosa en músculo, hígado y adipocitos vía cGMP
Ácidos grasos	Influye en el catabolismo vía NO/cGMP en músculo esquelético y cardiaco.
vasodilatación	vía NO/cGMP/cGK Regula niveles Ca^{2+}

* ROS, *reactive oxygen species* (Fuente de la tabla: Bradley et al., 2012).

Como se puede notar de la tabla anterior (Bradley et al., 2012), las isoformas de NOS y su producto NO participan en una gran variedad de funciones fisiológicas las cuales al verse alteradas pueden generar patologías de importancia.

1.5 Generación de anticuerpos policlonales

Cuando los linfocitos T y B encuentran y se unen a moléculas antigénicas a través de sus receptores estas células proliferan y se diferencian. Con este proceso se estimula la producción de anticuerpos y se generan células de memoria. Las células B generan anticuerpos con un gran repertorio de sitios de unión para el antígeno y cada clona de células B produce anticuerpos específicos contra un sitio antigénico (Hanly et al., 1995). Los componentes policlonales

constituyen el componente de la secreción de células plasmáticas de diferentes clones celulares y son por lo tanto proteínas heterogéneas entre sí (Palomo et al., 2009).

La activación de linfocitos B vírgenes, genera la producción de células de memoria y células plasmáticas lo que conduce a la producción de anticuerpos secretados con diferentes isotipos (Kindt et al., 2007; Abbas et al., 2012). El primer contacto con un antígeno externo genera una respuesta humoral primaria, produciendo células plasmáticas generadoras de anticuerpos y en menor medida células de memoria. De inicio se genera mayoritariamente IgM, seguida de un cambio de proporción creciente hacia IgG (Kindt et al., 2007).

Las células de memoria que se generan en la respuesta primaria dejan de dividirse y entran en fase G0 o de reposo fuera del ciclo mitótico. Estas células tienen tiempos de vida variables, pudiendo ser hasta de años. La respuesta secundaria depende de la presencia de células de memoria tanto B como T. En esta fase la respuesta es de mayor magnitud y perdura por más tiempo, generándose un cambio de clase de las inmunoglobulinas producidas, éstas con una mayor afinidad por el antígeno y predominando IgG (Kindt et al., 2007).

Cuando se inmuniza a animales con algún compuesto específico, se estimula la respuesta humoral que consiste en la producción de anticuerpos contra epitopos específicos de la molécula. Para generar una respuesta secundaria es importante inmunizar nuevamente con la misma molécula (Kindt et al., 2007). Posterior a la primera exposición a un antígeno, 7-10 días, ocurren tres fenómenos importantes en la maduración de las células B: maduración de afinidad, cambio de clase y formación de células B de memoria. La afinidad de los anticuerpos producidos en la respuesta humoral aumenta durante el proceso de maduración de la afinidad, resultando sobre todo del proceso conocido como hipermutación somática (Kindt et al., 2007).

1.5.1 Hipermutación somática

Las mutaciones críticas ocurren alrededor de los segmentos V(D)J (variable-diversity-functional joining) de los genes de la inmunoglobulina. Este proceso ocurre sobre todo en la región V (variable) y particularmente en el dominio de hipervariabilidad en el extremo amino. La mayor parte de las mutaciones se encuentra dentro de tres regiones determinantes de complementariedad (CDR, complementary determining regions). Se estima que la frecuencia de mutaciones es de alrededor de 10⁻³/pares de bases por cada división de la clona celular B y se sabe que la mutación somática ocurre de manera aleatoria (Kindt et al., 2007).

1.5.2 Cambio de clase

Este hace posible que cualquier dominio Vh (*variable heavy*) determinado se una a la región constante (C) de algún isotipo de inmunoglobulina (kappa o lambda). Varias citocinas influyen en la determinación de la clase de Ig. En el cambio de clase en respuesta a antígenos dependientes del timo requiere asimismo la interacción CD40/CD40L (Kindt et al., 2007).

Citocina	Inmunoglobulina
IFN-G	IgG2a IgG3
TGF-B	IgA IgG2b
IL-4	IgE IgG1
IL-2 IL-4 IL-5	IgM

Las células B vírgenes sólo expresan IgM o IgD. Como consecuencia del cambio de clase, las células B de memoria expresan isotipos adicionales, incluidas IgG, IgA e IgE (Kindt et al., 2007).

1.6 Criterios de selección del inmunógeno

1.6.1 Péptido

Thomas et al., 1981, nos dicen que la polaridad que presenten los aminoácidos es determinante para que se puede elegir una secuencia peptídica que presente una actividad inmunogénica.

La longitud de los péptidos es importante. Se recomienda la utilización de péptidos inmunogénicos que no sean menores ni mayores a una longitud de 10–20 aa. Aquellos más pequeños, por su tamaño pueden no actuar como buenos epitopos antigénicos. Más grandes puede generar interacciones secundarias en su propia estructura (Hancock y O'Reilly, 2005).

1.6.2 Acarreador

La proteína acarreadora BCP, es extraída del molusco *Concholepas concholepas* que reacciona de manera parecida a la proteína KLH (*keyhole limpet hemocyanin*). Ambas son muy utilizadas debido a su alto grado de inmunogenicidad a su vez asociada a una distancia filogenética considerable con mamíferos. Como agente antigénico se ha demostrado que presenta buenos resultados al utilizarse en mamíferos. Su utilidad incluye su alto potencial de conjugación con fines inmunogénicos con moléculas como hormonas, lípidos y polisacáridos, entre otros (Harris y Markl, 1999).

1.6.3 Entrecruzador

Sulfo-MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) es uno de los entrecruzadores más comunes en el proceso de conjugación y que indeseablemente puede generar reactividad con histidina. Por ello que es importante una secuencia libre de grupos que puedan interferir en la reacción ya que dicho compuesto reacciona principalmente con grupos tiolados. Otro entrecruzador es sulfo-SMCC (sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato), que de igual manera reacciona con grupos tiol. (Carter, 1994). EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)), es otro entrecruzador, el cual presenta una reactividad con grupos carboxilo terminales (Bartel y Campbell, 1959).

La estabilidad de los enlaces entre péptidos y acarreadores se comporta de la siguiente manera: de mayor a menor estabilidad del enlace químico: tioéter > amida > disulfuro > tioéster (Beekman et al., 2001). La reacción de conjugación genera enlaces amida entre el acarreador BCP y el entrecruzador y enlaces tioéter entre péptido y entrecruzador (imagen 1). De ahí la

importancia de introducir cisteína al extremo N-terminal ya que se producirá un compuesto estable.

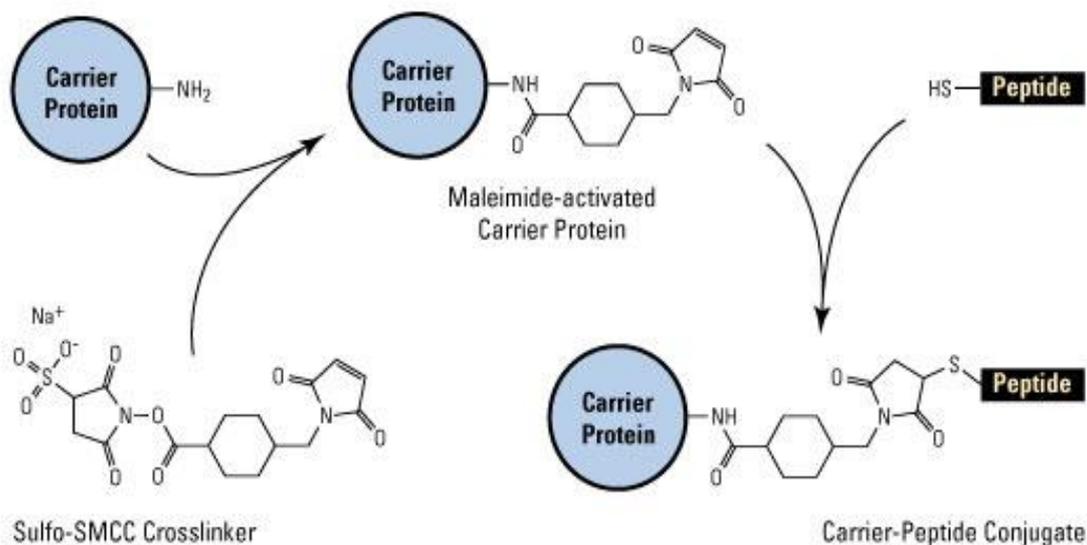


Imagen 1 Reacción de conjugación entre la proteína acarreadora Blue Carrier Protein, el entrecruzador químico Sulfo-SMCC y el péptido inmunogénico.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/77115>

Los grupos electrofílicos son pobres en electrones y pueden aceptar electrones a diferencia de los grupos nucleofílicos que son ricos en electrones y poseen pares de electrones que pueden ceder (Yurkanis, 2008). Lisina y grupos similares con grupos amino, tienden a reaccionar a pH 8.0. Los grupos amino alfa y N-terminales, al tener un carácter básico menor, reaccionan a pH neutro, así como el grupo tiol o sulfhidrilo de cisteína y metionina (Lemus y Karol, 2003). Es de suma importancia considerar entonces la reactividad de los grupos presentes dado que la reacción de conjugación se realiza a pH neutro.

Importantemente para que el grupo sulfhidrilo se encuentre disponible debe encontrarse en estado reducido. Se han reportado una gran variedad de reductores como 2-mercaptoetanol, ditiotretol, glutatión, y tributilfosfina, que a una concentración de 0.1% y temperatura ambiente por 60 min dan buenos resultados. Además estos pueden utilizarse alternativamente en soluciones acuosas u orgánicas (Capter, 1994).

2. Planteamiento del Problema:

El NO media procesos fisiológicos cruciales siendo uno de ellos la homeostasis cardiovascular. Todo parece indicar que desórdenes en el sistema de producción de NO juegan un papel importante en las enfermedades cardiovasculares. Los niveles elevados de NO se han asociado a hipotensión asociada a choque endotóxico, daño tisular y mutagénesis debido a la alta reactividad inespecífica del NO. Por otra parte, déficits en la producción de NO se asocian a hipertensión arterial e hipotensión pulmonar (Marletta, 1993).

Diferentes estudios han sugerido la fuerte posibilidad de que en eritrocitos se expresa NOS en una situación fisiológica tal que la enzima es capaz de sintetizar NO de manera funcional. Las evidencias sugieren que tal enzima NOS eritrocitaria presenta una similitud a la isoforma endotelial de la misma (eNOS) (Corsete-Krott et al., 2012). Por lo tanto, esperamos que la elaboración de un anticuerpo con afinidad hacia la isoforma endotelial de NOS presentará de igual manera afinidad por la enzima expresada en eritrocitos.

En nuestro laboratorio nos hemos encontrado con una extrema falta de confiabilidad de los anticuerpos comerciales. De la batería de cinco anticuerpos comerciales anti-NOS adquiridos en el pasado reciente algunos de ellos no presentan reactividad alguna y otros presentan fuerte reactividad cruzada hacia moléculas ajenas a la enzima NOS. En el mejor de los casos la reactividad ha sido extremadamente débil. Esto ha dificultado y atrasado enormemente nuestro trabajo. Debido al sistema actual de transporte desde el extranjero, depósito en agencias aduanales y, finalmente, entrega del producto a nosotros, hemos encontrado que frecuentemente los anticuerpos comerciales llegan a nuestras manos con un alto grado de degradación. En innumerables ocasiones los anticuerpos se encuentran inservibles. Es por esta razón que hemos decidido producir nuestros propios anticuerpos contra la enzima NOS y determinar la especificidad de los mismos, particularmente en cuanto a la expresión de eNOS en eritrocitos humanos

Pregunta de investigación:

Por diversas técnicas inmunoquímicas ¿podrán los anticuerpos policlonales de conejo producidos contra la isoforma endotelial de la enzima sintetasa de óxido nítrico reconocer lo siguiente?

- a. La enzima eNOS expresada en endotelio vascular.
- b. La enzima tipo eNOS, que recientemente se ha postulado se expresa en eritrocitos (Kleinbongard et al., 2006).
- c. No reconocer otras isoformas de NOS
- d. No reconocer proteínas diferentes

3. Hipótesis:

Hipótesis alterna: Los anticuerpos policlonales de conejo producidos en el Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, UAEMEX, contra la enzima eNOS, reconocerán con alta especificidad además de la eNOS presente en endotelio vascular una isoforma semejante presente en eritrocitos humanos.

Hipótesis nula: Los anticuerpos policlonales de conejo producidos en el Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, UAEMEX, contra la enzima eNOS, no reconocerán con alta especificidad la eNOS presente en endotelio vascular y no detectarán una isoforma semejante en eritrocitos humanos.

4. Objetivos:

4.1 General:

Producir un anticuerpo que reconozca específicamente la forma endotelial de la enzima sintetasa de óxido nítrico y comprobado esto por diversas técnicas inmunoquímicas.

4.2 Específicos:

- Solicitar la síntesis por maquila de dos péptidos (P44 y P58) presentes exclusivamente en la isoforma endotelial de la enzima sintetasa de óxido nítrico.
- Producir un antígeno tal que puedan elaborarse anticuerpos policlonales de conejo dirigidos al reconocimiento exclusivo de la isoforma endotelial de la enzima NOS. Dicho antígeno será el resultado de la síntesis química por “*crosslinking*” entre cada uno de los dos péptidos específicos de NOS y la proteína acarreadora de molusco BCP.
- Inmunizar individualmente conejos con diferentes dosis (mínima, media y máxima) de los productos antigénicos producidos: péptidos P44 y P58 entrecruzados químicamente a la proteína acarreadora de molusco BCP.
- Extraer suero (5 ml) de cada conejo y probarlo previo a la inmunización y 15 días posteriores a cada inmunización y refuerzos.
- Purificar los anticuerpos producidos por cada conejo a partir de la separación de la proteína inmunoglobulina presente en plasma sanguíneo al término de los protocolos de inmunización y refuerzo.
- Caracterizar la especificidad de los anticuerpos policlonales producidos en conejos y su especificidad en el reconocimiento de eNOS por diversas técnicas inmunoquímicas de acuerdo a movilidad electroforética (índice Rf) y expresión tisular.

5. Justificación

Bruno et al., (1996) lograron poner en evidencia la presencia de una proteína expresada en eritrocitos, principalmente unida a membrana, que podía ser identificada con anticuerpos contra las isoformas NOS2 y NOS3, siendo los anticuerpos para NOS1 incapaces de reconocer dicha proteína. En ese momento sólo se pudo considerar la posibilidad de que se expresaba en eritrocitos una proteína con posible relación a la familia de NOS. Aparte de esto, hasta ahora no se ha podido esclarecer si existe una función enzimática tipo NOS activa en la producción de NO al interior de las células rojas. Esta es una problemática complicada debido a la activa participación de nitroso-hemoglobina como gran reservorio de NO.

Se sabe que los efectos de vasodilatación producidos por NO son importantemente determinados por las enzimas NOS localizadas en el endotelio. Aunque se ha reportado que los eritrocitos transportan una enzima funcional productora de NO (Corsete-Krott et al., 2014), esto sigue en debate debido al considerable aporte de NO como gas y radical libre por parte de las formas nitroso y nitrosilhemoglobina. Aún existe discusión sobre la fuente de NO en los eritrocitos suponiendo la posible participación de hierro-nitrosilhemoglobina, S-nitrosohemoglobina y nitrato (Bradley et al., 2012; Kim 2014, Rychter et al., 2016). Diferentes estudios han reportado la presencia de dominios enzimáticos correspondientes a NOS que se encuentran en los eritrocitos pero de manera inactiva. Los eritrocitos tienen la capacidad de generar uniones con el óxido nítrico específicamente la hemoglobina (Bruno et al., 1996). Considerándose como un mecanismo de desecho del gas. Así mismo se presume que en los eritrocitos existe la producción de NO vía enzimática. Esto se ha puesto de manifiesto midiendo los productos de degradación, como son los nitratos y nitritos; como la determinación de L-citrulina marcada, obtenida por la transformación de L-arginina (Kang et al., 2000).

Esperamos que con la producción propia de anticuerpos anti-eNOS poder resolver algunas de las preguntas anteriores. Primeramente en cuanto a la expresión y distribución de la enzima en los compartimientos celulares de eritrocitos: membrana plasmática, citoesqueleto y citosol. Igualmente, de acuerdo a ensayos funcionales en ausencia de hemoglobina, diseñar un sistema de actividad fisiológica de eNOS en fantasmas de eritrocitos.

6. Materiales y Métodos:

6.1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo, cuantitativo y cualitativo.

Universo: Sueros inmunes de conejo

Método de muestreo: Extracción de sangre por punción venosa de oreja.

Tamaño de muestra: 6 conejos.

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

De acuerdo a la reacción de inmunorreactividad de los sueros y anticuerpos producidos en este proyecto, los siguientes factores determinaran su especificidad contra eNOS y por lo tanto los criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Factores a determinar:

Movilidad electroforética (índice Rf) de la proteína antigénica acorde al peso molecular reportado (133 kDa) de eNOS.

Reacción negativa de inmunorreactividad de los anticuerpos secundarios anti-conejo, i.e., especificad del anticuerpo primario producido.

Inmunorreactividad positiva en tejidos donde se ha reportado la expresión de eNOS.

Inmunorreactividad negativa en tejidos donde se ha demostrado la no expresión de eNOS.

Por lo tanto:

Criterios de inclusión: Sueros y anticuerpos purificados que reconozcan al antígeno buscado de acuerdo a los factores anteriores.

Criterios de exclusión: Sueros y anticuerpos purificados que no cumplan con los criterios anteriores

Criterios de eliminación: Sueros y anticuerpos purificados que no cumplan con los criterios anteriores.

6.3. Selección y síntesis de los péptidos antigénicos

La elección del péptido se realizó con apoyo del software de libre acceso IEDB Analysis Resource de acuerdo al código de la asociación Swiss Protein Bank Swiss-prot P29474 para NOS3-Humano (GeneCards), y esto además de acuerdo a la información obtenida de la base de datos NCBI para el análisis del código FASTA.

También se procedió a un análisis de imágenes de la estructura tridimensional de la proteína con el programa SWISS-MODEL. También el análisis de las secuencias peptídicas de las tres isoformas de la enzima NOS se realizó con el software Clustal Omega. Los péptidos seleccionados P44 y P58 fueron sintetizados por GenScrip.

6.3.1 Conjugación de los péptidos con la proteína acarreadora

Procedimiento de acuerdo a Hancock y O'Reilly (2005)

1.- Se disolvieron 4.1 y 4.2 mg de proteína acarreadora BCP (blue carrier protein, GenScript), por cada conjugado, de proteína acarreadora y entrecruzador a preparar para cada péptido, en un volumen de PBS (0.41 y 0.42 ml respectivamente)

2.- Se disolvieron 4 mg de sulfo-MBS (SIGMA-ALDRICH), por cada conjugado, en 0.4 mL agua ultrapura (Up) estéril.

3.- Una vez disueltos el entrecruzador y la proteína acarreadora, se mezcló bien y dejó a temperatura ambiente 1 h bajo agitación constante.

4.- Se dializó la muestra (volumen total de la muestra) en una membrana de celofán para eliminar el entrecruzador que no hubiese reaccionado. **Procedimiento de diálisis:** 1) el primer paso se realizó con 250 ml de PBS, pH: 7.4; 5 minutos, 2) se colocó nuevo PBS, 250 ml, por 20 minutos, 3) se colocó PBS nuevo, 250 ml, por 1 hora, 4) se colocó PBS nuevo, 250 ml, 2 horas, 5) se cambió nuevamente PBS, 250 ml, durante 12 horas, 6) por último, se cambió nuevamente el buffer; 250 ml y se dejó toda la noche, todo el proceso de diálisis se mantuvo a 4°C.

5.- Reducción química del péptido

a) Se preparó una solución fresca de borohidruro de sodio, SIGMA-ALDRICH, (5 mg/ml) en buffer de boratos y se mantuvo en hielo.

b) Se disolvió 4.1 y 4.2 mg (péptido P44 y péptido P58 respectivamente, GenScript) del péptido en buffer de borato (410 y 420 μ L, respectivamente), pH: 8.0

c) Se adicionó 1/10 de volumen de la solución de borohidruro de sodio (8.2 y 8.4 ml, respectivamente) hasta disolver el péptido, se mezcló bien y colocó en hielo por 2 horas, (Holtzhauer, 2006).

d) Se redujo el pH adicionando HCl 1 M (5 gotas), mezclándose bien y dejándose en hielo 5 minutos más.

e) Se adicionó el mismo número de gotas de NaOH 1M para neutralizar el pH y se verificó que este se encontrara entre pH 6 y 7. Cuando fue necesario, se ajustó hasta lograr la neutralidad.

6.- Se agregó el entrecruzador-peptido a la proteína acarreadora BCP en ausencia de sales. Se dejó la reacción proceder toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante y moderada.

6.3.1 Esquema de inmunización

Tabla 1. Esquema de inmunización

Peptido	Cantidad total de inmunógeno (μg)	Tiempo entre dosis (Sem)	Toma de muestra posterior a administración (días)
PWA	50	3	14
PWA	100	3	14
PWA	300	3	14
EQQ	50	3	14
EQQ	100	3	14
EQQ	300	3	14

(Harlow y Lane, 1998)

La primera administración se realizó con adyuvante completo de Freund, y las posteriores con adyuvante incompleto en proporción de volumen conjugado-adyuvante 1:1 (vía intra dérmica). Obtención de muestra (Harlow y Lane, 1998). Se tomaron las muestras sanguíneas de la oreja de conejo (10 mL). Después de la recolección las muestras se mantuvieron a 37 °C de 30 a 60 minutos para generar coagulo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se conservaron a -20 °C hasta su uso.

6.3.2 Técnica de doble inmunodifusión (Método de Ouchterlony)

Se preparó el gel de agarosa 1.2% en buffer PBS estéril disolviendo la agarosa en ebullición. Se dejó enfriar a 50-60 °C y vertió en cajas de Petri un volumen alrededor de 1-2 mm. Se perforaron 5 pozos, uno central y cuatro periféricos con un diámetro aproximado de 3-5 mm, con una distancia 4-5 mm entre cada uno de los pocillos. A cada pozo se le colocó 30 μl de antisuero y 40 μl de antígeno correspondiente. Se dejaron las cajas en cámara húmeda por 24

horas a temp/amb. Se realizó la recolección de muestras de sangre (5 ml) de los seis conejos inmunizados y se obtuvieron los sueros. De cada conejo y primeramente, el suero pre-inmune correspondiente a la etapa previa a la inyección del antígeno. Después, igualmente de cada conejo se recogieron los tres sueros correspondientes a los diferentes esquemas de inmunización: primero, segundo y tercer refuerzo (Tabla 1). Se procedió así a la prueba de Ouchterlony tanto para sueros preinmunes como para los sueros correspondientes a los tres refuerzos de cada dosis y de cada péptido. En total 24 sueros fueron colectados y probados. Péptidos inmunogénicos: P44 y P58. Pozos centrales 40 μ l de conjugado y 100 μ g de proteína de extracto celular de corazón con 30 μ l de sueros inmunes. Sueros: preinmune y primero, segundo y tercer refuerzo. Probados contra extractos celulares de corazón.

6.3.3 Purificación de inmunoglobulinas

6.3.3.1 Solución saturada de sulfato de amonio SAS

El sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) saturado (SAS) se disolvió en agua destilada hasta tener una concentración final de 4.84 M calentándose la solución hasta la disolución completa de SAS. El pH se ajustó a 7.45 con hidróxido de amonio y se refrigeró a 4 °C hasta su uso (Marjam et al., 2015).

6.3.3.2 Precipitación de inmunoglobulinas (Liddell, 2003)

Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4°C. Inicialmente se adicionaron dos partes de PBS por una de suero y posteriormente por goteo se agregó SAS hasta obtener una concentración final entre 37% y 40% (v/v). Esta mezcla se mantuvo toda la noche en reposo y el precipitado se colectó por centrifugación a 1000×g/15 minutos. El precipitado fue lavado de nueva cuenta con SAS y centrifugado otra vez a 1000×g/15 min. El volumen del precipitado se ajustó con buffer salino de fosfatos (PBS) hasta completar el volumen original de la muestra y se diluyó el centrifugado. Finalmente a 5000×g/15 min se removió el material insoluble.

El sobrenadante fue transferido a un recipiente limpio y las inmunoglobulinas nuevamente precipitadas con SAS al 40% centrifugando a 1000×g/15 min y re-disuelto el precipitado en PBS (0.5ml). Fue dializado contra un total de 5 litros de PBS toda la noche. Se centrifugó a 5000×g/15 minutos y removido todo material insoluble. Las fracciones purificadas de inmunoglobulinas se almacenaron a -72°C hasta su uso.

6.3.5 Inmunofluorescencia

Se realizaron cortes de tres tejidos, corazón, pulmón y cerebro, en parafina esperando encontrarse la expresión en el primero y solamente de manera mínima en endotelio vascular de los otros dos. Se realizó la desparafinación de los tejidos y la recuperación inmunogénica con buffer de EDTA pH=9. Se bloquearon con solución de leche baja en grasa al 5% durante 35 minutos. Se incubó con los anticuerpos anti-eNOS durante toda la noche, con una dilución 1:50. Seguido se realizó lavado y adicionándose anticuerpos secundarios anti-conejo acoplados al fluorocromo FITC durante 2 horas. Posteriormente se adiciono el fluorocromo DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) para marcar núcleos y se observaron en microscopio de fluorescencia.

6.3.6 Western blotting

50 µg de proteína de diferentes tejidos de ratón (cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón) fueron sometidas a separación por electroforesis en geles de poliacrilamida (8.0%) y condiciones desnaturalizantes con SDS y β-mercaptoetanol a 100 volts por 150 minutos. Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas (BioRad) durante 2 horas a una membrana de PVDF (polivinil difluoruro) durante 45 minutos a 350 mA utilizando una solución tamponada de electrotransferencia. La membrana se bloqueó durante una hora con solución de leche baja en grasa y sondeada con los anticuerpos anti-eNOS purificados previamente (Kleinbongard et al., 2006).

6.3.7 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit de *Biorad protein assay*, siguiendo las especificaciones del distribuidor.

6.3.8 Densitometría

La densidad de las bandas obtenidas por el western blotting se analizaron con el programa *Imagej*.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Enzima óxido nítrico sintetasa en eritrocitos.	Enzima que realiza la síntesis de NO	Western blotting Fluorescencia	Dependiente Categorizada	133 kDa Presencia o ausencia	N/A
Anticuerpos policlonales	Anticuerpos que actúan con diferentes epitopos de un mismo antígeno	Técnica de precipitación con sulfato de amonio.	Independiente Cualitativa categórica	Formación de precipitado	N/A
Concentración de inmunoglobulinas	Cantidad de proteína presente en una muestra en mg/ml	Técnica de Lowry para cuantificación de proteínas.	Interviniente Cuantitativa discreta	mg/ml	N/A

Variables de Estudio

Independientes: Anticuerpos policlonales

Dependientes: Reconocimiento de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintetasa.

6.5 Implicaciones Bioéticas

Basados en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y en los estándares internacionales y sus especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio se adecuó el trato digno y correcto de los animales para los ensayos experimentales.

6.6 Recolección de Datos

Cuantificación de proteínas en mg/ml por el método DC (*detergent compatible*) de BioRad. Se determinará la expresión presencia de la proteína la proteína de interés (eNOS) por Western blotting posterior a electrotransferencia (presencia de bandas con peso molecular de 133 kDa) por medio de inmunotinción con los anticuerpos anti-eNOS producidos por nosotros.

7 Resultados

7.1 Selección de péptido

Se obtuvo la figura 1 de hidrofiliidad/hidrofobicidad (IEDB Analysis Resource <http://tools.immuneepitope.org>) donde se representa en color amarillo aquellas secuencias cuya posición es externa (hidrofílica) con respecto a la estructura tridimensional global de NOS. Las áreas verdes corresponden a las secuencias internas (hidrofóbicas), determinado todo esto de acuerdo con la polaridad de los grupos laterales de los aa constituyentes.

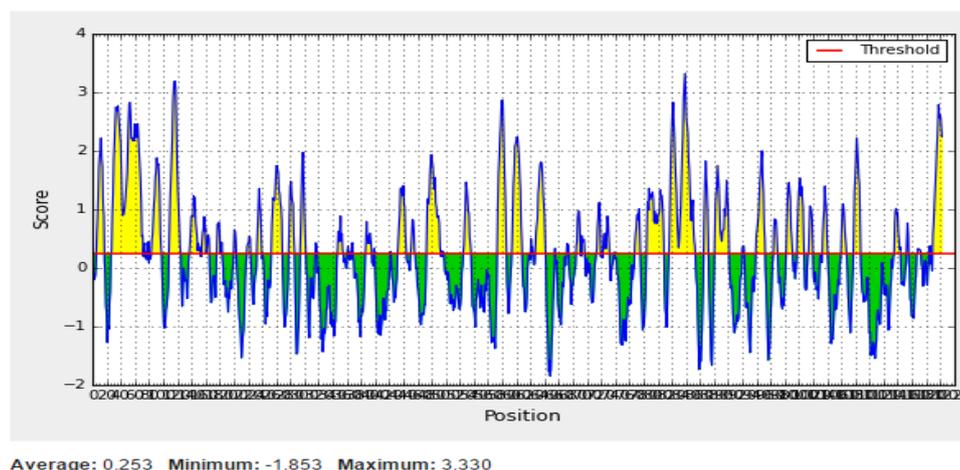


Figura 1. Posición de los péptidos de acuerdo a su probable hidrofiliidad / hidrofobicidad en la secuencia primaria de la proteína NOS3 (endotelial). Puntos superiores mayores a cero (color amarillo), corresponden a secuencias expuestas de la estructura 3D de la proteína. Los picos verdes con valores menores a cero, corresponden a las secuencias internas en la estructura 3D de la proteína. IEDB Analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org>)

Preliminarmente se seleccionaron 15 secuencias peptídicas diferentes (tabla 2). De estas se analizó la estructura química de los aminoácidos constituyentes con el objetivo de que no presentaran grupos laterales amino, sulfhidrilo o carboxilo que pudieran interferir con la reacción de conjugación por *crosslinking* con la proteína acarreadora o que condujeran a entrecruzamiento entre los aa presentes en la misma secuencia peptídica. Además de los criterios anteriores de especificidad de expresión y posición expuesta, se favoreció entonces optimizar la reacción de conjugación de los péptidos con la proteína acarreadora. Todo ello finalmente con el objetivo de promover el mayor reconocimiento antígeno-anticuerpo: eNOS – anti-eNOS de conejo.

Tabla 2. Selección preliminar de posibles péptidos eNOS inmunogénicos

No	inicio No	Fin No	Secuencia peptídica	Longitud (aa)
1	6	16	SVAQEPGPPCG	11
2	28	71	KQGPATPAPEPSRAPASLLPPAPEH SPPSSPLTQPPEGPKFPRV	44
5	84	96	LSAQAQQDGPCTP	13
6	109	124	LQGRPSPGPPAPEQLL	16
26	473	492	FRYQDPWKGSAAKGTGTR	20
29	594	608	SGPYNSSPRPEQHKS	15
32	627	641	RRKRKESNTDSAGA	15
40	785	809	TGGQEGLQYQPGDHIGVCPNRPGL	25
41	817	829	VEDPPAPTEPVAV	13
42	831	853	QLEKGSPGGPPPGWVRDPRLPPC	23
44*	881	901	<u>AEEPREQQELEALSQDPRRYE</u>	21
46	940	952	YSVSSAPSTHPGE	13
49	998	1007	SFRLPPDPSL	10
53	1078	1087	SREPDNPPTY	10
58*	1190	1203	<u>PWAFDPPGSDTNSP</u>	14

* Péptidos seleccionados: P44 y P58. Se subraya la secuencia de aminoácidos que se envió a sintetizar más un grupo cisteína en el extremo amino terminal.

La primera secuencia seleccionada fue P44 (Tabla 2), siendo su cadena peptídica:

E Q Q E L E A L S Q D P R R

ácido glutámico, glutamina, glutamina, ácido glutámico, leucina, ácido glutámico, alanina, leucina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, arginina y arginina

Esta secuencia se encuentra entre los aa 886-899 (figura 2) contando con características químicas adecuadas para realizar la conjugación. De la misma forma se encuentra en una posición externa de acuerdo a la polaridad de los aa constituyentes (figura 1) y hacia el exterior respecto a la forma tridimensional de la proteína (Figura 4).

Para el caso de la secuencia P58 (tabla 2), siendo su cadena peptídica:

P W A F D P P G S D T N S P

prolina, triptófano, alanina, fenilalanina, ácido aspártico, prolina, prolina, glicina, serina ácido aspártico, treonina, asparagina, serina y prolina

Esta secuencia abarca las posiciones de aminoácidos 1190–1203. A excepción del extremo amino terminal, no presentó en su estructura química ningún grupo lateral ϵ -amino (lisinas) ni α -amino que hubieran podido interferir en la reacción de conjugación con la proteína acarreadora BCP. Para dicha secuencia no hay modelo tridimensional disponible. De igual manera ninguna de las dos secuencias contó con cisteína por lo que este aa se adicionó en el extremo N-terminal de la cadena (Carter, 1994) para facilitar la reacción de síntesis con el entrecruzador químico (ver más adelante).

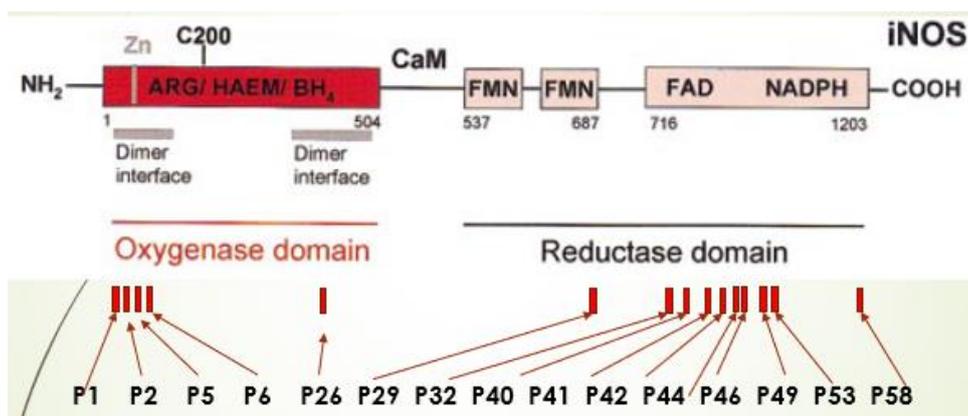


Figura 3. Posición de las posibles secuencias inmunogénicas en la estructura primaria de la proteína eNOS. Modificado de Alderton et al., 2001.

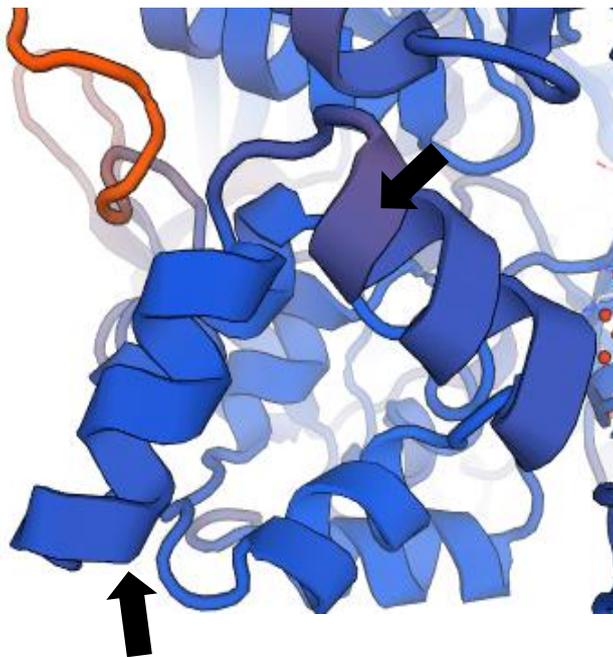


Figura 4. Modelo tridimensional de P44 con secuencia EQQELEALSQDPRR (aa 886-889) La flecha en la parte inferior izquierda señala el ácido glutámico (aa 886), y la flecha en la parte superior derecha indica la arginina final de la secuencia (aa 899). Modelo obtenido de SWISS MODEL.

7.2 Técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony

Por la prueba de Ouchterlony (Hornbeck, 2017) no se observó el precipitado característico correspondiente a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Esto debido muy probablemente al pequeño tamaño de los péptidos. Al contrario, el conjugado péptido-BCP es demasiado grande para poder lograr la difusión a través del gel y la formación del precipitado. Además de que muy probablemente la misma BCP generó antigenicidad y por lo tanto la banda de precipitado a observarse no necesariamente correspondería al péptido de interés.

7.3 Técnica de *Western Blotting*

Las pruebas correspondientes a los sueros con la dosis más baja de péptido (50 µg) correspondientes a P44, indicaron la presencia de manera tenue de la banda correspondiente a la proteína eNOS con un peso molecular de 133 kDa (Figura 5).

Se puede observar, que la identificación de proteínas con los segundos sueros inmunes obtenidos correspondientes al péptido P44 (figuras 5 y 7), se encuentran presentes bandas ligeramente por arriba del marcador con peso molecular de 130kDa correspondiente al peso molecular reportado para la isoforma eNOS. Esto es observado en las muestras de proteína de corazón, tejido en el que se esperaba encontrar la expresión de la enzima. Esta no se observa en la dosis menor de inmunización; tampoco es observable alguna otra banda entre un rango de 130-155 kDa que pudiera indicar el reconocimiento de otras isoformas de la enzima. Por otro lado, al analizar la figura 7 podemos observar que dentro del rango de estos pesos no aparecen bandas en la muestra de cerebro indicando que el anticuerpo producido contra P44 no reconoce la isoforma neuronal (nNOS). En el caso de la dosis alta y media puede observarse igual en cerebro, bandas con un peso molecular menor que hasta el momento permanecen sin identificar. En el caso de la muestra de hígado, se detectó de manera muy marcada, una banda la cual sólo es evidente para la dosis de 100 µg de inmunógeno (tabla 1).

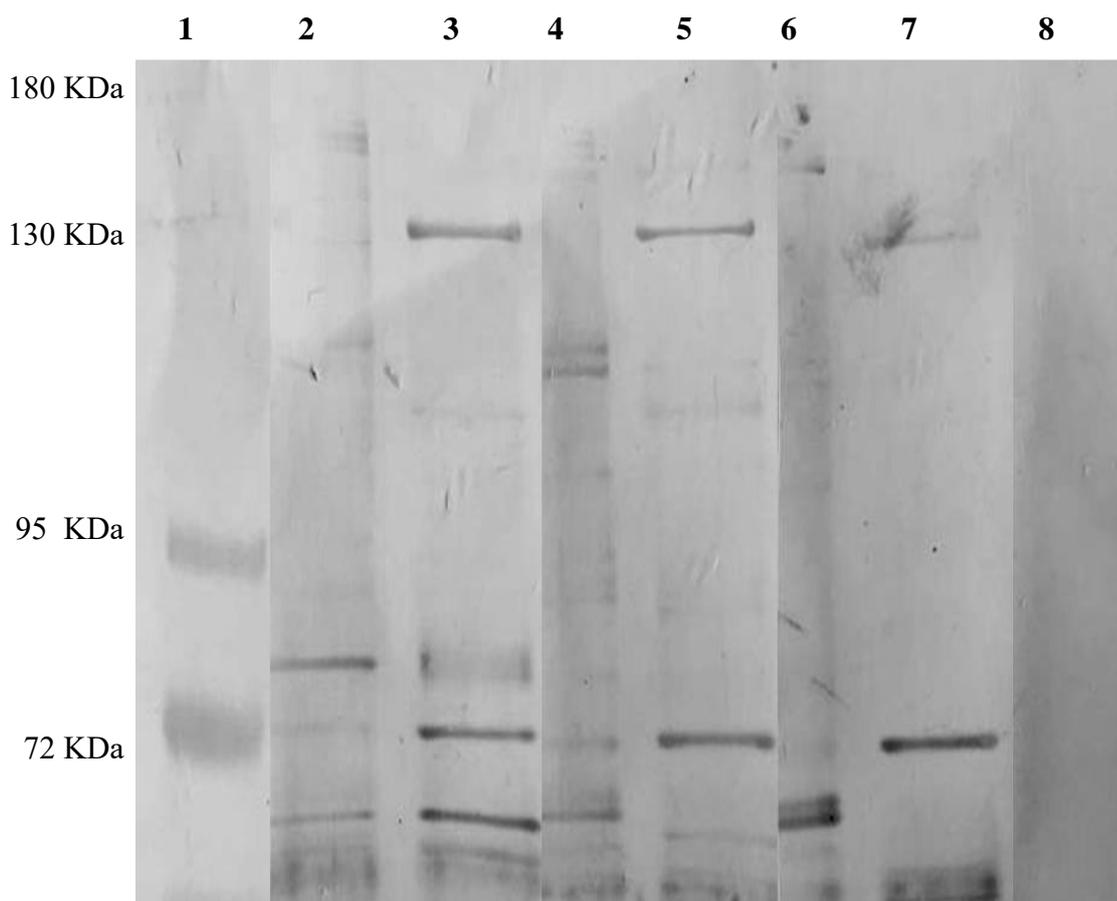


Figura 5. Western blot de eNOS de cerebro y corazón.

Inmunorreactividad primaria: tres sueros de conejo (20 μ g proteína por carril), segundo refuerzo con P44. Anticuerpo secundario de cabra-anticonejo ligado a peroxidasa, dilución 1:10000

1 marcadores de peso molecular,

2 cerebro, dosis de inmunización 300 μ g,

3 corazón dosis de inmunización 300 μ g,

4 cerebro, dosis de inmunización 100 μ g,

5 corazón, dosis de inmunización 100 μ g,

6 cerebro, dosis de inmunización 50 μ g,

7 corazón, dosis de inmunización 50 μ g,

8 control negativo proteína de tejido de corazón.

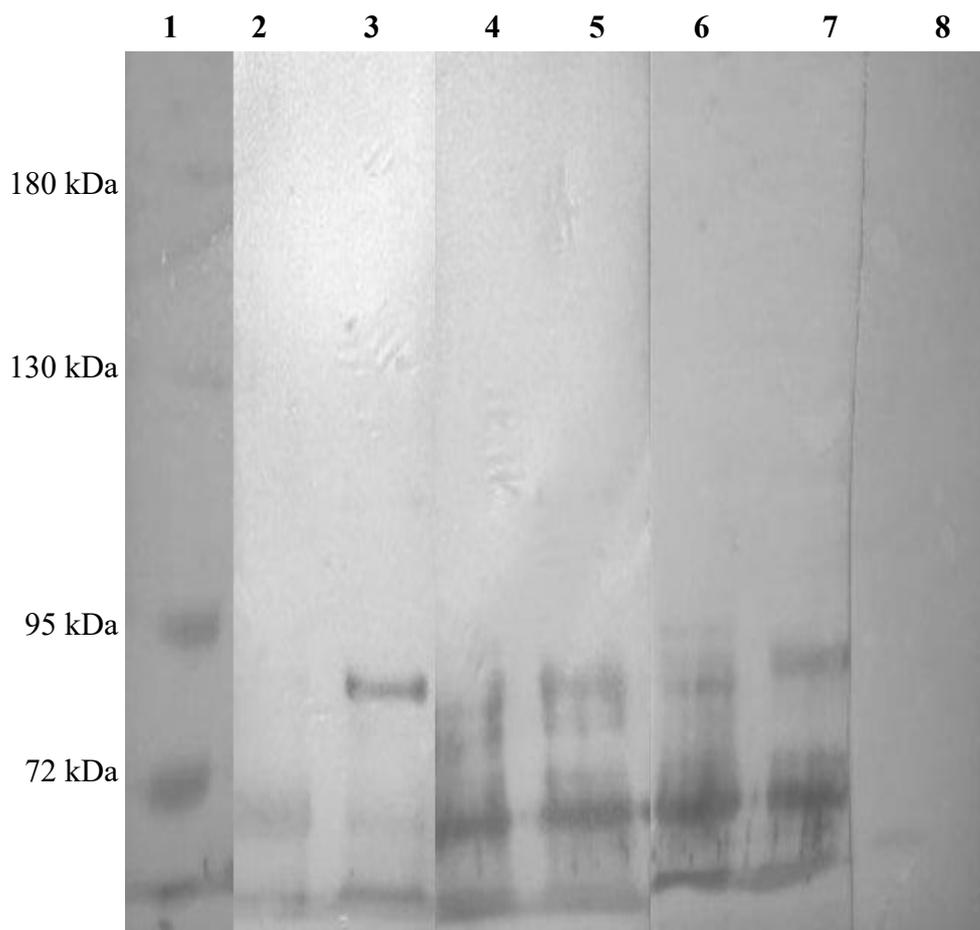


Figura 6. *Western blot* de cerebro y corazón (20 μ g de proteína por carril). Inmunorreactividad primaria: tres sueros de conejo correspondientes al segundo refuerzo con péptido P58. Anticuerpo secundario de cabra-anticonejo ligado a peroxidasa, dilución 1:10000.

- 1 marcadores de peso molecular,
- 2 cerebro, dosis de inmunización 300 μ g,
- 3 corazón dosis de inmunización 300 μ g,
- 4 cerebro, dosis de inmunización 100 μ g,
- 5 corazón, dosis de inmunización 100 μ g,
- 6 cerebro, dosis de inmunización 50 μ g,
- 7 corazón, dosis de inmunización 50 μ g,
- 8 control negativo proteína de tejido de corazón.

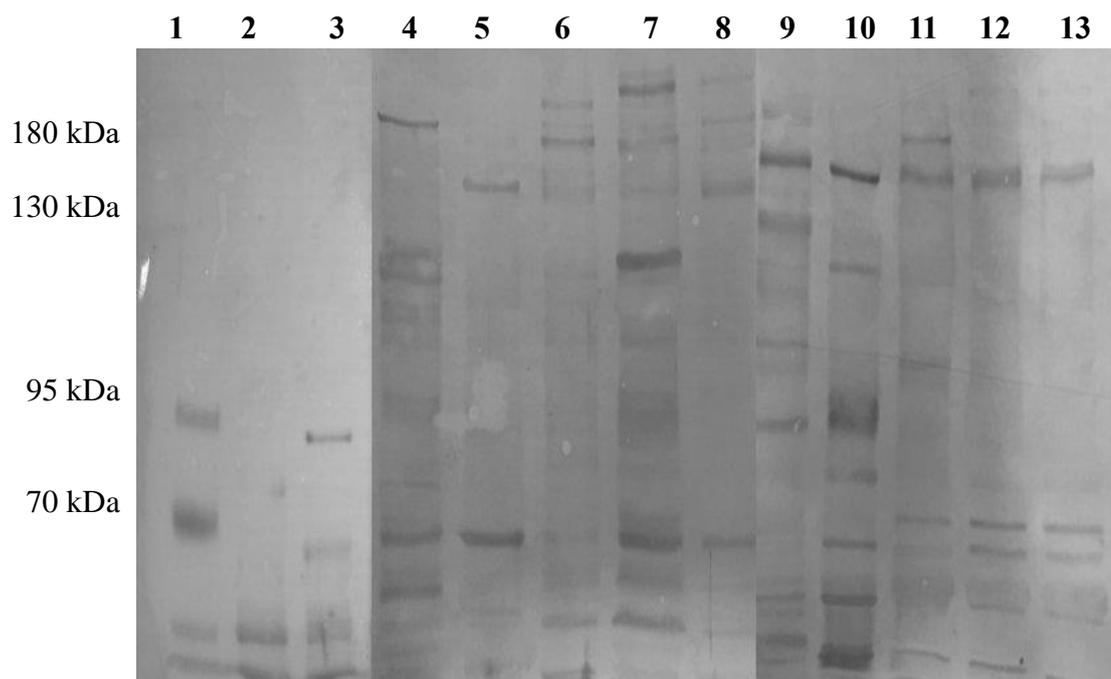


Figura 7. *Western blot* cerebro, corazón, pulmón, hígado y riñón (20 μ g de proteína por carril). Inmunorreactividad primaria: tres sueros de conejo correspondientes al tercer refuerzo con péptido P44. Anticuerpo secundario de cabra-anticonejo ligado a peroxidasa, dilución 1:10000.

- 1 marcadores de peso molecular,
- 2 cerebro, dosis de inmunización 50 μ g,
- 3 corazón dosis de inmunización 50 μ g,
- 4 cerebro, dosis de inmunización 100 μ g,
- 5 corazón, dosis de inmunización 100 μ g,
- 6 pulmón, dosis de inmunización 100 μ g,
- 7 hígado, dosis de inmunización 100 μ g,
- 8 riñón, dosis de inmunización 100
- 9 cerebro, dosis de inmunización 300 μ g,
- 10 corazón, dosis de inmunización 300 μ g,
- 11 pulmón, dosis de inmunización 300 μ g,
- 12 hígado, dosis de inmunización 300 μ g,
- 13 riñón, dosis de inmunización 300

En el caso de los sueros inmunes, correspondientes al péptido P58 no se observó ninguna inmunorreactividad en el rango de movilidad electroforética esperada, mayor a 130 kDa. Por ende, ninguna isoforma pudo ser detectada (Figura 6). Al no encontrarse reactividad con los antisueros correspondientes a P58 se continuó trabajando únicamente con P44. Importantemente el control negativo, *i.e.*, tira de PVDF la que sólo se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo, no presentó reactividad inespecífica alguna lo que es un elemento de alta confiabilidad de la especificidad del anticuerpo de conejo anti-P44 de eNOS. Por lo tanto la presencia de bandas se debe exclusivamente a la reactividad de los antisueros obtenidos.

7.4 Purificación de anticuerpos

De acuerdo a los resultados anteriores se trabajó exclusivamente con los sueros correspondientes a P44 ya que fue con dichos antisueros con los que de manera preliminar se identificó por *Western blotting* la banda correspondiente al peso molecular de eNOS. Se determinó cuantitativamente la cantidad de proteína (mg) obtenida por ml de suero de conejo correspondiente a cada anticuerpo purificado. Se cuantifico la cantidad de proteína por ml de suero de conejo obtenida por cada anticuerpo purificado. Para observar cómo se comportaba la cantidad de proteína presente en los sueros, producida por los conejos a través del tiempo.

7.5 Determinación de la cantidad de inmunoglobulina precipitada

En la figura 8 se muestra el Western blot correspondiente al anticuerpo purificado, P44, de la dosis más alta de inmunización (300 µg); así como el gráfico de la densidad que presentan las bandas correspondientes a la proteína eNOS. Se observa que el reconocimiento de la proteína decrece a partir del título 1:4000 del anticuerpo aunque sigue habiendo un buen reconocimiento a una dilución de 1:8000. Por otro lado, en la figura 9 se presenta la evaluación del anticuerpo, aunque esta vez utilizando un título fijo (1:4000) del mismo contra concentraciones crecientes de proteína de corazón por cada carril: 1, 3, 12.5, 25, 40 y 80 µg de proteína, respectivamente de izquierda a derecha. En ambos casos los valores de densitometría de los Western blots están dados en los números arbitrarios que el programa presenta (Imagej).

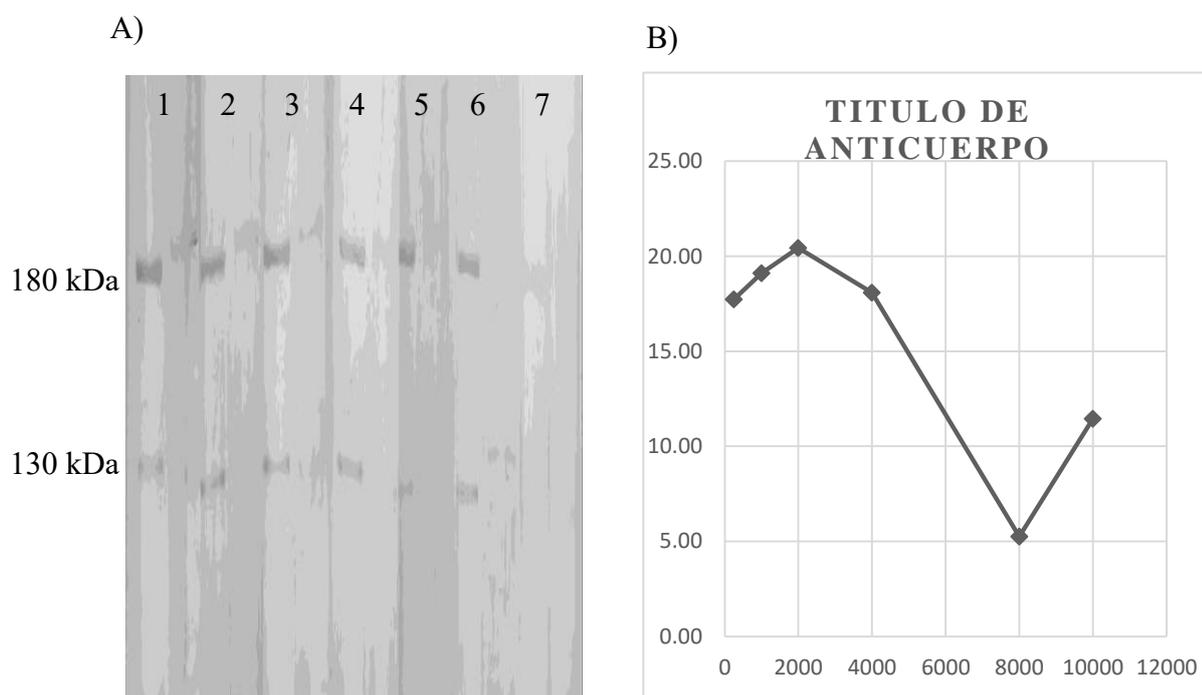


Figura 8.

A) Western blot de corazón y cerebro (20 μ g de proteína por carril). Utilizando como anticuerpo primario, anticuerpo de conejo purificado (P44), en diferentes títulos. Anticuerpo secundario cabra-anticonejo dilución 1:10000.

- 1) 1:250
- 2) 1:1000
- 3) 1:2000
- 4) 1:4000
- 5) 1:8000
- 6) 1:10000
- 7) control negativo

B) Densitometría de las bandas del Western blot. Unidades arbitrarias.

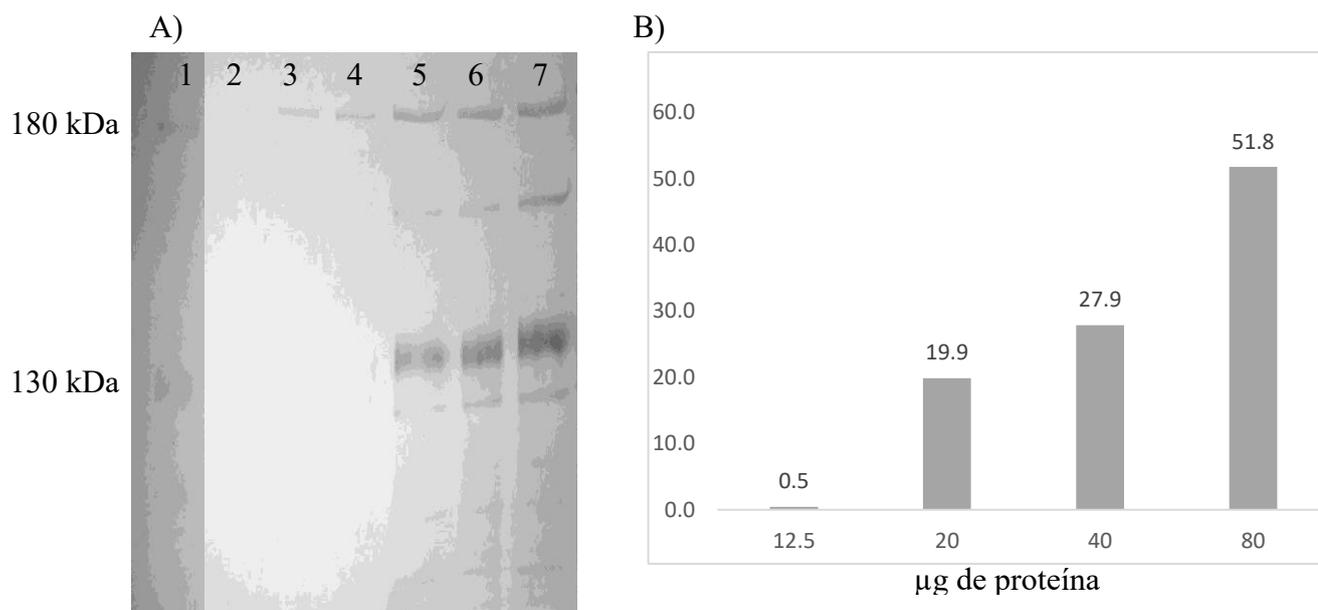


Figura 9.

A) Titulación del anticuerpo anti-eNOS (péptido P44; dilución 1:4000), Ig purificada conejo anti-peptido P44 eNOS. Diferentes cantidades de proteína (μg) de corazón de ratón.

- 1) marcadores de peso molecular
- 2) 1.0 μg
- 3) 3.0 μg
- 4) 12.5 μg
- 5) 25.0 μg
- 6) 40.0 μg
- 7) 80.0 μg

B) Densitometría de las bandas del *Western blot*. Unidades arbitrarias.

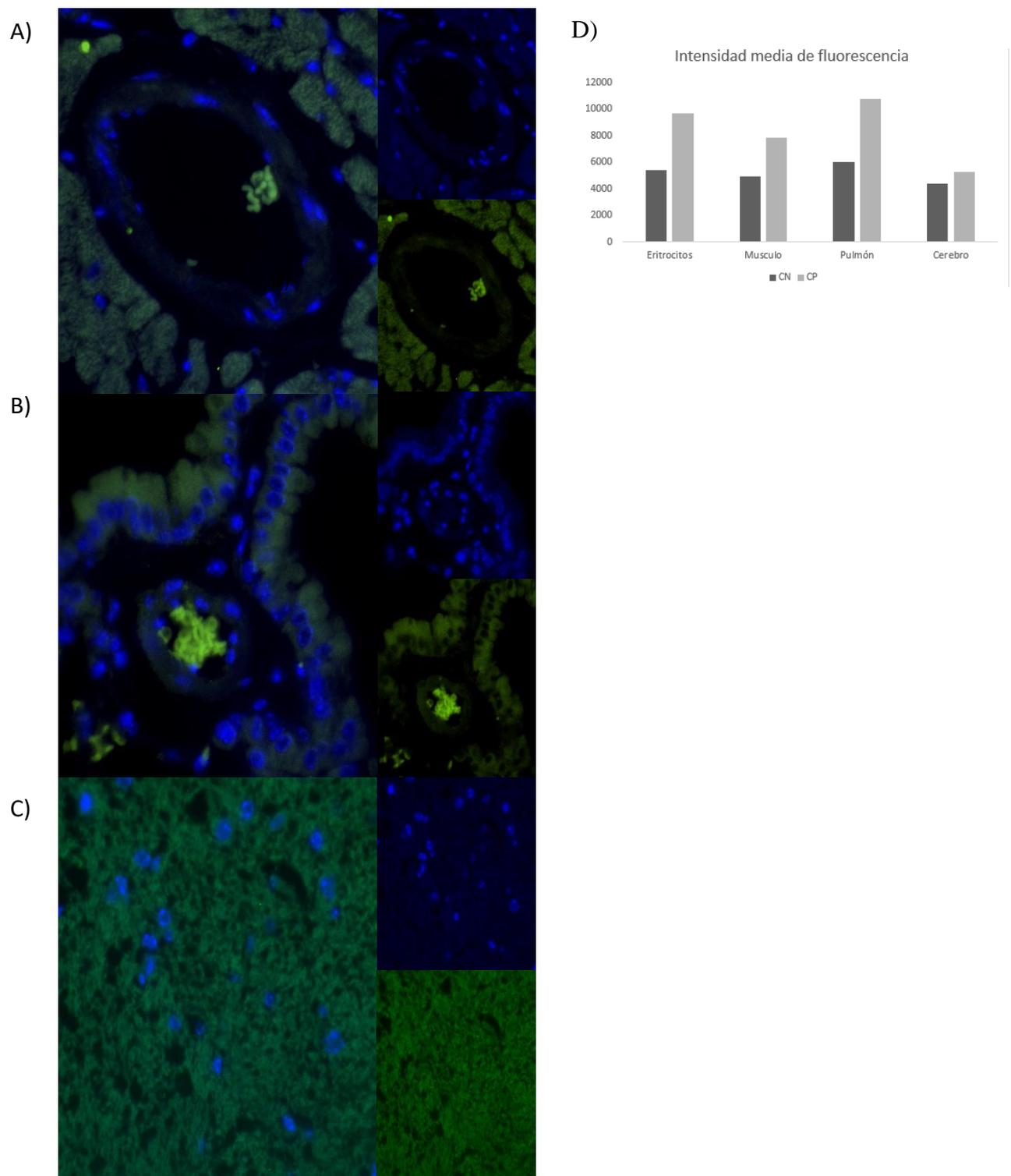


Figura 10. Inmunofluorescencia con el anticuerpo contra P44 marcado con anticuerpo secundario y fluorocromo FITC (verde), y DAPI (azul) para marcar núcleos. A) corazón, B) pulmón y C) cerebro. D) intensidad media de fluorescencia. El grosor de los cortes fue de 5 μ m. La dilución para los anticuerpos, primario y secundario, fue de 1:50.

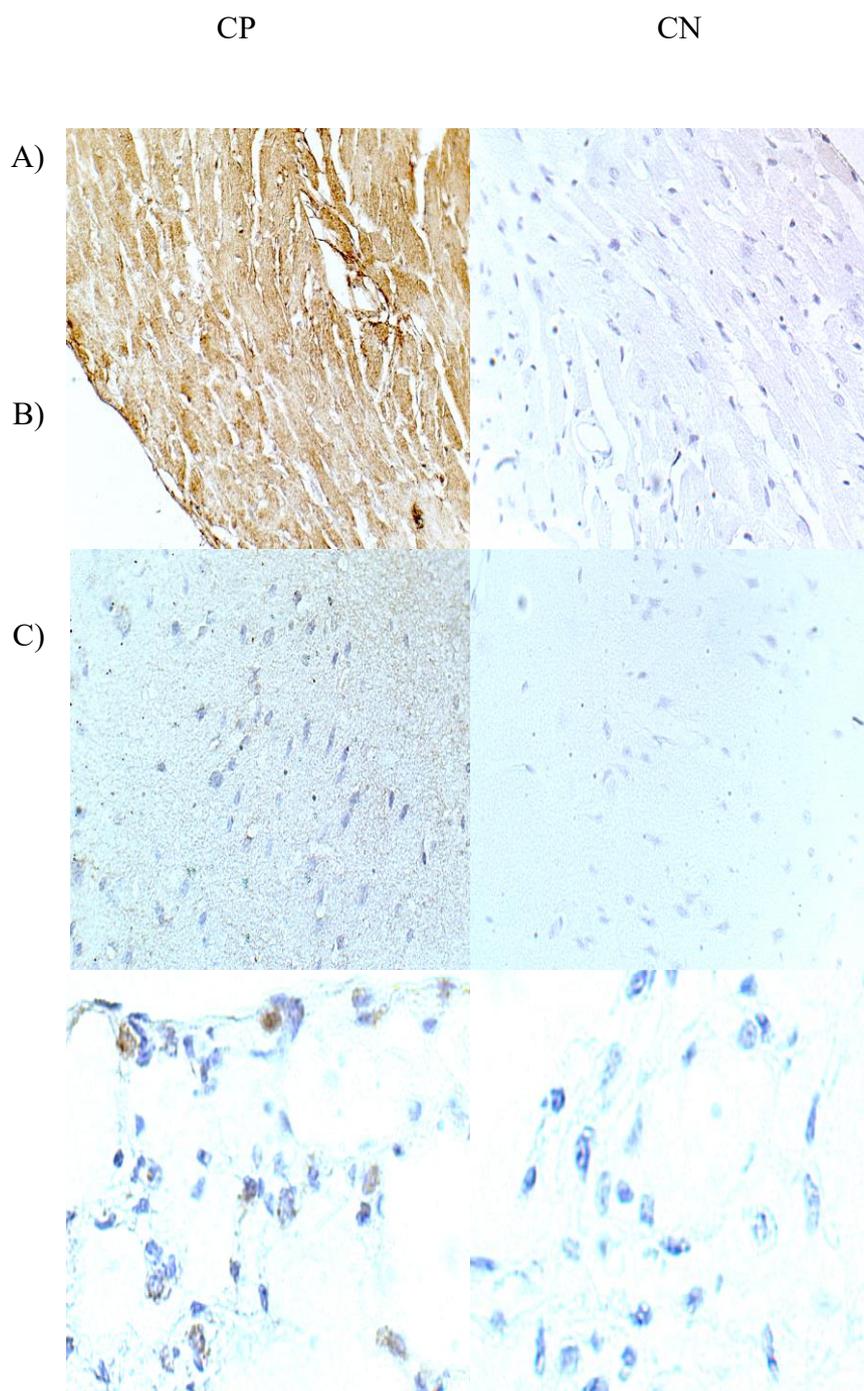


Figura 11. Inmunohistoquímica. En el lado izquierdo (CP), se presentan las pruebas utilizando como anticuerpo primario, nuestros anticuerpos correspondientes a P44, siendo A) ventrículo de corazón, B) cerebro y C) pulmón. Del lado derecho (CN), se presenta el control negativo de los mismos tejidos utilizando únicamente anticuerpo secundario.

7.6 Inmunofluorescencia

Los anticuerpos también fueron probados por inmunocitoquímica con la técnica de inmunofluorescencia. Esto se hizo con el objetivo de determinar la especificidad del anticuerpo en cuanto a la expresión de eNOS en tejidos en los que se ha reportado su expresión y por el contrario, la no reactividad en tejidos donde no se espera que la proteína se exprese. Se evaluaron tres tejidos diferentes donde es posible encontrar las 3 diferentes isoformas de la NOS, corazón para eNOS, pulmón para iNOS y cerebro para nNOS y en estos dos últimos se espera la expresión de eNOS únicamente en las paredes del endotelio vascular. Como se puede observar en la figura 10, pudo identificar la presencia de la eNOS en cortes de tejido de corazón, del mismo modo no presentó reactividad cruzada para las demás isoformas. Por otro lado, se logró detectar la isoforma endotelial presente en eritrocitos. Se realizó el análisis de la intensidad media de fluorescencia, comparando control negativo (solo Ab secundario) con las muestras tratadas con nuestros anticuerpos (P44), para realizar la diferencia entre una señal positiva y la señal dada por autofluorescencia del propio tejido.

7.7 Inmunohistoquímica

Se probaron los mismos tejidos que en la técnica de inmunofluorescencia (ver arriba), en donde es posible ver resultados semejantes a los obtenidos con inmunofluorescencia, para el tejido de corazón es posible detectar la presencia de la isoforma eNOS, y no se observa reactividad cruzada en tejido de pulmón (figura 11). En el caso de cerebro es posible ver una ligera coloración café, característica de la respuesta positiva a la técnica, dicha reactividad puede ser dada por dos diferentes motivos 1) reactividad cruzada con la otra isoforma constitutiva nNOS, o 2) la reacción positiva es dada por la presencia de vascularidad en el tejido. Para los tres casos el control negativo no presenta reactividad inespecífica por parte del anticuerpo secundario.

8. Discusión

8.1 Péptidos

Se estableció que la utilización de softwares libres son una herramienta adecuada para el diseño de secuencias peptídicas inmunogénicas. Siendo herramientas sencillas de usar, de libre acceso al público y que no generan ningún costo. Asimismo, para nuestro caso, determinamos las condiciones para poder producir nuestros propios anticuerpos dirigidos hacia la eNOS. Los cuales no presentaron reactividad cruzada con las otras isoformas de la proteína (nNOS e iNOS).

De acuerdo con Coers et al., 1998, los anticuerpos producidos por Transduction Laboratories (Lexington, KY), arrojaron mejores resultados al ser utilizados en la identificación de la enzima óxido nítrico sintetasa, en comparación con otras marcas comerciales al identificar la banda con peso molecular de 140 KD. Reportan que la secuencia que reconocen se encuentra entre los aacs 1030–1203 al haber utilizado un antígeno de 20 kD hacia el extremo COOH-terminal en una dilución de 1:50. Es en dicha sección de la secuencia que encontramos P58. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados los anticuerpos producidos contra P44 presentaron mejores resultados en comparación con P58. En nuestro caso los anticuerpos producidos contra este antígeno no identificaron la proteína con peso molecular de nuestro interés.

Múltiples factores pueden afectar el resultado. Por ejemplo, la presencia de una secuencia que pueda ser reconocida como un epitopo altamente conservado y que no genere inmunogenicidad (Hancock y O'Reilly, 2005). Otras dos posibilidades son la conformación tridimensional del péptido sintetizado la cual no necesariamente corresponde a la conformación presente en la proteína nativa o desnaturalizada (SDS-PAGE y Western blotting). Igualmente, el grado de exposición y la orientación en la proteína nativa pueden variar con respecto a la que presenta la proteína acarreadora. En nuestro caso, BCP (Harris y Markl, 1999). Estos factores, además de la propia respuesta inmunológica de los animales experimentales pueden modificar la capacidad de respuesta en la producción de buenos anticuerpos experimentales que reconozcan tanto los epitopos deseados como aquellos de la proteína de interés. Se tuvo sumo cuidado en cuanto a los criterios de selección de los péptidos: exclusividad de expresión (Clustal omega), que fueran hidrofílicos (Thomas et al., 1981) y expuestos al exterior de la molécula en su conformación nativa de acuerdo con los datos de modelado estructural (SWISS-MODEL).

Entonces, una de las razones por las que no se genere una buena conjugación con el hapteno puede resultar de diferencias estructurales entre la proteína acarreadora y eNOS, incluso generadas éstas en las reacciones de entrecruzamiento. Se ha reportado que una relación adecuada hapteno-proteína es importante para producir anticuerpos con mejor título de acción y mayor especificidad, una mayor sustitución desencadena una mayor respuesta IgM que IgG disminuyendo la afinidad (Singh et al., 2004 y Rajesh et al., 2013).

La presencia de 5 aminoácidos básicos en secuencia los vuelve buenos antígenos (Poland et al., 1990). Teniendo en cuenta que las secuencias seleccionadas se encuentran altamente conservadas en eNOS de mamíferos (Protein BLAST) nuestros anticuerpos tendrían la capacidad de

identificar la enzima en diversas especies, incluyendo muestras de tejido humano. Esto está por comprobarse experimentalmente y es el tema de un trabajo independiente. Por otra parte, al ser policlonales los anticuerpos purificados de los sueros, esto da cuenta de una mezcla de Igs con la capacidad de reconocer múltiples epitopos, sobre todo aquellos de BCP. Por lo tanto la fracción de anticuerpos de nuestro interés muy posiblemente sea un porcentaje menor. Para remover los anticuerpos no deseados podría utilizarse la misma BCP como adsorbente e inmunoprecipitar así la Ig ajena para quedarnos con los elementos específicamente producidos contra P44 de eNOS.

8.2 Detección de la isoforma eNOS

Cada organismo vivo puede generar una respuesta inmunitaria diferente, lo que puede existir una gran variedad de respuestas que puede ser producida hacia un inmunógeno, lo que genera la necesidad de producir diferentes esquemas de inmunización y utilizar antígenos alternativos. Reducir la concentración de inmunógeno administrada a conejos y colocados estos a intervalos mayores entre inmunizaciones, puede aumentar la sensibilidad de los anticuerpos producidos (Cooper et al., 2004). Sin embargo, los sueros correspondientes a la segunda inmunización del péptido P44 (figura 2), donde se observa una mejor respuesta para la identificar una banda de proteína en un peso molecular mayor a 130 kDa, se da en el suero que corresponde a la dosis más alta (300µg). Hay que notar el hecho de que con las dos dosis más bajas también se logra vislumbrar esta banda, aunque con menor intensidad. En cuanto a P58, la respuesta es la misma para las tres dosis, siendo identificada una banda solo muy ligeramente con un peso entre 100-150 kDa para la muestra de corazón. Se demuestra en el caso de la dosis más baja de P58 se identifica una banda de mejor manera para las muestras de cerebro corazón e incluso pulmón.

Los linfocitos con receptores de mayor afinidad se unirán a una mayor cantidad de antígeno lo que producirá mayor afinidad. De esta manera la disminución de antígeno en circulación aumenta la afinidad. Igualmente, mayores tiempos entre cada administración mejoran la afinidad de anticuerpos. Así como existen clonas de linfocitos B dominantes en circulación, también se presenta la existencia de clonas que pueden generar reactividad cruzada. Este perfil de reactividad cruzada de un antisuero puede cambiar con el tiempo y con el sujeto donante del suero. Se ha informado que en un periodo de 6 semanas se presenta mayor reactividad cruzada, disminuyendo ésta posterior a 6 meses (Cooper et al., 2004). Muy probablemente por estas razones se observan diferentes patrones de bandas en cada uno de los Western blots.

La vida media de los anticuerpos en el suero de los animales es importante para lograr obtener una mayor cantidad de estos. Peppard y Orlands (1980), demostraron que las inmunoglobulinas tipo IgG1 e IgG2 son las que presentan mayor vida media. Es IgG2 la que presenta una vida media más larga. Los conejos por sus características inmunológicas producen principalmente IgG1. En esta especie el aclaramiento sistémico de dicha inmunoglobulina es mayor por lo que los anticuerpos obtenidos de conejo son menos y con la posibilidad de reacción cruzada mayor.

8. Conclusiones

El péptido P44 resultó el más indicado en la producción de anticuerpos que identificaran la proteína con peso molecular de 133 KDa, correspondiente a la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintetasa. Asimismo, fue la dosis mayor de inmunogéno, 300 µg, la más adecuada en la elaboración de anticuerpos vs. eNOS. El título máximo y óptimo de los anticuerpos purificados para su utilización en Western blotting fue de 1:4000 con la posibilidad de utilizar también 1:8000. Esta última dilución asimismo permitiría la reducción en el reconocimiento de bandas espurias. Para su uso se pudo reconocer una proteína en el mismo rango de movilidad electroforética la que presenta la enzima de interés en extractos proteicos de tejido de corazón. La cantidad mínima fue reconocida en un total de 12.5 µg de proteína de dicho extracto. Dichos anticuerpos han sido útiles para trabajar con la técnica de Western blotting. En cuanto a inmunocitoquímica por reacción con peroxidasa, el uso de los anticuerpos sintetizados, son óptimos para su uso. Por inmunofluorescencia los resultados hasta ahora son prometedores y estamos trabajando en la reducción de la fluorescencia de fondo para resaltar la señal positiva del fondo.

9. Referencias Bibliográficas

- Acosta M, Roux K, Teuber S y Sathe S. (1999). Production and Characterization of Rabbit Polyclonal Antibodies to Almond (*Prunus dulcis* L.) Major Storage Protein. *J Agric Food Chem.* Vol 47, 4053-4059.
- Alderton, W, Cooper C y Knowles, RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615 (Printed in Great Britain).
- Bartel, A. and Campbell, D. (1959). *Arch. Biochem. Biophys.*
- Beekman, N., Schaaper, W., Langeveld, J., Boshuizen, R y Meloen R. (2001). The nature of the bond between peptide and carrier molecule determines the immunogenicity of the construct. *Journal Peptide Res.* pp: 237-245.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27, 343-350 (2011).
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., Schwede, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* 7 (2017).
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42, W252-W258 (2014).
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acids Res.* 45, D313-D319 (2017).
- Bradley A, Punihaole D y Barry t. (2012). Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology*, Vol 122, 55-68.
- Coers, W., Timens, W., Kempinga, C., Klok, P.A., y Moshage, H. (1998). Specificity of Antibodies to Nitric Oxide Synthase Isoforms in Human, Guinea Pig, Rat, and Mouse Tissues. *The Journal of Histochemistry y Cytochemistry*, Vol.46: pp. 1385-1391.
- Cooper K, Caddell A, Elliott C y Kennedy DG. (2004). Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivate of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurans furazolidone. *Analytica Chimica Acta.* Vol 520, 79-86.
- Corsete-Krott M y Kelm M. (2014). Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: Key to a new erythrocrine function? *Redox Biology* Vol 2, 251-258.
- Corsete-Krott M, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle G, Thaisan S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heib C, Kröncke K, Hogg N, Feelisch M y Kelm M. (2012). Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Vol 120*, 4229-4237.
- Fischman T, Hruza A, Da X, Fossetta J, Lunn C, Dolphin E, Prongay A, reichert P, Lundell D, Narula S y Weber P. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature structural biology.* Vol 6, 233-242.
- GeneCards, Human Gene Database, consultado el 7/11/2016, disponible en: <http://www.genecards.org/>
- Guex, N., Peitsch, M.C., Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis* 30, S162-S173 (2009).

- Hancock, D.C. y O'Reilly, N.J. (2005). Synthetic Peptides as Antigens for Antibody Production. *Methods in Molecular Biology*, vol. 295: Immunochemical Protocols, Third Edition. Edited by: R. Burns © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Hanley C, Artwohl J y Bennett T. (1995). Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR journal*. Vol 37, 93-118.
- Harris, JR y Markl J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. Vol 30, pp:597-623.
- HOPP, T.P., y WOODS K.R. (1981). *Proc. Nati. Acad. Sci. USA, Immunology*, Vol. 78: pp. 3824-3828.
- Hornbeck, P. (2017). Double-Immunodiffusion Assay for UNIT 2.3 Detecting Specific Antibodies (Ouchterlony). *Current Protocols in Immunology*.
- IEDB Analysis Resource, consultado el 7/11/2016, disponible en: <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>
- Jubelin B y Gierman J. (1996). Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *American Journal of Hypertension*. Vol 9, 1214-1219.
- Kang E, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang T y Acchiard S. (2000). *J Lab Clin Med*. Vol 135, 444-451.
- Kim S. (2014). The nitric oxide-mediated regulation of prostaglandin signaling in medicine. *Vitamins and Hormones*, Elsevier, Vol 96, 211-245.
- Kindt T, Goldsby R y Osborne R. (2007). *Inmunología de Kuby*. Ed 6°. Mc Graw Hill.
- Kleinbongar P, Schulz R, Rassaf T, Laurer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Özüyaman B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber A, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P y Kelm M. (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *The American Society of Hematology*. Vol 14, 2943-2951.
- Lemus, R. y Karol, M. *Methods in Molecular Medicine: Allergy Methods and Protocols* Edited by: M. G. Jones and P. Lympany © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Liddell JE. (2003). Antibody purification by ammonium sulfate precipitation. *Encyclopedia of life sciences*.
- Mariam SHS, Ooi CW, Janna OA, Arbakariya A y Tey BT. (2015). Purification of rabbit immunoglobulin G with ammonium sulfate precipitation and mixed-mode chromatography. *Separation and purification technology*. Vol 144, 133-138.
- Marletta M. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 17, 12231-1234.
- Marletta M. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. Vol 78, 927-930.
- NCBI, Constraint-based multiple alignment tool, consultado 7/11/2016, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>.
- Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. (2009). *Fundamentos de inmunología básica y clínica*. Ed Universidad de Talca.
- Peppard, J y Orlands, E. (1980). The biological half-lives of four rat immunoglobulin isotypes. *Immunology*. Vol 40, 683-686.
- Poland, A; Glover E y Bradfield. (1990). Characterization of Polyclonal Antibodies to the Ah Receptor Prepared by Immunization with a Synthetic Peptide Hapten. *Molecular Pharmacology*. Vol 39, 20-26.

- Rajesh, K; Rana, KV y Suri CR. (2013). Characterization of Hapten–Protein Conjugates: Antibody Generation and Immunoassay Development for Pesticides Monitoring. *BioNanoScience*. Vol 3, 137-144.
- Raman, C, Li H, Martásek P, Král V, Masters y Poulos T. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*. Vol 95, 939-950.
- Rychter, Marek., Gaucher, Caroline., Boudier, Ariane., Leroy, Pierre., y Lulek, Janina., S-nitrosothiols – NO donors regulating cardiovascular cell proliferation: insight into intracellular pathway alterations. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.003>.
- Singh, KV; Kaur J; Varshney, GC; Raje, M y Suri, R. (2004). Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chem*. Vol 15, 168-173.
- Webb A, Milson A, Rathod K, Chu W, Qureshi S, Lovell M, Lecomte F, Perrett D, Raimondo C, Khoshbin E, Ahmed Z, Uppal R, Benjamin N, Hoobs A y Ahluwalia A. (2010). Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and eNOS. *Circulation research*. Vol 103, 957-964.
- Yang J, Gonon A, Sjöquist P, Lundberg J y Pernow J. (2013). Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *PNAS*. Vol 110, 15049-15054.
- Yutkanis Bruce, P. (2008). *Química Orgánica*. PERASON, Prentice Hall. 5edición.

10. Anexos

Soluciones utilizadas

Buffer de Corrida 1X

25 mM Tris

190 mM glicina

0.1% SDS

Disolver 14.3 g de glicina, 3.035 g de trizma base, 1 g de SDS en agua desionizada y aforar a 1000 mL sin ajustar pH. Para preparar la solución de corrida 1x (SDS 0.1% en Tris-Glicina pH 8.3); diluir 1:5 la solución 5x, ajustando el pH de la solución 1x a un pH 8.3 y aforar.

Acrilamida 30%/bis acrilamida 0.8%

La acrilamida monomérica es neurotóxica, se debe usar guantes y mascarilla para su manipulación. En un volumen de 100 mL de agua desionizada mezclar 30 g de acrilamida, 0.8 g de N, N'-metilen-bis-acrilamida. Para conservar la solución se debe colocar en frasco de vidrio color ámbar. La mezcla permanece estable por 30 días, ya que la acrilamida se hidroliza a ácido acrílico y amoníaco.

Solución Tris-HCl/SDS pH 6.8

Se mezcla 6.05 g de trizma/base en 40 mL de agua desionizada ajustar pH a 6.8 con HCl 1 N, adicionar 0.4 g de SDS. Aforar a 100 mL con agua desionizada.

Solución Trizma-base pH 8.8

Mezclar 18.2 g de Trizma-base en 40 mL de agua desionizada ajustar pH a 8.8 con HCl 1 N y adicionar 0.4g de SDS. Aforar a 100 mL.

Conservar a una temperatura no mayor a 4°C las soluciones.

Buffer salino tris (TBS)

50 mM Tris -Cl pH:7.5

150 mM NaCl

Pesar 6.05 g de Tris y 8.76 g de NaCl, disolver en 800 mL de H₂O destilada. Ajustar pH a 7.5 con HCl y aforar a un litro.

*TBS-T preparar TBS y adicionar tween 20 al 0.1%

TBS 10/10 (Ab)

10 mM Tris -Cl pH:7.5

10 mM NaCl

Pesar 1.21 g de Tris y 0.584 g de NaCl, disolver en 800 mL de H₂O destilada. Ajustar pH a 7.5 con HCl y aforar a un litro.

Buffer transferencia 1X

48 mM Tris

39 mM glicina

20% metanol

0.04% SDS

Tris 5.81g, glicina 2.93 g

Buffer de lisis NP

150 mM NaCl

1.0% NP-40 (o triton X-100 0.1%)

50 mM Tris-HCl; pH: 8.0

Inhibidor de proteasas

Solución de recuperación antigénica (EDTA)

EDTA 0.5 mMolar

Aforar a un litro de PBS