



46
21

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

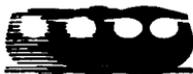
**COMPARACION DE ANTICUERPOS ANTI- α Gs
PRODUCIDOS EN CONEJO Y GALLINA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO JASSO CHAVEZ



MEXICO, D. F.,

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis padres

Jovita y José:

Como muestra de agradecimiento,

al esfuerzo y dedicación con que guiaron a cada uno de sus hijos,

dándonos siempre lo mejor de su vida.

A mis hermanos

Araceli, Antonio y Alejandro:

Por su amor, confianza y apoyo incondicionales;

pues sin ellos no lo hubiera logrado.

A Mitzi

Por haber estado conmigo en cada momento,

dándome otra visión de la vida...

Gracias.

Agradezco especial y profundamente a la Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez,
que con sus enseñanzas y amistad ha enriquecido mi vida,
tanto académica como personalmente.

A mis compañeros de laboratorio, Aliesha, Alicia, Mariana y Georgina.
Por su ilimitada ayuda.

A Lariza, Adriana, Elena, Enrique, Miguel Angel, Carlos,
Hugo, Juan Pablo y Ruperto.
Porque desde siempre he contado con su amistad.

A Aliesha, Gabriel, Edel, Raymundo y a todos
mis compañeros y amigos de generación,
por su amistad y apoyo, compartiendo conmigo
ésta importante etapa de nuestras vidas.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Medina Jimenez Beatriz Albina.

Vocal: Prof. León Chapa Saturnino De.

Secretario: Prof. Torres Márquez Ma. Eugenia.

1er. Suplente: Prof. García Tamayo Frenando.

2o. Suplente: Prof. Castillo Martinez Alicia.

El tema se desarrolló en los Departamentos de Bioquímica tanto del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" como de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Este trabajo se realizó con apoyo del donativo de CONACYT 3107-N9306.

2018 E. T. Torres Márquez
Asesor del Tema: Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez.

Sustentante: Ricardo Jasso Chávez.



INDICE.

CONTENIDO.	PAGINA.
Introducción.	
Características generales de la proteína G	1
Estructura de la Subunidad α	4
Diversidad de la Proteína G	8
Activación de Proteínas G por Receptores.....	11
Especificidad del Acoplamiento Receptor-Proteína G.....	12
Acoplamiento Receptor-Proteína G-Efector.....	12
Justificación de la Generación de Anticuerpos.....	14
Antecedentes.	
Decapeptido RMHLRQYELL	16
Huevos como fuente conveniente de Anticuerpos.....	17
Objetivos.	
Objetivo general	19
Objetivos particulares.....	19
Materiales y Métodos.	
Preparación del Antígeno y Esquema de Inmunización de los nimaes.....	20
Obtención de los Anticuerpos.....	20
Purificación Parcial de las IgG	22
Aislamiento de Membranas de Hígado de Rata.....	22
Aislamiento Parcial de Proteínas G de membranas de Eritrocito de Pavo	23
Electroforesis e "Immunoblotting".....	24
ELISA.....	25

Ensayos de la Adenilato Ciclasa.....	26
Resultados.	
Ensayos de ELISA.....	28
Figura 1.....	29
Figura 2.....	30
Figura 3.....	31
Figura 4.....	32
“Immunoblot”.....	33
Actividad de la Adenilato Ciclasa.....	33
Figura 5.....	34
Figura 6.....	35
Cantidad de Anticuerpos Producidos.....	36
Tabla 1.....	37
Discusión y Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	43

TABLA DE ABREVIATURAS.

AC: Adenilato Ciclasa.

AMPC: Adenosin monofosfato ciclico.

AR: Receptor adrenérgico.

BCIP: Bromo-Cloro-indolil fosfato

CTX: Toxina del Cólera.

GDP: Guanosin difosfato

GTP: Guanosin trifosfato.

GTP γ S: Guanosin-5'-O- (2-tiotrifosfato).

Gi: Proteína G inhibitoria.

Gs: Proteína G estimulatoria.

Gt: Proteína G "transducina".

IgG: Inmunoglobulina G.

IgY: Inmunoglobulinas totales.

NBT: Azul de nitrotetrazolio.

PBS: Amortiguador Salino de Fosfatos.

PEG: Polietilenglicol.

PTX: Toxina Pertussis.

TBS: Amortiguador Salino de Tris.

7-TMS: Receptores de siete dominios transmembranales.

SÍMBOLOS DE LOS AMINOÁCIDOS.

Alanina.	Ala	A	Metionina.	Met	M
Asparagina/	Asx	B	Asparagina	Asn	N
Ac. aspártico.					
Cisteína.	Cis	C	Prolina.	Pro	P
Ac. Aspartico.	Asp	D	Glutamina.	Gln	Q
Ac. Glutámico.	Glu	E	Arginina	Arg	R
Fenilalanina.	Phe	F	Serina.	Ser	S
Glicina.	Gli	G	Treonina	Tre	T
Histidina.	His	H	Valina.	Val	V
Isoleucina.	Ile	I	Triptófano.	Trp	W
Lisina.	Lys	K	Tirosina	Tyr	Y
Leucina.	Leu	L	Glutamina/	Glx	Z
			Ac. glutámico.		

INTRODUCCIÓN.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PROTEÍNA G.

Las proteínas G son una subfamilia pertenecientes a una superfamilia de proteínas enlazadas a GTP que incluyen a las proteínas ras y ras-like [1, 2]. Aunque se presenta una substancial diversidad en la subfamilia de las proteínas G, sus miembros tienen ciertas características comunes en estructura y función. Por definición, todas son heterotrimeros consistentes de subunidades α , β y γ , cada una codificada por distintos genes. La subunidad α es la que presenta homología estructural y funcional con otros miembros de la superfamilia de proteínas enlazadas a GTP. Estas enlazan a los nucleótidos de guanina con una alta afinidad y especificidad y poseen actividad intrínseca de GTPasa. Las subunidades β y γ están asociadas estrechamente pero no en forma covalente para formar un complejo funcional $\beta\gamma$.

La función de las proteínas G es como transductores de información a través de la membrana celular por acoplamiento de diversos receptores a efectores. Estas actúan como interruptores con un estado de "apagado" y "encendido" gobernado por el ciclo de la GTPasa (fig. 1).

Los receptores activados por una señal extracelular apropiada (hormonas, neurotransmisores, olores y fotones de luz) funcionan como factores de cambio, permitiendo que el fuerte y estrecho enlace con GDP de la subunidad α sea reemplazado por el enlace con GTP. Ciertas toxinas bacterianas modifican la función de la proteína G por transferencia de la ADP-ribosa del NAD hacia aminoácidos específicos dentro de la subunidad α . La PTX y la CTX, modifican covalentemente un subconjunto de subunidades α e inhiben el intercambio del nucleótido de guanina por bloqueo del receptor donde se acopla la proteína G. Puesto que las concentraciones intracelulares de GTP exceden a las de GDP por lo menos en una orden de magnitud, generalmente se asume que existe la misma afinidad para GDP que para GTP, el sitio "vacío" puede ser llenado por GTP después de la liberación de GDP. Las diferentes proteínas G presentan diferentes velocidades intrínsecas de intercambio de nucleótidos de guanina en ausencia del receptor [3-5].

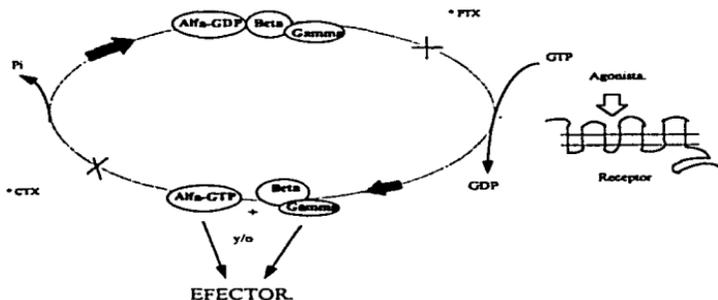


Figura 1. El ciclo de la GTPasa de la proteína G. En su estado basal o estado inactivo, la subunidad α está unida a GDP y está asociada como un heterotrímero con el complejo $\beta\gamma$. La interacción con la porción intracelular de un receptor activado por su agonista conduce al recambio de GDP por GTP. El enlace con GTP conduce a la disociación de la proteína $G\alpha$ tanto del receptor como de las subunidades $\beta\gamma$. La subunidad α -GTP interactúa con y regula efectores, como en algunos casos también lo hace $\beta\gamma$. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α conduce a la hidrólisis de GTP a GDP + P_i . Esto causa la disociación de la subunidad α del efector y su reasociación con $\beta\gamma$, dando fin al ciclo. Las toxinas bacterianas modifican covalentemente a la subunidad α y por lo tanto alteran la transducción de señales (ver texto).

El enlace de GTP conduce a un cambio en la conformación de la subunidad α [6] que provoca la activación de la proteína G y la disociación de la subunidad α enlazada al GTP del complejo $\beta\gamma$. Se ha sugerido [7], que la disociación de las subunidades de la proteína G también ocurre *in situ* (p. ej. membranas enlazadas a proteínas G), y es esencial para la regulación del efector, ya sea por la subunidad α [8], o por el complejo $\beta\gamma$ [9] o por ambos [10].

La activación de la proteína G está determinada por la actividad de la GTPasa intrínseca a la subunidad α . Aunque es relativamente baja la actividad de GTPasa de la subunidad α ($\approx 2-4$ GTP hidrolizado por minuto) es más rápida por varios ordenes de magnitud en comparación con la subfamilia de proteínas de bajo peso molecular unidas a GTP [2, 6]. Para éstas últimas, se han identificado distintas proteínas activadoras de GTPasa ya que estas proteínas no tiene esta capacidad de hacerlo por si mismas, no se han identificado este tipo de proteínas para la subunidad α , ya que esta función de GTPasa parece estar dada por un dominio dentro de la misma subunidad α .

El enlace de analogos no hidrolizables de GTP conducen a la activación persistente de proteína G. La CTX cataliza la modificación de α_s , provoca una estimulación en la formación de AMPc mediante la proteína G, inhibe la actividad de GTPasa y conduce a la activación persistente por su ligando natural, el GTP.

Los iones de fluoruro (en la forma de complejos de fluoruro de aluminio) también causan la activación persistente de la proteína G. El complejo se enlaza adyacente a GDP y aparenta ser el grupo γ -fosfato del GTP [11]. Interesantemente, a pesar de la alta conservación de los aminoácidos involucrados en el enlace del nucleótido de guanina a través de la superfamilia, únicamente la subunidad α es aparentemente capaz de ser activada por fluoruro [11, 12]. En la hidrólisis de GTP a GDP, la subunidad α regresa a su conformación original, teniendo otra vez una alta afinidad por el complejo $\beta\gamma$.

La formación del heterotrimeró es requerida por la alta afinidad de acoplamiento de la proteína G al receptor [13, 14].

ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD α .

Las subunidades α interactúan con los nucleótidos de guanina, el complejo $\beta\gamma$, receptores, efectores y membranas celulares y tal vez con otras estructuras no identificadas. Dada la multiplicidad de interacciones, no es de sorprenderse que el total de la secuencia de aminoácidos de una proteína G, en particular la subunidad α tienda a estar muy conservada. Hasta el momento se han identificado 30 tipos de subunidades α [15].

Ciertas regiones de todas las subunidades α están muy altamente conservadas (> 90%), mientras que otras son mucho más distintivas para un subtipo en particular (<60% de conservación) [2, 16, 17]. Las regiones terminales están involucradas probablemente en las interacciones proteína-proteína (p.ej. acoplamiento del receptor y efector) único para cada subtipo. Las regiones más altamente conservadas entonces determinan funciones en común, como enlazar GTP e hidrolizarlo. Estudios de mutagénesis dirigida, de mutantes espontáneos, construcción de subunidades α químicas y estudios de química de proteínas han ayudado a conocer en detalle pero de manera incompleta, la relación entre la estructura y función de la subunidad α .

El análisis cristalográfico de la estructura tridimensional basado en los rayos X es incompleto, pero las extrapolaciones de la estructura cristalina disponibles de ras p21 [6, 17-21] han proporcionado información adicional.

El peso de las subunidades α varía entre 39 y 52 KDa, peso molecular aparente basado en la electroforesis en gel con SDS. Hay cinco regiones discontinuas de la secuencia primaria de la subunidad α que representan la secuencia altamente conservada, no solamente a través de la subfamilia de las subunidades α , sino también a través de la superfamilia de proteínas enlazadas a GTP (Figura 11). Las extrapolaciones de la estructura cristalina de ras p21 apoyan la idea de que estas regiones de la subunidad α están involucradas en el enlace con el GTP. Se han asignado varios nombres usados para cada región pero se han referido más comúnmente como G1-G5 [6, 22]. G1 tiene el consenso GXXXXGK(S/T), (cada letra es un aminoácido donde X es cualquier residuo) y sabemos que está involucrado en el enlace fosfato de todos los tipos de proteínas unidas a nucleótidos. El último residuo de G1 participa presumiblemente en el enlace del ion magnesio. Muchas subunidades α tienen la secuencia GAGESGKS para G1, pero algunas clonadas más recientemente como la αz

(GTSNSGKS) y α q (GIGESGKS) varían en estos aminoácidos y esto puede ser fundamental para determinar su baja velocidad para liberar GDP [4, 23, 24]. Mutaciones en esta región de la subunidad α pueden disminuir la actividad de GTPasa [22, 25-27], pero no conducen a una activación constitutiva poderosa como sucede en ras p21.

G2 incluye un residuo de treonina altamente conservado que puede interactuar con el ion magnesio unido a los fosfatos β y γ del nucleótido de guanina [6]. G3 tiene la secuencia DVGCQ en todas las subunidades α y puede estar involucrado en el cambio conformacional crítico producido por el reemplazamiento de GDP por GTP, y en la hidrólisis del enlace de alta energía del GTP. La glutamina (Q) corresponde a la posición 61 en ras p21, el cual cuando es mutado reduce la actividad de GTPasa y causa una activación constitutiva y una transformación maligna en fibroblastos. Mutaciones similares en varias subunidades α causan así mismo una reducción en la actividad de la GTPasa y una activación constitutiva de las vías efectoras [25, 26, 28-30]. En las subunidades α s, la mutación de ambos residuos de glicina adyacentes a G3 (DVGGQ) bloquean la activación por GTP. Este contraste con ras p21, en el cual la mutación de glicina 59 o la glutamina 51 causa una activación constitutiva equivalente.

La región G4 que tiene la secuencia NKXD está involucrada en el enlace al anillo de purina del nucleótido de guanina, esta región confiere especificidad para la guanina. G5 es usualmente TCAXDT en las subunidades α , puede también interactuar indirectamente con el nucleótido de guanina.

La CTX cataliza la ADP-ribosilación de un residuo de arginina (Arg²⁰¹) en la forma larga de α s) dentro de la región G2. Ordinariamente sólo la α s es un buen sustrato para la CTX a pesar de que este residuo de arginina está conservado en todas las otras subunidades α . Es posible que esto refleje un requerimiento conformacional único, ya sea por acercamiento o distanciamiento de un residuo de un aminoácido desconocido. Bajo ciertas condiciones (activación del receptor y remoción del nucleótido de guanina), otras subunidades α también son sustratos de CTX [31]. La ADP-ribosilación catalizada por CTX de cada subunidad α puede requerir la creación de un "sitio vacante" [32]. La modificación por CTX inhibe la actividad de GTPasa y provoca una activación constitutiva, no sólo de α s sino también otros sustratos quiméricos como la α i2 [33]. La mutación del mismo residuo de arginina inhibe la

actividad de GTPasa y causa una activación constitutiva comparable con la causada por modificación covalente del residuo por CTX [34, 35]

La PTX también cataliza la ADP-ribosilación, pero el aceptor es un residuo de cisteína, cuarto a partir del carboxilo terminal [36]. Esto conduce a un desacoplamiento de la proteína G del receptor pero no modifica otros aspectos claves de la función de la proteína G como el intercambio de nucleótidos de guanina, ni la actividad de GTPasa [37]. La mutación de un residuo de arginina, sexto a partir del carboxilo terminal de las también conduce a un desacoplamiento al receptor [38, 39]. Esto y otras evidencias sugieren que la porción del carboxilo terminal es crítico en las interacciones con el receptor.

Dada la alta variación de la región entre G1 y G2, se tiende a especular que está involucrada en las interacciones con el efector [17], pero datos más recientes de proteínas G quiméricas [40-41] y de mutagénesis directa [21,42] indican que la región de interacción con el efector está dentro del tercer carboxilo terminal de la subunidad α .

La región entre G1 y G2 puede entonces representar una proteína tipo GAP endógena para las subunidades α [6].

Las extrapolaciones hechas de ras p21 de su estructura cristalina sugieren que el amino y carboxilo terminal de las subunidades α pueden estar cercanas y orientadas hacia la superficie membranal [19]. Existen evidencias a partir de la construcción quimérica de ambas terminaciones, que éstas pueden estar involucradas en la supresión de la disociación de GDP y en la interacción con el complejo $\beta\gamma$ [22, 41, 43]. El rompimiento proteolítico del amino terminal, una porción de 1-2 KDa de la subunidad α , elimina la interacción con el complejo $\beta\gamma$ [44].

Para ciertas subunidades α , la miristoylación de un residuo de glicina amino terminal es requerido para una alta afinidad de interacción con el complejo $\beta\gamma$ [45, 46]. De una manera interesante, a pesar de la evidencia que involucra al carboxilo terminal en el acoplamiento al receptor, el mastoparan (un péptido que mimetiza al receptor acoplado a la proteína G), presentó un enlace cruzado a un residuo de cisteína cercano al amino terminal de la subunidad α [47]. Esto puede reflejar una proximidad del amino y carboxilo terminales de las subunidades α , y la interacción de ambos, receptores y complejos $\beta\gamma$ con estas regiones.

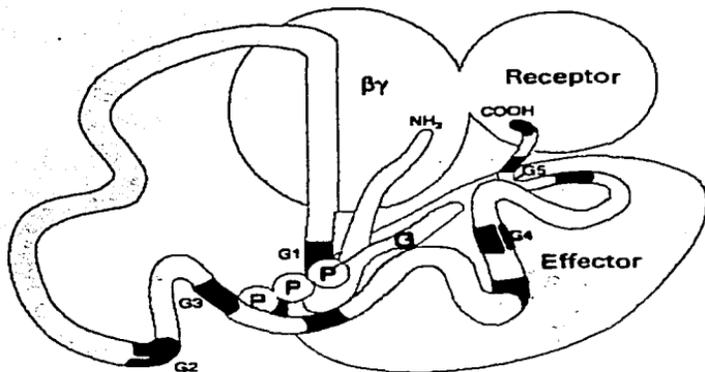


Figura II. Vista esquemática de la subunidad α de G_s . La figura está diseñada para resaltar las funciones propuestas y una relación espacial general de las diferentes regiones de una subunidad α , no está representando la actual estructura tridimensional de la proteína. La subunidad α es vista desde el citosol, con la membrana plasmática de fondo. El enlace a GTP está representado como PPP-G. El extremo amino terminal (involucrado en el enlace con $\beta\gamma$ y en la atenuación de la liberación de GDP) y el extremo carboxilo terminal (involucrado en el acoplamiento con el receptor) de la subunidad, están representados en la proximidad de la membrana. El complejo $\beta\gamma$ es requerido para la activación de la subunidad α por el receptor. Las cinco secuencias conservadas involucradas en el enlace al nucleótido de guanina y su hidrólisis están representadas por bandas oscuras (G1-G5). G1 está involucrada en el enlace de los fosfatos α y β del nucleótido. El residuo de Arg²⁰¹ en la región G2 es el sitio de la ADP-ribosilación por la CTX. G3 es crítico en el cambio conformacional que resulta del reemplazamiento de GDP con GTP y en la hidrólisis del fosfato γ . G4 y G5 están involucrados en el enlace con el anillo de guanina del nucleótido.

DIVERSIDAD DE LA PROTEÍNA G

Al principio las proteínas G fueron identificadas y caracterizadas por su funcionalidad Gs y Gi representaron proteínas G que mediaban estimulación e inhibición de adenilato ciclasa respectivamente; Gt (transducina) representa la proteína G fotorreceptora involucrada en el acoplamiento de rodopsina activada por luz a la fosfodiesterasa de GMPc. La susceptibilidad de modificaciones covalentes (y funcionales) por toxinas bacterianas también son de utilidad en la identificación, y algunas subunidades α de las proteínas G no están exentas de estas modificaciones. El primer efecto reconocido de la PTX fue la prevención de un receptor mediado por inhibición de la adenilato ciclasa [48]. De aquí que "Gi" fue el primer sustrato reconocido para PTX. Pronto se observó que la PTX puede bloquear la regulación del receptor de otras vías efectoras incluyendo ciertos canales de calcio y potasio. Esto trajo confusión en la identificación de las proteínas G sensibles a PTX involucradas en la regulación de cada vía.

La purificación y caracterización bioquímica de las proteínas G revelaron una diversidad que no se había anticipado en la subfamilia. Las proteínas correspondientes a Gs, Gt y Gi fueron purificadas [13, 48-51], pero surgieron proteínas nuevas de función desconocida. Por ejemplo, todas las proteínas G que son abundantes en el cerebro sólo se consideraban un nuevo sustrato para PTX, a las cuales se les llamo Go [52]. Además de la purificación, otros esfuerzos adicionales revelaron heterogeneidad bioquímica compatibles con múltiples subtipos de Gi y Go [53]. Evidencias inmunológicas también sugirieron una multiplicidad de subtipos de Gi [54]. La clonación molecular de DNA complementario (cDNA) que codifican a la subunidad α dio una clara evidencia de múltiples subtipos de α [55].

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa permitió la identificación de un número de distintos genes [56, 57] que codifican para por lo menos 15 subunidades α de mamíferos. Además de la diversidad que se logró por uniones alternativas de los genes de α s (cuatro formas) y α o (dos formas) [58, 59]. Para cada subtipo de una subunidad α , la secuencia de aminoácidos es altamente conservada (generalmente > 95%) a través de las especies de mamíferos.

Las subunidades α de mamífero pueden ser agrupadas dentro de cuatro clases [16] basadas en la identificación de aminoácidos y presumible distancia evolutiva (ver tabla I): 1) α s y α olf, 2) α 11, α 12, α i1, α i2, α i3, α o y α z, 3) α q, α 11, α 14, α 15/16, 4) α 12, α 13. α 15 que es aparentemente el equivalente murino de la α 16 humana [16], el cDNA de la subunidad α de hígado de bovino es llamado α L1 y α L2 [60] correspondiente a α 14 y α 11 [16], respectivamente, y el cDNA llamada α y del retinal humano corresponde a α 11 [61]. Otro cDNA nuevo, α _{guai}, ha sido aislado de las papilas gustativas de rata [62]. El análisis por "northern" e "immunoblot" han ayudado a definir el rango de expresión de las proteínas codificadas. Estos rangos van desde altamente restrictivos, como es el caso de las proteínas G involucradas en la transducción visual y olfatoria, hasta las proteínas tan ubicuas como son las involucradas en la regulación de AMPc como segundo mensajero. La nomenclatura arbitraria (letras y/o números usados para designar los subtipos) obviamente no reflejan en gran medida su función, puesto que en muchos casos definitivamente, se carece, del conocimiento concerniente a la función o funciones de un subtipo dado.

También existe cierta diversidad entre las subunidades $\beta\gamma$ [16], y actualmente no es claro como se combinan para formar los distintos complejos $\beta\gamma$. Hay algunas indicaciones de que dependiendo de los complejos $\beta\gamma$ estos pueden tener propiedades distintas con respecto a la subunidad α [63] y a las interacciones con el receptor [64, 65]; ésto se está estudiando actualmente por diferentes grupos.

Las proteínas G se encuentran representadas en una gran cantidad de organismos [66-69]. Aún con las distancias evolutivas, la conservación de la secuencia primaria entre las proteínas de mamífero y sus contrapartes no mamíferas es sorprendente [2, 16]. Hay algunos subtipos de proteína G que parecen estar conservados no sólo en estructura sino también en función. Gs, por ejemplo, estimula la formación de AMPc tanto en la mosca de la fruta [70], como en el protozooario *Euglena gracilis* [71], y en los mamíferos. En otros contextos, las proteínas G han evolucionado para tener una función única como un factor en la vía de apareamiento en levaduras fermentativas [72] y agregaciones celulares en el limo [68]. La clonación de proteínas G ha revelado nuevas proteínas G cuya función específica está por identificarse.

TABLA I.

Diversidad de la Subunidad α en Mamíferos.

SUBUNIDAD α .	SUBSTRATO PARA TOXINA.	SE EXPRESA EN:	EFECTOR.
Gs	CTX.	Ubicua.	Estimula AC, canales de calcio.
G _{ar}	CTX.	Olfato.	Estimula AC.
Gt1	PTX/CTX.	Fotorreceptores de los bastones.	Estimula fosfodiesterasa de GMPC.
Gt2	PTX/CTX.	Fotorreceptores de los conos.	Estimula fosfodiesterasa de GMPC.
Gi1	PTX.	Neuronas y otros tejidos.	Inhibe AC, estimula canales de calcio.
Gi2	PTX.	Ubicua.	Inhibe AC, estimula canales de calcio.
Gi3	PTX.	Neuronas y otros tejidos.	Inhibe AC, estimula canales de calcio
Go	PTX.	Neuronas y endocrino.	Inhibe canales de calcio.
Gz	—	Neuronas y plaquetas.	?
Gq	—	Ubicua	Estimula fosfolipasa C- β .
G11	—	Ubicua.	Estimula fosfolipasa C- β .
G14	—	Hígado, pulmón, riñón.	Estimula fosfolipasa C- β .
G15/16	—	Células sanguíneas.	Estimula fosfolipasa C- β .
G12	—	Ubicua.	?
G13	—	Ubicua.	?

ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS G POR RECEPTORES.

La identificación y caracterización de miembros de la familia de los receptores de siete dominios transmembranales (7-TMS) ha progresado rápidamente [73, 74]. Cuando un agonista se enlaza a uno de estos receptores, la perturbación molecular es conducida a través de las hélices embebidas en la membrana hacia la cara citoplasmática de la proteína. El análisis hecho de los efectos en mutantes con delección y en receptores quiméricos, ha permitido estudiar el efecto en la secuencia de péptidos correspondientes a porciones del receptor. También los anticuerpos dirigidos contra diferentes regiones citoplasmáticas, han sido utilizados para mapear los sitios potenciales de interacción entre el receptor y la proteína G [73, 75, 76]. Hay evidencias concernientes a la participación de algunos dominios intracelulares del receptor que están involucrados en el acoplamiento a las proteínas G. Estos dominios incluyen la segunda y tercera asas citoplásmicas, especialmente los segmentos del amino y carboxilo terminal y el segmento amino terminal de la cola citoplasmática. Las porciones de las asas intracelulares de un receptor son importantes para determinar la afinidad relativa de diferentes proteínas G y transmitir la señal producida por el enlace con el agonista. Un mutante con una delección de siete aminoácidos (residuos 267-273) en la región carboxilo terminal en la tercera asa citoplasmática de un receptor β_2 -adrenérgico (AR) retiene su capacidad para enlazarse a Gs sin ser capaz de transmitir una señal estimulatoria [77]. Aunque este descubrimiento sugiere que las funciones de enlace y activación pueden estar conducidas por discretos dominios citoplasmáticos, péptidos relativamente pequeños son capaces de actuar como receptores-miméticos [78, 79]. Por ejemplo, un péptido correspondiente al residuo 259-273 de β_2 AR es capaz de potenciar el enlace de un agonista para ocupar el receptor y activar a Gs [80]. Además los péptidos retienen la relativa selectividad del receptor nativo para Gs o Gi.

La proteína cinasa A cataliza la fosforilación de un residuo de serina correspondiente al sitio que puede ser modificado durante la desensibilización del receptor, esto provoca que no solo se pierda la capacidad del péptido para activar Gs sino potenciar de otro modo una débil activación de Gi. Estos descubrimientos enfatizan la importancia del dominio del C-terminal de la tercera asa intracelular del receptor en la activación de las proteínas G y eleva las especulaciones de la posibilidad

de que el acoplamiento específico no es una propiedad estática de los receptores, sino más bien podría estar dinámicamente regulada en la célula.

ESPECIFICIDAD DEL ACOPLAMIENTO RECEPTOR-PROTEÍNA G.

Una célula viva contiene una gran variedad de receptores 7-TMS, proteínas G, y proteínas efectoras. Hay múltiples receptores en la célula que pueden converger con un solo subtipo de proteína G. Un solo subtipo de receptor molecular es capaz de acoplarse a más de un tipo de proteína G en una reconstitución artificial [14, 81] y estudios de transfección [28, 82], pero si esto ocurre naturalmente va a ser muy difícil probarlo por la posible heterogeneidad del receptor *in vivo* [83]. La inmunoprecipitación selectiva de un solo tipo de receptor molecular muscarínico de tres diferentes tejidos, usando un anticuerpo monoclonal definido, demostró que este receptor parece estar asociado con un complemento diferente del sensible a PTX en proteína G en cada área [84].

La microinyección de anticuerpos contra C-terminal de α_0 y α_2 dentro de células vivas es capaz de producir disrupción de inhibición de canales de calcio mediado por α_2 AR [85] y la inhibición de síntesis de DNA por anticuerpos anti-G₁₂ [86], respectivamente. Altas concentraciones de péptidos sintéticos pertenecientes al C-terminal de la subunidad α han sido usados para generar anticuerpos y, estos mismos han sido capaces de impedir el acoplamiento del complejo receptor-proteína G [87]. Concentraciones relativamente altas de anticuerpo antipéptido son requeridas para impedir el acoplamiento receptor-proteína G, aún cuando se tiene una preparación purificada por una columna de afinidad, se espera que con una pequeña proporción de anticuerpos se obtenga una gran afinidad para la conformación nativa de la subunidad α [88].

ACOPLAMIENTO RECEPTOR-PROTEÍNA G-EFECTOR.

Algunos de los métodos usados para definir la especificidad del acoplamiento del receptor-proteína G, incluyendo la reconstitución de proteína, transfección con

cDNA, el uso de anticuerpos contra C-terminal de las subunidades α , aislamiento de componentes del complejo, tecnología de oligonucleótidos antisentido, son aplicables para definir la especificidad del acoplamiento proteína G-receptor y para la interpretación de los resultados. En la activación de las vías efectoras no sabemos si están asociadas con un receptor en particular *in vivo* que muchas veces puedan observarse con receptores sobreexpresados en un sistema heterólogo y algunos de estos efectos pueden ser indirectos, o de significancia fisiológica cuestionable [89, 90]. Las conclusiones acerca de la especificidad del acoplamiento han demostrado que depende tanto de la expresión del receptor como de la célula utilizada para la transfección, incluyendo el tipo de proteínas G y efectores que contienen las células. Investigaciones recientes en la proteína Gt acerca de la estructura tridimensional han revelado los sitios de enlace del receptor y de $\beta\gamma$ en la subunidad α . Una superficie de la proteína G que interactúa con el 7-TMR está localizada cerca de la membrana. Se ha propuesto que los cambios inducidos en 7-TMR provoquen un contacto con el anillo de guanina del GDP. Así, el cambio conformacional inducido por el 7-TMR puede ser propagado desde la membrana hasta el asa que los conecta justo en el lugar de unión a GDP [91].

El arreglo del receptor activado y las subunidades de la proteína G ocasionan de alguna manera en el paso de la activación de la proteína G, la liberación de GDP del heterotrímero α -GDP- $\beta\gamma$. Este paso probablemente participe en la interacción entre el receptor activado y el carboxilo terminal en permitir la liberación de GDP. Después de la liberación de GDP, el segundo paso en la activación de la proteína G es la entrada de GTP en su sitio de unión, dando como resultado un cambio conformacional que conduce a la disociación de G α de $\beta\gamma$ y del receptor activado. Aunque los detalles del mecanismo de como ocurre el segundo paso aún son oscuros, se ha propuesto que el cambio inducido por el GTP en la conformación de la región de α h2 (la superficie de α Gs que interacciona con el efector contiene una región α h2 que se conoce es la que sufre el cambio conformacional inducido por GTP), participa en alguna forma en el enlace de $\beta\gamma$. El receptor activado por sí mismo puede tener un papel activo en la promoción de este segundo paso, como se ha sugerido por mutaciones en la rodopsina que previene la liberación de Gt de la fotorrodopsina inducida por GTP [92].

Dos diferentes enfoques experimentales aplicados a dos diferentes pares de subunidad α -efector, han identificado regiones similares de interacción con el efector

situadas en el lado opuesto de G α . Experimentos de mutagénesis en α s revelaron tres regiones en las cuales la sustitución de residuos modificaban la estimulación de la adenilato ciclasa [42], sin alterar la expresión o el cambio conformacional de la proteína mutante inducida por GTP [21]; sin embargo se encontró que para dos de estas tres regiones, la sustitución de una secuencia de aminoácidos relevantes para α s en un contexto de α_2 restablecía la capacidad de una proteína quimérica α_2 - α s para estimular a la adenilato ciclasa. Estas regiones se ubican en la parte trasera de la proteína G que está viendo hacia la membrana.

Las subunidades α estimulan al efector únicamente en sus formas enlazadas a GTP, la superficie de α Gs que interacciona con el efector contiene una región ha2 que se conoce es la que sufre el cambio conformacional inducido por GTP. Así, un efector enlazado a la cara posterior de la G α sirve como una proteína activadora de la GTPasa, aún cuando el lugar de enlace del GTP a la G α se localice en la cara frontal [93].

JUSTIFICACIÓN DE LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS.

La primera herramienta utilizada para determinar y definir la especificidad del acoplamiento entre el receptor y la proteína G en membranas nativas fue la PTX, ya que el tratamiento con PTX daba como resultado proteínas G incapaces de recibir las señales del receptor, la inhibición de vías por toxinas dieron evidencias de que una o más formas de Gi y Go estaban participando pero no proporcionaba información más específica [94].

Los anticuerpos selectivos contra un péptido C-terminal que se enlazan a la misma región de la subunidad α que es modificada por la PTX, previenen la activación por el receptor, éstos sí de manera específica, ya que se ha reportado que el carboxilo terminal de las subunidades α de las proteínas G gobiernan en parte la interacción específica de las proteínas G con los receptores [17].

Los anticuerpos generados por un decapeptido sintético que representa el C-terminal de α Gs (llamados RM), han sido caracterizados en "immunoblot" y estudios funcionales. Los experimentos realizados con anticuerpos anti- α Gs de C-terminal describen un significado acerca del blanco en la interacción funcional de proteínas G específicas con

receptores y efectores [95]. Se han hecho estudios funcionales con RM y se ha observado que son capaces de inmunoprecipitar complejos de α -adenilato ciclasa activada por GTP γ S o fluoruro a partir de extractos con detergente. La regi3n del de-ap3ptido del C-terminal no es sin embargo esencial para el enlace con el efector por α s, pero puede servir como una herramienta para identificar el complejo proteina G-efector bajo condiciones similares de preactivaci3n por el uso de anticuerpos. Una clara definici3n de las interacciones relevantes de las proteinas G individuales, es un prerrequisito para un conocimiento general de las caracteristicas estructurales de las proteinas G que permite su interacci3n con receptores y efectores, siguiendo fielmente la transducci3n de se1ales [96].

En este sentido existen dos enfoques, el enfoque bioquimico y el de Biologia Molecular. En este trabajo se eligi3 en primer lugar obtener los anticuerpos para identificar estas proteinas que ser3n clonadas posteriormente en el laboratorio. Para este y otros objetivos del laboratorio es necesario el producir 3stos anticuerpos, que han mostrado su utilidad y relativa universalidad. Se puede observar de los antecedentes, que los anticuerpos se han originado 3nicamente en conejo, sin embargo nosotros utilizaremos adem3s del conejo a la gallina, las razones se discutir3n m3s adelante.

ANTECEDENTES

El uso de péptidos sintéticos como inmunógenos ha sido una técnica importante en la elucidación de las propiedades en la respuesta de un anticuerpo. Recientemente, como se han identificado más secuencias de DNA y sus correspondientes secuencias de proteínas, los péptidos sintéticos han sido utilizados para preparar anticuerpos específicos contra proteínas previamente no caracterizadas [97]. Los péptidos se sintetizan normalmente usando técnicas de fase sólida utilizadas por Merrifield en 1963. [98]. Estos son purificados y acoplados a proteínas acarreadoras, y es la forma péptido-acarreador la utilizada para inmunizar animales. Los péptidos sirven como haptenos que junto con las proteínas acarreadoras generan sitios adecuados para el enlace con el receptor de clase I de las células T. Los conjugados de péptido-acarreador, rara vez fallan y no provocan una respuesta inmune. Consecuentemente, los péptidos usualmente pueden funcionar como epitopos, obteniendo comúnmente altos títulos de anticuerpos [99].

Dos de las ventajas más importantes de los anticuerpos anti-péptido son, que se pueden preparar inmediatamente después de conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína (tanto de una secuencia de proteína como una secuencia de DNA) y también que se pueden dirigir a las regiones particulares de interés [99].

DECAPEPTIDO RMHLRQYELL

Se ha postulado que la región carboxilo terminal de $G\alpha$ está involucrada en el acoplamiento con el receptor a partir de las siguientes evidencias. La homología de la subunidad α de la proteína G retinal transducina, con la arrestina, la proteína de retina de 48 KDa que compete con la transducina para enlazarse a la fotorrodopsina (receptor), está confinada a la región carboxilo terminal de la α -transducina [17]. Las subunidades αG_i quedan desacopladas a los receptores por una mono-ADP-ribosilación por la PTX en un residuo de cisteína ubicado cuatro aminoácidos antes del carboxilo terminal [15]. También fue identificada una mutación puntual en el genoma de la variante *unc* de las células de linfoma de ratón S49 que presenta una substitución de una prolina por

una arginina en el aminoácido seis del carboxilo terminal de α s y ésto produjo el desacoplamiento entre el receptor y Gs [38].

Se han generado anticuerpos contra un decapeptido sintético, RMHLRQYELL, que representa el carboxilo terminal de α Gs el cual ha sido caracterizado en "immunoblots" y estudios funcionales. Este anticuerpo designado RM, reacciona exclusivamente con las subunidades α de 52 y 45 KDa en "immunoblots" de membranas de células de cerebro de bovino y de células nativas S49 de linfoma murino. Tal reactividad no se vio en membranas de células cye' S49, las cuales carecen de Gs. Los anticuerpos RM bloquean la activación por Gs de la adenilato ciclasa mediada por receptores en las células nativas S49. Los anticuerpos RM también pueden inmunoprecipitar a la adenilato ciclasa activada en extractos de detergente a partir de membranas de cerebro de bovino activadas con GTP γ S o fluoruro, este enlaceamiento de α s al efector y al anticuerpo dirigido contra el carboxilo terminal fue compatible mutuamente [95].

HUEVOS COMO FUENTE CONVENIENTE DE ANTICUERPOS.

La distancia filogenética entre aves y mamíferos hace que los anticuerpos de gallina sean los de elección contra un antígeno de mamífero que se desee [100]. La inmunoglobulina IgG contenida en la yema está en mayor cantidad que en el suero de gallina (Rose y col 1974) [101]. Aparentemente esto no ha sido totalmente aceptado por los inmunólogos, posiblemente debido a las dificultades en separar la IgG de los abundantes lípidos presentes en la yema que han impedido la explotación de esta fácil y disponible fuente de anticuerpos, cantidades que pueden ser equivalentes a más de 100 mL de suero por semana. [100] Los anticuerpos se han convertido en una herramienta central en las ciencias biológicas y, es necesario enfatizar la diferencia entre el trabajo que se requiere en sangrar conejos y colectar huevos [100].

Ya que un solo huevo contiene mucho más anticuerpos que la sangría promedio en un conejo, esta simple aproximación presenta una atractiva alternativa para practicar los métodos convencionales de producción de anticuerpos policlonales. La purificación del homólogo de IgG de 150 KDa de las inmunoglobulinas (IgY's) de las yemas de

huevo no requiere, desde luego la sangría del animal. Además, los huevos de las gallinas inmunizadas proveen de una fácil fuente de anticuerpos policlonales y esto es conveniente ya que ofrece gran compatibilidad con las leyes de protección a animales [102].

Las proteínas de mamífero, altamente conservadas algunas veces no inducen una buena respuesta inmune, debido a la baja respuesta humoral en animales como el conejo que son también mamíferos y a su vez los animales más comúnmente utilizados para generar anticuerpos policlonales [103]

La inmunización de las gallinas para la producción de anticuerpos policlonales, es comparable con la de los conejos con respecto a la ruta de inyección, la cantidad de antígeno usado y la cinética de generación de anticuerpos específicos. Las gallinas son inyectadas subcutáneamente en sitios múltiples en la pechuga, con el antígeno en adyuvante completo de Freund. Los títulos de anticuerpo específico son reforzados por dos o tres inyecciones adicionales a intervalos de una o dos semanas. Los huevos (usualmente se colectan y se marcan para su identificación), pueden ser almacenados hasta por un año a 4°C antes de la purificación de las IgY's. Normalmente cada huevo puede contener alrededor de 90-100 mg de IgY's totales, y el anticuerpo específico generalmente comprende de 1-10 % del total, aproximadamente de 1 a 10 mg de IgY's específicas por huevo [104].

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Comparar los anticuerpos contra α Gs producidos en conejo y en gallina.

OBJETIVOS PARTICULARES.

Verificar la capacidad de los anticuerpos anti-péptido en el reconocimiento de proteínas Gs presentes en membranas de hígado de rata y membranas de eritrocito de pavo.

Evaluar la capacidad de los anticuerpos producidos en ambas especies para bloquear la activación de la adenilato ciclasa por proteínas Gs activadas por receptores β -adrenérgicos

Comparar la cantidad de anticuerpos producidos tanto en conejo como en gallina así como la afinidad que presenten para diversas fuentes de antígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se obtuvo el péptido RMHLRQYELL conjugado con KLH (Keyhole limpet hemocyanin) de Multiple Systems (California USA), correspondiente al carboxilo terminal de α Gs [95].

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO Y ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN DE LOS ANIMALES.

Se disolvió 1mg de decapeptido en 100 μ L de solución salina isotónica y se le adicionó 1 mL de adyuvante completo de Freund y se agitó hasta formar una suspensión.

De esta suspensión se les administró por vía subcutánea 200 μ g del péptido (contenidos en 220 μ L de la suspensión del adyuvante completo de Freund) en tres ocasiones con intervalos de siete días cada una. Al conejo, se le inyectó la suspensión la primera vez en el lomo cerca del cuello y las posteriores inyecciones fueron en el lomo pero en regiones posteriores. A la gallina se le administró el antígeno en la pierna y en el ala. La sangría para el conejo se hizo 10 días después de la tercera inoculación. Para la gallina se utilizaron los huevos posteriores a la tercera inoculación. Los huevos de la gallina utilizados fueron, para la mayoría de los estudios el obtenido nueve días después de la tercera inoculación. Los otros fueron de 1 día posterior a la tercera inoculación y uno 5 días después de la segunda inoculación.

OBTENCIÓN DE LOS ANTICUERPOS.

CONEJO

Para obtener el suero inmune, primero se colocó al conejo en un lugar cómodo. Se le rasuró parte de la oreja cerca de la vena marginal y se puso ésta cerca de una lámpara para que se dilatara. Después de que se localizó la vena, se hizo un corte con una navaja estéril, el corte es en un ángulo de 45° con respecto a la vena y solo a través de la

superficie de esta. La sangre se colectó en un tubo de polipropileno limpio y se dejó reposar de 30-60 minutos a 37°C para que se coagulara. Se despegó el coágulo de la pared del tubo por medio de un palillo de madera. Posteriormente se removió el coágulo por centrifugación a 3,500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El suero obtenido se separó en alícuotas de 200 μ L que se almacenaron a -70°C hasta su uso. Una vez descongelado el suero, se mantuvo en refrigeración.

GALLINA

La obtención de las IgY's se basó en la propuesta por Polson y cols. [105] con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

Las yemas se separaron de la clara de manera individual, se lavaron minuciosamente con agua para remover la mayor parte posible de la clara. Una vez lavadas, se vaciaron por un embudo de vidrio largo para romper las yemas y liberar el contenido en un vaso para medir su volumen. Se añadieron dos volúmenes de amortiguador 1 (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 0.1 M, azida de sodio al 0.1 %, pH 7.5) por cada volumen de yema y se mezclaron minuciosamente. Posteriormente, se añadió polietilenglicol 8000 (PEG-8000) previamente pulverizado hasta obtener una concentración final de 3.5 % (p/v) para permitir la separación de los lípidos y la vitelina. La mezcla se agitó suavemente hasta que todo el polímero se había disuelto. Se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 14,000 x g por 10 minutos. Esta centrifugación causó la formación de tres fases en el tubo de centrifuga que son:

- a) Una capa de grasa amarilla sobre la superficie del fluido.
- b) Un sobrenadante claro.
- c) Una capa flexible de vitelina que representa 1/3 parte del volumen total de las sustancias en el tubo de centrifuga.

Se decantó el sobrenadante claro con la capa de grasa cuidadosamente en un embudo que contenía un tapón delgado de algodón en el cuello. El algodón detuvo la capa de grasa y dejó pasar al sobrenadante. Este paso se repitió una vez más. Se midió el volumen del filtrado para añadir suavemente más PEG pulverizado a una concentración final de 12 % (p/v); lo que causó la precipitación total de IgY's. El

precipitado se concentró por centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos. El botón se resuspendió con Amortiguador 1 en el volumen original de las yemas y se reprecipitaron las IgY's (dos pasos anteriores). Los botones obtenidos se compactaron por centrifugación a 14,000 x g durante 10 minutos y se eliminó el exceso de PEG. Este paso se repitió una vez más.

Los botones se resuspendieron en el menor volumen de amortiguador 1 que fue posible, y se le cuantificó la concentración de proteína de acuerdo con el método de Lowry [106].

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS IgG.

Se realizó de acuerdo con el método de Harlow and Lane [99], con algunas modificaciones como se describe a continuación:

Se midió el volumen del suero del conejo o la solución de IgY's de la yema de huevo de la gallina. Se colocaron en un vaso con agitación sumergido en hielo. Se añadió 0.5 volúmenes (con respecto al suero o a las IgY's) de sulfato de amonio saturado (4.1M) lentamente. La solución se dejó a 4°C durante 6 horas o toda la noche. Se centrifugó a 3,000 x g durante 30 minutos. El botón se resuspendió en 0.3 volúmenes de PBS con respecto del volumen inicial del suero o solución de IgY's. Esta solución se dializó contra PBS con tres cambios durante la noche. El contenido se separó en alícuotas de 100 μ L y se almacenaron a -70°C.

AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE HÍGADO DE RATA.

Las membranas se obtuvieron con modificaciones al método de Prpic y cols. [107] como se describe a continuación:

Se homogeneizó el hígado con un vástago de teflón en una solución de sacarosa 250 mM-HEPES 20 mM y EDTA 1 mM. Se centrifugó a 5,000 x g durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante y se añadió Percoll, tres partes del sobrenadante por una parte de Percoll. La solución se repartió en tubos de centrifuga y a cada tubo se le adicionó

0.5 mL de sacarosa 2.2 M. Se centrifugó a 11,500 x g durante 40 minutos. Se separó la interfase que contenía a las membranas y se le adicionó Tris 50 mM-Mg²⁺ 10 mM. Se centrifugó a 11,000 x g durante 20 minutos para eliminar el Percoll. El botón se resuspendió en Tris 50 mM-Mg²⁺ 10 mM.

AISLAMIENTO PARCIAL DE PROTEÍNAS G DE MEMBRANAS DE ERITROCITO DE PAVO.

La metodología se realizó por una modificación a las técnicas de Abramowitz y cols. [108] e Iyengar [109], como se describe a continuación.

Se obtuvo la sangre del pavo en una solución de EDTA al 0.1%, y se centrifugó a 900 x g durante 10 minutos y se separaron los eritrocitos, éstos se lavaron 4 veces con NaCl 150 mM a 900 x g durante 10 minutos. Las células se lisaron resuspendiéndolas en 3 volúmenes de Tris 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, DTT 20 mM y MgCl₂ 1 mM a pH 7.5 y se centrifugaron a 15,000 x g por 10 minutos. Los fantasmas (que constituyen la fracción membranal y el citoesqueleto del eritrocito) se obtuvieron en el precipitado, este paso se realizó 5 veces y se cuantificó la proteína por el método de Lowry [106].

La preparación se colocó en agitación a temperatura ambiente y se preextrajo incubándose 30-40 minutos a 4°C con una solución de MgCl₂ 10 mM, NaCl 300 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, colato al 0.1 % y HEPES o MOPS 10 mM a pH 8 (la concentración final de proteína es aproximadamente 17mg/mL). Se centrifugó a 70,000 x g durante 30 minutos en tres ocasiones. El sedimento conteniendo a las proteínas G, se volvió a extraer con EDTA 1 mM en HEPES 10 mM pH 8. Se centrifugó a 70,000 x g durante 30 minutos. El botón se resuspendió en colato al 1%, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoetanol 20 mM y HEPES 10 mM a pH 8. Se agitó 45 minutos a 4°C, se centrifugó a 70,000 x g durante 30 minutos y se colectó el sobrenadante, se le agregó EDTA y etilenglicol a una concentración final de 11 mM y 30% respectivamente.

ELECTROFORESIS E "IMMUNOBLOTTING."

Se utilizaron membranas de hígado de rata como fuente de antígeno, estas se disolvieron en amortiguador muestra (fosfato de sodio 100 mM pH 7.2, SDS 1%, glicerol 10 % y azul de bromofenol al 0.001 %) y se pusieron a hervir durante 5 minutos. A cada pozo se adicionó 300µg de proteína contenidas en 45µl. y en otro pozo se pusieron marcadores de masa molecular relativa. Se corrieron en geles de acrilamida al 10% de acuerdo con Laemmli [110] a 12 mA durante toda la noche. A partir de la migración de los marcadores de masa molecular relativa en el gel, se determinó su migración relativa y se graficaron éstos valores vs log de masa molecular relativa (no se muestran), para posteriormente determinar el masa molecular relativa de las bandas reconocidas por el anticuerpo.

Los geles se transfirieron al papel de nitrocelulosa como se reporta por Harlow and Lane [98]; brevemente el gel se colocó en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, metanol 20%) junto con el papel durante media hora, después se colocaron el gel y el papel en la cámara de transferencia, poniendo especial atención a la polaridad de los electrodos, y se transfirieron las proteínas aplicando una corriente de 120 mV durante 3 horas.

Después de la transferencia, se colocó el papel en una solución saturante del enlazamiento inespecífico (leche descremada al 5% en PBS) por 1-4 horas. Después de eliminar el enlazamiento no específico, se agregó el anticuerpo anti- α s diluido 1:500 para conejo y gallina y 1:1000 para el anticuerpo anti-G de conejo comercial que utilizamos como control ambos diluidos en TBS y se dejó incubar durante toda la noche. Posteriormente, se lavó el papel tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween al 0.1%. Se agregó un segundo anticuerpo anti-conejo o anti-gallina marcados con fosfatasa alcalina a una dilución de 1:3000 en TBS y se incubó durante una hora. Se repitieron los lavados con TBS-Tween tres veces más y se reveló la actividad de la fosfatasa alcalina en un amortiguador que contenía NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris 100 mM a pH 9.5 con NBT al 0.005% como agente acoplante y BCIP al 0.005% como sustrato. Los papeles se incubaron hasta que empezó a dar una coloración azul-púrpura. La reacción se paró con PBS conteniendo EDTA 20 mM para quelar a los iones Mg²⁺.

ELISA.

La metodología se llevó a cabo como se reporta por Harlow and Lane [99], con algunas adaptaciones, como se describe a continuación:

Como fuente de antígeno utilizamos al decapeptido sintético (antígeno puro), membranas de hígado de rata y membranas de eritrocito de pavo (antígeno parcialmente puro).

Para enlazar el antígeno puro o parcialmente puro a la base del pozo de cloruro de polivinilo, se le añadieron 100ng/50 μ L o 1 μ g/50 μ L. de la solución del péptido o extracto de membranas a cada pozo. Se incubaron toda la noche a 4°C y se lavó la placa 2 veces con PBS. Los espacios libres de la placa que no contenían antígeno se saturaron con amortiguador saturante del enlazamiento inespecífico (BSA al 3% en PBS y 0.02% de azida) por 2 horas a temperatura ambiente.

Nuevamente se lavaron los pozos dos veces con PBS. Se adicionaron 50 μ l pozo de solución con el anticuerpo en diluciones de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:3000 y 1:5000 para el caso del péptido o 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:3000 para el caso del extracto membranar. Se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en atmósfera húmeda. Todas las diluciones del anticuerpo se hicieron en amortiguador saturante del enlazamiento inespecífico. Se lavaron los pozos por cuatro ocasiones con PBS.

Se adiciono el 2o. anticuerpo anti-gallina el cual estaba marcado con peroxidasa o fosfatasa alcalina, según el experimento donde se indique, y con fosfatasa alcalina en el caso del anticuerpo anti-conejo, en una dilución de 1:3000 en amortiguador saturante del enlazamiento inespecífico. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pozos nuevamente 4 veces con PBS.

El color se desarrolló como se describe a continuación.

DESARROLLO DE COLOR CON EL 2o. ANTICUERPO.

Cuando el segundo anticuerpo era marcado con peroxidasa de rábano se hizo lo siguiente para desarrollar color:

Se preparó una solución de 6 mg de o-fenildiaminobenzidina en 12 mL de amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.6 (solución concentrada) A esta solución se adicionó 100 μ L de peróxido de hidrógeno al 3 %. Después del lavado final con PBS se adicionaron 50 μ L de la solución sustrato a cada pozo. Se incubó aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 μ L de ácido sulfúrico 5 N para parar la reacción a todos los pozos. Como blanco se utilizó sólo el sustrato, en este caso, 50 μ L de o-fenildiaminobenzidina mas 50 μ L de ácido sulfúrico 5N. Las absorbencias se leyeron a 492 nm.

Si el anticuerpo se encontraba acoplado a la fosfatasa alcalina, el color se desarrolló de la siguiente manera:

Se disolvieron 10 mg de p-nitrofenilfosfato (PNPP) en 10 mL de dietanolamina 10 mM pH 9.5 conteniendo $MgCl_2$ 0.5 mM (solución concentrada) Después del lavado final con PBS, la placa se lavó 2 veces con 10 mM de dietanolamina con 0.5 mM de $MgCl_2$ a pH 9.5. Se adicionaron 50 μ L de la solución sustrato a cada pozo por microtitular. Se incubó 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente. Se adicionó 50 μ L de EDTA 0.1 M para parar la reacción. Como blanco se utilizó sólo el sustrato, en este caso, 50 μ L de p-nitrofenil fosfato mas 50 μ L de EDTA 0.1M. La placa se leyó a 405 nm.

ENSAYOS DE LA ADENILATO CICLASA.

La actividad de la adenilato ciclasa se midió por el método de Salomon y cols. [111] como sigue:

La mezcla de reacción estuvo compuesta de teofilina 10 mM, fosfocreatina 7.4 mg/mL, creatina cinasa 1 mg/mL y ATP frío 0.4 mM; todo esto se disolvió en 5 mL de amortiguador Tris-HCl 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, se adicionó además a la mezcla de reacción [$\alpha^{32}P$] ATP (1 μ Ci/tubo). El ATP 0.4mM y el [$\alpha^{32}P$] ATP se agregaron al final para evitar hidrólisis.

Se adicionó a cada tubo 50 μ L de la mezcla de reacción y GTP a una concentración de 10^{-4} M. Para lograr una estimulación en la actividad de la AC via receptores β -adrenérgicos se adicionó en un tubo además, isoproterenol 10^{-4} M

(agonista β -adrenérgico) y para determinar que los anticuerpos tienen la capacidad de bloquear α Gs, se puso respectivamente a otro par de tubos isoproterenol mas anticuerpo de conejo e isoproterenol mas anticuerpo de gallina, ambos anticuerpos a una dilución de 1:50. Se adicionó a otro tubo forskolina a una concentración final de 10^{-8} M para verificar el buen estado funcional del sistema transductor.

La reacción se inició con 50 μ L de membranas de hígado de rata (100-150 μ g). Se incubaron 20 minutos a 30°C en agitación. La reacción se paró con 1 mL de SDS al 1 %. Se adicionó [3 H] AMPe a cada tubo (12,000 cpm). El contenido de los tubos se colocó en columnas de Dowex, desechando el eluado. Las columnas se lavaron con 2 mL de agua, se transfirieron a columnas de alúmina y se les añadió 3 mL de agua, cuyo eluado también se desechó. Las columnas de alúmina se colocaron sobre viales y se eluyeron con 4 mL de imidazol 0.1 M-azida de sodio 0.1 mM a pH 7.5. A los viales se les adicionó líquido de centelleo y se determinaron 32 P y 3 H.

RESULTADOS.

ENSAYOS DE ELISA.

Se realizaron experimentos para observar la capacidad de los anticuerpos para reconocer antígenos de diferente naturaleza en membranas de hígado de rata y membranas de eritrocito de pavo, también se probaron con el decapeptido sintético. Se utilizaron estos tres antígenos para titular los anticuerpos mediante pruebas de ELISA.

Al usar como antígeno al decapeptido sintético (antígeno puro) se observó un reconocimiento prácticamente igual con el anticuerpo de conejo que con el de gallina a notar por las diluciones del anticuerpo que se hicieron que fueron desde 1:100 hasta de 1:5000 (Fig. 1)

En los ensayos donde usamos como fuente de antígeno membranas de eritrocito de pavo (Fig. 2) y membranas de hígado de rata (Fig. 3) respectivamente, se observó un reconocimiento ligeramente mayor en los anticuerpos de conejo que para los anticuerpos de gallina, las diluciones para ambos anticuerpos fueron desde 1:100 hasta 1:3000. Para llevar a cabo la comparación de los anticuerpos de conejo y gallina se obtuvieron en el caso de la gallina, la yema de 9 días después de la tercera inoculación y, en el caso del conejo, el suero obtenido 10 días después de la tercera inoculación.

Se hicieron otros inmunoensayos para las yemas que se obtuvieron a diferentes fechas durante el proceso de inmunización para confirmar que es después de la tercera inoculación cuando se logra una mayor producción de anticuerpos. Para las yemas que se obtuvieron 5 días después de la segunda inoculación se observa, que existe ya una producción de anticuerpos específicos anti- α Gs, esto es que aunque con absorbencias pequeñas se obtuvo una respuesta leve con una dilución 1:100 comparable con la dilución 1:500 de la yema obtenida a los 9 días después de la tercera inoculación (Fig. 4). También se realizaron inmunoensayos con las IgG's de la yema de 1 día después de la tercera inoculación obteniendo que en la dilución de 1:100 se obtiene el 71% de la respuesta de la yema del día 9 después de la tercera inoculación por lo que ya se observa una cantidad mayor de anticuerpos producidos (Fig. 4)

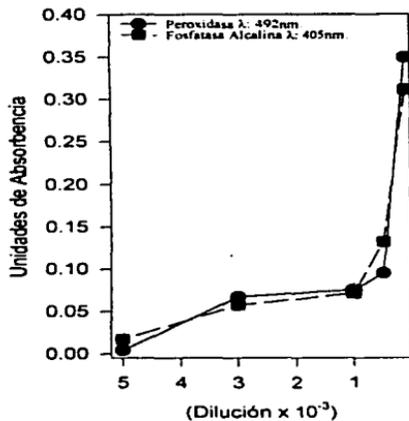


FIG. 1 Titración de anticuerpos anti- α Ga. Se usó el decapeptido sintético como antígeno a una concentración de 100ng/pozo. El decapeptido se añadió y se fijó a la placa como se indica en métodos al igual que las diluciones realizadas. (●) anticuerpos de gallina. (■) anticuerpos de conejo. El anticuerpo anti-gallina está unido a peroxidasa, el anticuerpo anti-conejo está marcado con fosfatasa alcalina. La figura es representativa de 1 experimento realizado por duplicado.

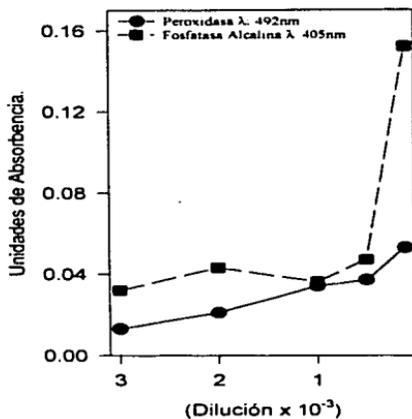


Fig. 2 Titulación de anticuerpos anti- α Gs vs membranas de eritrocito de pavo. El antígeno se utilizó a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{pozo}$ (●) anticuerpos de gallina, (■) anticuerpos de conejo. El anticuerpo anti-gallina está unido a peroxidasa, el anticuerpo anti-conejo está marcado con fosfatasa alcalina. La figura es representativa de 1 experimento realizado por duplicado.

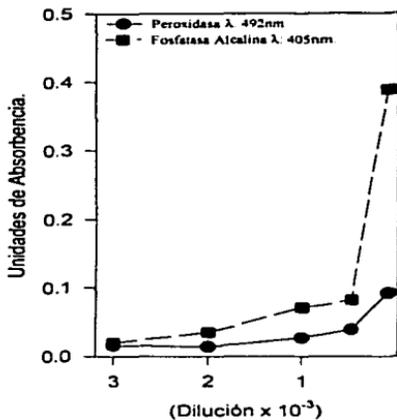


Fig. 3 Titulación de anticuerpos anti- α Gs vs membranas de hígado de rata. El antígeno se utilizó a una concentración de $1\mu\text{g/pozo}$ (●) anticuerpos de gallina, (■) anticuerpos de conejo. El anticuerpo anti-gallina está unido a peroxidasa, el anticuerpo anti-conejo está marcado con fosfatasa alcalina. La figura es representativa de 1 experimento realizado por duplicado

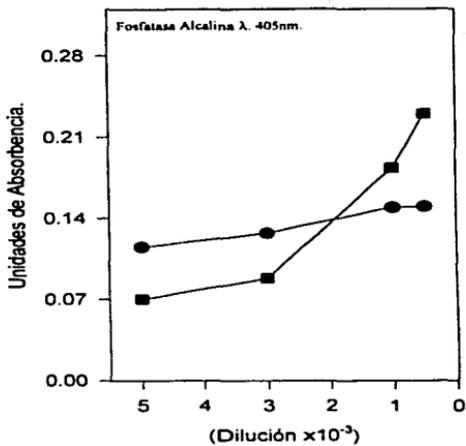


Fig. 4 Titulación de anticuerpos anti- α -Ga de gallina vs el decapeptido sintético. Se pusieron 100 ng pozo de antígeno. (●) La yema de 5 días después de la segunda inoculación, (■) La yema de 1 día después de la tercera inoculación. El 2o. anticuerpo está marcado con fosfatasa alcalina. La figura es representativa de 1 experimento realizado por duplicado.

"IMMUNOBLOT".

Para comprobar que se produjeron los anticuerpos contra α Gs en conejo y gallina se realizaron "immunoblots" utilizando como fuente de antígeno membranas de hígado de rata, y las bandas que fueron reconocidas se observaron en una región de 45 KDa aproximadamente (Fig. 5). Esto indica que ambos anticuerpos son capaces de reconocer al antígeno desnaturalizado.

ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA.

Para determinar si estos anticuerpos pueden bloquear *in situ* la capacidad acoplante de la subunidad α Gs, se midió la activación de la adenilato ciclasa por receptores β -adrenergicos. Como una prueba del buen estado funcional de las membranas se utilizó un ensayo con forskolina, que estimula directamente a la adenilato ciclasa para la producción de AMPc, y se observó una estimulación de 4-5 veces con respecto al basal (Fig. 6b). Se observó también la estimulación de la adenilato ciclasa en membranas de hígado de rata por isoproterenol (Fig. 6c), agonista β -adrenergico acoplado mediante Gs a la adenilato ciclasa y que esta activación es revertida con los anticuerpos producidos tanto en conejo (Fig. 6d) como en gallina (Fig. 6e). Para los anticuerpos de conejo, se observó que estos disminuyeron la actividad de la adenilato ciclasa a valores prácticamente iguales al del basal. De manera interesante se observó que los anticuerpos producidos en gallina son capaces de disminuir la actividad de la adenilato ciclasa aun por debajo del basal, lo que sugiere que inhibe la activación de la adenilato ciclasa por la proteína Gs endógena.

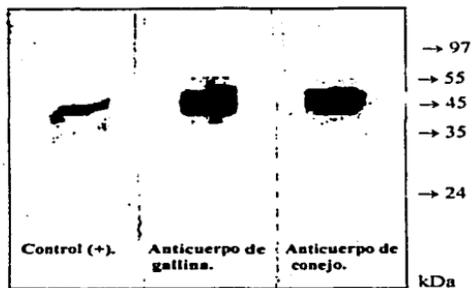


Fig. 5 "Immunoblot" de anticuerpos producidos en gallina y en conejo anti- α G. Las membranas plasmáticas de hígado de rata se corrieron en geles al 10 % y se transfirieron como se describe en metodos. El carril 1, reconocimiento por anticuerpos anti- α G comerciales, el carril 2 reconocimiento por los anticuerpos de gallina y en el carril 3 a los anticuerpos inducidos en conejo. Las flechas corresponden a los PM aproximados en kDa. La dilucion para el anticuerpo comercial fue 1:1000 y de 1:500 para los anticuerpos de gallina y de conejo. La figura es representativa de 1 experimento realizado por duplicado.

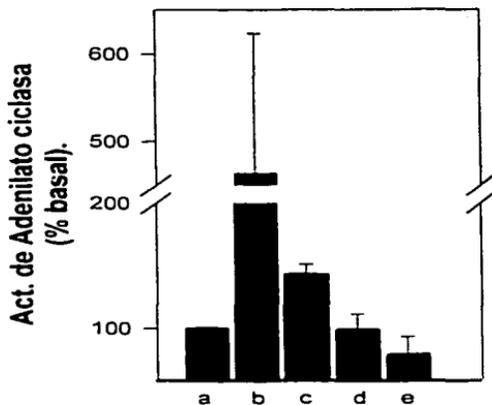


Fig. 6 Estimulación de la Adenilato Ciclasa por Isoproterenol y su bloqueo por anticuerpos anti- α Gs. Se midió en membranas de hígado de rata como se describió en métodos: (a) basal, (b) Forskolina, (c, d, e) en presencia de isoproterenol, (d) + anticuerpo de conejo anti- α Gs, (e) - anticuerpo de gallina anti- α Gs. El anticuerpo se añadió a una dilución de 1:50. Los resultados representan la $X \pm ES$ de tres experimentos realizados por duplicado. La actividad basal fue de 3.06 ± 0.2 pmol/min/mg de proteína.

CANTIDAD DE ANTICUERPOS PRODUCIDOS.

En la tabla 1 se muestra la comparación del rendimiento de anticuerpos obtenidos de las dos fuentes utilizadas en este trabajo

Se le hizo una sangría de 10 ml. al conejo y se obtuvieron 2.7 mL de suero inmune, mientras que de una yema de huevo de la gallina de 25 mL. se obtuvieron 2.0 mL. de IgY's (la yema con la que se hizo la comparación es de 10 días después de la tercera inoculación) Hasta este punto tanto en volumen como en cantidad de proteína, el conejo parecía el mejor pero, al tomar 1 mL. de suero e IgY's y precipitarlos por separado con una solución de sulfato de amonio saturado para la purificación parcial de las IgG's, observamos que tanto suero como IgY's proporcionaron una cantidad de proteína por mililitro similar (15 mg/mL) sin embargo, la diferencia estuvo en la cantidad de proteína enriquecida con IgG, ya que para el conejo se obtuvieron 16.2 mg de proteína y para la gallina se obtuvieron 42.0 mg de proteína.

FUENTE DE ANTICUERPOS	VOLUMEN (ml.)	CANTIDAD DE PROTEÍNA (mg/ml.)	PROTEÍNA OBTENIDA DESPUÉS DE PRECIPITAR CON SELECCION DE AMONIO		FRACCIÓN ENRIQUECIDA EN IgG. (mg totales de proteína).		DILUCIÓN PARA IDENTIFICACION.
			(mg/ml.)	(ml.)			
Suero de conejo (10 ml. de sangre)	2.7	86.0	15.0	0.4	16.2	1.500	
IgY's de gallina (25 ml. de una yema de huevo).	2.0	43.0	15.0	1.4	42.0	1.500	

Tabla 1. Procedimiento de la purificación parcial de los anticuerpos producidos en conejo y gallina.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Lowry [106]

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Los anticuerpos selectivos contra péptidos correspondientes al carboxilo terminal de la subunidad α de Gs se enlazan a la misma región de la subunidad α que interacciona con el receptor. La utilidad de estos anticuerpos en determinar la especificidad del acoplamiento receptor-proteína G en sistemas celulares está bien documentada. Las manifestaciones de señales mediadas por agonistas pueden ser interrumpidas selectivamente con anticuerpos como la estimulación o inhibición de la adenilato ciclasa [95].

En este trabajo se realizó la comparación de anticuerpos producidos tanto en conejo como en gallina anti- α Gs, por el decapeptido que comprende el carboxilo terminal de α Gs. Esta región del extremo carboxilo terminal de la subunidad α Gs parece jugar un papel importante en la interacción con el receptor. Los anticuerpos contra el decapeptido inhiben potentemente la estimulación de la adenilato ciclasa vía receptores β -adrenérgicos mediada por Gs, acorde con los estudios, que sugieren que el carboxilo terminal de α Gs es esencial para la interacción con el receptor [112]. Esto nos indica que los anticuerpos producidos en conejo o gallina funcionan de manera similar como se ha reportado por Knecht [113].

El estudio realizado con los anticuerpos producidos tanto en conejo como en gallina nos permite hacer una comparación de éstos, desde dos puntos de vista generales: la capacidad de reconocimiento que presentan los anticuerpos por su antígeno, sin importar la naturaleza de este; y la cantidad de anticuerpos producidos por estos dos animales.

El "immunoblot" es usado para detectar la presencia y la cantidad de un antígeno, la masa molecular relativa de la cadena polipeptídica y la eficiencia en la extracción de un antígeno. Esta técnica es particularmente útil para ensayar la presencia, cantidad y especificidad de anticuerpos de un suero policlonal. El principal factor que puede determinar el éxito de la prueba es la naturaleza del epítipo que sea reconocido por el anticuerpo. La resolución de la electroforesis en gel implica la desnaturalización del antígeno de la muestra; entonces sólo podrán unirse los anticuerpos a los epítipos que fueron resistentes a la desnaturalización. Todos los sueros policlonales tienen al menos algunos anticuerpos de este tipo. El "immunoblot"

no requiere en particular anticuerpos policlonales al α G. Los anticuerpos policlonales son probablemente el tipo más usado de anticuerpos para el "immunoblot". Un suero policlonal contiene cantidades considerables de anticuerpos específicos por lo que pueden ser diluidos extensamente [99].

Los anticuerpos producidos en las dos especies utilizados en el "immunoblot" para determinar su especificidad contra α Gs, presentan la misma capacidad para reconocer antígenos desnaturalizados, ya que las bandas se observaron en un peso molecular de 45 KDa que es el peso aproximado de α Gs. La dilución con la que se trabajaron los anticuerpos en el "immunoblot" fue de 1:500, si estas diluciones se comparan con las que se usan con algunos anticuerpos anti- α G comerciales que son repurificados generalmente en columnas de proteína A, cuya dilución recomendada para "immunoblot" es de 1:1000, se puede decir entonces que los títulos que obtuvimos con nuestros anticuerpos son satisfactorios considerando que solo se les sometió a un proceso de purificación parcial precipitándolos con sulfato de amonio. Esto se debió a que se intentó manejar ambos anticuerpos en condiciones semejantes y las IgY's de gallina no tienen la capacidad de enlazarse a la proteína A, lo que impide su unión a las columnas con este tipo de soporte, generalmente utilizadas para purificar los anticuerpos de conejo.

Los anticuerpos también se compararon mediante pruebas de ELISA, las cuales se realizaron por sus grandes ventajas, como el límite de detección que es de aproximadamente de 0.1-1.0 fmoles, aproximadamente 0.01-0.1 ng de proteína (considerando un PM de 100 KDa), es rápido y fácil, detecta la presencia de anticuerpos y lo cuantifica [99], lo más importante para el laboratorio acerca de usar esta técnica es que su sensibilidad depende de la actividad específica del antígeno y que necesita una gran afinidad del anticuerpo por su antígeno. Además de que nos permitió saber si había alguna preferencia en el reconocimiento, determinado por el antígeno de la especie filogenéticamente más cercana. Con esta técnica comprobamos que los anticuerpos producidos en ambas especies presentan este reconocimiento para varias fuentes de antígeno como el decapeptido sintético que se inoculó, además este reconocimiento fue mucho mayor con el decapeptido que el que presentaron con las otras dos fuentes de antígeno ya fueran membranas de hígado de rata o membranas de eritrocito de pavo, ya que el título con el decapeptido para ambas fuentes de anticuerpos fue de 1:5000.

La afinidad que presentaron los anticuerpos de gallina para con las otras fuentes de antígeno fue menor con respecto a los anticuerpos de conejo, esta diferencia se observa principalmente en la dilución más baja de anticuerpo ya que a diluciones más altas la diferencia no es grande. El título de los anticuerpos para estas dos fuentes de antígeno fue de 13000. La afinidad de ambos anticuerpos fue mayor para las membranas de hígado de rata, en relación a la observada para las membranas de eritrocito de pavo, esto es aproximadamente tres veces más grande para las membranas de hígado de rata. Sin embargo, cabe señalar que el 2o anticuerpo anti-gallina estaba conjugado con peroxidasa, que es menos sensible que la fosfatasa alcalina la cual estaba conjugada al anticuerpo anti-conejo, lo que pudo contar para las diferencias que se observaron.

También se practicaron inmunoensayos para los anticuerpos de otras yemas de huevo de gallina en los cuales observamos que antes de una tercera inoculación, ya hay presencia de los anticuerpos anti- α Gs, aunque la cantidad de anticuerpos producidos aún es baja en comparación de la cantidad presente en la yema de un día después de la tercera inoculación. Cabe mencionar que los anticuerpos que utilizamos para todos los ensayos, excepto donde se indique lo contrario, fueron obtenidos de la yema de huevo, correspondiente a nueve días después de la tercera inoculación.

Con estos ensayos de "immunoblot" y ELISA comprobamos que el anticuerpo tiene la capacidad de reconocer al antígeno ya sea que este se obtenga sintéticamente (ELISA, Figs. 1 y 4), o desnaturalizado ("immunoblot" Fig 5) o en su forma silvestre formando parte estructural de la proteína (ELISA, Figs 2 y 3).

En cuanto a la afinidad que presentaron los anticuerpos de gallina y conejo para la proteína Gs *in situ*, esta se comprobó indirectamente midiendo el bloqueo de la activación de la adenilato ciclasa a través de la proteína Gs acoplada con receptores β -adrenérgicos. En este ensayo se obtuvo una elevación en la actividad de la adenilato ciclasa con forskolina que activa directamente a esta enzima y se usó para comprobar que los elementos del sistema de transducción de señales estaban presentes y en buen estado. Al medir la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, se obtuvo una elevación en su actividad del 43% con respecto al basal, y que ésta se revierte prácticamente al nivel del basal (99%) en presencia de los anticuerpos de conejo. En presencia de los anticuerpos de gallina esta reversión en

la actividad de la adenilato ciclasa fue mas allá del basal (79%), lo que sugiere que se está inhibiendo la activación de la adenilato ciclasa por la proteína Gs activada de manera endógena [114], hecho que nos sugiere la gran potencia de estos anticuerpos para unirse al antígeno. La capacidad que presentaron los anticuerpos de gallina para bloquear a la proteína Gs es mayor que la que presentaron los anticuerpos de conejo en membranas de hígado de rata (fig. 6).

En cuanto a la cantidad de anticuerpos producidos en gallina y conejos se observa que de la yema de la gallina se obtiene una cantidad considerable de IgY's que se pueden utilizar para los ensayos, obviamente los anticuerpos aquí están más puros que en el suero de conejo. Al precipitar el suero y las IgY's con sulfato de amonio con la finalidad de obtener una purificación parcial de IgG's, se obtuvo una concentración igual de proteína tanto en conejo como en gallina, pero en gallina se obtuvo un volumen 3.5 veces mayor que en el conejo (Tabla 1). Hasta aquí la producción de anticuerpos en gallina ha resultado mejor en varios aspectos primero se logró una mejor respuesta en el bloqueo a la proteína Gs, segundo, se produjo una mayor cantidad de anticuerpos semipurificados de IgY's y/o suero. Algunos autores han considerado otra ventaja de los anticuerpos de gallina, que es la facilidad con que se obtienen considerando sus respectivas fuentes. Esto es, que es más difícil sangrar un conejo que coleccionar los huevos de la gallina. Sin embargo, estos se ve balanceado en que es menos laborioso el proceso para obtener las IgG's de conejo en relación a las de gallina.

Otro aspecto importante a considerar cuando se utilizan estas dos especies para producir anticuerpos es que la edad óptima para la producción de anticuerpos en conejos es sólo dentro de los 4 a los 6 primeros meses de edad, después de este tiempo, la calidad y cantidad de los anticuerpos que se obtienen va disminuyendo, además del tiempo que se tiene que esperar para que un conejo se recupere de una sangría a otra.

En el caso de las gallinas la producción de huevos empieza a partir de los tres meses de vida y es constante durante todo un año, por lo que la cantidad de anticuerpos que se pueden obtener de las yemas es mucho más grande, sólo tendría que reinocularse a la gallina en el tiempo en el cual el título de anticuerpos ya sea bajo. Después del año de producción de huevos se descansa a la gallina para que tenga otro periodo para poner huevos, aunque la cantidad de huevos disminuye así como la capacidad de reconocimiento y cantidad de anticuerpos que se obtienen de éstas.

Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- En el reconocimiento de antígenos silvestres la afinidad entre los anticuerpos producidos en conejo y gallina es prácticamente igual, como lo presentan los ensayos de ELISA.
- Los anticuerpos anti-péptido obtenidos de la yema de huevo de gallina demostraron ser una mejor alternativa que las inmunoglobulinas del suero de conejo, en cuanto a que se logró un mejor bloqueo en la proteína Gs para activar a la adenilato ciclasa.
- La producción de los anticuerpos de una yema del huevo de gallina es mayor que la de una sangría de conejo, esta simple aproximación presenta una atractiva alternativa para practicar los métodos convencionales de producción de anticuerpos policlonales en gallina.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1] Bourne HR, Sanders DA, Mc Cormick F. 1990 Nature 348:125.
- 2] Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. 1991. Annu. Rev. Biochem. 60 349
- 3] Linder ME, Ewald DA, Miller RJ Gilman AG. 1990 J. Biol. Chem. 265 8243
- 4] Casey PJ, Fong HKW, Simon MI, Gilman AG. 1990 J. Biol. Chem. 265:2383.
- 5] Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar R. 1990 J. Biol. Chem. 265 6268.
- 6] Bourne HR, Sanders DA, Mc Cormick F. 1991. Nature 349:117.
- 7] Lee E, Taussig R, Gilman AG. 1992 J. Biol. Chem. 267:1212.
- 8] Rarick, H.M, Artemyev, N O , and Hamm, H.E. 1992. Science. 256:1031.
- 9] Blank J L, Brattan K A , and Exton J.H. 1992 J. Biol. Chem. 267:23069.
- 10] Dippel E, Kalkbrenner F, Wittig B, Schultz G. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 1391.
- 11] Higashijima T, Graziano MP, Suga Hkainosho M, Gilman AG. 1991. J. Biol. Chem. 266 3396
- 12] Kahn RA. 1991 J. Bio Chem 266 15595.
- 13] Fung BK, 1983. J. Biol. Chem. 258: 10495.
- 14] Cerione RA, 1991 Biochim Biophys. 1071:473.
- 15] Lochrie, M, and Simon, M I. 1988. Biochemistry. 27:4957.
- 16] Simon MI, Strathmann MP, Gautman N. 1991. Science. 252:802.
- 17] Masters SB, Stroud RM, Bourne HR. 1986. Protein Eng. 1:47.
- 18] Pai EF, Krenzel U, Petsko GA, Goody RS, Kabsch W, Wittinghofer A. 1990 EMBO J 9 2351
- 19] Holbrook SR, Kim SH. 1989 Proc Natl. acad. Sci. USA 86:1751.
- 20] de Vos AM, Tong L, milburn MV, Matias PM, Jancarik J, Noguchi S, Nishimura S, Miura K, Ohtsuka E, Kim SH. 1988 Science 239:888.
- 21] Bertot CH, Bourne HR. 1992 Cell 68 911.
- 22] Johnson GL, Dhanasekaran N, Gupta SK, Lowndes JM, Vaillancourt RR, Ruoho AE. 1991 J. Cell Biochem. 47:136.
- 23] Pang I-H, Sternweis PC. 1990 J Biol Chem. 265 18707.
- 24] Blank JL, Ross AH, Exton JH. 1991. J. Biol. Chem. 266 18206.
- 25] Masters SB, Miller RT, Chi MH, Chang FH, Beiderman B, Lopez NG, Bourne H R. 1989 J Biol Chem. 264 15467
- 26] Graziano MP, Gilman AG. 1989 J Biol Chem 264 15475
- 27] Woon CW, Heasley L, Osawa S, Johnson GL. 1989 Biochemistry 28:4547
- 28] Wong YH, Conklin BR, Bourne HR. 1992 Science 255:339
- 29] Conklin BR, Chabre O, Wong YH, Federman AD, Bourne HR. 1992. J. Biol. Chem. 267:31.
- 30] Wu, D., Lee, C. H., Rhee, S. G., Simon, M. Y. 1992. J. Biol. Chem. 267:1811.

- 31] Gierschik P, Sidiropoulos D, Jakobs KH. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:21470.
- 32] Bornancin F, Chabre M. 1991. *FEBS Lett.* 291:273.
- 33] Iri T, Ohoka Y, Ui M, Katada T. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:1020.
- 34] Hermouet S, Merendino Jr JJ, Gutkind JS, Spiegel AM. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10455.
- 35] Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR. 1991. *Nature.* 351:63.
- 36] West Jr RE, Moss J, Vaughan M, Liu TY. 1985. *J. Biol. Chem.* 260:14428.
- 37] Ramdas L, Disher RM, Wensel TG. 1991. *Biochemistry.* 30:11637.
- 38] Sullivan KA, Miller RT, Masters SB, Beiderman B, Heideman W, Bourne HR. 1987. *Nature* 330:758
- 39] Rall T, Harris BA. 1987. *FEBS Lett.* 224:365
- 40] Gupta SK, Diez E, Heasley LE, Osawa S, Johnson GL. 1990. *Science* 249:662
- 41] Gupta SK, Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL. 1991. *J. Cell Biochem.* 47:359.
- 42] Itoh H, Gilman AG. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:16226.
- 43] Osawa S, Heasley LE, Dhanasekaran N, Gupta SK, Woon CW, Berlot C, Johnson GL. 1990. *Mol. Cell Biol.* 10:2931.
- 44] Neer EJ, Pulsifer L, Wolf LG. 1998. *J. Biol. Chem.* 263:8996.
- 45] Jones TLZ, Simonds WF, Merendino Jr JJ, Brann MR, Spiegel AM. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:568.
- 46] Linder ME, Pang I-H, Duronio RJ, Gordon JI, Sternweis PC, Gilman AG. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:4654
- 47] Higashijima T, Rose EM. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:12655.
- 48] Ui M. 1984. *Trends. Pharmacol. Sci.* 5:277.
- 49] Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG. 1983. *J. Biol. Chem.* 258:2072.
- 50] Codina J, Hildebrandt J, Iyengar R, Birnbaumer L, Sekura RD, Manclark CR. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:4276.
- 51] Gilman AG. 1987. *Annu. Rev. Biochem.* 56:615.
- 52] Neer EJ, Lok JM, Wolf LG. 1984. *J. Biol. Chem.* 259:14222
- 53] Goldsmith P, Backlund Jr PS, Rossiter K, Carter A, Milligan G, Unson CG, Spiegel A. 1988. *Biochemistry.* 27:7085
- 54] Gierschik P, Falloon J, Milligan G, Pines M, Gallin JI, Spiegel A. 1986. *J. Biol. Chem.* 261:8085
- 55] Jones DT, Reed RR. 1987. *J. Biol. Chem.* 262:14241.
- 56] Amatrua I TT, Steele DA, Slepak VZ, Simon MI. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5587.
- 57] Wilkie TM, Scherle PA, Strathmann MP, Slepak VZ, Simon MI. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10049.
- 58] Bray P, Carter A, Simons C, Guo V, Puckett C, Kamholz J, Spiegel A, Nirenberg M. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8893.
- 59] Tsukamoto T, Toyama R, Itoh H, Kosaka T, Matsuoka M, Kaziro Y. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2974.

- 60] Nakamura F, Ogata K, Shiozaki K, Kameyama K, Ohara K, Haga T, Nukada T. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:12676.
- 61] Jiang M, Pandey S, Tran VT, Fong HKW. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:3907.
- 62] Mc Laughlin SK, Mc Kinnon PJ, Margolskee RF. 1992. *Nature.* 357:563.
- 63] Cerione RA, Gierschik P, Staniszewski C, Benovic JL, Codina J, Somers R, Birnbaumer L, Spiegel AM, Lefkowitz RJ, Caron MG. 1987. *Biochemistry.* 26:1485.
- 64] Fawzi AB, Fay DS, Murphy EA, Tamir H, Erdos JJ, Northup JK. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:12194.
- 65] Rubenstein RC, Linder ME, Ross EM. 1991. *Biochemistry.* 30:10769.
- 66] Olate J, Martinez S, Purcell P, Jorquera H, Codina J, Birnbaumer L, Allende JE. 1990. *FEBS Lett.* 268:27.
- 67] Pottinger JDD, Ryba NJP, Keen JN, Findlay JBC. 1991. *Biochem. J.* 279:323.
- 68] Pupillo M, Kumagai A, Pitt GS, Firtel RA, Devreotes PN. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:4892.
- 69] Ma H, Yanofsky NF, Meyerowitz EM. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:3821.
- 70] Quan, F, Thomas, L., and Forte, M. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:1898.
- 71] Torres Márquez ME, Macías-Silva M., and Vega-Segura A. 1996. *Biochem. Physiol.* 115C:233.
- 72] Blumer KJ, Thoner J. 1991. *Annu. Rev. Physiol.* 53:37.
- 73] Savarese TM, Fraser CM. 1992. *Biochem. J.* 283:1.
- 74] Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Lefort A, Eggerickx D, Ledent C, Mollereau C, Gérard C, Perret J, Grootegoed A, Vassart G. 1992. *Nature.* 355:453.
- 75] Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:1633.
- 76] Kjelsberg M A., Cotecchia S, Ostrowski J., Caron M.G. Lefkowitz R. J. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:1430.
- 77] Hausdorff WP, Hnatowich M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:1388.
- 78] Okamoto T, Katada T, Murayama Y., Ui M., Ogata E., Nishimoto Y. 1990. *Cell.* 62:709.
- 79] Munch G, Dees C, Hekman M, Palm D. 1991. *Eur. J. Biochem.* 198:357.
- 80] Okamoto T, Murayama H, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E, Nishimoto Y. 1991. *Cell.* 67:723.
- 81] Parker EM, Kameyama K, Higashijima T, Ross EM. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:519.
- 82] Milligan G, Carr C, Gould GW, Mullanev I, Lavan B. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:6447.
- 83] Schmidt A, Hescheler J, Offermanns S, Spicher K, Hirsch K-D, Klinz F J, Codina J, Birnbaumer L, Gausepohl H, Frank R, Schultz G, Rosenthal W. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:18025.
- 84] Matesic DF, Manning DR, Luthin GR. 1991. *Mol. Pharmacol.* 40:347.

- 85] McFadzean I, Mullaney I, Brown DA, Milligan G. 1989. *Neuron*. 3:177.
- 86] La Morte VJ, Goldsmith PK, Spiegel AM, Meinkoth JL, Feramisco JR. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:691.
- 87] Palm D, Munch G, Malek D, Dees C, Heckman M. 1990. *FEBS. Lett.* 261:294.
- 88] Gutowski S, Smarcka A, Nowak L, Wu D, Simon M, Sternweis PC. 1991. *J. Biol. Chem.* 266:20519.
- 89] Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:20356.
- 90] Mac Nault EE, McClue SJ, Carr IC, Jess T, Wakelman MJO, Milligan G. 1992. *J Biol Chem.* 267:2149.
- 91] Onrust R, Herzmark P, Chi P, Garcia P. D, Lichtarge O, Kingsley Ch, Bourne HR. 1997. *Science.* 275:381.
- 92] Franke, RR., König, B., Sakmar, T.P., Khorana, H.G., and Hofmann, K.P. 1990. *Science.* 250:123.
- 93] Conklin B R. and Bourne HR. 1993. *Cell.* 73:631.
- 94] Spiegel, A. M., Shenker, A., and Weinstein, L. S. 1992. *Endocrine Reviews.* 13:536
- 95] Simonds W F, Goldsmith PK, Woodard CJ, Unson CG, Spiegel AM. 1989. *FEBS Lett.* 249:189.
- 96] Simonds WF, Goldsmith PK, Codina J, Unson CG, Spiegel AM. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7809
- 97] Sutcliffe, J. G., Shinnick, T. M., Green, N., Liu, F-T., Niman, H. L., and Lerner, R. A. 1980. *Nature.* 287:801.
- 98] Merrifield, R.B. 1963. *Science.* 85:2149.
- 99] Ed Harlow, David Lane. 1988. *Antibodies. A laboratory Manual.* Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 100] Jensenius, J.C, Andersen Y, Hau J, Crone M, and Koch C. 1981. *J. Immunol. Meth.* 46:63.
- 101] Rose, M.E., E, Orlans and N. Buttriss, 1974. *Eur. J. Immunol.* 4:521.
- 102] Arita, E. M., and Nakai, S. 1992. *J. Food Sci.* 57:629.
- 103] D. Danielpour. 1993. *J. Immunol. Meth.* 158:17.
- 104] Song C S. 1985. *J. Immunol.* 135:3354.
- 105] Polson A. T., Von Wechmar M.B., and Van Regenmortel M.H.V. 1980. *Immunol. Commun.* 9:475.
- 106] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. *J. Biol. Chem.* 193:265
- 107] Prpic V., Green K. C., Blackmore P. F., and Exton J. H. 1984. *J. Biol. Chem.* 259:1382
- 108] Abramowitz J, Iyengar R, and Birnbaumer L. 1980. *J. Biol. Chem.* 255:8259.
- 109] Iyengar R. 1994. *Methods of Enzymology* 237:210.
- 110] Laemmli, 1970. *Nature.* 227:680-685.
- 111] Salomon Y, Londos C, and Rodbell M. 1974. *Anal. Biochem.* 58:541.
- 112] Master S.B., Sullivan K.A., Miller R.T., Beiderman B., Lopez N.G. Ramachandran J., and Bourne H.R. 1988. *Science.* 241:448.
- 113] Knecht W, Köhler R, Minét M, and Löffler M. (1996). *Eur. J. Biochem.* 236:609.
- 114] Somkuti SG, Hildebrandt JD, Herberg JT, and Iyengar R. 1982. *J. Biol. Chem.* 257:6387.