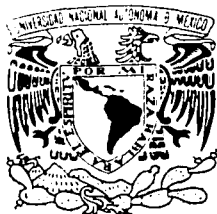


00322

114



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Diseño, implementación y aplicación de una estrategia experimental para generar anticuerpos monoespecíficos contra la forma estructural α -amidada del aminoácido valina: su empleo potencial para clonar nuevos péptidos bioactivos del sistema nervioso de mamíferos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:
MAYRA MEDÉCIGO RÍOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. BENIGNO ANTONIO GARCÍA



Facultad de Ciencias



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.



SECRETA
NACIONAL
AZORES
MEXICO

TESIS CON
FAVORABLE

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Diseño, implementación y aplicación de una estrategia experimental para generar anticuerpos monoespecíficos contra la forma estructural α -amidada del aminoácido valina: su empleo potencial para clonar nuevos péptidos bioactivos del sistema nervioso de mamíferos.

realizado por Mayra Medécigo Ríos

con número de cuenta 9333862-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Benito Antón Palma

Propietario

Dr. Alejandro Alagón

Propietario

Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera

Suplente

M. en I.B.B. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Suplente

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS



M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

b

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría bajo la dirección del Dr. Benito Antón Palma.

Con el apoyo de CONACYT (proyecto 28887 N).

DEDICATORIA

A mis padres y hermana, por su cariño y el apoyo que siempre me han brindado.

A mis amigos: Jorge, Juan, Luis, Carlos, René, Claudia, Javier, Abraham, Rocío, Alfredo, Oscar, Itzel y a todos los que se me hayan olvidado, por todos los momentos que compartimos.

A Miguel y a mi familia (en especial a mi tía Marcela), con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Psiquiatría por las facilidades otorgadas para la realización de mi servicio social y tesis de licenciatura.

A CONACYT por el financiamiento de este proyecto (28887 N), del cual recibí una beca para la realización de mi tesis de licenciatura.

A mis compañeros de laboratorio, que me apoyaron en la realización de este trabajo, gracias a Juan Carlos, Philippe y Armando.

A mi asesor por participar en mi proceso de aprendizaje.

A los miembros del jurado les agradezco la revisión y sus valiosos comentarios de este trabajo.

... muchas gracias, Mayra

e

**DISEÑO, IMPLEMENTACIÓN Y APLICACIÓN DE UNA ESTRATEGIA
EXPERIMENTAL PARA GENERAR ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS
CONTRA LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DEL AMINOÁCIDO
VALINA: SU EMPLEO POTENCIAL PARA CLONAR NUEVOS PÉPTIDOS
BIOACTIVOS DEL SISTEMA NERVIOSO DE MAMÍFEROS.**

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
A) IMPORTANCIA DE LOS MENSAJEROS QUÍMICOS DE NATURALEZA PEPTÍDICA	2
B) LA SUBFAMILIA DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS α -AMIDADOS Y SU SÍNTESIS	3
C) RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA PRESENCIA DEL GRUPO α -AMIDA EN LA ESTRUCTURA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	6
D) ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES COMÚNMENTE EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS α -AMIDADOS	8
E) LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES, SU APLICACIÓN Y UTILIDAD EXPERIMENTALES	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	13
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO EXPERIMENTAL	14
V. OBJETIVOS DE TRABAJO EXPERIMENTAL	15
GENERAL	15
PARTICULARES	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
1) GENERACIÓN DE ANIMALES HIPERINMUNES A LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DEL AMINOÁCIDO VALINA	16
a) <i>Generación de un conjugado inmunogénico de la valina α-amida</i>	<i>16</i>
b) <i>Síntesis de péptidos en fase sólida, empleados como antígenos de adsorción, para los ensayos inmunoenzimáticos de ELISA por captura de anticuerpo, para la identificación de ratones hiperinmunes a la valina α-amidada</i>	<i>16</i>
c) <i>Esquema de inmunización de animales contra la valina α-amidada</i>	<i>17</i>
d) <i>Identificación inmunológica de animales hiperinmunes contra la valina α- amidada a través de un ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo</i>	<i>18</i>

2) GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DE LA VALINA.....	19
1) CULTIVO DE MIELOMAS.....	19
3) PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS	22
a) Preparación de células de mieloma para la fusión.....	22
b) Generación y expansión de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales, que reconozcan como epítopo inmunogénico a la forma estructural α -amidada de la valina.....	22
c) Ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo, para la identificación de sobrenadantes de hibridomas, que producen anticuerpos que reconocen a la valina α -amidada como epítopo inmunogénico	24
d) Preservación de hibridomas productivos: congelación y descongelación.....	25
4) CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA RECONOCER A LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DE LA VALINA.....	26
a) Ensayo inmunoenzimático por captura de anticuerpo (ELISA), de sobrenadantes de hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales que reconocen a la valina α -amidada como epítopo inmunogénico.....	26
b) Ensayo de validación adicional de la especificidad de los anticuerpos monoclonales, contra la forma estructural α -amidada de valina, mediante un ensayo de inmunodot-blot.....	28
c) Radioinmunoensayo en fase sólida para la identificación y cuantificación de material inmunoreactivo a la valina α -amidada	29
VII. RESULTADOS	34
1) IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES VACUNADOS ACTIVAMENTE CONTRA LA VALINA α -AMIDADA, CON RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL CONTRA ESTE AMINOÁCIDO, POR MEDIO DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELISA POR CAPTURA DE ANTICUERPO	34
2) GENERACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTIVOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DE LA VALINA	36
3) CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES P15A4, P17C11 Y P18C5 CONTRA LA VALINA α -AMIDADA, A TRAVÉS DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELISA POR CAPTURA DE ANTICUERPO	39
4) CARACTERIZACIÓN COMPLEMENTARIA DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES P15A4, P17C11 Y P18C5 CONTRA LA VALINA α -AMIDADA A TRAVÉS DE UN ENSAYO INMUNOLÓGICO DE INMUNODOT-BLOT	46
5) EMPLEO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL P18C5 CONTRA LA VALINA α -AMIDADA PARA ESTANDARIZAR UN RADIOINMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA (RIA), CAPAZ DE IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR MATERIAL INMUNOREACTIVO A ESTE AMINOÁCIDO α -AMIDADO, PRESENTE EN SECUENCIAS PEPTÍDICAS SINTÉTICAS DISEÑADAS EN EL LABORATORIO, ASÍ COMO EN NEUROPEPTIDOS BIOACTIVOS.....	51
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	53

1) GENERACIÓN DE CONJUGADOS CON ALTA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA DE LA VALINA α -AMIDADA	53
2) GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTIVOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA VALINA α -AMIDADA.....	54
3) COMPROBACIÓN ULTERIOR DE LA CAPACIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES P15A4, P17C11 Y P18C5, EN EL RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO POR COMPLEMENTARIEDAD ANTIGÉNICA HACIA LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DEL AMINOÁCIDO VALINA	55
4) EMPLEO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL P18C5, ESPECÍFICO PARA LA VALINA α -AMIDADA, PARA ESTANDARIZAR Y VALIDAR UN RADIOINMUNOENSAYO (RIA), CON CAPACIDAD PARA IDENTIFICAR Y CUANTIFICAR CON ALTA SENSIBILIDAD DE DETECCIÓN, MATERIAL INMUNOREACTIVO A ESTE AMINOÁCIDO α -AMIDADO CODIFICADO EN SECUENCIAS PEPTÍDICAS	58
IX. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABAJO.....	60
X. LITERATURA CONSULTADA.....	61

PAGINACIÓN DISCONTINUA

I. RESUMEN

La superfamilia de los péptidos bioactivos está conformada por más de 300 sustancias. La diversidad de las funciones modulatorias que ellas ejercen es también muy amplia. Casi la mitad de los péptidos bioactivos, presentan la característica estructural común de la α -amidación del último aminoácido del extremo carboxilo terminal. Con base en los estudios del mapeo del genoma humano, se postula la existencia de un número significativo de miembros peptídicos α -amidados nuevos. Sin embargo, no existen todavía estrategias experimentales que en forma específica y dirigida permitan la identificación, aislamiento y caracterización estructural de este número importante de péptidos bioactivos α -amidados. El presente trabajo de tesis experimental, se centró en la generación de anticuerpos monoclonales específicos para reconocer la forma estructural α -amidada del aminoácido valina. Este aminoácido amidado, se encuentra codificado en el extremo carboxilo terminal de solamente tres péptidos bioactivos, llamados α -MSH, metorfinamida y secretina. Así, la aportación de este trabajo experimental, es la generación y validación de un reactivo inmunológico, para la aplicación de una estrategia inmunocromatográfica para identificar, aislar y caracterizar la estructura de nuevas sustancias peptídicas que codifiquen este aminoácido α -amidado.

II. INTRODUCCIÓN

a) Importancia de los mensajeros químicos de naturaleza peptídica

En invertebrados y vertebrados existen diferentes superfamilias de moléculas con función transmisora, neuromoduladora y hormonal de naturaleza peptídica, con múltiples funciones. Por un lado, podemos mencionar como ejemplos representativos de péptidos α -amidados, que modulan importantemente la excitabilidad neuronal a la sustancia P, la metorfinamida, la secretina, la deltorfina, la colecistocinina, el VIP, las cromograninas, el TRH, la amidorfina, las endomorfina (1-2) y el neuropéptido Y (Eipper *et al.*, 1992). Por otro lado, como ejemplos representativos de algunas de las hormonas polipeptídicas α -amidadas, que regulan la fisiología de estructuras neuroendócrinas en el sistema nervioso, así como de glándulas de secreción hormonal periféricas, son la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la gastrina, la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), la insulina B22-35 y B21-26, la oxitocina y vasopresina, el factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RH), la hormona adipocinética, la hormona concentradora de melanina en roedores (neuropéptido EI), la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), el péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa, el factor inhibidor de la hormona de crecimiento (GH-RH), la calcitonina y la familia de polipéptidos pancreáticos y la del glucagón (Eipper *et al.*, 1992). Resulta interesante hacer notar que han sido clonadas diversas toxinas peptídicas α -amidadas a partir de extractos del veneno de algunos insectos, crustáceos y reptiles. Como ejemplos representativos de estas toxinas peptídicas, podemos mencionar a la familia de las conotoxinas, la toxina II del escorpión y la melitina (Eipper *et al.*, 1992).

A pesar del conocimiento de la acción de algunos péptidos y del esfuerzo en la investigación de éstos, incluyendo estudios con antagonistas, ha sido difícil el

definir un papel exacto para muchas de estas moléculas en el funcionamiento del sistema nervioso.

Una gran cantidad de métodos han sido empleados para el estudio funcional de la familia de péptidos bioactivos, incluyendo a los péptidos α -amidados. Ejemplos de estas metodologías incluyen al radioinmunoensayo, la inmunohistoquímica, la electrofisiología, la biología molecular y la inmunología. Recientemente la biología molecular ha tenido un fuerte impacto y con la ayuda de diversos procedimientos de métodos de recombinación y secuenciación del ADN (Young, 1990), ha hecho posible la clonación de un número cada vez más creciente de sustancias péptídicas y de sus receptores.

b) La subfamilia de los péptidos bioactivos α -amidados y su síntesis

Un gran número de mensajeros químicos, con funciones moduladoras sobre la actividad nerviosa, neuroendócrina y hormonal sobre múltiples tejidos de vertebrados e invertebrados son de naturaleza peptídica. En la actualidad, conocemos más de 300 sustancias de naturaleza peptídica con funciones bioactivas (GEN BANK) y resulta sorprendente el hallazgo estructural, de que casi la mitad de ellas presentan una modificación estructural postraduccional, que es la α -amidación del último aminoácido del extremo carboxilo terminal (Eipper *et al.*, 1992). En general, estas sustancias son codificadas y procesadas postraduccionalmente, por enzimas específicas a partir de precursores protéicos de alto peso molecular (Manis *et al.*, 1990; Eipper *et al.*, 1992). Ejemplos de estas enzimas procesadoras peptídicas son las endopeptidasas, que cortan y escinden péptidos de precursores protéicos a nivel de secuencias de pares de aminoácidos básicos; exopeptidasas, las cuales remueven residuos de aminoácidos del extremo amino y/o carboxilo terminal de péptidos escindidos de su precursor y, enzimas de modificación química postraduccional tales como α -amidadas, acetiltransferasas, glicosilasas y fosforilasas. La

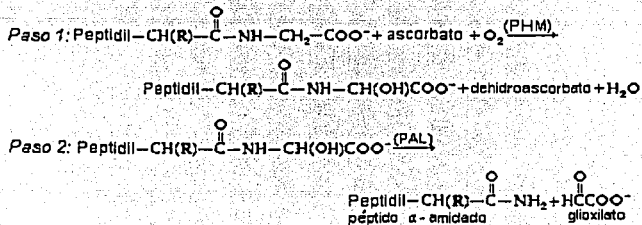
Introducción

modificación química postraducciona, que se encuentra presente en casi la mitad de la población de todos los péptidos bioactivos conocidos en la actualidad, es la amidación del grupo carboxilo del átomo de carbono alfa del aminoácido del extremo carboxilo terminal. Así, este grupo de mensajeros peptídicos presentan un grupo α -amida no ionizable (-CONH₂), en lugar de un grupo ácido carboxílico libre ionizable (-COOH \leftrightarrow COO⁻), en el último aminoácido de su extremo carboxilo terminal. La monooxigenasa α -amidante del sustrato peptídilglicina es la enzima responsable de la reacción de la α -amidación de mensajeros peptídicos, referida comúnmente como PAM (Eipper *et al.*, 1992 y 1993). Bradbury y colaboradores (1982) fueron los primeros en reportar la existencia de una actividad enzimática, con capacidad para llevar a cabo la α -amidación de neuropéptidos, a partir de homogenados hipofisarios. A partir de este trabajo inicial, diversos grupos de investigación generaron un gran número de evidencias experimentales, que hicieron posible un mejor conocimiento acerca de la naturaleza de los mecanismos involucrados en las reacciones enzimáticas de α -amidación de péptidos bioactivos, así como también de la identificación y la caracterización molecular de la enzima responsable de esta modificación postraducciona peptídica en el tejido nervioso y endócrino, de especies como el humano (Glauder *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1990), bovino (Murthy *et al.*, 1986), roedor (Noguchi *et al.*, 1989), anfibio (Mizuno *et al.*, 1986) y moluscos como la *Aplysia californica* (Bradbury y Smyth, 1991; Eipper *et al.*, 1992 y 1993; Boudreault *et al.*, 1996).

La producción de un péptido bioactivo α -amidado, por la acción de la PAM, depende de una serie de reacciones enzimáticas previas sobre el precursor (ver abajo el esquema de reacciones bioquímicas). Todo péptido bioactivo, deberá primero ser escindido de su proteína precursora por el corte enzimático endoproteolítico, a nivel de secuencias de pares de aminoácidos básicos presentes en la secuencia del precursor, en los flancos amino y carboxilo

Introducción

terminal del péptido bioactivo. Posteriormente, la acción de la enzima carboxipeptidasa B, removerá el aminoácido básico localizado en el extremo carboxilo terminal del péptido escindido, el cual presentará subsiguientemente un residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal. Este residuo servirá como señal de reconocimiento, sobre el cual se iniciará la reacción de α -amidación catalizada por la PAM. Esta enzima es capaz de convertir al péptido inactivo con el residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal, en un péptido bioactivo maduro α -amidado, mediante un proceso catalítico de dos etapas. En la primera etapa, demostrada inicialmente por Bradbury y Smyth (1988), la actividad α -hidroxilante de la PAM convierte al intermediario peptídico inactivo con el residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal, en un intermediario peptidil- α -hidroxiglicina, en presencia de cobre, ascorbato y oxígeno molecular. La actividad catalítica dealquilante de la PAM convertirá el residuo α -hidroxiglicina del intermediario, en glioxilato, dando finalmente origen al grupo peptidil- α -amida en el extremo carboxilo terminal del péptido bioactivo maduro. Las dos etapas en la reacción de amidación son las siguientes:



c) Relevancia funcional de la presencia del grupo α -amida en la estructura de péptidos bioactivos

Los estudios de caracterización estructural del genoma de mamíferos, como el roedor y el humano, postulan la existencia de un número aproximado de 26 000 a 35 000 genes funcionales, de los cuales al menos un 1% de ellos pudiesen codificar proteínas precursoras de péptidos bioactivos (Venter *et al.*, 2001). Esto hace posible postular la existencia todavía de un número significativo de péptidos bioactivos, que se tienen que identificar desde el punto de vista estructural y funcional. Del número de péptidos bioactivos conocidos a la fecha actual (≈ 300), casi la mitad tienen la característica de estar α -amidados en el último aminoácido del extremo carboxilo terminal. Si se postula que la población de estas sustancias peptídicas conocidas es estadísticamente representativa de la población total de la superfamilia de péptidos bioactivos que están codificados en el genoma de los mamíferos, entonces podemos plantear la hipótesis de que dentro de la población de nuevas moléculas peptídicas que esperan ser descubiertas, casi un 50% deberán de codificar un aminoácido α -amidado en su extremo carboxilo terminal.

Tamburini y colaboradores (1990), investigaron la capacidad catalítica amidativa de la PAM sobre una serie de sustratos peptídicos sintéticos, del tipo N-dansil-(Gli)₄-X-Gli (X= cualquier aminoácido esencial). Los resultados de estos experimentos mostraron no tener la actividad amidante de la PAM, sobre el sustrato peptídico con el aminoácido aspártico en la posición X. La ausencia de la actividad amidante de la PAM sobre este aminoácido también parece ser manifiesta *in vivo* en el tejido nervioso y endócrino de vertebrados e invertebrados. La deltorfina, un péptido opioide de mamíferos, sería el único péptido bioactivo potencialmente existente a nivel tisular que presentaría dicho aminoácido α -amidado en el átomo de carbono alfa de su extremo carboxilo-terminal. Sin embargo, la existencia de este péptido amidado no ha podido ser

confirmada en extractos de tejido nervioso y endócrino y solo ha sido propuesta por Richter y colaboradores (1987), con base en la secuencia de nucleótidos del ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc), que potencialmente codifica a su molécula protéica precursora.

Dentro de la familia de mensajeros peptídicos amidados clonados a la fecha, una gran proporción de estas sustancias presentan a los aminoácidos fenilalanina (Fen), glicina (Gli), leucina (Leu), tirosina (Tir), metionina (Met), isoleucina (Ile) y triptofano (Tri) como residuos terminales α -amidados (Eipper *et al.*, 1992).

Por lo menos la mitad de todos los mensajeros peptídicos ya clonados en el sistema nervioso y endócrino, tanto de vertebrados como de invertebrados, presentan la modificación química de la α -amidación (Eipper *et al.*, 1992). Así, dada esta gran proporción de péptidos bioactivos α -amidados, diversos grupos de investigación han estudiado el significado funcional que esta modificación estructural confiere a este importante y numeroso grupo de moléculas peptídicas. Así, se ha encontrado que esta modificación estructural es esencial, tanto para la expresión correcta de la actividad biológica, como para el aumento de la estabilidad y la vida media biológica de estas sustancias, una vez que son escindidas enzimáticamente de sus moléculas precursoras (Barchas *et al.*, 1987; Eipper *et al.*, 1992; Lew y Smith, 1996; Boudreaull *et al.*, 1996). Con relación a la actividad biológica, se puede mencionar como ejemplo representativo la presencia del grupo α -amida en la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y en la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), la cual es requerida para la unión de alta afinidad de estos dos péptidos a sus receptores, para la expresión de la actividad biológica de ambos péptidos en la hipófisis de mamíferos y sus acciones conductuales en todo el animal (DeSouza y Kuhar, 1986; Harvey, 1990; Tazi *et al.*, 1987; Vale *et al.*, 1981). En contraste, ninguno de los intermediarios peptídicos CRH-Gli y TRH-Gli, normalmente encontrados en el tejido endócrino de esta glándula, así como tampoco las formas

Introducción

estructurales de ácido carboxílico libre terminal de la CRH-OH y TRH-OH (normalmente no presentes en este tejido), muestran las características de unión de alta afinidad y la capacidad de actividad biológica reportadas para sus contrapartes peptídicas α -amidadas. En cuanto a la estabilidad peptídica, cabe mencionar que la presencia del grupo peptidil α -amida, lleva hacia una mayor resistencia de péptidos α -amidados, a la acción degradativa de enzimas del tipo de las carboxipeptidasas (v.g.r. B), que normalmente degradan e inactivan péptidos bioactivos no amidados, a través de su extremo carboxilo-terminal, una vez que las sustancias peptídicas son liberadas en los sitios celulares de acción biológica (v.g.r. espacio sináptico en el sistema nervioso) (Barchas *et al.*, 1987; Eipper *et al.*, 1992; Lew y Smith, 1996; Boudreaull *et al.*, 1996).

d) Estrategias experimentales comúnmente empleadas para la identificación molecular de péptidos bioactivos α -amidados

En función de la predicción de un importante número adicional de sustancias peptídicas bioactivas α -amidadas, así como a la posibilidad de identificar nuevas funciones de este grupo adicional de péptidos, diversas estrategias metodológicas se han diseñado y empleado en el campo de trabajo experimental dirigido hacia la búsqueda sistemática de nuevos mensajeros peptídicos α -amidados (Barchas *et al.*, 1987). Una de las estrategias más exitosas, se ha basado en una metodología bioquímica para lograr la identificación, aislamiento y caracterización molecular de material peptídico biológico con el grupo α -amida (Tatemoto y Mult, 1978; Tatemoto y Mult, 1981; Tatemoto, 1982 a. b; Tatemoto *et al.*, 1983; Tatemoto *et al.*, 1984). Esta estrategia se basa en el empleo de un método químico, donde una porción del extremo carboxilo-terminal del péptido, es cortada enzimáticamente y convertida a un derivado dansilado fluorescente, el cual es purificado e

Introducción

identificado subsecuentemente por procedimientos cromatográficos. Por ejemplo, la búsqueda sistemática de nuevos péptidos amidados, por el grupo de Tatemoto y colaboradores, dió como resultado el aislamiento y la caracterización estructural del neuropéptido Y (NPY), el péptido H1 (PH1), la galanina y la colecistocinina-58 (CCK-58) (Barchas *et al.*, 1987), todas ellas, sustancias peptídicas amidadas con importantes acciones hormonales y/o neuroactivas. A pesar de estos logros experimentales, esta estrategia experimental es poco empleada en la actualidad para abordar trabajo experimental dirigido al aislamiento de nuevos mensajeros peptídicos α -amidados. Esto se debe fundamentalmente, a que la familia de estas sustancias peptídicas es ya muy numerosa y cada vez más creciente en la actualidad, factores que aumentan el costo económico y el tiempo de trabajo para lograr la identificación y el aislamiento de nuevos péptidos amidados, con una metodología que no tiene la capacidad de discriminar diferencias estructurales, a nivel del tipo de aminoácido α -amidado y de la secuencia primaria entre especies de péptidos amidados ya clonados, con la de nuevos miembros peptídicos amidados por identificar. No obstante, esta metodología tiene la ventaja de identificar péptidos α -amidados sin el previo conocimiento de su actividad biológica.

Otro enfoque experimental exitoso en la búsqueda y aislamiento de nuevas sustancias peptídicas amidadas, se ha basado en el empleo de técnicas moleculares (Barchas *et al.*, 1987). La mayoría de las moléculas precursoras proteicas contienen codificada la secuencia de múltiples mensajeros peptídicos que, a menudo, exhiben diferentes actividades biológicas. En general, el procesamiento enzimático postraduccional de precursores protéicos, sigue una serie de reglas bien definidas, ya mencionadas con anterioridad, lo que permite identificar las secuencias de péptidos potencialmente bioactivos. Así, una vez que se ha aislado y caracterizado la estructura molecular de un ADNc, que codifica para un precursor de mensajeros peptídicos, es factible identificar y

Introducción

deducir, mediante el análisis de su secuencia nucleotídica, la estructura primaria de aminoácidos potencialmente representativa de un péptido α -amidado. El desarrollo de metodologías de síntesis de péptidos en fase sólida, ha hecho posible que se puedan sintetizar secuencias de péptidos α -amidados, cuya estructura primaria ha sido deducida a partir de su molécula precursora. En esta forma, es factible emplear péptidos sintéticos como haptenos antigénicos en procedimientos de inmunización, para la generación de anticuerpos que reconozcan epítopes inmunogénicos localizados en distintos dominios de la secuencia primaria del péptido antigénico. Estos anticuerpos pueden así, emplearse en distintos procedimientos inmunológicos, cromatográficos y de secuenciación peptídica, para comprobar la existencia tisular y para identificar y caracterizar la estructura del péptido α -amidado endógeno, responsable de la inmunoreactividad en el tejido. El aislamiento y caracterización molecular del neuropéptido amidorfina (Seizinger *et al.*, 1985), se puede citar como un ejemplo representativo, donde este acercamiento metodológico funcionó para el aislamiento de un neuropéptido α -amidado. La combinación de este tipo de metodologías moleculares y bioquímicas ofrecen, por regla general, la posibilidad de identificar la presencia, así como lograr el aislamiento tisular y la caracterización molecular final de un péptido amidado, cuya secuencia de aminoácidos fue deducida inicialmente a partir de la secuencia codificada en el ADNc de su molécula precursora. Sin embargo, como es obvio de deducir, la principal desventaja radica en el hecho de que el hallazgo experimental, que justifica el abordaje al trabajo de identificación y aislamiento molecular de un nuevo mensajero peptídico α -amidado, depende del aislamiento y conocimiento previo de la estructura del ADNc que codifica la secuencia primaria de dicha sustancia peptídica. Desafortunadamente, este último hallazgo experimental ocurre en la mayoría de los casos, como un factor serendípico y no como resultado de una estrategia experimental sistemática dirigida a la búsqueda selectiva de nuevas moléculas peptídicas α -amidadas.

e) Los anticuerpos monoclonales, su aplicación y utilidad experimentales

Un anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina capaz de reconocer un solo epítoto inmunogénico en un antígeno, la cual es sintetizada por una única clona celular de linfocito B (Roitt, 1998). Así, el grupo de anticuerpos monoclonales sintetizados por una sola clona de linfocito B maduro, desde el punto de vista estructural, tienen sitios idénticos de fijación antigénica en sus sitios de complementariedad antigénica de las cadenas hipervariables, lo cual confiere la capacidad de exhibir, desde el punto de vista funcional inmunológico, idéntica especificidad, selectividad, avidéz y afinidad en el reconocimiento inmunológico del mismo epítoto estructural inmunogénico de un solo antígeno.

Desde el punto de vista experimental, los anticuerpos monoclonales se producen por la fusión de un linfocito B activado, capaz de sintetizar una inmunoglobulina contra un epítoto inmunogénico determinado y, de un tipo de célula de una línea celular cancerígena de linfocitos B, que puede cultivarse y reproducirse rápida y fácilmente, pero que no tiene la capacidad de sintetizar inmunoglobulinas funcionales (Goding, 1996). Estas líneas celulares cancerígenas son los mielomas, usualmente inmortalizadas a partir de roedores (rata y ratón), aunque se dispone de algunas de origen humano y se obtienen en casas comerciales específicas. Los linfocitos B activados, son extraídos y purificados a partir del tejido linforetico (el bazo), de animales de laboratorio (usualmente ratones) inmunizados en forma activa, contra una serie de epítopes inmunogénicos de un antígeno. Cuando el proceso de fusión es completo, las células hijas se conocen como "hibridomas", es decir, células híbridas que han heredado algunas características genotípicas y fenotípicas importantes de ambos progenitores: inmortalidad de la célula de mieloma y capacidad de producir anticuerpos funcionales con especificidad definida de la célula B activada de un animal vacunado (Goding, 1996).

Introducción

Las aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son tan variadas y tan útiles como lo permita la imaginación. Tan sólo se necesita una molécula que tenga que ser reconocida y, que sea capaz de provocar una respuesta inmune de tipo humoral. Por lo tanto, las aplicaciones se extienden a muchas áreas de la biología y la medicina, así como a la industria biotecnológica. Por ejemplo, podemos emplear a los anticuerpos monoclonales en el diagnóstico de virus, bacterias y parásitos patógenos, simplificando enormemente su búsqueda e identificación en muestras de origen clínico (Campbell, 1991). Los anticuerpos monoclonales también son útiles para la identificación de antígenos marcadores de superficie celular de linfocitos y tumores, auxiliando las técnicas de imagen para la detección de tumores y su tratamiento (Campbell, 1991; Blakey *et al.*, 1995; Bischof y Delaloye, 1995). Otra aplicación de los anticuerpos monoclonales, es en la terapéutica de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, a través de protocolos experimentales de inmunización pasiva (Campbell, 1991; Casadevall, 1996; Harris, 1995; Ostberg, 1995; Boleti *et al.*, 1995; Cosimi, 1995; Alegre *et al.*, 1995). Los anticuerpos monoclonales también son herramientas biológicas de utilidad estratégica única para diseñar, desarrollar y aplicar diversas metodologías de identificación, aislamiento, purificación, caracterización estructural y funcional de productos y moléculas en las áreas médica y biológica (Campbell, 1991). En el diagnóstico forense, los anticuerpos monoclonales sirven para la detección de aditivos no declarados en bebidas y alimentos, así como en la búsqueda de cantidades traza de drogas ilícitas en la clínica toxicológica adictiva (Campbell, 1991).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Como ya se mencionó con anterioridad, existe un número significativo de nuevas sustancias peptídicas bioactivas α -amidadas, que esperan ser identificadas y caracterizadas a nivel estructural y funcional en los mamíferos, incluyendo al humano. El logro experimental de identificar y caracterizar nuevas funciones para nuevos transmisores peptídicos en mamíferos, incluyendo al humano, nos pondría en posibilidad de entender mejor la fisiología del señalamiento celular peptídico y así estar también en posibilidad de diseñar y mejorar la terapéutica, en condiciones de patología transmisora peptídica. Tomando como punto de referencia las ventajas y limitaciones de las metodologías clásicas antes descritas, que se han empleado para clonar péptidos bioactivos α -amidados, es claro deducir que se necesitan nuevos abordajes experimentales, que en forma sistemática y dirigida, permitan la identificación, aislamiento y caracterización estructural de este tipo de sustancias peptídicas. Estos nuevos abordajes experimentales requieren de la generación y validación de herramientas biológicas novedosas de experimentación. En este contexto, el presente proyecto muestra la generación y validación de anticuerpos monoclonales, contra la forma estructural α -amidada del aminoácido valina, los cuales servirán de base como reactivo biológico, en estudios futuros, para clonar y caracterizar funciones de posibles nuevos péptidos bioactivos que codifiquen a este aminoácido amidado.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO EXPERIMENTAL

La subfamilia de péptidos transmisores α -amidados en el último aminoácido del extremo carboxilo terminal, forma casi el 50% de todos los miembros peptídicos transmisores conocidos a la fecha actual. Los estudios del mapeo del genoma humano, hacen posible postular la existencia de un número adicional significativo de nuevos péptidos bioactivos α -amidados. Al momento actual, existen solo tres péptidos bioactivos, que son sintetizados a partir de tres distintos precursores protéicos, los cuales codifican la α -amidación en el aminoácido valina. El presente proyecto se centró en la generación y validación de anticuerpos monoclonales, con la capacidad de reconocimiento inmunológico específico, para la forma estructural α -amidada del aminoácido valina. Una vez obtenido este logro experimental, estos anticuerpos serán el reactivo biológico crítico para desarrollar y aplicar ulteriormente en el laboratorio, una estrategia experimental inmunocromatográfica, que permitiría lograr en forma selectiva, dirigida y sistemática, la identificación, aislamiento y caracterización molecular de nuevos péptidos bioactivos que presenten este aminoácido α -amidado en su extremo carboxilo terminal.

V. OBJETIVOS DE TRABAJO EXPERIMENTAL

GENERAL

Generación y validación de la especificidad de anticuerpos monoclonales, con capacidad funcional de reconocimiento inmunológico, por complementariedad antigénica específica, a la forma estructural α -amidada del aminoácido valina, presente en la secuencia primaria de péptidos.

PARTICULARES

- Diseño, síntesis y purificación de una preparación inmunogénica de la valina α -amidada.
- Síntesis de secuencias peptídicas, para emplearse como antígenos de adsorción, para los ensayos inmunoenzimáticos de identificación de animales hiperinmunes a la valina α -amidada.
- Inmunización activa e identificación inmunológica de animales hiperinmunes a la valina α -amidada.
- Diseño de un ensayo inmunoenzimático por captura de anticuerpo, para la identificación de sobrenadantes de hibridomas que reconocen a la valina α -amidada.
- Generación y expansión de hibridomas, capaces de sintetizar y secretar anticuerpos monoclonales a la valina α -amidada.
- Caracterización de la especificidad de los anticuerpos monoespecíficos para la valina α -amidada, mediante ensayos inmunoenzimáticos por captura de anticuerpo (ELISA) e inmunodot-blot.
- Empleo de los anticuerpos monoclonales anti-valina α -amidada para desarrollar un radioinmunoensayo en fase sólida, para cuantificar material peptídico inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1) GENERACIÓN DE ANIMALES HIPERINMUNES A LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DEL AMINOÁCIDO VALINA

a) Generación de un conjugado inmunogénico de la valina α -amida

Se empleó como hapteno la forma libre α -amidada del aminoácido valina (Sigma), que fue conjugada covalentemente con una proteína acarreadora (los detalles del procedimiento se omiten por razones de trámite de registro de patente del conjugado). El inmunógeno sintetizado fue purificado, mediante diálisis al equilibrio, con membranas de nitrocelulosa de 12 000 daltones de corte molecular (Sigma), en presencia de una solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS: 0.15 M NaCl, 0.01 M Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄, pH 7.4). Después de la diálisis, el inmunógeno fue congelado a -20°C para su preservación hasta su uso ulterior.

b) Síntesis de péptidos en fase sólida, empleados como antígenos de adsorción, para los ensayos inmunoenzimáticos de ELISA por captura de anticuerpo, para la identificación de ratones hiperinmunes a la valina α -amidada

Se diseñó en el laboratorio y se mandó a sintetizar a la casa comercial de Laboratorios Península, dos fragmentos peptídicos con las secuencias primarias de aminoácidos. Tir-X1-X2-X3-X-CONH₂, donde el último residuo (-X-CONH₂) del extremo carboxilo-terminal, es la valina con el grupo α -amida condensado o la valina con el grupo de ácido carboxílico libre (-X-COO-). Por otro lado, X1-X3 son residuos de aminoácidos que debido al trámite de patente de esta secuencia peptídica, se omite su nombre. La valina α -amidada

condensada covalentemente a esta secuencia general, es representativa de aquel aminoácido que fue empleado como hapteno, en el inmunógeno utilizado en los procedimientos de inmunización de los animales. La ventaja de la implementación experimental del fragmento peptídico con la secuencia primaria Tir-X1-X2-X3-Val-CONH₂, fue la de introducir covalentemente a la tirosina como aminoácido inicial en cada fragmento peptídico sintético. Así, esta tirosina inicial fue útil para llevar a cabo el marcaje radioactivo con el isótopo ¹²⁵I de este péptido sintético, para emplearlo ulteriormente como trazador en experimentos de radioinmunoensayo (ver más adelante).

c) Esquema de inmunización de animales contra la valina α -amidada

Se empleó un protocolo estándar de inmunización (Hockfield *et al.*, 1993), donde se inmunizaron 7 ratones hembra adultas BALB/c (2 meses). La inmunización inicial de los animales, consistió en la inyección subcutánea de 50 μ g de proteína acarreadora-Val-CONH₂ / 100 μ l de PBS / animal del inmunógeno emulsificado, en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (100 μ l), Sigma. Después de un periodo de descanso de 21 días, se aplicaron tres reinmunizaciones subsiguientes, a intervalos de 30 días, inyectando subcutáneamente 50 μ g / 100 μ l / animal del inmunógeno emulsificado en un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (100 μ l), Sigma. El primer sangrado (50 μ l / animal) se obtuvo después de 15 días de la última inmunización, de donde se generó la fracción de suero mediante la coagulación de la sangre a 4 °C por 24 horas y la centrifugación de la fracción coágulo / sobrenadante a 1200 r.p.m. por 10 minutos. Los sueros fueron congelados a -20 °C hasta su uso posterior. Este procedimiento fue empleado para generar las fracciones de sueros después de cada reinmunización.

d) Identificación inmunológica de animales hiperinmunes contra la valina α -amidada a través de un ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo

La identificación inicial de ratones con sueros con altos títulos de anticuerpos contra valina α -amidada se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo, de acuerdo al protocolo estándar descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En este ensayo, se emplearon placas de poliestireno (Immulon I, Corning) de 96 pozos, donde se adsorbieron individualmente a cada pozo 0.3 μ g del antígeno peptídico α -amidado, diluido en una solución 0.1 M de bicarbonato de sodio (pH 9). Como antígeno se empleó el fragmento peptídico con la secuencia Tir-X1-X2-X3-Val-CONH₂ acoplado covalentemente a la proteína BSA. Después de la adsorción del antígeno peptídico, los pozos se lavaron tres veces con una solución de 0.01 M de NaH₂PO₄, 0.5% de gelatina de teleósteo (Sigma) y 0.05% de Tween-20 (Sigma) a pH 7.2-7.4 y se incubaron con una alícuota de 50 μ l / pozo de antisuero policlonal diluido 1:100 y 1:1000 en la misma solución y como control se utilizó el suero preinmune. Después de 24 horas de incubación a 4°C, los pozos se lavaron nuevamente con la solución de 0.01 M de NaH₂PO₄, 0.5% de gelatina de teleósteo (Sigma) y 0.05% de Tween-20 (Sigma) a pH 7.2-7.4 y se agregó una enzima (peroxidasa de rábano) conjugada a un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:5000. Después de la incubación por un período de 2 horas a temperatura ambiente y del lavado del exceso de segundo anticuerpo, se agregó a cada pozo el sustrato cromogénico adecuado OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma) para obtenerse como producto de la reacción, el aumento de coloración y de la absorbancia a 490 nm en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAS, (Bio-Tek Instruments, modelo EL 311), en los pozos positivos (aquellos en los cuales se

llevó a cabo la unión de anticuerpos específicos del antisuero, al correspondiente antígeno peptídico α -amidado adsorbido a la fase sólida de los pozos).

2) GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DE LA VALINA

1) CULTIVO DE MIELOMAS

a) Crecimiento de mielomas

La línea celular de mielomas Sp2/0, empleada para los experimentos de fusión celular con esplenocitos activados, de animales hiperinmunes a la valina α -amidada, fue proporcionada por el Dr. Pascal Herion del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

La variante celular de mieloma inmortalizada de Sp2/0 de ratón, fue producida por Fazekas y Scheidegger (1980). Estas células son ampliamente empleadas, debido a que poseen un crecimiento y replicación particularmente rápidos, así como una alta frecuencia de fusión y una buena eficiencia de clonación (Goding, 1996).

Las células inicialmente se crecieron a una densidad de 1×10^5 células / ml en frascos de cultivo estériles de poliestireno de 25 ml (Corning) en una incubadora (Nuair modelo UN-4500) a 37°C, en un porcentaje de humedad relativo del 95% y en un ambiente constante de 5% de CO₂ y 95% de aire, en un medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco), enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (Sigma), 300 μ g / ml de L-Glutamina (Sigma), 15 mM de HEPES (Cellgro) y 50 μ g / ml de gentamicina (Sigma). Los cultivos se revisaron diariamente, a través de microscopía de luz por contraste de fases, para evaluar la viabilidad celular.

El muestreo de alícuotas de suspensiones celulares en medio de cultivo y el conteo celular microscópico, en cámaras de Neubauer con el colorante de azul de tripán (ver mas adelante), permitió cuantificar la densidad celular por mililitro de medio, así como la viabilidad celular. Los mielomas se mantuvieron en las condiciones de cultivo antes mencionadas, hasta alcanzar condiciones ideales de crecimiento logarítmico ($4-6 \times 10^5$ mielomas / ml) y un porcentaje de viabilidad mayor al 95%, para la realización de la fusión celular de ellos, con los esplenocitos activados del bazo de los animales hiperinmunes a la valina α -amidada.

b) Conteo de la densidad de mielomas en cultivo empleando un hemocitómetro o Cámara de Neubauer

Para determinar el crecimiento y la densidad de los mielomas (por mililitro de medio) en condiciones de cultivo, se empleó un hemocitómetro o Cámara de Neubauer para el conteo de células en suspensión (medio de cultivo). La técnica consiste en alicuotar un pequeño volumen (10 μ l) de la suspensión celular de cultivo y mezclarla con un volumen igual de una solución al 0.4 % del colorante para tinción supravital, azul de tripán (Gibco). Subsecuentemente, 10 μ l de la suspensión celular teñida es aplicada a cada lado del hemocitómetro, tocando la punta de la pipeta al cubreobjetos. Por capilaridad, la suspensión se distribuye en cada cámara, que tiene un patrón de cuadrículas con dimensiones conocidas, que indica un volumen estándar bajo un cubreobjetos. En una cámara hay nueve cuadros grandes, cada uno tiene un volumen de 0.1 μ l; para obtener la densidad celular se pueden contar las células de los cuadros grandes, pues se conoce el volumen que cada cuadro contiene.

c) Determinación de la viabilidad celular con tinción celular supravital empleando azul de tripán

Se usó el método estándar de exclusión con azul de tripán al 0.4% (Gibco) para determinar la viabilidad celular, en una proporción 1:1 de la suspensión celular y el colorante. Las células muertas o no saludables se tiñen de azul, al no tener intacta su membrana plasmática, permitiendo el paso del colorante al interior de la célula, mientras que las células sanas no permiten el paso de este colorante.

d) Congelación y descongelación de mielomas

Los mielomas pueden ser almacenados congelados por periodos largos de tiempo. Los mejores resultados se obtienen congelando las células cuando éstas se encuentran en fase de crecimiento logarítmica ($4-6 \times 10^5$ células / ml). Los mielomas fueron congelados y almacenados en criotubos (Nunc), en una unidad criogénica de nitrógeno líquido a -150°C , de acuerdo al protocolo estándar de Hockfield y colaboradores (1993), a una densidad de 1×10^6 células por mililitro, en medio de congelación, cuya composición fue del 7% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 10 % de suero fetal bovino (Sigma). La descongelación de los mielomas y su lavado de la mezcla de medio criogénico, se llevó a cabo por un procedimiento estándar de centrifugación (Hockfield *et al.*, 1993).

3) PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

a) Preparación de células de mieloma para la fusión

Las células de mieloma fueron descongeladas y sembradas en las condiciones experimentales antes descritas, por lo menos 10 días antes del experimento de fusión con esplenocitos activados. En general, los cultivos celulares de mielomas fueron definidos como candidatos para fusión celular, cuando los índices porcentuales de viabilidad de estas células fueron mayores del 95% y, su concentración promedio indicaba niveles de replicación en fase logarítmica ($4-6 \times 10^5$ células / ml de medio de cultivo).

b) Generación y expansión de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales, que reconozcan como epítipo inmunogénico a la forma estructural α -amidada de la valina

El animal con los títulos séricos más altos de anticuerpos contra la valina α -amidada, fue seleccionado como candidato para la fusión de sus esplenocitos activados, con células de mieloma en cultivo de la línea celular Sp2/0. Se empleó el protocolo experimental de fusión celular, descrito por Hockfield y colaboradores (1993), para la generación y expansión de hibridomas productivos. El animal hiperinmune seleccionado para estos fines, recibió una última inmunización intraperitoneal con $50 \mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$ del inmunógeno proteína acarreadora-Val-CONH₂, siete días antes de ser sacrificado para la fusión. El animal inmunizado fue sacrificado por dislocación cervical y las células linfoides disociadas rápidamente del bazo en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar de seguridad biológica (Nuairé, Class II, Typ A/B3). Los esplenocitos colectados a partir de este tejido, fueron fusionados con las células de mieloma en cultivo, en una proporción de cinco esplenocitos por

cada célula de mieloma, en presencia de polietilenglicol-4000 al 50 % (Gibco). Las células fusionadas fueron resuspendidas, a una concentración de 1×10^6 células / ml en medio de cultivo selectivo para hibridomas y sembradas en un total de 20 placas estériles de poliestireno de 96 pozos (Immunolon I, Corning), a una densidad de 5×10^4 a 1×10^5 células / 200 μ l de medio de cultivo selectivo por pozo. La composición química del medio cultivo selectivo hibridoma fue la siguiente: RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 20% de Suero Fetal Bovino (Gibco), 1X de una solución de factores tróficos (BM-condimed H1 Hybridoma cloning supplement, Roche), 300 μ g / ml de L-Glutamina (Sigma), 15 mM de HEPES (Cellgro), 1X de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina, Sigma) y 50 μ g / ml de gentamicina (Sigma). Después de 15-30 días de la fusión, se tomaron alícuotas de 50 μ l de sobrenadante del medio de cultivo de pozos con colonias de hibridomas visibles a la observación microscópica. La identificación de hibridomas productivos de anticuerpos con la especificidad deseada, se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar de análisis inmunoenzimático de ELISA, descrito en el inciso siguiente (ver abajo). Los hibridomas productivos de anticuerpos, que reconocieron a la forma estructural α -amidada de la valina, como epítoto inmunogénico en la secuencia primaria de los fragmentos peptídicos sintéticos, fueron invariablemente sometidos a procedimientos de expansión y clonación celular a través de siete ciclos de dilución celular limitada de acuerdo al protocolo reportado por Hockfield y colaboradores (1993). Un análisis estadístico de Poisson de la distribución y la frecuencia de clones productivos después del séptimo ciclo de subclonación celular fue empleado para la demostración del origen monoclonal de los hibridomas productivos seleccionados. Los hibridomas monoclonales productivos se congelaron y almacenaron a -196°C en nitrógeno líquido a una densidad de 1×10^6 células por mililitro en medio de cultivo selectivo en presencia de 7% de dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma. La identificación de la clase y el isotipo de las inmunoglobulinas representativas de los anticuerpos monoclonales de interés

se llevó a cabo mediante un "kit" de tipificación de isotipo de inmunoglobulinas de ratón (Sigma).

c) Ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo, para la identificación de sobrenadantes de hibridomas, que producen anticuerpos que reconocen a la valina α -amidada como epítotope inmunogénico

La identificación inicial de hibridomas secretores de anticuerpos que reconocen a la valina α -amidada como epítotope inmunogénico, se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) por captura de anticuerpo, descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En este ensayo, se emplearon placas de poliestireno (Immunolon I, Corning) de 96 pozos, donde se adsorbieron individualmente a cada pozo, 0.3 μ g del antígeno peptídico α -amidado diluido en una solución 0.1 M de bicarbonato de sodio (pH 9). El antígeno de adsorción fue el conjugado de BSA-Val-CONH₂. Después de la adsorción del antígeno, los pozos se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de ELISA (0.01 M de NaH₂PO₄, 0.5% de gelatina de teleósteo (Sigma) y 0.05% de Tween-20 (Sigma) a pH 7.2-7.4) y, se incubaron con una alícuota de 50 μ l / pozo de sobrenadante de hibridomas diluido 1:20 en la misma solución. Después de 24 horas de incubación a 4°C, los pozos se lavaron nuevamente con la misma solución amortiguadora de ELISA antes descrita y se agregó una enzima (peroxidasa de rábano) conjugada a un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:5000. Después de la incubación por un período de 2 horas a temperatura ambiente y de lavar seis veces el segundo anticuerpo con solución amortiguadora de ELISA, se agregó a cada pozo el sustrato cromogénico adecuado OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride, Sigma). Los pozos con señales de inmunorreacción positivas seleccionados, fueron aquellos en los cuales se observó inicialmente el desarrollo de una coloración

ámbar a la inspección visual, después de 15 minutos de la adición del sustrato cromogénico. Estos pozos también mostraron en forma correlativa un aumento significativo (de por lo menos 3 veces por arriba del valor control promedio de la señal inespecífica control) de la absorbancia a 490 nm, en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAS, (Bio-Tek Instruments, modelo EL 311).

d) Preservación de hibridomas productivos: congelación y descongelación

Los hibridomas, al igual que los mielomas pueden ser almacenados en condiciones de ultracongelación a largo plazo (años). Al igual que con los mielomas, se obtienen mejores resultados congelando las células, cuando se encuentran en fase logarítmica de crecimiento ($4-6 \times 10^5$ células / ml). Así, los hibridomas positivos identificados, se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido, de acuerdo al protocolo estándar descrito por Hockfield y colaboradores (1993). Brevemente, los hibridomas en condiciones de cultivo en fase de crecimiento y replicación logarítmica, fueron colectados de los frascos de cultivo y centrifugados a 1000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esta centrifugación, los sobrenadantes fueron aspirados por vacío y el botón celular resuspendido, en medio de congelación que contiene 7% de dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma en RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 10% de Suero Fetal Bovino (Sigma), para tener una densidad celular de 1×10^6 células por mililitro en tubos de plástico criogénicos (Nunc), los cuales se mantuvieron a 4°C por 30 minutos y posteriormente congelados y almacenados en nitrógeno líquido a -196 °C.

La descongelación de hibridomas para su cultivo y expansión posteriores, se llevó a cabo por la dilución de estas células a 37°C en medio de cultivo, seguido de centrifugación a 1000 r.p.m. por 10 minutos a temperatura ambiente, la

aspiración de la solución de congelación, y la resuspensión de la pastilla celular en medio de cultivo selectivo para crecimiento de hibridomas (ver arriba su composición). Normalmente, se empleó una densidad celular de 1×10^6 hibridomas / ml para su crecimiento y expansión iniciales en frascos de cultivo de 25 ml de capacidad.

4) CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA RECONOCER A LA FORMA ESTRUCTURAL α -AMIDADA DE LA VALINA

a) Ensayo inmunoenzimático por captura de anticuerpo (ELISA), de sobrenadantes de hibridomas, que producen anticuerpos monoclonales que reconocen a la valina α -amidada como epítipo inmunogénico

La caracterización de la especificidad de los anticuerpos monoclonales, para reconocer exclusivamente a la valina α -amidada como epítipo inmunogénico a partir de sobrenadantes de hibridomas productivos inicialmente identificados en los ensayos postfusión (ver arriba), se llevó a cabo a través de un ensayo inmunoenzimático estándar de ELISA por captura de anticuerpo, descrito por Hockfield y colaboradores (1993). Este ensayo se llevó a cabo en placas de poliestireno (Immunolon I, Corning) de 96 pozos, en donde, 0.3 μg de cada antígeno se adsorbieron individualmente a cada pozo. Los 0.3 μg de antígeno son diluidos en una solución de 0.1 M de bicarbonato de sodio (pH 9). Como antígenos, se emplearon diferentes formas estructurales de compuestos que codifican a la valina α -amidada (BSA-Val-CONH₂ y BSA-Metorfinamida (BSA-YGGFMRRV-CONH₂)), siendo la secuencia peptídica de este último conjugado, representativa de uno de los neuropéptidos endógenos ya clonados que

contienen a la valina α -amidada como último aminoácido del extremo carboxilo terminal. Después de la adsorción del antígeno peptídico, los pozos se lavaron tres veces a temperatura ambiente, con una solución amortiguadora de ELISA (0.01 M de NaH_2PO_4 , 0.5% de gelatina de teleósteo (Sigma) y 0.05% de Tween-20 (Sigma) a pH 7.2-7.4) y se incubaron con una alícuota de 50 μl / pozo de sobrenadantes de hibridomas diluido 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 y 1:6400 con esta misma solución amortiguadora. Después de 24 horas de incubación a 4°C, los pozos se lavaron nuevamente con la misma solución y se agregó una enzima (peroxidasa de rábano) conjugada a un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (Sigma) a una dilución 1:5000. Después de la incubación por un período de 2 horas a temperatura ambiente y de seis lavados del exceso de segundo anticuerpo, con la solución amortiguadora de ELISA, se agregó a cada pozo el sustrato cromogénico OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride, Sigma), para obtenerse como producto de la reacción la coloración (aumento de la absorbancia a 490 nm), en un lector automatizado de longitud de onda variable de ELISAS, (Bio-Tek Instruments, modelo EL 311) en los pozos positivos (aquellos en los cuales se llevó a cabo la unión de anticuerpos específicos del sobrenadante de cultivo de hibridomas productivos al correspondiente antígeno peptídico α -amidado). También se llevó a cabo un experimento inmunoenzimático control, donde se emplearon como antígenos adsorbidos al pozo, compuestos químicos cuya estructura contenía al aminoácido valina en su forma estructural de ácido carboxílico libre (BSA-V-COOH, BSA-RGDV-COOH), éste último un conjugado con un péptido endógeno, y por último el conjugado BSA-INWKGIAAMAKLL-CONH₂ (BSA-Mastoparan X), conjugado con un péptido endógeno que presenta como último aminoácido del extremo carboxilo terminal a la leucina α -amidada, aminoácido amidado con la más alta homología estructural a la valina α -amidada (la leucina posee un grupo metilo adicional en la cadena lateral). Este ensayo control fue diseñado y aplicado para identificar y asegurar la especificidad del

reconocimiento inmunogénico de los anticuerpos monoclonales hacia la forma α -amidada de la valina.

b) Ensayo de validación adicional de la especificidad de los anticuerpos monoclonales, contra la forma estructural α -amidada de valina, mediante un ensayo de inmunodot-blot

Se llevaron a cabo diversos ensayos de inmunodot-blot para evaluar y verificar adicionalmente, la especificidad de los anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada. Estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo estándar descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En forma breve, se emplearon diferentes concentraciones molares (1×10^{-12} , 1×10^{-13} , 1×10^{-14} , 1×10^{-15} y 1×10^{-16} M), de varios conjugados de péptidos antigénicos sintéticos. Las preparaciones antigénicas fueron YGGFMRRV-CONH₂ (Metorfinamida), INWKGIAAMAKLL-CONH₂ (Mastoparan X), Y-X1-X2-X3-V-CONH₂, Y-X1-X2-X3-V-COOH y RGDV-COOH, las cuales se aplicaron en un volumen de 1 μ l de 100% de metanol a membranas de acetato de nitrocelulosa (Bio Rad) de 0.22 μ m de diámetro del poro. La adsorción de las preparaciones peptídicas a las membranas fue facilitada por la incubación de ellas a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, las membranas fueron expuestas a un proceso serial de tres lavados de 10 minutos cada uno, con una solución amortiguadora de 10 mM de fosfatos con un pH de 7.4. Las membranas fueron subsiguientemente incubadas por una hora a temperatura ambiente, con una solución de prebloqueo (10 mM fosfatos; 1% gelatina de teleósteo (Sigma) y 0.05% Tween-20 (Sigma), pH 7.4). Después de este paso experimental, las membranas se incubaron por 24 horas a 4°C, con los anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada, diluidos 1:25 en la solución de prebloqueo. A continuación, las membranas fueron sujetas a un proceso de cinco lavados de 10 minutos por

lavado a temperatura ambiente, con una solución amortiguadora de 10 mM fosfatos; 0.05% de Tween-20 (Sigma), pH 7.4, e incubadas subsecuentemente con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (Sigma), diluido 1:20 000, en una solución de fosfatos 10 mM, 0.05% Tween-20 (Sigma), pH 7.4 por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron expuestas a cinco lavados continuos por 10 minutos en la solución de fosfatos 10 mM, 0.05% Tween-20 (Sigma), pH 7.4, para eliminar el exceso del segundo anticuerpo. Para la detección de señales inmunoreactivas se empleó, un kit de quimioluminiscencia (NEN, No. NEL 101; Life Science, Boston, MA, USA), siguiendo un procedimiento estándar recomendado por el fabricante.

c) Radioinmunoensayo en fase sólida para la identificación y cuantificación de material inmunoreactivo a la valina α -amidada

La caracterización final de la especificidad de los anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada fue evaluada mediante un radioinmunoensayo en fase sólida. Este ensayo fue empleado para identificar y cuantificar el material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado. Los diferentes pasos metodológicos de este ensayo son descritos a continuación.

a) Iodinación del trazador peptídico empleando el método del IODO-GEN

El trazador peptídico empleado para el radioinmunoensayo en fase sólida se marcó radiactivamente con el isótopo ^{125}I , de acuerdo al procedimiento descrito por Hockfield y colaboradores (1993). En forma resumida, el reactivo de IODO-GEN (Amersham Pharmacia Biotech) se disolvió inicialmente en cloroformo

para tener una solución de 10-40 μg / ml. Esta solución fue empleada subsecuentemente para recubrir la pared interna de tubos de borosilicato (12 mm x 75 mm, Pyrex), mediante la incubación de cada uno de ellos con 100 μl del reactivo a temperatura ambiente y la evaporación al vacío del solvente orgánico, empleando una corriente de nitrógeno líquido. Antes de iniciar la iodinación, cada tubo recubierto con IODO-GEN, fue enjuagado dos veces con una solución de PBS, pH 7.4, antes de la adición de 2 μg / 100 μl PBS 0.1 M del péptido trazador a ser marcado (Y-X1-X-2-X3-V-NH₂). Después de este paso, se adicionaron 250 μCi del reactivo isotópico (Na ¹²⁵I, Amersham Pharmacia Biotech) a cada tubo. La reacción se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual se procedió a la transferencia de la solución de reacción a tubos de plástico de 1.5 ml (Eppendorf). A este nivel, la solución de reacción se incubó adicionalmente por 15 minutos a temperatura ambiente. La purificación subsiguiente de la fracción del trazador peptídico iodinado, se realizó en amberlita XAD-16 (Sigma), con el objeto de purificar el péptido iodinado, el Na¹²⁵I libre y los productos de la reacción, empleando una solución de elusión de 50% de metanol en agua bidestilada. La medición de la incorporación del isótopo radiactivo y del cálculo de la actividad específica del marcaje isotópico en la fracción peptídica, se llevó a cabo mediante el conteo en c.p.m. en un contador de radiación gama (Beckman).

b) Radioinmunoensayo (RIA)

Se desarrolló un procedimiento de radioinmunoensayo en fase sólida, con el objeto de identificar y medir el contenido de material inmunoreactivo a la valina α -amida, de diversos péptidos que la codifican. Este radioinmunoensayo fue llevado a cabo de acuerdo al protocolo estándar descrito por Hockfield y colaboradores (1993).

Materiales y Métodos

En forma breve, el trazador empleado en el radioinmunoensayo fue el péptido sintético Y-X1-X2-X3-V-CONH₂. Para su empleo como trazador en el radioinmunoensayo, este péptido fue marcado radiactivamente con ¹²⁵I en la tirosina inicial mediante el empleo del método del IODO-GEN descrito por Hockfield y colaboradores (1993) (ver arriba en el inciso "a" de esta sección). En el radioinmunoensayo en fase sólida se emplearon platos de 96 pozos removibles (Immunolon II, Dynatech). El recubrimiento inicial de los pozos se hizo con 0.1 µg de proteína G / 50 µl de 0.1 M de bicarbonato de sodio / pozo. Después de un período de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, los pozos fueron lavados tres veces con una solución amortiguadora de radioinmunoensayo (0.1 M fosfato de potasio: (Sigma) / 0.1% gelatina de teleósteo (Sigma) / 0.2% Tween-20 (Sigma), pH 7.4). A este nivel experimental, se corrió un ensayo inicial para determinar la dilución de caldo de cultivo de los hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales contra valina la α-amidada, capaz de dar un valor del 20-25% de unión específica del trazador en ausencia de competencia con antígeno no marcado. Para este fin, se emplearon diluciones seriadas (1:5, 1:20, 1:50 y 1:100) del caldo de cultivo con anticuerpos monoclonales anti-valina α-amidada en solución amortiguadora de radioinmunoensayo, las cuales fueron incubadas en fracciones de 40 µl / pozo, en presencia del trazador previamente marcado (10 µl) por un período de 24 horas a 4 °C. Después de esta incubación, los pozos fueron lavados 4 veces, con la solución amortiguadora de radioinmunoensayo, y el porcentaje de unión específica del anticuerpo al trazador fue calculada después del conteo de radiactividad (c.p.m.) contenida en cada pozo, una vez extraída toda la solución de los pozos, mediante un contador gama (Beckman). Estos experimentos permitieron determinar la dilución del caldo de cultivo de hibridomas productivos de anticuerpos anti-valina α-amidada, a la cual se obtiene un valor del 20-25% de unión específica del trazador, dilución que se empleó rutinariamente para los ensayos de radioinmunoensayo.

Para el desarrollo subsiguiente de una curva estándar de este último ensayo se aplicaron los siguientes pasos experimentales:

1) Incubación de los pozos recubiertos con proteína G por 24 horas a 4 °C con 50 μ l del caldo de cultivo del hibridoma secretor de anticuerpos monoclonales anti-valina α -amidada diluido en la solución amortiguadora de radioinmunoensayo.

2) Lavado de los pozos por 4 veces, con la solución amortiguadora de radioinmunoensayo a 4°C.

3) Preparación de cada una de las siguientes soluciones en la solución amortiguadora de radioinmunoensayo, de tal forma que cada 50 μ l de cada una estas soluciones contenga, por triplicado, ya sea 5000 cuentas por minuto (c.p.m) del trazador (pozos control de unión total del trazador), o 5000 c.p.m. de trazador peptídico más una dilución seriada (1, 10, 100 y 1000 femtomoles) de péptidos competidores de la unión del péptido trazador, los cuales fueron la secuencia peptídica del trazador pero sin marcar radiactivamente con 125 I (Y-X1-X2-X3-V-CONH₂), así como el neuropéptido metorfinamida (YGGFMRRV-CONH₂), el cual, como ya se mencionó con anterioridad, es uno de los tres péptidos neuroactivos que contiene a la forma α -amidada del aminoácido valina en su extremo carboxilo terminal.

4) Lavado de los pozos por 4 veces, con la solución amortiguadora de radioinmunoensayo a 4°C, con la posterior remoción de la última solución de lavado de cada pozo del plato, el cual deberá depositarse en un tubo de vidrio, para el conteo de la radiactividad (c.p.m.) contenida en cada pozo mediante un contador gama (Beckman). A este nivel experimental, se determinó la fracción porcentual de unión específica del trazador peptídico radiactivo en presencia de cantidades conocidas de los péptidos fríos.

Se construyó una curva estándar con los valores de fracción porcentual de unión específica del antígeno radiactivo de los ensayos control y, se calcularon los valores de referencia de concentración inhibitoria del 50% de unión (IC₅₀) del trazador iodinado, para establecer los niveles de confiabilidad y de

sensibilidad de detección de material inmunoreactivo a valina α -amidada en el ensayo.

VII. RESULTADOS

1) Identificación de animales vacunados activamente contra la valina α -amidada, con respuesta inmunológica humoral contra este aminoácido, por medio de un ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo

Se diseñó, sintetizó y purificó una formulación estructural de un conjugado de proteína acarreadora-valina α -amidada, para evaluar la capacidad de inducir una alta inmunogenicidad de esta preparación al aminoácido α -amidado, en modelos de vacunación activa en el ratón. Los detalles del procedimiento de preparación de este inmunógeno y del esquema de inmunización fueron descritos en la sección de Materiales y Métodos. Se llevó a cabo un esquema de vacunación activa de ratones de la cepa BALB/c para generar animales hiperinmunes a la forma estructural α -amidada del aminoácido valina con el inmunógeno previamente seleccionado. Se inmunizó un grupo de siete animales y los datos experimentales de los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo mostraron que la aplicación de un programa de vacunación activa (con el derivado α -amidado del aminoácido valina acoplado covalentemente a una proteína acarreadora), empleando 5 reinmunizaciones espaciadas por 30 días, resultó un procedimiento eficaz para generar animales con respuesta humoral al aminoácido antes mencionado. En la figura 1, se muestra un ejemplo representativo de la medición del título de los anticuerpos contra la valina α -amidada (como valores de absorbancia en el ensayo) en un grupo de siete ratones vacunados activamente contra el aminoácido amidado. Los animales vacunados cuyo suero mostró la capacidad de una respuesta de incrementos de absorbancia en el ELISA de al menos dos veces (marcados como R1, R4, R5, R6 y R7) sobre el valor control de sueros preinmunes (marcado como preinmune en la figura 1) fueron definidos y seleccionados como posibles

candidatos a la fusión subsiguiente de sus esplenocitos activados con células de mieloma.

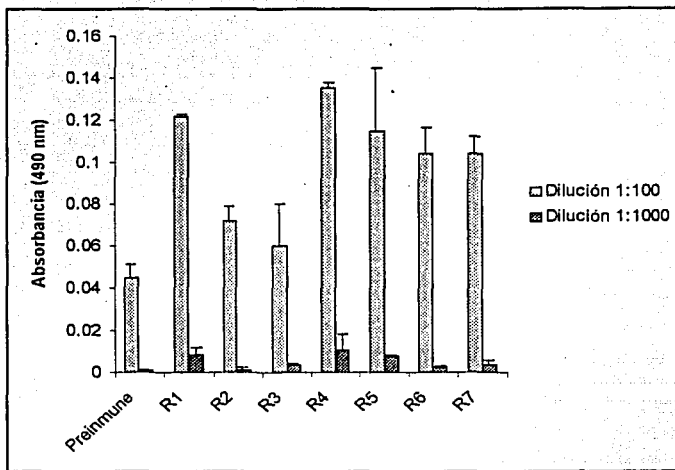


Figura 1. Ensayo representativo de ELISA por captura de anticuerpo, para la identificación de animales con respuesta inmunológica humoral, a la forma estructural α -amidada de la valina. Los sueros de los animales vacunados activamente contra este aminoácido α -amidado, fueron ensayados por triplicado en dos diferentes diluciones. Los niveles de captura de anticuerpos específicos de los distintos sueros de animales vacunados (eje de las abscisas) son mostradas como el promedio de los valores de absorbancia \pm desviación estándar (eje de las ordenadas). En este ensayo se empleó el péptido sintético BSA-Tir-X1-X2-X3-Val-CONH₂ como antígeno de adsorción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2) Generación e identificación de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra la forma estructural α -amidada de la valina

La vacunación activa contra la valina α -amidada con nuestra preparación inmunogénica permitió la generación exitosa de animales inmunes contra este aminoácido. Nuestros resultados permitieron identificar y seleccionar animales inmunes a este aminoácido α -amidado, como candidatos para la fusión de sus esplenocitos activados con células de mieloma de ratón (línea celular Sp2/0), para la generación de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra este aminoácido.

De esta manera, se seleccionó al ratón vacunado R4, el cual mostró los niveles de anticuerpos séricos contra la valina α -amidada más altos (ver figura 1). Después de llevar a cabo los procedimientos de la fusión celular de los esplenocitos activados del bazo con células de mieloma, así como del sembrado y cultivo de los hibridomas formados (ver sección de Materiales y Métodos), se obtuvieron 340 hibridomas formados en distintos pozos de fusión (ver figura 2 y tabla 1), con una eficiencia de formación de hibridomas postfusión del 17.9% (ver figura 2 y tabla 1). A partir de los pozos con formación de hibridomas visibles a la inspección microscópica, se colectaron 50 μ l / pozo de caldo de cultivo como muestra a ensayarse para la detección e identificación de anticuerpos contra la valina α -amidada en ensayos de ELISA por captura de anticuerpo. Cada alícuota del sobrenadante de cultivo fue ensayada a una dilución 1:20 en el ensayo de ELISA, empleando a la BSA-Val-CONH₂ como antígeno de adsorción a la fase sólida de los pozos de las placas de ensayo. Estos ensayos inmunoenzimáticos permitieron la identificación de tres colonias distintas de hibridomas productivos de anticuerpos que potencialmente reconocían a la Val-CONH₂ como epítipo inmunogénico (ver figura 3). La identificación de la clase e isotipo de inmunoglobulina representativa de cada

Resultados

uno de estos anticuerpos se llevó a cabo por medio de un "kit" comercial de tipificación de inmunoglobulinas del ratón (Sigma) y los tres distintos anticuerpos monoclonales fueron identificados como de la clase e isotipo IgG1 (dato no mostrado).

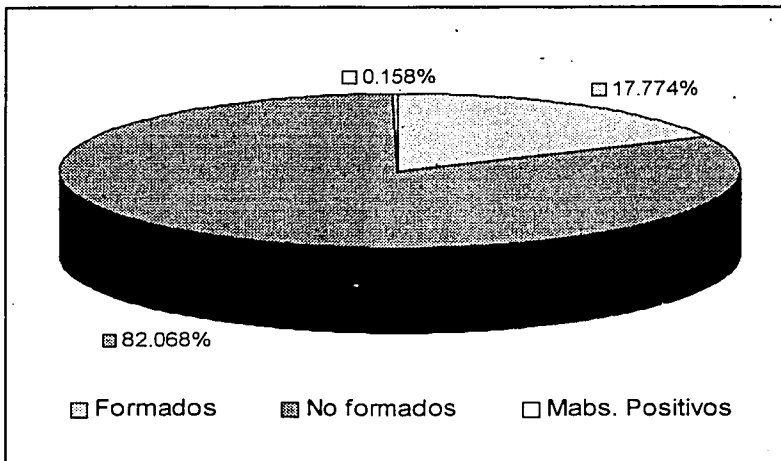


Figura 2. Diagrama de la eficiencia porcentual de la formación de hibridomas post-fusión y de la fracción porcentual de formación de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada.

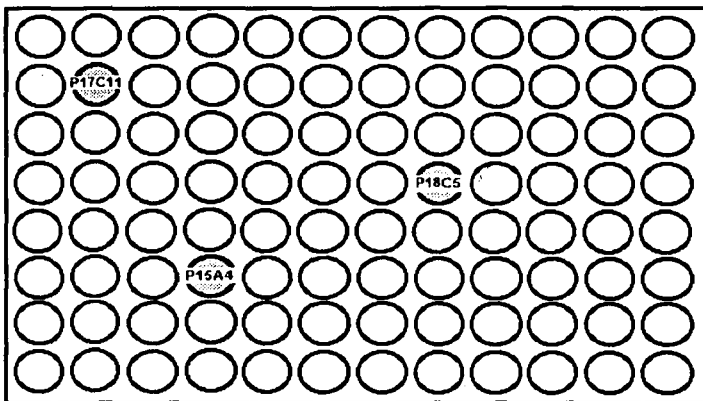


Figura 3. Dibujo esquemático de una placa de poliestireno de 96 pozos en donde se identificaron por medio de un ensayo de ELISA por captura de anticuerpo, tres clonas distintas de hibridomas identificados como P15A4, P17C11 y P18C5 productivas de tres anticuerpos monoclonales contra la valina α -amida. Los pozos sombreados muestran el desarrollo de inmunorreacción, como consecuencia de la captura de los anticuerpos del caldo de cultivo de los hibridomas por el antígeno de adsorción BSA-Val-CONH₂ a la fase sólida de la pared de los pozos.

	RESULTADOS
Células del bazo	100 000 000
Mielomas	20 000 000
Relación células del bazo:mielomas	5:1
Número total de pozos sembrados	1920
Eficiencia de fusión	17.932%
Número de hibridomas positivos	3
Número de clones obtenidas	340

Tabla 1. Resumen cuantitativo de los parámetros numéricos de células empleadas para la fusión celular, en la generación de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada. Nótese la cantidad y relación del número de células del tejido linfóide de un ratón inmunizado contra la valina α -amidada y de células de mieloma empleados para la fusión celular, así como de la relación del número total de pozos sembrados, de la eficiencia porcentual de formación post-fusión y del número total final obtenido de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada.

3) Caracterización inicial de la especificidad de los anticuerpos monoclonales P15A4, P17C11 y P18C5 contra la valina α -amidada, a través de un ensayo inmunoenzimático de ELISA por captura de anticuerpo

Después de haber identificado las tres clones de hibridomas productivas de anticuerpos contra la valina α -amidada, el siguiente objetivo del trabajo experimental de mi proyecto, consistió en la caracterización de la especificidad única de estos tres anticuerpos contra la forma estructural α -amidada de la valina. En este contexto, los tres anticuerpos monoclonales anti-valina α -amidada (figura 2) fueron evaluados por su capacidad para reconocer y unirse a diferentes antígenos de captura estructuralmente homólogos a la forma α -amidada de la valina de la fase sólida, en ensayos de ELISA por captura de anticuerpo. La figura 4 muestra el resultado de una curva de titulación del

anticuerpo monoclonal P15A4 en un ensayo de ELISA donde se emplearon a la BSA-Val-CONH₂, BSA-Metorfinamida, BSA-Val-COOH, BSA-RGDV y BSA-Mastoparan X como antígenos de adsorción a la fase sólida de los pozos de ensayo.

Como se puede observar en esta figura 4, el anticuerpo P15A4 mostró una capacidad de reconocimiento inmunológico cruzado, aunque con diferente título (definido como el valor inverso de la dilución que da un valor del 50% de unión del anticuerpo a la fase sólida antigénica), hacia todas las formas estructurales de preparaciones químicas de antígenos de adsorción, que presentan a la forma α -amidada de la valina. Por ejemplo, el α -aminoácido libre *per se* (BSA-Val-CONH₂), el α -aminoácido codificado en un neuropéptido (BSA-Metorfinamida), el α -aminoácido libre en su forma estructural de carboxilo libre (BSA-Val-COOH) o codificado en un neuropéptido acoplado a esta misma proteína (BSA-RGDV). Adicionalmente, este anticuerpo (P15A4), mostró reconocimiento inmunológico cruzado hacia el aminoácido α -amidado leucina, que es el homólogo estructural más cercano a la valina (ver curva de titulación en la figura 4), donde se empleó como antígeno de adsorción de la fase sólida del ensayo de ELISA, BSA-Mastoparan X, un hapteno representativo de un neuropéptido bioactivo que codifica a la leucina α -amidada. Así, en conjunto, estos datos muestran la ausencia de una especificidad única de reconocimiento inmunológico de este anticuerpo (P15A4), hacia la forma estructural α -amidada de la valina y sugiere, en principio, que el reconocimiento de complementariedad antigénica de este anticuerpo, está dirigido fundamentalmente hacia un epítipo inmunogénico estructural del aminoácido valina en dónde no se incluye el grupo α -amida (cadena lateral).

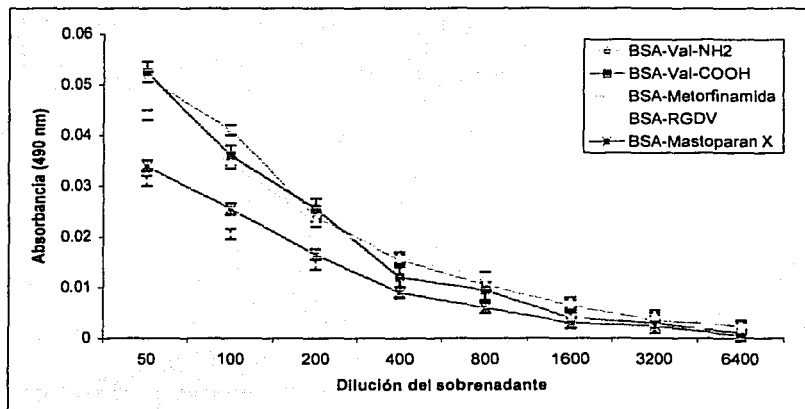


Figura 4. Ensayo representativo de ELISA por captura de anticuerpo para la caracterización de la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-valina α -amidada P15A4. Las diferentes curvas de dilución del anticuerpo ensayadas, empleando diferentes antígenos de adsorción a la fase sólida del ensayo, que presentan diferentes formas estructurales de la valina y de su homólogo estructural de aminoácido más cercano (leucina), se muestran trazados con diferente símbolo. Cada valor de dilución de este anticuerpo para cada curva de ensayo, fue muestreado por triplicado y los niveles de captura del anticuerpo (eje de las abscisas) son mostradas como el promedio de los valores de absorbancia \pm la desviación estándar (eje de las ordenadas), para cada valor de dilución / curva (eje de las abscisas). Los valores del título del anticuerpo monoclonal P15A4, calculados en las diferentes curvas de dilución del ensayo, empleando los diferentes antígenos de adsorción de captura fueron los siguientes: 1/200 para BSA-Val-NH₂, 1/200 para BSA-Val-COOH, 1/200 para BSA-Metorfinamida, 1/190 para BSA-RGDV y 1/180 para Mastoparan X.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Resultados

Fueron llevados a cabo experimentos análogos de ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, para la caracterización del patrón de la especificidad de reconocimiento inmunológico para el anticuerpo P17C11 anti-valina α -amidada. En estos ensayos también se empleó el mismo sistema de antígenos de adsorción antes mencionados. Un ejemplo representativo de los datos experimentales obtenidos de estos ensayos de ELISA se muestra en la figura 5. De igual forma que para el anticuerpo P15A4, los resultados conjuntos de especificidad del anticuerpo monoclonal P17C11 mostraron un patrón heterogéneo de reconocimiento inmunológico cruzado, tanto a diferentes isoformas estructurales de la valina (Val-CONH₂ y Val-COOH), así como por la leucina α -amidada. Así entonces, este resultado sugiere, en principio, que el reconocimiento de complementariedad antigénica de este anticuerpo, al igual que el anticuerpo producido por la clona del hibridoma P15A4, también está dirigido fundamentalmente hacia un epítipo inmunogénico estructural del aminoácido valina en donde no se incluye el grupo α -amida (cadena lateral).

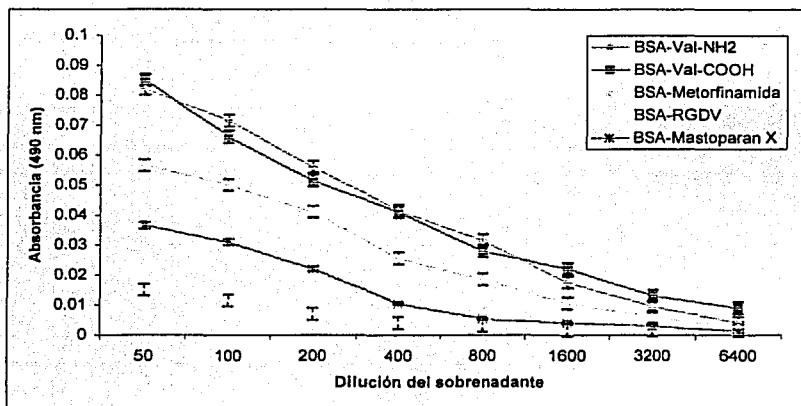


Figura 5. Ensayo representativo de ELISA por captura de anticuerpo para la caracterización de la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-valina α -amidada P17C11. Las diferentes curvas de dilución del anticuerpo ensayadas, empleando diferentes antígenos de adsorción a la fase sólida del ensayo, que presentan diferentes formas estructurales de la valina y de su homólogo estructural de aminoácido más cercano (leucina), se muestran trazados con diferente símbolo. Cada valor de dilución de este anticuerpo para cada curva de ensayo, fue muestreado por triplicado y los niveles de captura del anticuerpo (eje de las abscisas) son mostradas como el promedio de los valores de absorbancia \pm la desviación estándar (eje de las ordenadas), para cada valor de dilución / curva (eje de las abscisas). Los valores del título del anticuerpo monoclonal P17C11, calculados en las diferentes curvas de dilución del ensayo, empleando los diferentes antígenos de adsorción de captura fueron los siguientes: 1/400 para BSA-Val-NH₂, 1/360 para BSA-Val-COOH, 1/400 para BSA-Metorfinamida, 1/200 para BSA-RGDV y 1/300 para Mastoparan X.

El último experimento de caracterización inicial de la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-valina α -amidada, fue llevado a cabo para el anticuerpo monoclonal P18C5 (ver figura 6). La evaluación de la especificidad inmunológica de este último anticuerpo, empleando un diseño experimental de ELISA por captura de anticuerpo análogo al empleado para los anticuerpos P15A4 y P17C11, mostró que a diferencia de estos dos últimos anticuerpos, el anticuerpo monoclonal P18C5 fue capaz de reconocer en forma específica y selectiva exclusivamente a la forma estructural α -amidada de la valina, pero no a la isoforma de carboxilo libre de este aminoácido, así como tampoco a su aminoácido amidado estructuralmente análogo (leucina-CONH₂), al menos dentro del rango de diluciones ensayadas para este anticuerpo.

Así, por lo tanto, este resultado en conjunción con los obtenidos para los anticuerpos P15A4 y P17C11, muestra que el anticuerpo P18C5 es el único que tiene especificidad y selectividad únicas por el reconocimiento inmunológico de la forma estructural α -amidada de la valina. En este contexto experimental, es factible proponer que el reconocimiento de complementariedad antigénica de este anticuerpo, a diferencia del mostrado por los anticuerpos P15A4 y P17C11, si está dirigido fundamentalmente hacia un epítoto inmunogénico estructural del aminoácido valina, conformado probablemente por la cadena lateral y el grupo amida condensado covalentemente en el átomo de carbono α de este aminoácido amidado.

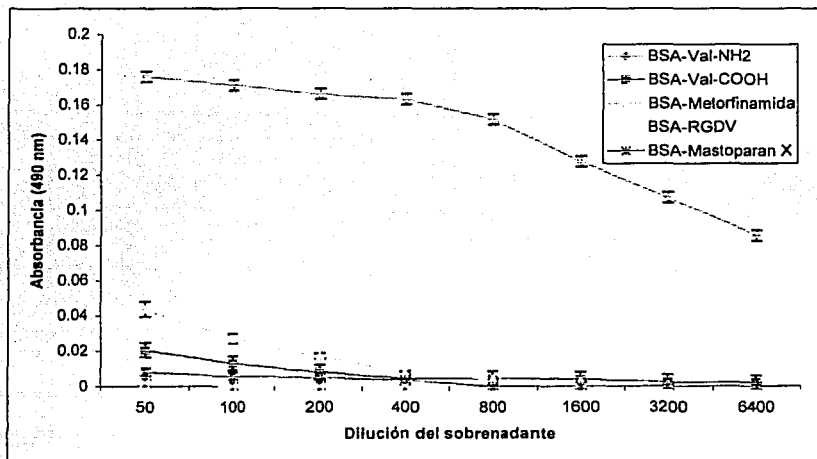


Figura 6. Ensayo representativo de ELISA por captura de anticuerpo para la caracterización de la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-valina α -amidada P18C5. Las diferentes curvas de dilución del anticuerpo ensayadas, empleando diferentes antígenos de adsorción a la fase sólida del ensayo, que presentan diferentes formas estructurales de la valina y de su homólogo estructural de aminoácido más cercano (leucina), se muestran trazados con diferente símbolo. Cada valor de dilución de este anticuerpo para cada curva de ensayo, fue muestreado por triplicado y los niveles de captura del anticuerpo (eje de las abscisas) son mostradas como el promedio de los valores de absorbancia \pm la desviación estándar (eje de las ordenadas), para cada valor de dilución / curva (eje de las abscisas). Los valores del título del anticuerpo monoclonal P18C5, calculados en las diferentes curvas de dilución del ensayo, empleando los diferentes antígenos de adsorción de captura fueron los siguientes: 1/5000 para BSA-Val-NH₂, 1/250 para BSA-Val-COOH, 1/130 para BSA-Metorfinamida, 1/1 para BSA-RGDV y 1/100 para Mastoparan X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4) Caracterización complementaria de la especificidad de los anticuerpos monoclonales P15A4, P17C11 y P18C5 contra la valina α -amidada a través de un ensayo inmunológico de inmunodot-blot

La evaluación y verificación complementarias de la especificidad de los anticuerpos P15A4, P17C11 y P18C5 contra la valina α -amidada, se llevó a cabo a través de ensayos de inmunodot-blot. En estos ensayos se emplearon como sistema de captura de los anticuerpos a la fase sólida de los filtros de membranas de nitrocelulosa, diferentes preparaciones de antígenos peptídicos sintéticos, cuya secuencia primaria presentan en el extremo carboxilo terminal, diferentes formas estructurales de la valina (en su forma α -amidada y de carboxilo libre), así como a su aminoácido con más estrecha homología estructural (leucina). En el diseño experimental de estos ensayos de inmunodot-blot, se emplearon concentraciones seriadas de los distintos antígenos peptídicos de captura de los anticuerpos (ver figuras 7, 8 y 9), en rangos de concentración peptídica (10^{-12} a 10^{-18} molar) que normalmente logran identificar la capacidad de unión de alta afinidad de anticuerpos por antígenos en la fase sólida en esta clase de ensayo inmunológico. Los datos experimentales del inmunodot-blot corroboraron, al igual que los resultados de ELISA por captura de anticuerpo, que los anticuerpos P15A4 (figura 7) y P17C11 (figura 8) carecen de un patrón de especificidad y selectividad únicas en reconocer inmunológicamente a la forma estructural α -amidada de la valina. Por el contrario, la especificidad del reconocimiento de complementariedad antigénica del anticuerpo P18C5 hacia la forma α -amidada de este aminoácido, fue comprobada adicionalmente a través de este ensayo inmunológico (ver figura 9). Así, en conjunto, los datos experimentales de los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo y del inmunodot-blot, permitieron la identificación del anticuerpo monoclonal P18C5, como el único capaz de poseer la especificidad y selectividad de reconocimiento inmunológico, exclusivamente por la forma α -amidada de la valina. En este contexto experimental, entonces, el anticuerpo

monoclonal P18C5 fue empleado posteriormente para diseñar y estandarizar un radioinmunoensayo (RIA), para lograr identificar con confiabilidad y medir con alta sensibilidad de detección, material inmunoreactivo a la valina α -amidada presente en distintos péptidos (ver adelante figura 10), para así validar el empleo conjunto posterior de este anticuerpo monoclonal y RIA en la identificación, aislamiento y caracterización estructural de nuevas especies peptídicas neuroactivas que presenten este aminoácido α -amidado. Esta última línea experimental será tópico de desarrollo experimental de otro trabajo.

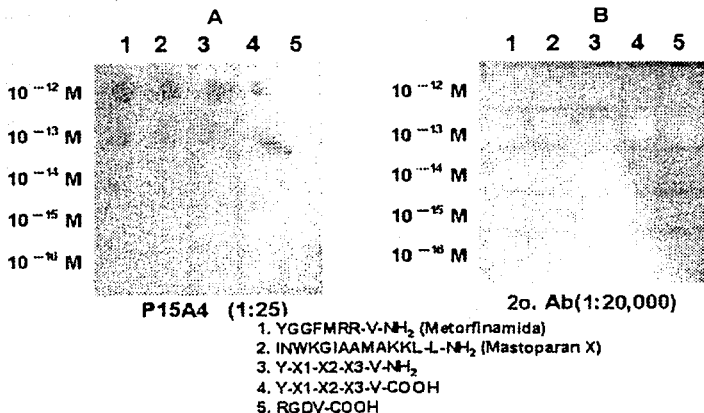


Figura 7. Ensayo representativo de un Inmunodot-blot, para caracterizar la especificidad del anticuerpo P15A4 contra la forma estructural α -amidada de la valina. El patrón de reconocimiento inmunológico cruzado de este anticuerpo, se evaluó contra la forma estructural de carboxilo libre de la valina, así como contra la leucina, su homólogo estructural más cercano. Todas estas formas estructurales están presentes en diferentes secuencias peptídicas sintéticas, representativas tanto de neuropéptidos como la Metorfinamida (YGGFMRR-V-CONH₂), RGD-V-COOH y Mastoparan X (INWKGIAAMAKKL-L-CONH₂), así como de dos péptidos sintéticos diseñado en el laboratorio (Y-X1-X2-X3-V-COOH y Y-X1-X2-X3-V-CONH₂). El código de identificación numérico de cada secuencia peptídica antigénica de captura del anticuerpo ensayadas en el filtro, se muestra en números progresivos del 1 al 5. Las distintas concentraciones molares decrecientes de cada péptido empleadas como antígenos de captura en el filtro, se anotan en las columnas de la izquierda del filtro, ensayado con una dilución 1:25 del anticuerpo P15A4 (A) y del filtro control ensayado exclusivamente con una dilución 1:20,000 del segundo anticuerpo (B).

TENE CON
 FALLA DE ORIGEN

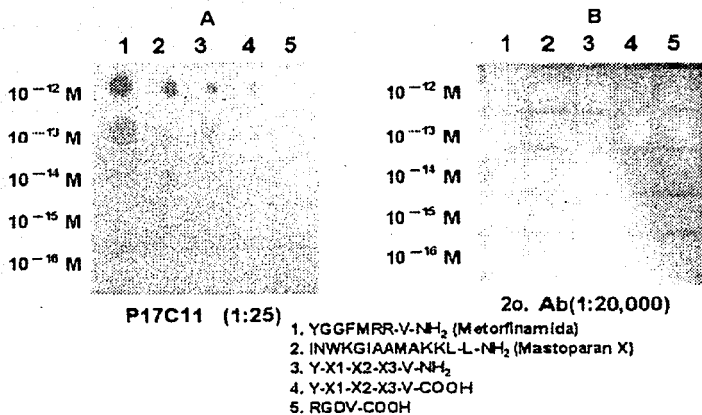


Figura 8. Ensayo representativo de un Inmunodot-blot, para caracterizar la especificidad del anticuerpo P17C11 contra la forma estructural α -amidada de la valina. El patrón de reconocimiento inmunológico cruzado de este anticuerpo, se evaluó contra la forma estructural de carboxilo libre de la valina, así como contra la leucina, su homólogo estructural más cercano. Todas estas formas estructurales están presentes en diferentes secuencias peptídicas sintéticas, representativas tanto de neuropéptidos como la Metorfinamida (YGGFMRR-V-CONH₂), RGD-V-COOH y Mastoparan X (INWKGIAMAKKL-L-CONH₂), así como de dos péptidos sintéticos diseñados en el laboratorio (Y-X1-X2-X3-V-COOH y Y-X1-X2-X3-V-CONH₂). El código de identificación numérico de cada secuencia peptídica antigénica de captura del anticuerpo ensayadas en el filtro, se muestra en números progresivos del 1 al 5. Las distintas concentraciones molares decrecientes de cada péptido empleadas como antígenos de captura en el filtro, se anotan en las columnas de la izquierda del filtro, ensayado con una dilución 1:25 del anticuerpo P17C11 (A) y del filtro control ensayado exclusivamente con una dilución 1:20,000 del segundo anticuerpo (B).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

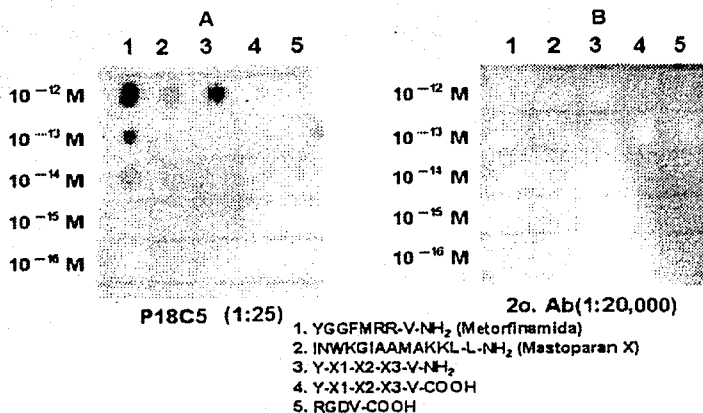


Figura 9. Ensayo representativo de un Inmunodot-blot, para caracterizar la especificidad del anticuerpo monoclonal P18C5 contra la forma estructural α -amidada de la valina. El patrón de reconocimiento inmunológico cruzado de este anticuerpo, se evaluó contra la forma estructural de carboxilo libre de la valina, así como contra la leucina, su homólogo estructural más cercano. Todas estas formas estructurales están presentes en diferentes secuencias peptídicas sintéticas, representativas tanto de neuropéptidos como la Metorfinamida (YGGFMRR-V-CONH₂), RGDV-COOH y Mastoparan X (INWKGIAAMAKKL-L-CONH₂), así como de dos péptidos sintéticos diseñados en el laboratorio (Y-X1-X2-X3-V-COOH y Y-X1-X2-X3-V-CONH₂). El código de identificación numérico de cada secuencia peptídica antigénica de captura del anticuerpo ensayadas en el filtro, se muestra en números progresivos del 1 al 5. Las distintas concentraciones molares decrecientes de cada péptido empleadas como antígenos de captura en el filtro, se anotan en las columnas de la izquierda del filtro, ensayado con una dilución 1:25 del anticuerpo monoclonal P18C5 (A) y del filtro control ensayado exclusivamente con una dilución 1:20,000 del segundo anticuerpo (B).

5) Empleo del anticuerpo monoclonal P18C5 contra la valina α -amidada para estandarizar un radioinmunoensayo en fase sólida (RIA), capaz de identificar y cuantificar material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado, presente en secuencias peptídicas sintéticas diseñadas en el laboratorio, así como en neuropéptidos bioactivos

La parte final de mi trabajo experimental de tesis estuvo centrada en el desarrollo y estandarización de un radioinmunoensayo, empleando el anticuerpo monoclonal P18C5 específico para la forma estructural α -amidada de la valina. En la figura 10 se muestran los resultados de dos curvas estándar, para identificar la sensibilidad de detección de material inmunoreactivo a la valina α -amidada, presente en la secuencia peptídica diseñada en el laboratorio (Y-X1-X2-X3-V-CONH₂) y en uno de los tres neuropéptidos bioactivos (Metorfinamida) que presentan a este aminoácido α -amidado en su extremo carboxilo terminal. El resultado muestra la capacidad de este anticuerpo monoclonal, para detectar con confiabilidad material inmunoreactivo a valina α -amidada en el rango de concentraciones de fmoles / pozo de ensayo, en el valor de referencia de concentración de péptido competidor capaz de desplazar el 50% de unión del trazador iodinado al anticuerpo monoclonal de la fase sólida del RIA (IC₅₀ por sus siglas en inglés en la nomenclatura estándar empleada para estos ensayos). Otro dato importante obtenido en este ensayo fue que el anticuerpo monoclonal P18C5, demostró la misma capacidad para reconocer y cuantificar casi con la misma sensibilidad de detección al material inmunoreactivo de la valina α -amidada, codificado tanto en el péptido sintético de diseño en nuestro laboratorio (143 fmoles al valor de referencia de IC₅₀ para Y-X1-X2-X3-V-CONH₂), así como en el neuropéptido bioactivo Metorfinamida (50 fmoles al valor de referencia de IC₅₀ para YGGFMRR-V-CONH₂). Este último resultado, hace factible postular la capacidad potencial de este

anticuerpo monoclonal P18C5 para identificar y cuantificar material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado, el cual pudiera estar presente en otros nuevos neuropéptidos amidados, que codifiquen a la valina α -amidada empleando este radioinmunoensayo ya estandarizado.

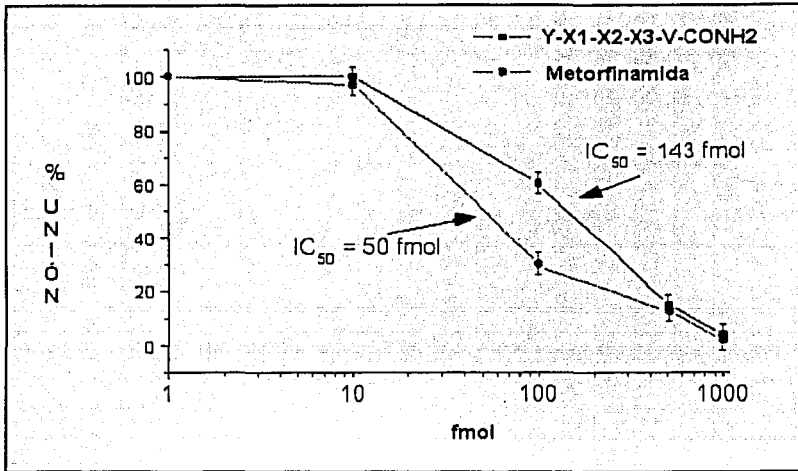


Figura 10. Ensayo representativo de la estandarización de un radioinmunoanálisis, para identificar y cuantificar el material inmunoreactivo a la valina α -amidada, empleando el anticuerpo monoclonal P18C5 contra este aminoácido. La gráfica muestra los distintos valores del porcentaje de unión (eje de las ordenadas) del trazador peptídico ^{125}I -Y-X1-X2-X3-V-CONH₂ con el anticuerpo monoclonal P18C5, a diferentes concentraciones progresivas de dos péptidos sintéticos competidores (eje de las abscisas, en escala logarítmica) que codifican a la valina α -amidada en su extremo carboxilo terminal (Y-X1-X2-X3-V-CONH₂ y Metorfinamida). Los niveles de sensibilidad de detección confiable, de material inmunoreactivo a la valina α -amidada del ensayo al valor de referencia estándar del 50% de la inhibición de unión del trazador (IC₅₀), fueron de 50 y 143 fmol respectivamente para Metorfinamida y para el péptido Y-X1-X2-X3-V-CONH₂.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1) Generación de conjugados con alta capacidad inmunogénica de la valina α -amidada

El objetivo central de mi proyecto de tesis estuvo dirigido hacia la generación e identificación de hibridomas, capaces de sintetizar anticuerpos monoclonales con reconocimiento inmunológico de complementariedad antigénica, hacia la forma estructural α -amidada del aminoácido valina, presente como último aminoácido en el extremo carboxilo terminal de la estructura primaria de mensajeros peptídicos amidados. Desde el punto de vista antigénico, el primer problema científico-metodológico que tuvo que resolver mi trabajo experimental fue el diseño, síntesis y purificación de un conjugado que fuera capaz de presentar como hapteno altamente inmunogénico, al sistema inmune del ratón de la cepa BALB/c, a la forma estructural α -amidada de la valina. La justificación de este abordaje experimental inicial de mi proyecto se basó en el hecho conceptual del campo de la inmunología, de que moléculas de muy escasa complejidad estructural y peso molecular, como es el caso de la valina α -amidada, normalmente son muy poco o carecen de capacidad inmunogénica para generar y consolidar una respuesta inmunológica humoral en mamíferos inmunocompetentes (Harlow y Lane, 1999). Así entonces, el punto de partida experimental inicial de mi proyecto fue el logro del diseño y síntesis de un conjugado inmunogénico el cual fuera capaz de conferir inmunogenicidad a la valina α -amidada. Los resultados experimentales de vacunación activa con este inmunógeno de poblaciones de ratones BALB/c (ver la figura 1 de la sección de Resultados), mostraron la capacidad de este inmunógeno para inducir una respuesta inmunológica humoral contra la valina α -amidada en la mayoría de los animales vacunados ($\geq 90\%$), al identificar títulos significativos máximos y estables de anticuerpos séricos contra este aminoácido, después de

un programa de 4 reinmunizaciones, en el ensayo de ELISA por captura de anticuerpo.

2) Generación de hibridomas productivos de anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada

La vacunación activa contra la valina α -amidada con la preparación inmunogénica de este aminoácido, permitió la generación exitosa de un gran número de animales inmunes (siete) contra este aminoácido α -amidado. Estos resultados permitieron también identificar, seleccionar y definir animales inmunes candidatos para la fusión de sus esplenocitos activados con una línea celular cancerígena de linfocitos B (mielomas Sp2/0), para la generación de hibridomas que tuvieran la capacidad de sintetizar anticuerpos monoclonales contra el aminoácido α -amidado. Un experimento de fusión celular de esta naturaleza, empleando al ratón R4, permitió la obtención de 340 hibridomas visibles a la inspección microscópica (ver figura 2 y tabla 1), de los cuales un porcentaje del 0.158% (tres clonas), fueron identificadas inicialmente como hibridomas con el potencial de sintetizar anticuerpos con capacidad de reconocimiento inmunológico a la valina α -amidada. Es pertinente mencionar que el índice numérico de la eficiencia de fusión fue bajo, ya que el número total de pozos sembrados con células de fusión fue de 1920. Normalmente, en condiciones experimentales óptimas, los valores de rendimiento de eficiencia de fusión y formación de hibridomas visibles a la inspección microscópica deben ser valores de referencia reportados en la literatura de entre el 40-60% del total de pozos de cultivo sembrados con células postfusión (Harlow y Lane, 1999). No obstante de esta desventaja experimental, los ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, permitieron identificar inicialmente en este experimento de fusión a tres clonas de hibridomas distintas denominadas P15A4, P17C11 y P18C5, con actividad potencial de sintetizar anticuerpos contra la valina α -

amidada (ver Figura 3). A este nivel experimental, mi interés estaba centrado en la identificación inicial y rápida de clonas de hibridoma con capacidad potencial de síntesis y secreción de anticuerpos contra este aminoácido amidado, con el objeto de eliminar, también rápidamente, la necesidad del cultivo y expansión de un gran número de clonas de hibridomas no productivos. Así, una vez identificadas estas tres clonas de hibridomas potencialmente productivas de anticuerpos anti-valina α -amidada, por el criterio del ensayo de ELISA por captura de anticuerpo (empleando como antígeno de captura de la fase sólida a la BSA-ValCONH₂), estos tres hibridomas fueron ulteriormente sujetos a procedimientos de cultivo, expansión y clonación celular. La identificación de la clase e isotipo de inmunoglobulinas de los anticuerpos monoclonales P15A4, P17C11 y P18C5, se llevó a cabo mediante un kit de tipificación de inmunoglobulinas de ratón de Sigma, y las tres mostraron ser de la clase e isotipo IgG1. Este último resultado apoya adicionalmente el origen monoclonal de estos tres anticuerpos. Finalmente, una vez identificados estos tres hibridomas, fueron sujetos a procedimientos de congelación y criopreservación a -150°C en un número alto de replicas ($\cong 30$ alícuotas de 1×10^6 células / ml / tubo criogénico) en distintos lugares de almacenamiento y preservación criogénica para asegurar su viabilidad y disponibilidad futuras a largo plazo.

3) Comprobación ulterior de la capacidad de los anticuerpos monoclonales P15A4, P17C11 y P18C5, en el reconocimiento inmunológico por complementariedad antigénica hacia la forma estructural α -amidada del aminoácido valina

El aminoácido valina en su forma estructural nativa como L-aminoácido con un grupo carboxílico libre en su átomo de carbono α , y aún en su forma α -amidada en este mismo átomo, tiene poca complejidad estructural. Así, por lo tanto, el

logro experimental de mi proyecto de lograr sintetizar un inmunógeno que confirió alta inmunogenicidad a este aminoácido α -amidado, fue un objetivo inicial que había que lograr para la vacunación activa y generación de ratones hiperinmunes a la valina α -amidada. Esto con el objeto, como se explicó anteriormente, de obtener animales donadores de esplenocitos activados para fusionarse con células de mieloma. Sin embargo, una vez identificados tres hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la valina α -amidada, fue necesario comprobar y asegurar la especificidad absoluta de estos tres anticuerpos, para reconocer exclusivamente a la forma α -amidada de este aminoácido y no también a la forma de carboxilo libre de la misma. Este criterio de especificidad absoluta está basado en el hecho y justificación del objetivo de generar anticuerpos monoclonales con especificidad única a la valina α -amidada para poder emplearlos posteriormente en la estandarización de un radioinmunoensayo (ver más adelante inciso "4" de esta sección), capaz de identificar material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado codificado en fracciones peptídicas del sistema nervioso de mamíferos, con el objeto de clonar nuevos péptidos bioactivos α -amidados, que presenten en su extremo carboxilo terminal a este aminoácido α -amidado. Así, una vez identificados los tres hibridomas (P15A4, P17C11 y P18C5) productivos de anticuerpos contra la valina α -amidada, fue necesario comprobar ulteriormente en forma más sistemática la especificidad única hacia la valina α -amidada. Adicionalmente, también fue necesario explorar y asegurar la capacidad funcional de que estos anticuerpos tuvieran la característica de reconocer específicamente a la valina α -amidada, presente en el extremo carboxilo terminal de una serie de péptidos sintéticos de diseño en el laboratorio, así como en péptidos representativos de especies peptídicas bioactivas de origen neural. Los resultados de estos experimentos de evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales P15A4, P17C11 y P18C5 a través de ensayos de ELISA por captura de anticuerpo, son mostrados en las figuras 4, 5 y 6 de la sección de

"Resultados" y en ellos se determinó que solamente el anticuerpo P18C5 tiene la capacidad funcional de reconocimiento inmunológico específico por la forma estructural α -amidada de la valina, así como la de llevar a cabo este reconocimiento cuando este aminoácido modificado está condensado estructuralmente con el extremo carboxilo terminal de secuencias peptídicas de distinta estructura primaria (BSA-Val-CONH₂, BSA-Metorfinamida (BSA-YGGFMRRV-CONH₂). Nótese que estos requisitos funcionales no son exhibidos por los otros dos anticuerpos monoclonales P15A4 y P17C11 inicialmente identificados, ya que ellos dos, además de reconocer a la valina α -amidada, también identifican a otras secuencias peptídicas que codifican en su extremo carboxilo terminal a la forma estructural de ácido carboxílico libre la valina (BSA-Val-COOH, BSA-RGDV-COOH) y a BSA-Mastoparan X (BSA-INWKGIAAMAKLL-CONH₂). La hipótesis más plausible para explicar estos patrones de reconocimiento inmunológico cruzado de los anticuerpos P15A4 y P17C11, por la forma estructural no amidada de la valina, está relacionada posiblemente al hecho de que el reconocimiento de complementariedad antigénica de estos dos anticuerpos, no está dirigido a un epítope estructural de la molécula de la valina α -amidada conformado por el átomo de carbono α del aminoácido modificado, sino que más bien, este epítope estaría conformado predominantemente por el resto de la estructura molecular del aminoácido (cadena lateral y el átomo de carbono del grupo α -amino). Estas mismas deducciones se ven apoyadas por los ensayos complementarios de especificidad a los que fueron ulteriormente sujetos los tres anticuerpos monoclonales, a través de ensayos de inmunodot blot (ver figuras 7, 8 y 9 de la sección de "Resultados"). Adicionalmente, estos últimos ensayos también nos permitieron identificar, por primera vez, la sensibilidad de detección de este ensayo de material inmunoreactivo a la valina α -amidada, presente en secuencias peptídicas (ver "A", columna 1 en la figura 9), cuyo valor mínimo confiable para el anticuerpo P18C5 fue de 10^{-14} M de material inmunoreactivo a valina α -amidada detectado.

4) Empleo del anticuerpo monoclonal P18C5, específico para la valina α -amidada, para estandarizar y validar un radioinmunoensayo (RIA), con capacidad para identificar y cuantificar con alta sensibilidad de detección, material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado codificado en secuencias peptídicas

Como ya se ha discutido con anterioridad, el desarrollo de mi trabajo experimental permitió la obtención de un anticuerpo monoclonal (P18C5), que cumple con los requisitos de especificidad y selectividad únicas por el reconocimiento de la forma estructural α -amidada de la valina, presente en el extremo carboxilo terminal de secuencias peptídicas. Así, este logro, permite estar en la posibilidad de diseñar, implementar y validar un ensayo inmunológico que tiene, por un lado, la capacidad de confirmar finalmente la especificidad de este anticuerpo monoclonal, y adicionalmente, de brindar las ventajas experimentales de poder identificar con confiabilidad y de cuantificar con alta sensibilidad de detección, material inmunoreactivo a este aminoácido α -amidado, presente en secuencias peptídicas de diseño y representativas de péptidos neuroactivos α -amidados en la valina ya clonados. Así entonces, los resultados de la figura 10 mostraron que el anticuerpo monoclonal P18C5 anti-valina α -amidada demostró una capacidad funcional óptima como inmunoreactivo para poder desarrollar y validar un radioinmunoensayo (RIA), que satisface las características funcionales de especificidad y muy alta sensibilidad, para la detección de material inmunoreactivo a la valina α -amidada, codificada en el extremo carboxilo terminal de secuencias peptídicas sintéticas de diseño en el laboratorio (Y-X1-X2-X3-Val-CONH₂), así como en la secuencia primaria representativa de uno de los tres neuropéptidos conocidos a la fecha que presenta a la valina α -amidada (Metorfinamida, YGGFMRRV-CONH₂). Esta capacidad del anticuerpo monoclonal P18C5 para detectar material inmunoreactivo en dos secuencias peptídicas de distinta estructura

primaria en el RIA, hace posible postular la utilidad de este anticuerpo en ensayos futuros para clonar nuevos posibles péptidos neuroactivos, que pudieran presentar a este aminoácido α -amidado en su extremo carboxilo terminal a través de procedimientos inmunocromatográficos. Otro aspecto funcional que es pertinente mencionar de este RIA, es la alta sensibilidad de detección de material inmunoreactivo a la valina α -amidada en secuencias peptídicas. Por ejemplo, en la figura 10 se observa que la sensibilidad mínima del ensayo es del orden de 50-140 fmoles de material peptídico α -amidado, respectivamente para Metorfinamida y Y-X1-X2-X3-Val-CONH₂, al valor de referencia del 50% de desplazamiento del trazador (IC₅₀, por su nomenclatura en inglés). Estos niveles de sensibilidad de detección son altos para los estándares rutinarios de inmunoensayos de esta naturaleza, en la detección y cuantificación peptídica (usualmente valores promedio reportados en la literatura del campo alrededor de 2-500 fmoles, Harlow y Lane, 1999). Desde el punto de vista de la utilidad futura de este RIA, para su empleo como bioensayo para clonar nuevas especies peptídicas bioactivas con valina α -amidada, se debe mencionar que la alta sensibilidad de detección del ensayo, será una ventaja experimental de primer orden, ya que usualmente los péptidos neuroactivos, aún los α -amidados, se sintetizan en muy bajas concentraciones (alrededor de pmoles / mg de tejido húmedo, (Barchas, et al., 1987) en los tejidos nerviosos y neuroendócrinos del sistema nervioso de mamíferos. Así, los índices de recuperación de los mismos, después de procedimientos de homogenización tisular y purificación cromatográficas, son generalmente aún más bajos (generalmente en el rango bajo de pmolas / mg de tejido húmedo, (Barchas, et al., 1987).

IX. APORTACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE TRABAJO

Mi trabajo experimental de tesis logró la generación y validación de la especificidad de un anticuerpo monoclonal contra la forma estructural α -amidada del aminoácido valina. Adicionalmente, este anticuerpo se empleó para diseñar, implementar y validar un radioinmunoensayo, con la capacidad de identificar y cuantificar con muy alta sensibilidad de detección, material inmunoreactivo a este aminoácido modificado, codificado en el extremo carboxilo terminal de secuencias peptídicas de distintas estructuras primarias. Dado que solo existen clonados tres neuropéptidos bioactivos (Secretina, Metorfinamida y α -MSH) en el sistema nervioso y neuroendócrino de los mamíferos que presentan este aminoácido α -amidado, y basados en los estudios actuales de mapeo genómico de mamíferos, los cuales predicen la existencia de un número considerable de nuevos péptidos bioactivos, anticipamos que el empleo de este anticuerpo monoclonal en el RIA ya estandarizado, permitirá en futuros experimentos de clonación peptídica inmunocromatográfica, la identificación, aislamiento y caracterización estructural y funcional de nuevos neuropéptidos con valina α -amidada. Estos estudios ya están siendo desarrollados en el laboratorio de mi tutor principal de tesis, y forman parte del desarrollo de trabajos experimentales de tesis de postgrado de diferentes alumnos.

X. LITERATURA CONSULTADA

Alegre, M. L., Lenschow, D. J., Bluestone, A. B. (1995). Immunomodulation of transplant rejection using monoclonal antibodies and soluble receptors. *Seminars in Nuclear Medicine*. XXV(2):58-64.

Barchas, J. D., Tatemoto, K., Faulk, K., Evans, C. J., Valentino, K., Eberwine, J. (1987). The search for neuropeptides. In: *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Edited by H. Y. Meltzer., Raven Press, New York. pp. 437-447.

Blakey, D. C., Burke, P. J., Davies, D. H., Dowl, R. I., Melton, R. G., Springer, C. J., Wright, A. F. (1995). Antibody-Directed Enzyme Product Therapy (ADEPT) for Treatment of Major Solid Tumor Disease. *Biochem. Soc. Trans.* 23:1047-1052.

Bishop, D. and Delaloye, B. (1995). Tumor Imaging with Monoclonal Antibodies. *Seminars in Nuclear Med.* XXV(2):144-164.

Boleti, E., George, A., Epenetos, A. (1995). Therapeutic monoclonals. *Biochem. Soc. Trans.* 23:1044-1047.

Boudreault, A., Castellucci, V., Chretien, M., Lazure, C. (1996). Identification, purification, and characterization of the molecular forms of *Aplysia californica* peptidylglycine alpha-amidating enzyme. *J. Neurochem.* 66:2596-2605.

Bradbury, A. F., Finnie, M. D., Smyth, D. G. (1982). Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 298:686-688.

Literatura consultada

Bradbury, A. F. and Smyth, D. G. (1991). Peptide amidation. Trends Biochem. Sci. 16:112-115.

Bradbury, A. F. and Smyth, D. G. (1988). Peptide amidation: evidence for multiple molecular forms of the amidating enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154:1293-1300.

Campbell, A. M. (1991). Monoclonal Antibodies and Immunosensor Technology Elsevier. The Netherlands. 427 pp.

Cassadevall, A. (1996). Antibody-Based Therapies for Emergin Infectious Diseases. Emerging Infect. Dis. 2(3):200-208.

Cosimi, A. B. (1995). Future of monoclonal antibodies in solid organ transplantation. Diges. Dis. Science. 40(1):64-72.

DeSouza, E. B., Kuhar, M.J. (1986). Methods Enzymol. 124:560-590.

Eipper, B. A., Stoffers, D. A., Mains, R. E. (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. Annu. Rev. Neurosci. 15:57-85.

Eipper, B. A., Milgranas, L., Husten, E. J., Yun, H. Y., Mains, R. E. (1993). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. Protein Sci. 2:489-497.

Fazekas de St. Groth, S. and Scheidegger, D. (1980). Production of monoclonal antibodies: a brief review. J. Immunol. Methods. 47:129-144.

Literatura consultada

- Glauder, J., Ragg, H., Rauch, J., Engels, J. W. (1990). Human peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: cDNA, cloning and functional expression of a truncated form in COS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169: 551-558.
- Goding, J. W. (1996). *Monoclonal antibodies: principles and practice*. Academic Press. London, 491 pp.
- Harlow, E. and Lane, D. (1999). *Using Antibodies. A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 495 pp.
- Harris, W. J. (1995). Production of Humanized Monoclonal Antibodies for *in vivo* Imaging and Therapy. *Biochemical Society Transactions*. 23:1035-1038.
- Harvey, S. (1990). Thyrotrophin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor. *J. Endocrinol.* 125: 345-358.
- Hockfield, S., Carlson, S., Evans, C., Levitt, P., Pintar, J., Silberstein, L. (1993) In: *Molecular Probes of the Nervous System: Selected Methods for antibody and nucleic acid Probes*. Vol. 1. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Lew, R., and Smith, I. (1996). *Meth. Neurosci.* 23:219-236.
- Mains, R. E., Dickerson, I., May, V., Stoffers, D. A., Perkins, S. N., Quafik, L. H., Husten, E. J., Eipper, B. A. (1990). *Front. Neuroendocrinol.* 11:52-89.
- Mizuno, K., Sakata, J., Kojima, M., Kangawa, K., Matsuo, H. (1986). Peptide C-terminal alpha-amidating enzyme purified to homogeneity from *Xenopus laevis* skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:984-991.

Literatura consultada

Murthy, A. S. N., Manis, R. E., Eipper, B. A. (1986). Purification and characterization of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase from bovine neurointermediate pituitary. *J. Biol. Chem.* 261:1815-1822.

Noguchi, M., Takahashi, K., Okamoto, H. (1989). Rat peptidylglycine alpha-amidating enzyme: the relation between activities at neutral and alkaline pH Values. *Arch. Biochem. Biophys.* 275:505-513.

Ostberg, L. and Queen, C. (1995). Human and humanized monoclonal antibodies: Preclinical studies and clinic experience. *Biochem. Soc. Trans.* 23:1038-1043.

Richter, K., Eggen, R., Kreil, G. (1987). D-alanine in the frog skin peptide dermorphin is derived from L-alanine in the precursor. *Science* 238:200-202.

Roitt, I. (1998). *Inmunología, Fundamentos*. Panamericana. Buenos Aires. 497 pp.

Scott, F. M., Treston, A., Avis, I., Kasprzyk, P., Eipper, B.A., et al. (1990). *Clin. Res.* 38:248A.

Tamburini, P. P., Young, S. D., Jones, B., Plainesiu, R., Consalvo, A. P. (1990). Peptide substrate specificity of the alpha-amidating enzyme isolated from rat medullary thyroid (A-77 cells). *Int. J. Pept. Protein Res.* 35:153-156.

Tatemoto, K. and Mutt, V. (1978). Chemical determination of polypeptide hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5115-4119.

Literatura consultada

- Tatemoto, K. and Mutt, V. (1981). Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:6603-6607.
- Tatemoto, K. (1982a). Neuropeptide Y: complete amino acid séquence of the brain peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:5485-5489.
- Tatemoto, K. (1982b). Isolation and characterization of peptide YY (pYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:5485-5489.
- Tatemoto, K., Carquist, M., McDonald, T. J., Mutt, V. (1983). Isolation of a brain peptide identical to the intestinal PHI (peptide HI). FEBS Lett. 153:248-252.
- Tatemoto, K., Jornvall, H., Siimesmaa, S., Halden, G., Mutt, V. (1984). FEBS Lett. 174 (2) 2S9-293.
- Tazi, A., Dantzer, R., LeMoal, M., Rivier, J., Vale, W., Koob, G. F. (1987). Corticotropin-releasing factor antagonist blocks stress-induced fighting in rats. Regul. Pept. 18:37-42.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue bovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. Science. 213: 1394-1397.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. Science. 291:1304-1351.

Literatura consultada

Young, W. S. I. (1990). In situ hybridization histochemistry. In: Bjorklund, A., Hokfelt, T., Wouterlood, F. G., Van den Pol, A. N. (Eds.) Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 8. Elsevier, Amsterdam, pp. 481-512.