

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS
POLICLONALES ESPECÍFICOS CONTRA EL
TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS DEPENDIENTE DE
SODIO 2 (SNAT2)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

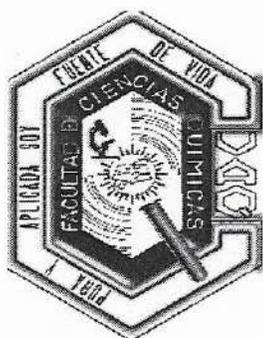
PRESENTA

AMÉRICA GABRIEL CONEJO CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS
POLICLONALES ESPECÍFICOS CONTRA EL
TRANSPORTADOR DE AMINOÁCIDOS DEPENDIENTE DE
SODIO 2 (SNAT2)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

AMÉRICA GABRIEL CONEJO CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

DIRECTOR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODAL

Dr. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

SINODAL

Dr. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|---|--------|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| RESUMEN | |
| | |
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1. Transporte de membrana | 1 |
| 1.2. Acarreadores de soluto (SLC) | 1 |
| 1.2.1. SLC38 | 2 |
| 1.2.1.1. SNAT2 | 2 |
| 1.3. Anticuerpos | 3 |
| 1.4. Sistema Inmune | 4 |
| 1.4.1. Activación del sistema inmune adaptativo a través de receptores celulares | 4 |
| 1.4.2. Células presentadoras de antígeno | 5 |
| 1.4.3. Linfocitos | 6 |
| 1.4.3.1. Linfocitos T | 6 |
| 1.4.3.2. Linfocitos B | 7 |
| 1.4.4. Anticuerpos monoclonales y policlonales | 7 |
| 1.5. Producción de anticuerpos policlonales | 9 |
| 1.5.1. Selección del antígeno | 9 |
| 1.5.1.1. Diseño del péptido para inducir una respuesta inmune | 10 |
| 1.5.2. Características de la especie animal a inmunizar | 11 |
| 1.5.3. Adyuvante | 11 |
| 1.5.4. Esquema de inmunización | 12 |

| | |
|---|----|
| 2. HIPÓTESIS | 14 |
| 3. OBJETIVOS | 15 |
| 3.1. General | 15 |
| 3.2. Específicos | 15 |
| 4. METODOLOGÍA | 16 |
| 4.1. Materiales | 16 |
| 4.1.1. Equipo | 16 |
| 4.1.2. Reactivos | 16 |
| 4.1.3. Material biológico | 17 |
| 4.1.4. Consideraciones bioéticas | 18 |
| 4.2. Métodos | 18 |
| 4.2.1. Análisis bioinformático para el diseño de péptidos | 18 |
| 4.2.2. Inmunógenos | 19 |
| 4.2.3. Inmunización | 19 |
| 4.2.4. Toma de muestra de sangre pre inmunizada | 19 |
| 4.2.5. Procesamiento de la muestra de sangre | 19 |
| 4.2.6. Ensayo inmunoenzimático para la determinación del título de anticuerpos | 20 |
| 4.2.7. Cultivo de células HEK293 | 20 |
| 4.2.8. Inmunofluorescencia | 21 |
| 4.2.9. Sobreexpresión de SNAT2 en cultivos celulares HEK293 con estrés osmótico | 21 |
| 4.2.10. Transfección por precipitado con fosfatos de calcio | 21 |
| 4.2.11. Obtención de proteínas con solución de RIPA | 22 |
| 4.2.12. Extracción de proteínas con Tris-HCl | 22 |
| 4.2.13. Purificación de proteínas de membrana | 22 |
| 4.2.14. Cuantificación de proteínas | 23 |
| 4.2.15. Inmunodetección en fase sólida | 24 |
| 4.2.16. Purificación de anticuerpos por precipitado de sales | 25 |
| 4.3. DIAGRAMA EXPERIMENTAL | 26 |
| 5. RESULTADOS | 27 |

| | |
|---|----|
| 5.1. Análisis bioinformático de zonas antigénicas localizadas en la secuencia del transportador SNAT2 | 27 |
| 5.2. Homogeneidad de los inmunógenos | 34 |
| 5.3. Evaluación del título de anticuerpos mediante un ELISA indirecto | 35 |
| 5.4. Extracción de proteínas con Tris-HCl | 40 |
| 5.5. Especificidad de reconocimiento del transportador SNAT2, de los anticuerpos del suero CC2 en un modelo celular | 43 |
| 5.6. Purificación de anticuerpos policlonales por precipitación de sales | 44 |
| 5.7. Inmunofluorescencia en células HEK293 | 44 |
| 6. DISCUSIÓN | 47 |
| 7. CONCLUSIONES | 53 |
| 8. REFERENCIAS | 54 |
| 9. ANEXOS | 60 |
| 9.1. Aprobación del Comité de Bioética de la FCN-UAQ | 60 |

RESUMEN

La capacidad que tiene el sistema inmunológico de reconocer antígenos y promover la producción de inmunoglobulinas, puede ser aprovechada para la producción de anticuerpos facilitando el estudio molecular de proteínas funcionales en varios estados fisiológicos y patológicos, convirtiéndolo en una herramienta biotecnológica muy poderosa, para poder identificar epítomos específicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es producir anticuerpos policlonales dirigidos contra regiones del transportador de aminoácidos dependiente de sodio 2 (SNAT2), dado que, los anticuerpos comerciales contra esta proteína que se encuentran disponibles, no reconocen epítomos con interés particular para nuestro laboratorio. SNAT2 es miembro del sistema A de la familia de transportadores SLC38 y es requerido en la modulación del tráfico y disponibilidad de aminoácidos. Esta proteína está asociada a enfermedades cerebrales, renales, intestinales, hepáticos, entre otras. En el presente trabajo, logramos crear una herramienta molecular a través de la producción de anticuerpos policlonales mediante el uso de péptidos sintéticos. Estos tienen capacidad de reconocer con gran especificidad y afinidad a la región carboxilo del transportador SNAT2 tanto en tejidos como en cultivos celulares. Lo que permitirá avanzar en el conocimiento de su funcionamiento y expresión en célula.

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Curva estándar para cuantificación proteica por método de Bradford. | 23 |
| 2 | Dilución de suero anti- SNAT2 usada para incubar las membranas de WB. | 24 |
| 3 | Resultados obtenidos de la inmunodetección en fase sólida, dilución, concentración proteica usada y bandas obtenidas. | 41 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Predicción de epítopes reconocidos por células B. | 27 |
| 2 | Esquema de hidropatía. | 28 |
| 3 | Predicción de regiones transmembranales. | 29 |
| 4 | Predicción de regiones expuestas en superficie. | 29 |
| 5 | Predicción de hélices transmembranales. | 30 |
| 6 | Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de SNAT2 de ratón, gallo y humano. | 31 |
| 7 | Marcaje de identidad y similitud. | 32 |
| 8 | Alineamiento de las secuencias peptídicas. | 33 |
| 9 | Identificación de las secuencias peptídicas candidatas en la estructura de SNAT2. | 33 |
| 10 | Microscopía en campo claro de los inmunógenos. | 34 |
| 11 | Esquema de inmunización. | 35 |
| 12 | Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros CC1 y CC2. | 36 |
| 13 | Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros N1C1 y N1C2. | 37 |
| 14 | Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros N2C1 y N2C2. | 38 |
| 15 | Análisis de las inmunizaciones basado en la dilución del título más alto contra el número de inmunizaciones realizadas por conejo. | 39 |
| 16 | Curva estándar de Bradford. | 40 |
| 17 | Evaluación de la especificidad hacia el transportador SNAT2 con suero total. | 42 |
| 18 | Análisis de expresión de SNAT2 en tejido y cultivo celular. | 43 |

| | | |
|----|--|----|
| 19 | Análisis de la especificidad de reconocimiento por suero anti SNAT2 purificado CC2 en extracto proteico total de hígado de rata. | 44 |
| 20 | Inmunofluorescencia de suero contra SNAT2 en células HEK293 tratadas con y sin sacarosa 200mM. | 45 |
| 21 | Inmunodetección en fase sólida de células HEK293 con y sin tratamiento con sacarosa 200mM. | 46 |

1. ANTECEDENTES

1.1. Transportadores de membrana

Los transportadores de membrana son proteínas cuya función es facilitar el traslado de sustratos a favor o contra su gradiente de concentración, permitiendo el paso selectivo de moléculas específicas a través de su cambio conformacional (Lodish y col., 2011). Se caracterizan por mediar un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo, pero no limitado a la conducción de impulsos nerviosos, transducción de señales, absorción de nutrientes, proliferación celular, regulación inmune y génesis tumoral.

Los mecanismos de transporte se clasifican en tres tipos: transporte simple, cotransporte e intercambiadores. El transporte simple traslada un solo tipo de molécula por difusión facilitada, a favor del gradiente de concentración. En contraste los cotransportadores e intercambiadores movilizan el sustrato contra su gradiente de concentración y/o gradiente electroquímico. El cotransportador impulsa dos o más iones en la misma dirección, mientras que el intercambiador importa y exporta uno o más moléculas en direcciones opuestas (Dahl y col., 2004; Jiménez y Merchant, 2003). Se han clasificado cerca de 5600 transportadores de membrana en varios organismos y están agrupados en 7 familias, subdivididos en sus respectivas subfamilias, basado en su función y filogenia (Saier, 2000). Los acarreadores de soluto (SLC, por sus siglas en inglés, Solute Carrier) corresponde al grupo más abundante de proteínas transportadoras, la mayoría se encuentran localizados en la membrana celular, en mitocondrias y orgánulos intracelulares (Fredricksson y col., 2008).

1.2. Acarreadores de soluto (SLC)

Los transportadores SLC controlan el flujo de varios solutos, incluyendo metabolitos, iones, toxinas y fármacos (Hediger y col., 2004; Fredriksson y col., 2008). Se han clasificado en 52 subfamilias, de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y homología de secuencias. Organizados en cuatro grupos (α , β , γ , δ) basado en el tipo de sustrato transportado (Hagglund, 2013) y por el número de regiones

transmembranales. El grupo α contiene seis familias, SLC2, 16, 17, 18, 22, 37; el grupo β incluye tres familias de transportadores de aminoácidos SLC 32, 36 y 38, mientras que el grupo γ incluye a SLC7 y 12 y el grupo δ , SLC8 y 24 (Fredriksson y col., 2008). Las familias SLC1,6,7,32 y 38 median la movilización de aminoácidos, su importancia radica en la participación que tienen en numerosos procesos biológicos tal como la síntesis de proteínas, síntesis de neurotransmisores o señalización celular (Baird y col., 2009; Colas y col., 2016).

1.2.1. SLC38

La superfamilia SLC38 lleva a cabo el transporte de aminoácidos neutros a través de la membrana, se caracteriza principalmente por ser Na^+ dependiente. Se destacan por tener un mecanismo selectivo del transporte activo, dado que, para transportar un aminoácido neutro requiere de iones como Na^+ y de algunos otros como, H^+ , K^+ y/o Cl^- (Taylor, 2014).

La familia de transportadores SLC38, también conocido como SNATs (por sus siglas en inglés: Sodium-coupled Neutral Aminoacid Transporters), está compuesto por once miembros (Hyde y col, 2001), clasificados de acuerdo a su mecanismo de transporte en el sistema A, integrado por las proteínas SNAT1, 2, 4 y 8, con función de cotransporte de aminoácidos neutros y sodio. El sistema N constituido por SNAT3, 5 y 7, con función de intercambiador Na^+/H^+ . Los cinco miembros restantes de esta familia, se les denomina transportadores huérfanos, debido a que no se ha descrito aún su mecanismo de acción (Chaundhry y col., 2002; Mackenzie y Erickson, 2004).

1.2.1.1. SNAT2

El transportador de aminoácidos dependiente de sodio 2 (por sus siglas en inglés Sodium-coupled Neutral Aminoacid Transporters 2, SNAT2) media un transporte electrogénico de un Na^+ y el cotrasporte de un aminoácido neutro (alanina, asparagina, cisteína, glutamina, glicina, histidina, metionina, prolina, serina). Está compuesto de 504 aminoácidos teniendo una masa molecular de 56kDa (Schiöth y col., 2013). Estructuralmente está compuesto de once hélices transmembranales con

su N-terminal intracelular y el C-terminal extracelular (Yao y col., 2000; Schiöth y col., 2013).

Este transportador participa en la regulación del crecimiento intrauterino (Chen y col., 2015), en la activación de la vía de señalización mTOR, así como en la regulación del crecimiento celular y proliferación (Avruch y col., 2009). A nivel fisiológico, tiene importantes implicaciones en: La regulación en la concentración de ácidos grasos (Nardi y col., 2015), la modulación de la síntesis de glucosa en la vía de gluconeogénesis en hígado (Varoqui y Erickson, 2002) y está involucrado en la movilidad de glutamina dentro del ciclo glutamato/glutamina en cerebro, participando en el reciclamiento y abastecimiento de neurotransmisores (Schiöth y col., 2013). Para facilitar su estudio funcional en varios estados patológicos y fisiológicos, se requieren de herramientas moleculares. Un claro ejemplo de estas herramientas son los anticuerpos, que se han usado como moléculas valiosas para la detección específica y reconocimiento de regiones de interés.

1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas, son proteínas heterodiméricas, con capacidad de reconocer una molécula extraña (conocida como antígeno) (Rojas- Espinosa, 2006). Estructuralmente consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, compuestas por regiones variables (amino terminales) y constantes (carboxi terminales). Las regiones variables participan en el reconocimiento del antígeno, conocida como región Fab (del inglés antibody fraction) (Schroeder y Cavacini, 2010) y las regiones constantes median las funciones efectoras de activación del sistema inmune, regiones Fc (del inglés constant fraction) (Williams y Barclay 1988). Los anticuerpos están clasificados en cinco clases IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en las diferencias estructurales polipeptídicas en la región constante de la cadena pesada. Cada una tiene su función específica. La IgM ayuda a la activación de complemento; IgG tiene como función de reconocer de forma inmediata a antígenos patógenos o exógenos promoviendo la fagocitosis por los macrófagos; IgE participa en el reconocimiento de helmintos mediada por eosinófilos y mastocitos y las IgA que

son inmunoglobulinas que se transportan a través del epitelio hacia las superficies de mucosas en defensa contra la invasión de patógenos inhalados e ingeridos (Alberts y col., 2002; Woof y Kerr, 2004). Todas tienen como fin, reconocer regiones del antígeno (también conocido como epítope) y mediar la activación del sistema inmune.

1.4. Sistema Inmune

El sistema inmunológico es un sistema de defensa del huésped que comprende estructuras y procesos biológicos que tiene como función proteger al organismo ante una diversidad de patógenos. Consta de dos líneas de defensa, clasificadas de acuerdo a la especificidad de respuesta y el tiempo de la misma, estos son: Sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo. La activación del sistema inmune innato es la primera línea de defensa mediada por fagocitos, células presentadoras de antígeno y linfocitos citosólicos, cuya función es combatir la infección y atacar a los agentes patógenos. Posteriormente, se activa la segunda línea de respuesta que es la activación del sistema inmune adaptativo, que tiene como fin reconocer con especificidad epítopes por parte de los linfocitos T y B aumentando la magnitud y la capacidad de defensa ante el agente patógeno (Warrington, 2011). Estos procesos de identificación y activación son mediados por receptores celulares, que difieren en tipo y concentración entre las estirpes celulares, con capacidad de distinguir la diversidad de conformación estructural de cada antígeno (Granados, 2018).

1.4.1. Activación del sistema inmune adaptativo a través de receptores celulares.

La activación del sistema inmune adaptativo es llevada a cabo por los linfocitos T y B a través de sus receptores membranales. Los receptores de los linfocitos B, llamado BCR (por sus siglas en inglés: B Cell Receptor, BCR) tienen la capacidad de reconocer antígenos proteicos cuando la proteína mantiene su conformación tridimensional nativa, promoviendo así su activación (Janeway y col., 2001). Así mismo, los linfocitos T se activan al reconocer fragmentos de antígenos que han sido procesados por una célula presentadora de antígeno y presentado por complejos

MHC (por sus siglas inglés, Major Histocompatibility Complex). El reconocimiento de este complejo es dado a través de sus receptores de membrana TCR (por sus siglas en inglés: T Cell Receptor, TCR) que consta de dos cadenas polipeptídicas (α y β), y del anclaje con las moléculas accesorias (CD4 y CD8) a las regiones conservadas del complejo MHC. Estas interacciones tienen como objetivo informar al núcleo celular que se ha reconocido un antígeno. Como respuesta, el núcleo comienza a transcribir de un conjunto de genes que permite al linfocito T activarse y diferenciarse (Janeway y col., 2001; Abbas y col., 2012).

El complejo principal de histocompatibilidad MHC se localiza en el cromosoma 6, contiene dos tipos de genes polimórficos: MHC clase I y II, el primero se encuentran expresadas de forma constitutiva en casi todas las células nucleadas, mientras que el MHC clase II se encuentran en células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Su principal función es presentar fragmentos peptídicos a linfocitos T (Neefjes y col., 2011).

1.4.2. Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés Antigen-Presenting Cell), son las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Tienen la capacidad de reconocer antígenos, endocitar o fagocitar, procesarlas en fragmentos peptídicos y presentarlas en su superficie con complejos MHC para que los linfocitos T puedan reconocerlos a través de sus receptores TCR (Abbas y col., 2012).

Las células dendríticas están ampliamente distribuidas en los tejidos linfáticos, epitelios mucosos y en el parénquima de los órganos. Se caracterizan por ser iniciadoras y moduladoras de la respuesta inmune a través de su vasta expresión de receptores en membrana. Tiene como función servir de enlace entre el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, mediante la presentación de péptidos a través de sus moléculas MHC clase II para activar a linfocitos T en ganglios linfáticos promoviendo la activación del sistema inmune adaptativo (Bamchereau y Steinman, 1998). Los macrófagos son fagocitos mononucleares presentes de forma innata en los tejidos, surgen en médula ósea y su diferenciación se debe a las

citocinas interferón gamma (IFN- γ), TNF- α (por sus siglas en inglés: Tumor Necrosis Factor alfa, TNF- α) y endotoxinas bacterianas. Una de sus funciones es reclutar fagocitos polimorfonucleares al sitio de infección a través de la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina- 6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), además de activar a los linfocitos CD4+ en la presentación de antígeno por receptores MHC clase II (Chaplin, 2009). Los linfocitos B tienen capacidad de reconocer antígenos solubles a través de su receptor BCR, procesarlo y eventualmente presentarlo en complejos MHC clase II para que un linfocito T active eficientemente al linfocito B a través de sus receptores TCR (Prieto y col., 2013).

1.4.3. Linfocitos

Los linfocitos son las principales células que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa y representan el 20-40% de los leucocitos circulantes y 99% de las células en linfa. Los linfocitos pueden subdividirse en dos poblaciones principales con base a sus diferencias funcionales y fenotípicas: linfocitos T (células T), teniendo como función de reconocer antígenos de forma específica y linfocitos B (células B) con capacidad de producir anticuerpos.

1.4.3.1. Linfocitos T

Las células de la inmunidad celular surgen de médula ósea y migran al timo para madurar expresando receptores celulares (receptores de célula T, TCR), convirtiéndose en linfocitos T funcionales; una vez terminado su proceso de maduración migran al torrente sanguíneo, pueblan los tejidos linfáticos secundarios y se reclutan en las zonas periféricas de exposición al antígeno. Si alguna APC llega a reconocer un antígeno, éste se aloja en los órganos linfáticos para inducir la proliferación de los linfocitos T, generando linfocitos específicos tales como los linfocitos CD8+ (Linfocitos T citotóxicos) y los linfocitos CD4+ (linfocitos T cooperadores) que pueden diferenciarse a TH1, TH2, TH17 y Treguladoras, (Masopust y Schenkel., 2013). Los linfocitos T citotóxicos median la lisis de células blanco que portan péptidos antigénicos que forman complejos con una molécula de MHC clase I. Los linfocitos T cooperadores están involucrados en la diferenciación

de los linfocitos B mediante el reconocimiento de complejos peptídicos MHC clase II a través de los receptores TCR del linfocito CD4+ (Bamchereau y col., 1998).

1.4.3.2. Linfocitos B

Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos y, por tanto, mediar las respuestas inmunitarias. Se desarrollan en la médula ósea y migran a través del torrente sanguíneo para alojarse en los órganos linfáticos periféricos (bazo, ganglios linfáticos y los tejidos mucosos linfáticos) para madurar, en donde sintetiza y despliega el receptor de célula B (BCR), así mismo, expresan anticuerpos unidas a su membrana. Salen de nuevo a torrente sanguíneo para alojarse en los órganos linfáticos y situarse en los folículos para encontrarse con el antígeno y reconocerlo a través de su receptor BCR (Boyce y col., 2013). Una vez que reconoce al antígeno, lo endocitan y procesan para generar péptidos que se unen a complejos MHC clase II. Posteriormente, estos complejos son presentados a los linfocitos CD4+ y son reconocidos a través de sus receptores TCR. Esta interacción induce a los linfocitos CD4+ producir IL-4 y TNF- α provocando la proliferación y diferenciación de linfocitos B a linfocitos B de memoria y células plasmáticas. Los linfocitos B de memoria tienen la capacidad de sobrevivir en los linfoides secundarios, mediando respuestas inmunológicas en la exposición secundaria del mismo antígeno, reconociéndolos con mayor afinidad a través de sus receptores BCR. Mientras que las células B plasmáticas, al ser células diferenciadas terminalmente se alojan en el bazo y en la médula ósea, volviéndose la principal fuente de anticuerpos, siendo responsables de la neutralización de antígenos ante una segunda infección (Bernasconi y col., 2002).

1.4.4. Anticuerpos monoclonales y policlonales

Los antígenos son altamente complejos, presentan numerosos epítopes que son reconocidos por un gran número de linfocitos B. Estos linfocitos B son activados y diferenciados a células plasmáticas dando como resultado una respuesta de anticuerpos policlonales. Se define como anticuerpos policlonales a la mezcla de inmunoglobulinas que reconocen diferentes epítopes del antígeno y son derivados de diferente linfocito B. Esto anticuerpos, son generados al inmunizar repetidas veces

a un animal con antígeno, con el fin de activar su sistema inmune e inducir una respuesta de inmunoglobulinas. Al tener un título alto de anticuerpos, se extrae sangre del sujeto, y se purifican. Se obtiene una mezcla de anticuerpos que reconocen diversos epítopes del antígeno inmunizante. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales son producidos por un único clon de linfocitos B, siendo altamente específicos para un epítopo. La producción de estos anticuerpos se logra mediante la fusión por medios físicos y químicos (polietilen-glicol y centrifugación) de células B del bazo de un animal inmunizado con una línea inmortal de mieloma no secretora de anticuerpos, deficiente en la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT). Esta deficiencia que porta el mieloma, es útil en el proceso de selección de las hibridomas (línea celular obtenida de la fusión de linfocitos B-mieloma) ya que aporta su capacidad de división limitada (inmortalidad). De tal forma que, la selección del híbrido, es derivado del bloqueo de la síntesis de DNA con medio HAT y solamente podrán sobrevivir aquellas que contengan la enzima HGPRT aportadas por la célula B. Una vez efectuada la fusión y selección, son sometidas a pruebas para determinar si producen el anticuerpo deseado. Si el resultado es positivo, la colonia de células se siembra en placas manteniendo diluciones continuas, de modo que solo haya una célula por pozo, hasta obtener anticuerpos monoclonales con capacidad de reconocer un solo epítopo del antígeno (Lipman y col., 2005; Howard y Bethell, 2009; Owen y col., 2014; Abbas y col., 2018).

La ventaja que tienen los anticuerpos policlonales, es que se obtienen en un corto periodo de tiempo (4-8 semanas), en comparación con los anticuerpos monoclonales (3 y 6 meses). Los policlonales reconocen múltiples epítopes de un antígeno teniendo como ventaja detectar proteínas en bajas concentraciones. Mientras que los monoclonales son útiles para evaluar cambios en la conformación de la proteína, estados de fosforilación, etc., sin embargo, su mono-especificidad es limitada ante los cambios en la estructura del epítopo, afectando notablemente la función del anticuerpo. Otra de las ventajas que poseen los anticuerpos policlonales, es que son estables a los cambios de pH y a las concentraciones salinas, mientras que los monoclonales son susceptibles a estos cambios (Lipman y col., 2005).

La capacidad que tienen los anticuerpos, son de gran utilidad en investigación como herramientas moleculares, ya sea para identificar, aislar y purificar proteínas específicas, o para ser usadas en el diagnóstico o tratamiento terapéutico para bloquear receptores o competir con ligandos. Es por ello, que la producción de anticuerpos son una estrategia importante para cumplir con los objetivos del investigador.

1.5. Producción de anticuerpos policlonales

La producción de anticuerpos tiene gran utilidad en aplicaciones biológicas, médicas, así como pruebas diagnósticas. Al elegir entre producir anticuerpos policlonales o monoclonales se debe considerar la aplicación deseada del anticuerpo, el tiempo y dinero disponible (Leenaars y Hendriksen, 2005). Los anticuerpos reconocen eficientemente al antígeno, dado que obtenemos una mezcla de anticuerpos dirigidos al antígeno inmunizante producidos por diferentes clonas de linfocitos B, son fáciles de producir y menos costosos que los anticuerpos monoclonales (Lipman y col., 2005).

Para la producción de anticuerpos policlonales, son necesarios llevar pasos críticos y continuos como son 1) elección del antígeno, 2) elección de la especie animal a inmunizar, 3) elección del adyuvante, 4) esquema de inmunización.

1.5.1. Selección del antígeno

Un antígeno se define como cualquier sustancia que es reconocida por un anticuerpo o receptor celular, no necesariamente genera una respuesta inmune. Para aquellas que generan una respuesta inmune se les denomina inmunógeno. Los inmunógenos son generalmente de alto peso molecular, tal como proteínas y polisacáridos, presentan un grado mínimo de complejidad bioquímica y son reconocidos como extraños en el organismo (Abbas y col., 2018). La respuesta inmune puede también ser generada por compuestos de bajo peso molecular, también conocido como hapteno, solo si están químicamente acopladas a proteínas transportadoras como: albumina de suero bovino, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina y las

matrices sintéticas como los ramificados de lisina. Estas proteínas le dan mayor tamaño estructural al hapteno, permitiendo tener muchos epítopes para estimular a los linfocitos T cooperadores (Burns, 2005).

Históricamente se usaban proteínas completas, patógenos microbianos atenuados o inactivados para la inducción de respuestas específicas de antígeno, con el fin de producir anticuerpos. Por esta razón, la variedad de anticuerpos generados tenía la capacidad de reconocer distintos epítopes presentes en el antígeno inmunizante. Por otra parte, usar proteínas adicionales pueden inducir respuestas alérgicas, o el tener varios epítopes de una proteína que son innecesarias, lo que enfatiza la necesidad de eliminarlas. Por tal motivo se ha tenido el interés de usar secuencias peptídicas como antígeno con capacidad de inducir la respuesta inmune positiva mediada por células T y B, produciendo anticuerpos específicos. Estos péptidos son diseñados a través de herramientas bioinformáticas, se sintetizan y purifican artificialmente, para posteriormente ser acoplados a proteínas transportadoras para aumentar su inmunogenicidad y después son conjugados con adyuvantes para inmunizar animales (Harlow y Lane, 1988; Li y col., 2014).

1.5.1.1. Diseño del péptido para inducir una respuesta inmune.

Los péptidos son biomoléculas complejas que tienen propiedades químicas y físicas únicas que son resultado directo de su composición aminoacídica. Algunos elementos clave en el diseño de péptidos para inducir una respuesta inmune son (Harlow y Lane, 1988; Almeida y col., 2018):

- 1) Identificación de epítopes potenciales con capacidad inmunogénica para activar el sistema inmune. Esto se realiza mediante una predicción bioinformática de epítopes de células B.
- 2) Longitud del péptido: Los péptidos ideales son de una longitud aproximada de 10-20 aminoácidos. Las secuencias cortas debajo de ese rango son difíciles de reconocer aun estando acoplados a proteínas transportadoras. Una secuencia larga incrementaría el número de posibles epítopes, sin embargo, son más difíciles de sintetizar.

- 3) Solubilidad peptídica: Se recomienda diseñar péptidos solubles, debido a que los anticuerpos generados por la secuencia peptídica con estas características, es más probable que reconozcan a la proteína nativa, siendo indicativo que la zona de reconocimiento se encuentra de forma expuesta. Esto depende de la secuencia de aminoácidos, es por ello que con ayuda de bases de datos como ProtScale nos permite conocer las características fisicoquímicas de nuestra secuencia peptídica.

El diseño del péptido es uno de los puntos clave para obtener anticuerpos específicos y es necesario considerar que la secuencia peptídica sea específica, refiriéndose a que este epítipo pueda reconocerse entre la presencia de otros epítopes.

1.5.2. Características de la especie animal a inmunizar.

Para producir anticuerpos policlonales, es relevante usar una especie animal, dado la complejidad que comprende el sistema inmune y su dificultad de crear un sistema artificial con ambientes especializados. Por esta razón, es necesario considerar algunos aspectos importantes para la elección de una especie animal, tal como la cantidad de anticuerpos a obtener, ya que depende directamente del tamaño del animal. La facilidad para obtener el suero y la relación filogenética entre el antígeno y la especie animal (Leenaars y Hendriksen, 2005). Algunas de las especies más usados en el laboratorio son el conejo, ratón, rata, hámster, cobayo, cordero, cabra y pollo. Sobre todo, los conejos representan la mejor opción de rutina para la producción de anticuerpos policlonales, dado que se tienen protocolos establecidos para la inmunización, manipulación y obtención de los anticuerpos (Harlow y Lane, 1988).

1.5.3. Adyuvante

Los adyuvantes son sustancias que aceleran, prolongan o potencian la respuesta inmune. Estas sustancias inmunomoduladoras se clasifican con base a su naturaleza química y actividad biológica específica (Li y col., 2014). Hay varios tipos de adyuvantes con diferentes modos de acción, estos incluyen sales minerales,

emulsiones de aceite, complejos inmunoestimulantes, derivados microbianos, adyuvantes de carbohidratos, etc., (Sivakumar y col., 2011).

En general los péptidos necesitan de un adyuvante para aumentar la activación del sistema inmune a través de la inducción de inflamación por el depósito generado permitiendo la liberación lenta del antígeno y alargando el tiempo de exposición. Este puede actuar directa o indirectamente como un mediador en la función de las células inmunológicas y como un vehículo para transportar el inmunógeno a los ganglios linfáticos (Klimka y col., 2015). Uno de los adyuvantes más usados en animales son los completos de Freud por su capacidad de activar eficientemente el sistema inmune (Freud y col., 1937), sin embargo, tiende a inducir lesiones serias como los granulomas, reacciones de hipersensibilidad e inflamación local, dado por su composición de aceite de parafina con micobacterias muertas. El adyuvante incompleto de Freud compuesto de aceites minerales no produce efectos adversos y tiene la ventaja de ser menos viscoso y más estable en comparación con el completo de Freud (Aucouturier y Ganne, 2001), por ejemplo, el adyuvante Montanide™ ISA 71 VG está compuesto de aceites minerales con un tensioactivo no iónico refinado a partir de un éster del manitol de azúcar y ácido oleico purificado de origen vegetal. De acuerdo con la información del fabricante, tiene la capacidad estimular el sistema inmune, así como de elevar la respuesta de los linfocitos TH1 y mejorar significativamente la producción de anticuerpos policlonales tipo IgG, incluso si el antígeno es de baja inmunogenicidad intrínseca (Jang y col., 2013).

1.5.4. Esquema de inmunización

El esquema de inmunización es determinado por tres criterios: 1) la especie animal seleccionada, 2) tipo de adyuvante a usar y 3) las características, cantidad y volumen del antígeno. Las vías de administración recomendadas para producción de anticuerpos policlonales en conejos con adyuvante de aceites minerales y péptidos solubles son por vía subcutánea o intradérmica a una concentración de 50-100 µg (Harlow y Lane, 1988; Leenaars y Hendriksen, 2005). La cantidad de los anticuerpos policlonales depende parcialmente del diseño del péptido antigénico, la cantidad

inmunizada, y su pureza. La concentración y especificidad de los anticuerpos generados se verán reflejados en ensayos inmunoenzimáticos. Una de las ventajas de la producción de anticuerpos policlonales, es la rapidez con la que pueden ser producidos.

2. HIPÓTESIS

Los anticuerpos policlonales generados a partir de la inmunización de péptidos sintéticos en conejos Nueva Zelanda reconocen regiones particulares del transportador SNAT2.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Obtener y purificar anticuerpos policlonales contra el transportador de aminoácidos dependiente de sodio 2 (SNAT2) a partir de péptidos sintéticos

3.2. Específicos

- Diseñar las secuencias peptídicas antigénicas dirigidas hacia el transportador SNAT2 a través de un análisis bioinformático.
- Generar anticuerpos policlonales a través de la inmunización del péptido sintético en conejos Nueva Zelanda.
- Evaluar el título de anticuerpos mediante un ELISA indirecto.
- Determinar la especificidad de los anticuerpos generados mediante Inmunodetección de fase sólida.
- Purificar anticuerpos policlonales anti-SNAT2 por precipitación de sales.
- Determinar la especificidad de los anticuerpos por inmunofluorescencia en células HEK293.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Equipo

- Agitador orbital (IKA KS 130)
- Agitador vortex Genus 3 (IKA)
- Equipo electroforesis (BioRad)
- Equipo para electrotransferencia (BioRad)
- Fuente de poder (PowerPac Basic)
- Homogenador de tejido (Tissue-Tearor)
- Incubadora 37°C (Felisa)
- Lector de microplacas 450 nm iMark (Biorad)
- Membrana de nitrocelulosa
- Micropipeta multicanal 200 µl (transferpette)
- Microscopio invertido Axiovert25 (Leica)
- Pipetas 10-1000 µL (BioPette9)
- Placas Elisa de 96 pocillos (Costar 3590)
- Revco Value Plus (Thermoscientific)

4.1.2. Reactivo

- Ácido acético (J.T.Baker)
- Acrilamida (Sigma)
- Agua destilada (Milli-Q)
- Albúmina de suero bovino (ASB)
- Amortiguador de carga (SDS, 2-mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol, Tris-HCl)
- Anticuerpo Anti-conejo acoplado a HRP (JacksonImmunoResearch)
- Coctel de inhibidores de proteasas (Roche)
- Detergente Tween 20 (Sigma)
- DMEM alto en glucosa con glutamina (Biowest)

- Dodecil sulfato sódico (por sus siglas en inglés: Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (Sigma)
- Glicina (BioRad)
- Marcador de peso molecular (Ladder Thermo Scientific)
- Metanol (J.T.Baker)
- NaCl (J.T. Baker)
- OPD (por sus siglas en inglés: O-phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma)
- PBS (por sus siglas en inglés: Phosphate Buffered Saline, PBS) (1.05mM KH_2PO_4 , 155.1 mM NaCl, 2.9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4)
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- Reactivo Bradford (Sigma)
- Reactivos para quimioluminiscencia (Amersham)
- Rojo ponceau
- Sacarosa Affymetrix
- Solución 0.25% tripsina/ 0.053 mM EDTA (Sigma)
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1M, pH 9.6 (Na_2CO_3 y NaHCO_3)
- Solución de antibiótico/ antimicótico 10, 000 ug/ml (Biowest)
- Solución de bloqueo (leche descremada al 5% en TBS-Tween)
- Solución de lavado (TBS- Tween)
- Solución de sustrato (orto-fenilendiamina en ácido cítrico, citrato de sodio y peróxido de hidrógeno) (Sigma)
- Suero Fetal Bovino (Biowest)
- Sulfato de amonio
- TBS (por sus siglas en inglés: Tris Buffered Saline- Tween, TBST)
- TBS (por sus siglas en inglés: Tris Buffered Saline, TBS)
- Tris (J.T.Baker)

4.1.3. Material biológico

- Conejos Nueva Zelanda
- Línea celular HEK293 (ATCC® CRL-1573™)

- Ratas Sprague Dawley

4.1.4. Consideraciones bioéticas

Para la producción de anticuerpos policlonales se implementaron ocho conejos (2 conejos por cada péptido y dos conejos control) de la raza Nueva Zelanda, con peso de 1.5Kg. Se alojaron dos conejos por jaula (superficie de piso de 0.46 m² de acuerdo a la norma de producción NOM-062-ZOO-1999), con comedero de tolva y bebedero automático. Las jaulas se colocaron a 1.10 m del piso. Los animales fueron revisados por un MVZ para evaluar su estado general tres veces por semana. Las instalaciones de mantenimiento que se encuentra en la Facultad de Ciencias Naturales UAQ campus Amazcala cumplen con las especificaciones de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para una granja de producción, bajo techo, sin corrientes de aire, ventilación y manteniendo una temperatura de 18 y 22°C. El sacrificio se llevó a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-033-ZOO-1995 y con la aprobación del Comité de Bioética de la FCN-UAQ (Anexo 1). Para la obtención de extractos proteicos totales de cerebro se usaron 3 ratas Sprague Dawley sacrificadas con CO₂, estas fueron mantenidas en el Bioterio del INB-Juriquilla, donadas y eutanasiadas por la misma institución.

4.2. Métodos

4.2.1. Análisis bioinformático para el diseño de péptidos

Se realizó un análisis de la secuencia aminoacídica de SNAT2 para diseñar los péptidos inmunogénicos. A partir de las secuencias publicadas de SNAT2 de ratón, humano, gallo, rata, se alinean a través del programa Bio Edit para determinar las secuencias conservadas entre especies. Así mismo se identificaron las características fisicoquímicas de la proteína a través de la base de datos ProtScale, las hélices transmembranales por TMHMM© y la predicción de secuencias antigénicas de células B con ABCpred© y BCEpred©. Con base a la información obtenida se seleccionaron las secuencias que cumplieron con las propiedades de ser hidrofílica, antigénica y no transmembranal. Ésta se envió a la casa comercial GL Biochem, Shangai, China para su síntesis.

4.2.2. Inmunógenos

El inmunógeno fue preparado a una concentración de 100 µg/mL de péptido y a un volumen 1:1 con adyuvante Montanide ISA71VG (SEPPIC) el cual fue homogenizado en una zona estéril durante 10 min. Se visualizó el tamaño de la partícula en el microscopio DFC450C (Leica) a un objetivo de 100X

4.2.3. Inmunización

Se administró 1mL (100 µg/mL) de inmunógeno vía subcutánea a conejos Nueva Zelanda con edad posnatal de 45 días. Se limpió el muslo con alcohol, posteriormente se le introdujo una aguja calibre 22 con el bisel hacia arriba en el tejido subcutáneo del animal y una vez dentro se depositó el antígeno. Se realizaron cuatro inmunizaciones con intervalos de 25 días, se incluyó dos animales como control sin inmunógeno, pero con adyuvante Montanide ISA71VG (SEPPIC) con PBS 1X estéril y dos conejos por péptido.

4.2.4. Toma de muestra de sangre pre inmunizada

Se realizó una toma de sangre antes de cada inmunización, mediante la técnica por goteo. Se limpió la oreja del animal con alcohol, posteriormente se introdujo una aguja calibre 22 con el bisel hacia arriba en la vena marginal recolectándose la toma de sangre en un tubo sin anticoagulante.

4.2.5. Procesamiento de la muestra de sangre

Se dejó coagular la muestra de sangre y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, con el fin de separar el suero del paquete globular. Finalmente, el suero se alicuotó y almacenó a -70°C para mantener la estabilidad de los anticuerpos.

4.2.6. Ensayo inmunoenzimático para la determinación del título de anticuerpos

Se diluyó el péptido sintético con una solución amortiguadora de carbonatos (0.1 M de Na₂CO₃ y NaHCO₃, pH 9.6) para tener una concentración de 10 µg/mL. Se

sensibilizaron los pozos de poliestireno con un volumen de 100 μL (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la solución del antígeno. La placa de ELISA se dejó incubar a 4°C durante toda la noche. Se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se lavó con PBS-Tween. Posteriormente se bloqueó la placa ELISA con solución de bloqueo (PBS-Tween con leche descremada al 5%) durante 1 hr a 37°C, se descartó la solución, se realizaron tres lavados con PBS-Tween, enseguida se adicionó 100 μL de la dilución de los sueros en PBS-Tween y se dejó incubar durante 1 hr a 37°C. Se descartó la solución y se realizaron lavados con PBS-Tween. Se adicionó 500 μL de anticuerpo conjugado (anti-IgG de conejo-peroxidasa) a una dilución 1:3000 en PBS-Tween, y se dejó incubar durante 1 hr a 37°C, se realizaron lavados con PBS-Tween y enseguida se le adicionó 100 μL de solución cromógeno/sustrato (OPD en solución ácido cítrico 0.1M, citrato de sodio 0.1M y peróxido de hidrógeno). Se dejó incubar en oscuridad durante 30 min. Finalmente se leyó la absorbancia en un lector ELISA a 450 nm.

4.2.7. Cultivo de células HEK293

La línea celular HEK293 se mantuvo en medio DMEM completo (DMEM alto en glucosa con glutamina, 10% SFB y 1% antibiótico) a una confluencia de 70%. Los pases de células se realizaron con 2 lavados de PBS (1.05 mM KH_2PO_4 , 155.1 mM NaCl, 2.9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4). Enseguida se adicionaron 400 μL de tripsina (0.25% Tripsina/0.053 mM EDTA), se dejó incubar durante 1 min a 37 °C, posteriormente se neutralizó la reacción con 1.6 mL de medio DMEM completo, se centrifugó durante 5 min a 4,000 rpm y se resuspendió en 1 mL de DMEM completo. Se realizó conteo de células en la cámara de Neubauer con azul de tripano y se sembró la cantidad de células necesarias para cada experimento, incubando a 37 °C y 5% de CO_2 .

4.2.8. Inmunofluorescencia

Se comprobó la especificidad del anticuerpo primario purificado en células HEK293 mediante inmunofluorescencia. Se sembró 350,000 células por pozo, se incubó a 37 °C y 5% de CO_2 durante 24-30 hrs para tener una confluencia del 70%,

posteriormente se trataron con sacarosa 200 mM durante 8hrs, para que expresen el transportador en un ambiente osmótico. Transcurrido el tiempo de tratamiento se efectuaron lavados con PBS y se fijó con 500 μ L de una solución 95% etanol absoluto/ 5% ácido acético glacial frío durante 10 minutos a -20 °C, se lavó nuevamente con PBS y se permeabilizó con Tritón 0.1% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Se lavó con PBS y se incubó a 4 °C durante 16 hrs en cámara húmeda con el anticuerpo primario purificado diluido 1:100 en BSA 1%. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS, 2 con agua destilada (H₂O_d) y 1 con agua bidestilada (H₂O_{bd}) y se incubó 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti- IgG de conejo Alexa 488, Thermoscientific) diluida 1:250 en PBS. Se realizaron nuevamente lavados y los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos con 30 μ L de solución de montaje, observándose en microscopio de fluorescencia con el filtro I3 (450-290).

4.2.9. Sobreexpresión de SNAT2 en cultivos celulares HEK293 con estrés osmótico.

Se añaden 600 μ L de sacarosa 1 M estéril a células HEK293 con confluencia del 70%, teniendo una concentración final de 200 mM de sacarosa. Se dejó incubar a 37 °C y 5% de CO₂ durante 4 hrs.

4.2.10. Transfección por precipitado con fosfatos de calcio

Alcanzada una confluencia del 70% de la línea celular HEK293. Se preparó la solución A (H₂O hasta completar 600 μ L, 60 μ L de 2M CaCl₂, 8 μ g de ADN plasmídico pcDNA3HASNAT2, en ese orden) y esta solución se añadió a 600 μ L de amortiguador HBS simple (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7) por goteo lento y en agitación continua, dejando reposar a temperatura ambiente por 20 min.

Luego, se añadieron 1.2 mL de la solución en cada pozo, se dejó incubando toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, al día siguiente se realizó un cambio de medio y se mantienen en cultivo 24 hrs más.

4.2.11. Obtención de proteínas con solución de RIPA

Las células HEK293 tratadas con sacarosa, se lavaron 2 veces con PBS, se recuperaron por raspado con PBS. Se centrifugaron a 4,500 rpm 5 min a 4 °C, el precipitado se resuspendió con 500 µL de solución de RIPA con inhibidores de proteasas 1X (20 mM Tris pH 7.4, 37 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Acido deoxicolato, 10% glicerol 89%, 0.1% SDS, 1% Tritón, Inhibidores de proteasas Roche).

Se mantuvo 5 min en hielo con vortex, se dejó reposar 15 min en hielo. El hígado de rata se pesó y se le adicionó solución RIPA con inhibidor de proteasas 1x (Roche), se homogenizó mecánicamente y se incubó en hielo durante 45 min. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm 15 min. Finalmente, los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos.

4.2.12. Extracción de proteínas con Tris-HCl

El tejido cerebral de rata se pesó y se le adicionó amortiguador Tris-HCl (Tris 50 mM pH 9.0, 5 mL por cada gramo de tejido) con inhibidor de proteasas 1X (Roche). La muestra se homogenizó con vortex durante 2 hrs a 4°C. Concluidos las 2 hrs se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, finalmente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

4.2.13. Purificación de proteínas de membrana

Las células transfectadas se lavaron 2 veces con PBS. Se recuperaron por raspado con PBS y se centrifugaron a 4,000 rpm 5 min a 4°C, el precipitado se resuspendió en 500 µL de solución amortiguadora de sacarosa (0.32 M sacarosa, 5 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) con coctel de inhibidores de proteasas, se homogenizaron mecánicamente.

Posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm por 4 min a 4°C, se tomó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 14, 000 g por 15 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en solución HBM (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.2 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM glucosa, 20 mM HEPES, pH 7.4

4.2.14. Cuantificación de proteínas

Una vez extraídas las proteínas de tejido o de cultivos celulares, se cuantificaron por el método de Bradford. La curva estándar utilizada para la cuantificación se realizó de acuerdo a los parámetros recomendados por la casa comercial (Sigma- Aldrich, B6916). Se realizaron diluciones en serie con un rango de 0 a 1.4 mg/ml a partir de una solución stock de 14.61 mg/ml de BSA. En la Cuadro 1 se muestra el volumen del estándar y agua necesarios para la obtención de las concentraciones específicas de BSA para la curva estándar.

Cuadro 1. Curva estándar para cuantificación proteica por método de Bradford.

| Concentración BSA | Volumen del estándar | H ₂ O |
|-------------------|-----------------------|------------------|
| 1.4 mg/mL | 6.7 µL de 14.61 mg/ml | 63.3 µL |
| 1 mg/mL | 50 µL de 1.4 mg/mL | 20 µL |
| 0.5 mg/mL | 35 µL de 1 mg/mL | 35 µL |
| 0.25 mg/mL | 34 µL de 0.25 mg/mL | 35 µL |

Se realizó una dilución 1:10 de las muestras de tejido para su cuantificación. Por triplicado se añadieron 10 µL de cada concentración de BSA, de agua utilizada como concentración 0 mg/mL y de la dilución de la muestra. Se adicionó 250 µL de reactivo de Bradford a cada pozo.

Posteriormente se cubrió y agitó la placa en un agitador a velocidad media por 1 min y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la microplaca a una absorbancia de 595nm. Las absorbancias de la curva estándar fueron graficadas obteniendo una línea de tendencia central y una ecuación de la recta. Las concentraciones de las muestras problema se calcularon interpolando las absorbancias en la ecuación de la recta y multiplicando por su dilución.

4.2.15. Inmunodetección en fase sólida

Se tomaron 25 µg de los extractos proteicos, se le añadió amortiguador de carga (40% glicerol, 240mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol, 5% betamercaptoetanol) y se desnaturalizaron a 95 °C 5 min, finalmente se dejaron

reposar en hielo 1 min. Las muestras se cargaron en un gel concentrador de poliacrilamida al 5% (30% mix de poliacrilamida, 1.0 M Tris pH 6.8, 10% SDS, 10% persulfato de amonio, TEMED Sigma) y un gel separador al 10% (30% mix de poliacrilamida, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% persulfato de amonio, TEMED Sigma).

Se añadieron 3 µL de marcador de peso molecular Ladder Thermo Scientific preteñido por gel. Se corrió el gel por 3 hrs a 100 V con amortiguador de electrodo (25 mM Tris, 250 mM glicina, 0.1% SDS). Posteriormente se realizó una transferencia húmeda con solución de transferencia (25 mM Tris, 250 mM glicina, 20% metanol) durante 1 hr a 100V. Una vez terminada la transferencia, se reveló con rojo ponceau. La membrana se incubó con 5% leche descremada en TBS durante 2 hrs a temperatura ambiente. Se adicionó el suero total diluido en TBS- 1% de leche descremada (en el Cuadro 2 se muestra la dilución usada por conejo) y la membrana se dejó incubar con el anticuerpo toda la noche a 4°C.

Cuadro 2. Dilución de suero anti-SNAT2 usada para incubar las membranas de WB. N1C1 y N1C2, conejos inmunizados con el péptido amino₄₋₃₂. Conejos N2C1 y N2C2 con el péptido amino₁₁₋₂₄. Conejos CC1 y CC2 con el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃:

| Suero | Dilución usada |
|-------|----------------|
| N1C1 | 1:250 |
| N1C2 | 1:50 |
| N2C1 | 1:50 |
| N2C2 | 1:1000 |
| CC1 | 1:125 |
| CC2 | 1:5000 |

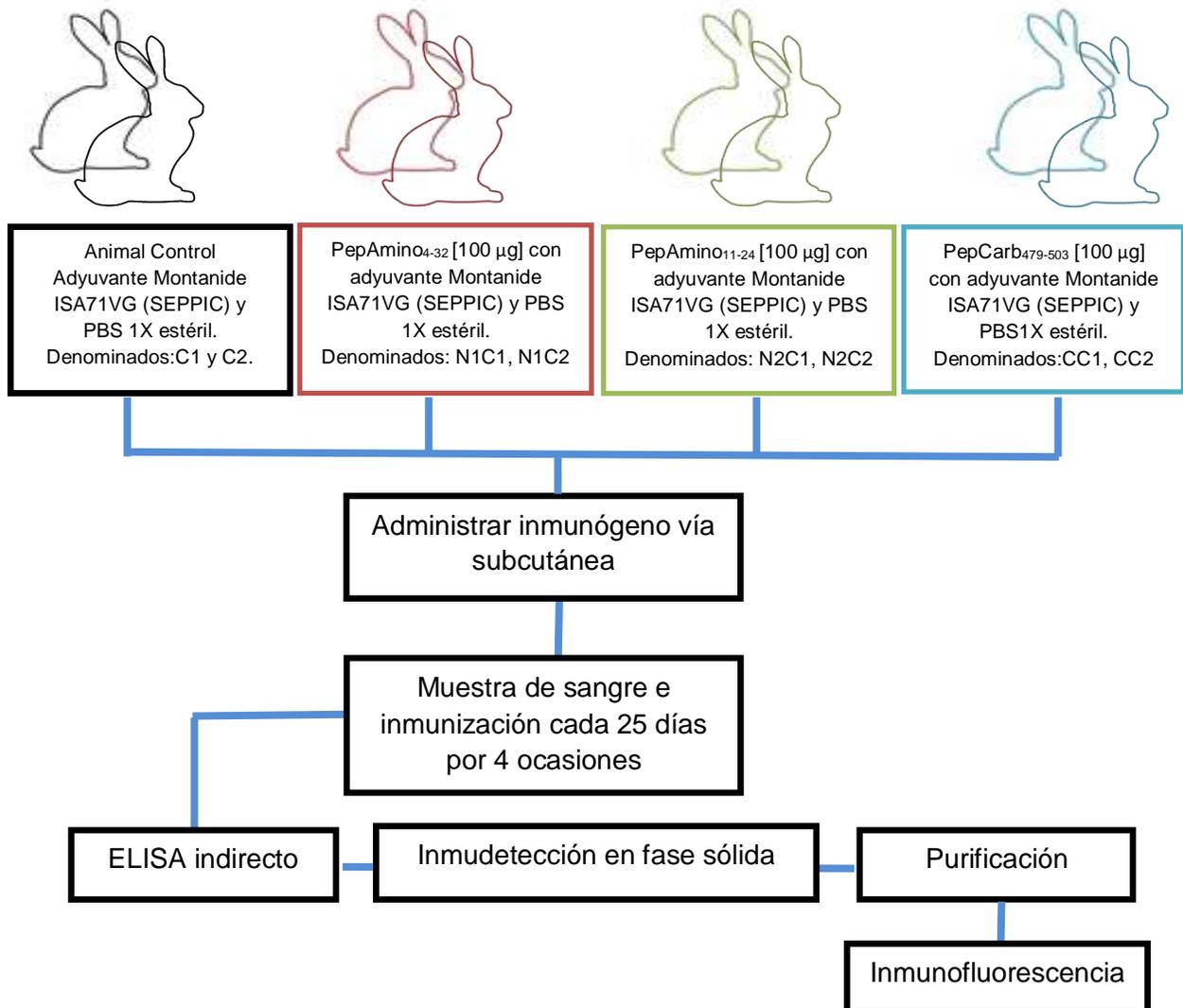
Al día siguiente se realizaron tres lavados con TBS- 2% leche descremada durante 1 hr. Se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente con anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-peroxidasa) a una dilución 1:5000 en TBS leche 2%. Posteriormente se realizaron dos lavados con TBS-2% leche descremada y uno con TBST-2% leche descremada.

Por último, se agregó el sustrato quimioluminiscente y se expuso en una placa radiográfica. Finalmente se reveló la placa radiográfica.

4.2.16. Purificación de anticuerpos por precipitación de sales

Se centrifugó el suero total a 3000 x g por 30 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se diluyó el suero a un volumen igual con PBS frío y se mezcló con pipeteo constante a 4°C. Se agregó gota a gota sulfato de amonio saturado hasta llegar a una saturación del 40% de la solución, se mantuvo en agitación constante por 2-4 hrs a 4°C. Se centrifugó a 10, 000 x g durante 30 min a 4°C. Se disolvió la pastilla en 200 µl de PBS. Se dializó durante 3 hrs a 4°C en un 1 L de PBS y luego durante la noche a 4°C en 1 L de PBS fresco.

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL



5. RESULTADOS

5.1. Análisis bioinformático de zonas antigénicas localizadas en la secuencia del transportador SNAT2

Se realizó el análisis bioinformático de las secuencias publicadas del transportador SNAT2 de rata, con el fin de determinar sus propiedades hidrofílicas, antigénicas y sus regiones transmembranales. Se describe secuencialmente el análisis bioinformático realizado sobre la secuencia SNAT2 de rata. Primero se determinaron los epítopes de las células B. Dichas características se analizaron a través de los servidores BCEpred© y ABCpred©. En rojo se encuentran las secuencias predichas por BCEpred© y subrayado por ABCpred© dentro de la secuencia de SNAT2 de rata.

Como puede observarse en la Figura 1, algunas secuencias empatan con los resultados de ambos servidores. Para discernir cual es la mejor secuencia candidato, es necesario determinar las características fisicoquímicas de las regiones aminoacídicas y su organización espacial, como transmembranales.

```
1           11           21           31           41           51           60
|           |           |           |           |           |           |
MKKTEMGRFNISPDEDSSSYSSNGDFNYSYPTKQAALKSHYVDVDPENQNFLLESNLGKK 60
KYETDFHPGTTSFGMSVFNLSNAIVGSGILGLSYAMANTGIALFIILLTFVSIFSLYSVH 120
LLLKTANEGGSLLYEQLGHKAYGLAGKLAASGSITMQNIGAMSSYLFIVKYELPLVIKAL 180
MNIEDTNGLWYLNGDYLVLLVSFVLILPLSLLRNLGYLGYTSGLSLLCMIFFLIVVICKK 240
FQIPCPVEALMANETVNGTFTQVALAALASNSTAADTCRPRYFIFNSQTVYAVPILTFS 300
FVCHPAVLPIYEELKRSRRRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALFGYLTFYEHVESELLHTY 360
SAIVGTDILLLVRLAVLVAVTLTVPVVIFPIRSSVTHLLCPTKEFSWFRHSVITVTILA 420
FTNLLVIFVPTIRDIFGFIGASAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMRSVQKIGALCFLLSG 480
VVVMIGSMGLIVLDWVHDASAGGH 504
```

Figura 1. Predicción de epítopes reconocidos por células B. Se usaron los servidores BCEpred© (rojo) y ABCpred© (subrayado) en una secuencia de SNAT2 de rata.

Las características fisicoquímicas de la secuencia SNAT2 de rata se realizaron mediante el servidor ProtScale usando el análisis Kyte-Doolittle, para obtener la predicción de hidrofobicidad. Podemos observar en a Figura 2 un esquema en donde se trazan las escalas de hidrofobicidad e hidrofiliidad de cada secuencia de aminoácidos presente en la proteína SNAT2 de rata. Este esquema nos proporciona

información sobre la estructura parcial de la proteína, para identificar regiones expuestas a la superficie, así como las regiones transmembranales. Las regiones con valor positivo son hidrófobas. Valores por arriba de 1.6 comparado entre los valores representados y las estructuras conocidas determinadas por cristalografía, indican que pertenecen a regiones transmembranales.

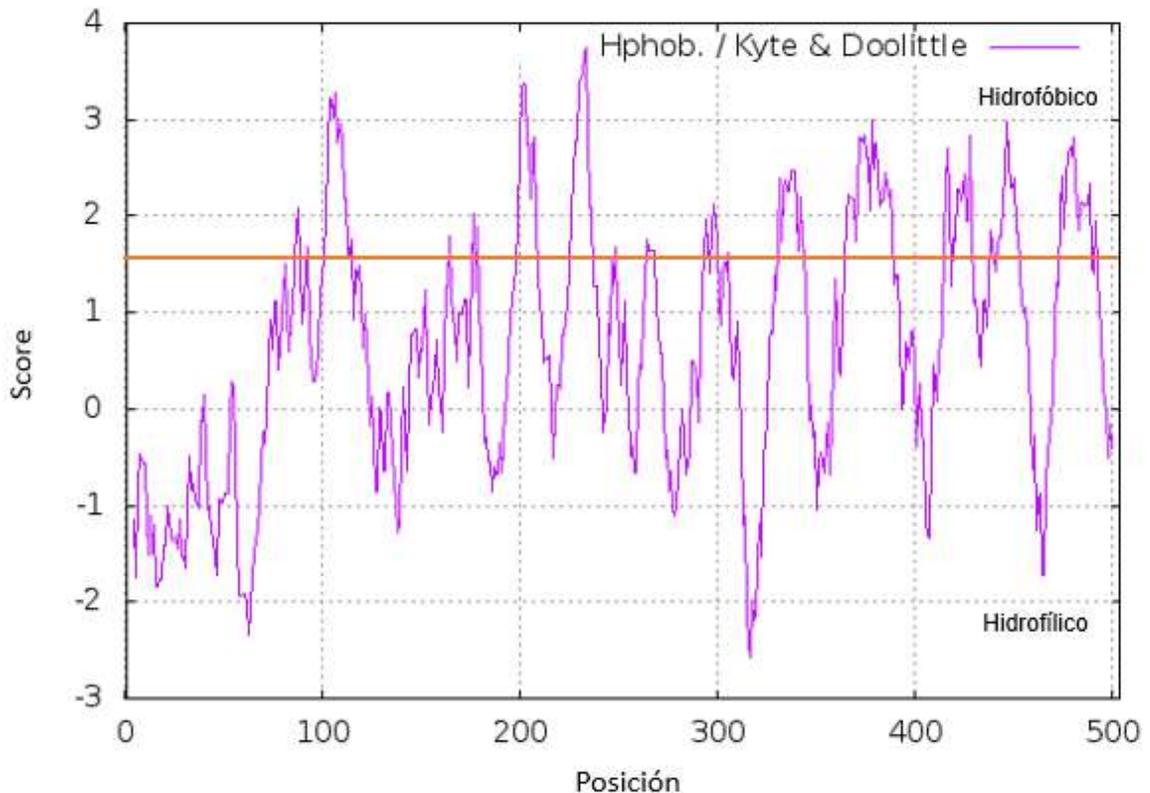


Figura 2. Esquema de hidropatía. Análisis de la secuencia de SNAT2 de rata mediante el servidor ProtScale. Análisis Kyte-Doolittle. Modificado de: <https://web.expasy.org/protscale/>

Con estas aproximaciones podemos discernir los dominios que cumplen con características de ser una secuencia antigénica y expuesta. En la Figura 3, se resalta en amarillo las secuencias aminoacídicas de la proteína SNAT2 con valores mayores a 1.6, análisis realizado en la Figura 2.

```

1           11           21           31           41           51           60
|           |           |           |           |           |           |
MKKTEMGRFNISPDEDSSSYSSNGDFNYSYPTKQAALKSHYVDVDPENQNFLLLESNLGKK 60
KYETDFHPGTTSFGMSVFNLSNAIIVGSGILGLSYAMANTGIALFIILLTFVSIFSLYSVH 120
LLLKTANEGGSLLYEQLGHKAYGLAGKLAASGSITMQNIGAMSSYLFIVKYELPLVIKAL 180
MNIEDTNGLWYLNGDYLVLLVSFVLIPLSLLRNLGYLGYSGLSLLCMIFFLIVVIC 240
FQIPCPVEVALMANETVNGTFTQVALAALASNSTAADTCRPRYFIFNSQTVYAVPILTFS 300
FVCHPAVLPIYEELKSRSRRRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALFGYLTFYEHVESELLHTY 360
SAIVGTDILLLVRLAVLVAVTLTVPVVIFPIRSSVTHLLCPTKEFSWFRHSVITVTILA 420
FTNLLVIVFPTIRDIFGFIGASAAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMRSVQKIGALCFLLSG 480
VVVMIGSMGLIVLDWVHDASAGGH 504

```

Figura 3. Predicción de regiones transmembranales. Análisis predictivo de regiones transmembranales mediante la hidropatía de la secuencia aminoacídica de la proteína SNAT2 de rata, realizado a través de ProtScale (amarillo), utilizando como base el análisis previo de secuencias con capacidad de estimular la respuesta antigénica de células B a través de los programas BCEpred© (rojo) y ABCpred© (subrayado).

Posteriormente se realizó el análisis de accesibilidad para determinar qué zonas están expuestas en la superficie y cuáles no. En la Figura 4 se puede observar la predicción obtenida por BCEpred© resaltado en gris.

```

1           11           21           31           41           51           60
|           |           |           |           |           |           |
MKKTEMGRFNISPDEDSSSYSSNGDFNYSYPTKQAALKSHYVDVDPENQNFLLLESNLGKK 60
KYETDFHPGTTSFGMSVFNLSNAIIVGSGILGLSYAMANTGIALFIILLTFVSIFSLYSVH 120
LLLKTANEGGSLLYEQLGHKAYGLAGKLAASGSITMQNIGAMSSYLFIVKYELPLVIKAL 180
MNIEDTNGLWYLNGDYLVLLVSFVLIPLSLLRNLGYLGYSGLSLLCMIFFLIVVIC 240
FQIPCPVEVALMANETVNGTFTQVALAALASNSTAADTCRPRYFIFNSQTVYAVPILTFS 300
FVCHPAVLPIYEELKSRSRRRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALFGYLTFYEHVESELLHTY 360
SAIVGTDILLLVRLAVLVAVTLTVPVVIFPIRSSVTHLLCPTKEFSWFRHSVITVTILA 420
FTNLLVIVFPTIRDIFGFIGASAAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMRSVQKIGALCFLLSG 480
VVVMIGSMGLIVLDWVHDASAGGH 504

```

Figura 4. Predicción de regiones expuestas en superficie. Análisis realizado con BCEpred © (gris), utilizando como base los análisis previos de secuencias peptídicas a través de BCEpred© (rojo) y ABCpred© (subrayado) y el análisis de las regiones transmembranales mediante la hidropatía (amarillo) de la secuencia proteica SNAT2 de rata.

Con base a los resultados obtenidos, se determinaron las hélices transmembranales con ayuda del servidor TMHMM©. Este método es basado en la integración de características tal como la hidrofobicidad, la carga neta de los aminoácidos discriminando entre proteínas de membrana y proteínas solubles. A diferencia del análisis Kyte-Doolittle basado en la hidropatía de la secuencia proteica. Las predicciones obtenidas por este servidor están señaladas en doble línea en la secuencia proteica de SNAT2 de rata observan en la Figura 5.

```

1           11           21           31           41           51           60
|           |           |           |           |           |           |
MKKTEMGRFNISPDEDSSSYSSNGDFNYSYPTKQAALKSHYVDVDPENQNFLLESNLGKK 60
KYETDFHPGTTSFGMSVFNLGNAIVGSGILGLSYAMANTGIALFFILLTFVSIFFSLYOVH 120
LLKKTANEGGSLLYEQLGHKAYGLAGKLAASGSITMONICAMSSVLFIVKYELPLVTKAL 180
MNIEDTNGLWYLNCDYLVLLVSEFVLLLPESLLRNLYLGYLCYTSGLSLLCMIFFLIVVIGKK 240
FQIPCPVEVALMANETVNGTFTQVALAALASNSTAADTCRPRYFI FNSQT VYAVPILTES 300
FVCHPAVLPPIYEELKRSRSMNVSKEEFAMFLMYLLAALFCVLTFFYEHVESELLHTY 360
SAIVGTDILLLVRLAVLVAVTLLTVPVVIPIRSSVTHLLCPTKEFSWFRHSVITVPIIA 420
FTNLLVLPVPTFRDIFGFI GACAAAMLPIFLPSAFYIKLVKKEPMRSVQKIGALCFLLSG 480
VVVMICSMGLIVLDWVHDASAGGH 504

```

Figura 5. Predicción de helices transmembranales. Análisis realizado mediante TMHMM© (doble línea), utilizando como base los análisis predictivos de las regiones expuestas en superficie con BCEpred © (gris), los análisis de secuencias peptídicas a través de BCEpred© (rojo) y ABCpred© (subrayado) y de las regiones transmembranales mediante la hidropatía (amarillo) de la secuencia proteica SNAT2 de rata.

Con base a los resultados obtenidos, se determinó las posibles secuencias candidato, que cumplen con las características de ser hidrofílicas, antigénicas y que se encuentre en una región no transmembranal. Estas variables le proporcionan un potencial para generar respuesta sistema inmune. *in vivo*, sin embargo, una limitante importante para el diseño de péptidos contra SNAT2, era que fuese una secuencia conservada entre distintas especies. Por tal motivo, se realizó el análisis bioinformático de las secuencias proteicas de ratón, gallo y humano para determinar las regiones antigénicas. En la figura 6 se muestra en rojo las predicciones de las secuencias peptídicas de BCEpred© y subrayado de ABCpred©, resaltado en amarillo las regiones transmembranales mediante hidropatía, en gris las regiones expuestas en superficie con la predicción de BCEpred© y el análisis predictivo de hélices transmembranales por el servidor TMHMM© indicado en doble línea

SNAT2 Mus Musculus

```

1          11          21          31          41          51          60
|          |          |          |          |          |          |
MKKTEMGRFNISPDEDSSSYSSNSDFNYSYPTKQAALKSHYADVDPENQNFLLESNLGKK 60
KYETDFHPGTTISFGMSVFNLSNAIVGSCILCLSYAMANTGIALFFILLTFVSIPLYSVH 120
LLLKTANEGGSLLYEQLGHKAYGLAGKLAASGSITMQLICAMSSVLFIVKYELPLVIAL 180
MNIEDTNGLWYLNCDYLVLLVSLVILPLSLLRNLYLGYLGYTSGLSLLCMIFPLIVVI 240
FQIPCPVEAALVANETVNGTFTQAALALAFNSTADDACRPRYFIFNSQTVYAVDILTF 300
VCHFAVLPPIVEELKSRSRRRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALFCYLTFFYGHVESELLHTYS 360
EIVGTDILLVRLAVLMAVTLTVDPVVFPIRSSVTHLLCPTKEFSWLRHCSITVVL 420
TNLLVIFVPTIRDLFCFICASAAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMRSVQKIGALCFLLSGI 480
VVMIGSMGLIVLDWVHDSAAGGH 504

```

SNAT2 Gallus Gallus

```

1          11          21          31          41          51          60
|          |          |          |          |          |          |
MSSAEMGKFNISPDEDSSSYSSNSNDFSYPYPTKPAAMKSHYADMDPENQNFLLDSNVGK 60
KKYETQYHPGTTISFGMSVFNLSNAIVGSCILCLSYAMANTGIALFVILLVVSILSLYSV 120
HLLKTANEGGSLLYEQLGMKAFGMPGKLAASGSITMQLICAMSSVLFIVKYELPLVIKT 180
FMNIEENAGHWYLNCDYLVLLVSVILILPLSLLKNLGYLGYTSGLSLLCMVFFLIVVIWK 240
MFQIPCPMESDIINATLINATLAPFADENITISDACKPEYFIFNSQTVYAVDILTFSEV 300
HPALLPPIVEELKSRSRKRMMNVSYVCFAMFLMYLLAALFCYLTFFYGRVESELLHTYSAF 360
LGADILLVRLAVLMAVTLTVDPVVFPIRSSVTQLLWAGKEFSWWRHCSITVVL 420
VLVIFVPTIRDLFCFICASAAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMKSVQKIGAAALPFLSGILV 480
MTCMTEIILDWIHTDASDGH 501

```

SNAT2 Homo Sapiens

```

1          11          21          31          41          51          60
|          |          |          |          |          |          |
MKKAEMGRFNSISPDEDSSSYSSNSDFNYSYPTKQAALKSHYADVDPENQNFLLESNLGKK 60
KYETEFDHPGTTISFGMSVFNLSNAIVGSCILCLSYAMANTGIALFFILLTFVSIPLYSVH 120
LLLKTANEGGSLLYEQLGYKAFGLVGLAASGSITMQLICAMSSVLFIVKYELPLVIQAL 180
TNIEDKTGLWYLNCDYLVLLVSLVILPLSLLRNLYLGYLGYTSGLSLLCMVFFLIVVI 240
FQVPCPVEAALIINETINTTTLQPTALVPALSHNVTENDSCRPHYFIFNSQTVYAVDILI 300
FSTVCHFAVLPPIVEELKDRSRRRMMNVSKISFFAMFLMYLLAALFCYLTFFYEHVESELLH 360
TYSSILGTDILLVRLAVLMAVTLTVDPVVFPIRSSVTHLLCASKDFSWWRHCSITV 420
LAFPTNLLVIFVPTIRDLFCFICASAAAMLIFILPSAFYIKLVKKEPMKSVQKIGALFFLL 480
SGVIVMFGSMALIVLDWVHNAPGGGH 506

```

Figura 6. Análisis bioinformático de las secuencias proteicas de SNAT2 de ratón, gallo y humano. Se muestra la predicción de las hélices transmembranales (doble línea) mediante TMHMM©, regiones expuestas en superficie con BCEpred © (gris), los análisis de secuencias peptídicas a través de BCEpred© (rojo) y ABCpred© (subrayado) y de las regiones transmembranales mediante la hidropatía (amarillo).

Posteriormente, se determinaron las secuencias conservadas con ayuda del programa Bio Edit que nos permite alinear las secuencias aminoacídicas de distintas especies a través de la ponderación en la comparación de las secuencias, determinando el grado de similitud que existen entre ellas. En la Figura 7 se muestra la múltiple alineación de las secuencias aminoacídicas del trasportador SNAT2 de gallo, ratón, rata y humano. Se puede visualizar la conservación que existe entre especies por el marcaje de identidad y similitud en las secuencias, cada aminoácido es representado por un color, y resaltado cuando existe esta similitud (Figura 7).

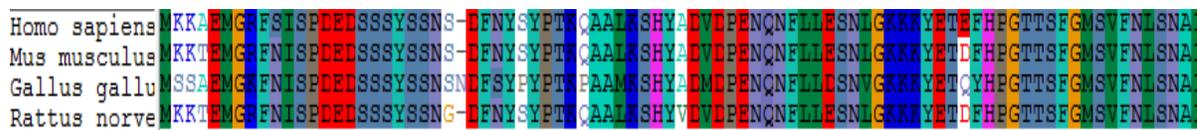


Figura 7. Marcaje de identidad y similitud. Se alinearon las secuencias aminoacídicas del trasportador SNAT2 de gallo, ratón, rata y humano a través del programa Bio Edit. La similitud entre secuencias es marcada con el color correspondiente a cada aminoácido.

Cada servidor nos ayuda a realizar un análisis exhaustivo de la secuencia de SNAT2 con el objetivo de delimitar la secuencia que cumpla con los parámetros teóricos necesarios para activar la respuesta inmunitaria en los conejos. Es así como logramos obtener tres secuencias candidatas para el diseño de los péptidos sintéticos

- PepAmino₄₋₃₂: TEMGRFNIISPDEDSSSYSSNGDFNYSYPT
- PepAmino₁₁₋₂₄: ISPDEDSSSYSSNG
- PepCarb₄₇₉₋₅₀₃: SGVVVMIGSMGLIVLDWVHDASAGG

Se identificaron las secuencias peptídicas en el alineamiento de secuencias del trasportador SNAT2 de gallo, ratón, rata y humano para determinar la similitud que existen entre ellas, realizado con el programa Bio Edit. En la región N-terminal se muestra dos secuencias peptídicas, PepAmino₄₋₃₂ en un cuadrante naranja y el PepAmino₁₁₋₂₄ en un cuadrante azul. En la región C-terminal se muestra en un cuadrante verde el PepCarb₄₇₉₋₅₀₃ (Figura 8).

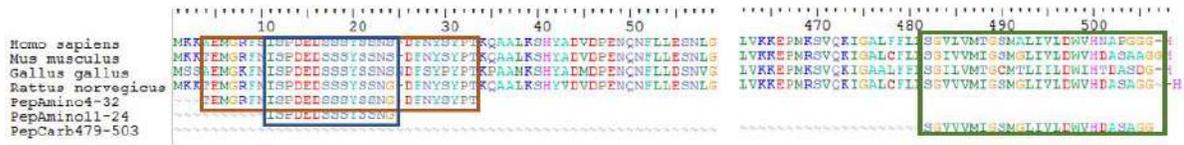


Figura 8. Identificación de las secuencias peptídicas. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del transportador SNAT2 de gallo, ratón, rata y humano, señalando la secuencia peptídica y su similitud entre especies.

En la Figura 9 se señalan las secuencias peptídicas sobre el diseño esquemático más aceptado de la estructura de SNAT2, dado que hasta el momento no existe un análisis cristalográfico de su organización tridimensional.

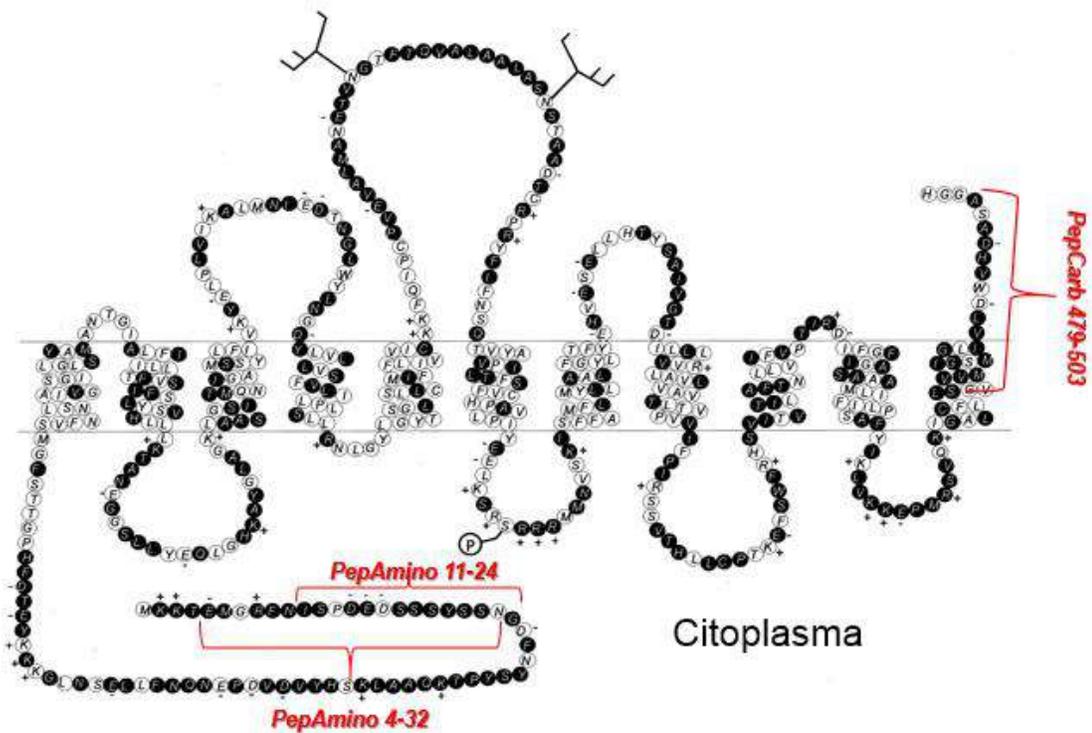


Figura 9. Identificación de las secuencias peptídicas candidatas en la estructura de SNAT2. Modificada de: Yao y col., 2000.

Estas secuencias se mandaron a sintetizar a la casa comercial GL Biochem, Shanghai, China.

5.2. Homogeneidad de los inmunógenos.

Se hidrataron 1000 μg de péptido liofilizado en 1 ml de PBS estéril. Posteriormente se realizó una suspensión homogénea del péptido soluble a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con adyuvante Montanide ISA71VG (SEPPIC). Esta suspensión tiene como fin el mejorar la respuesta inmunogénica.

La suspensión se homogenizó con un homogenizador tisular Tearor durante 10 min en una zona estéril. Se visualizó el tamaño de la partícula y la homogeneidad de la emulsión en el microscopio DFC450C (Leica) a un objetivo de 100X y se tomó foto. En la Figura 10 se observa las emulsiones realizadas por cada péptido.

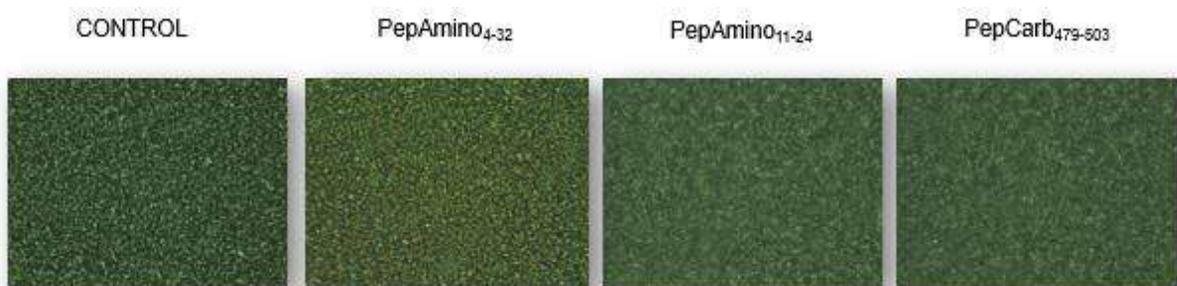


Figura 10. Microscopía en campo claro de los inmunógenos. Evaluación de su homogeneidad, visualización 100x.

Al analizar la homogeneidad de los inmunógenos se prosiguió a la inmunización de los conejos como se establece en el esquema de la Figura 11, teniendo en cuenta de que se usaron dos conejos por péptido y se mantuvieron dos como control, inyectado únicamente adyuvante con PBS.

Se nombró cada conejo dependiente del péptido inmunizado, teniendo al conejo N1C1 y N1C2 para el péptido amino₄₋₃₂, los conejos N2C1 Y N2C2 para el péptido amino₁₁₋₂₄ y el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃: nombrándolos como CC1 y CC2.

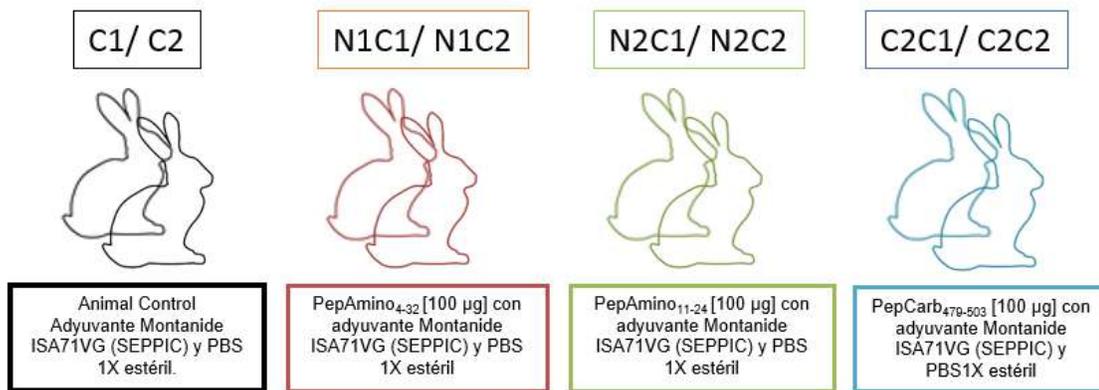


Figura 11. Esquema de inmunización. Conejos control C1 y C2 inmunizados con adyuvante y PBS, los conejos N1C1 y N1C2 con el péptido amino₄₋₃₂, N2C1 y N2C2 con péptido amino₁₁₋₂₄ y CC1 y CC2 con el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃.

5.3. Evaluación del título de anticuerpos mediante un ELISA indirecto

Antes de iniciar con el esquema de inmunización se tomó una muestra de suero pre-inmune a cada conejo para usarlo como control, posteriormente y antes de cada inmunización se tomaba una muestra de sangre para evaluar el título de anticuerpos. Se analizó mediante ELISAS indirectos manteniendo diluciones continuas, con el fin de determinar el título más alto a través del punto de corte. Se analizó el punto de corte con la media de la densidad óptica (OD) más 3 desviaciones estándar de la muestra control. Esto ayuda a definir si el suero post-inmune presenta un título de anticuerpos estadísticamente significativo en comparación con el suero pre-inmune. Las densidades ópticas del suero pre-inmune y post-inmune del título más alto fueron graficadas a través del programa GraphPad. Cada variable muestra la barra de desviación estándar, el punto de corte es representado en una línea punteada.

En la Figura 12 se muestran los conejos CC1 y CC2 fueron inmunizados con el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃ cada 25 días por cuatro ocasiones. En la Figura 13 los conejos N1C1 Y N2C2 que fueron inmunizados con el péptido amino₄₋₃₂ cada 25 días por cinco ocasiones, así mismo los conejos N2C1 y N2C2 inmunizados con el PepAmino₁₁₋₂₄ (Figura 13). Las muestras de suero obtenidas en cada inmunización

fueron analizadas con ELISAS indirectos, determinando así su título más alto. En la Figura 12, 13 y 14, se muestra una gráfica por inmunización y por conejo. Podemos observar en cada una de ellas las densidades ópticas obtenidas del título más alto del suero pre, post-inmune y el punto de corte. Los valores representados se muestran en la tabla que se encuentra debajo de cada gráfico. Se considera estadísticamente significativo si el punto de corte se encuentra por debajo de las barras de desviación estándar del suero post-inmune.

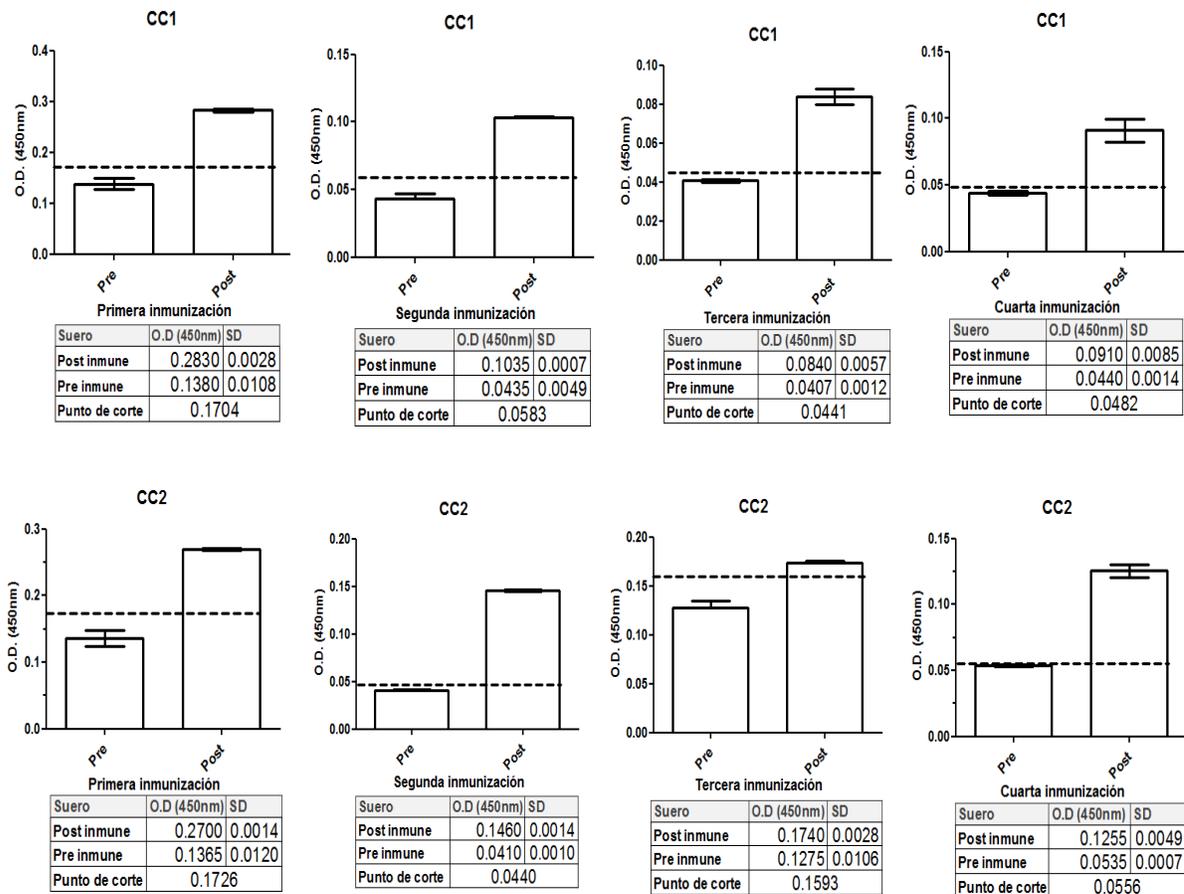


Figura 12. Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros CC1 y CC2. Son graficadas las densidades ópticas del título más alto del suero post y pre-inmune por cada inmunización y conejo (datos representados en cuadro). En cada gráfica se encuentra el punto de corte en línea punteada y la desviación estándar de las dos variables.

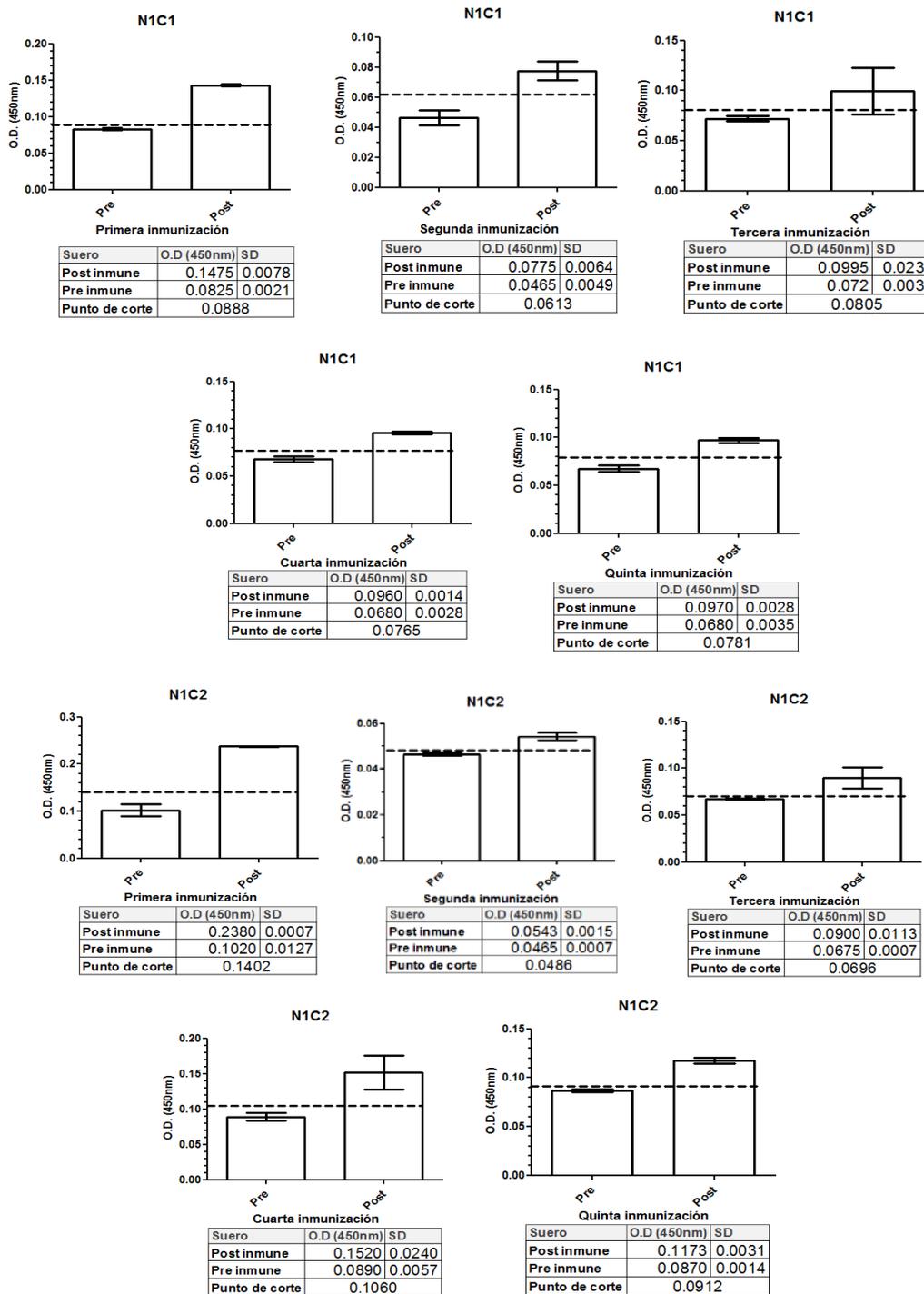


Figura 13. Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros N1C1 y N1C2. Son graficadas las densidades ópticas del título más alto del suero post y pre-inmune por cada inmunización y conejo (datos representados en cuadro). En cada gráfica se encuentra el punto de corte en línea punteada y la desviación estándar de las dos variables.

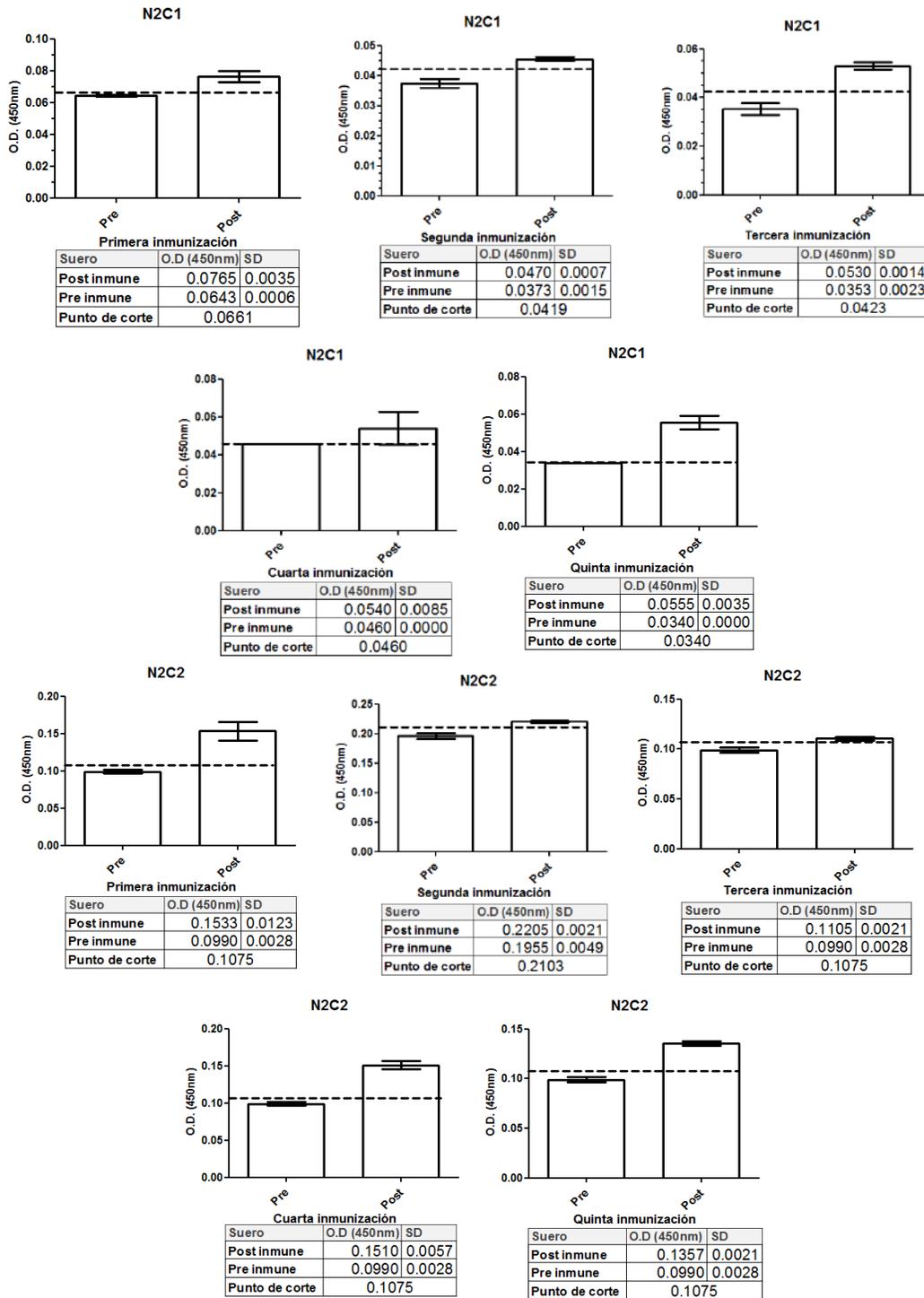


Figura 14. Título de anticuerpos más alto de cada inmunización obtenido por ELISA indirecta de los sueros N2C1 y N2C2. Son graficadas las densidades ópticas del título más alto del suero post y pre-inmune por cada inmunización y conejo (datos representados en cuadro). En cada gráfica se encuentra el punto de corte en línea punteada y la desviación estándar de las dos variables.

Con el fin de visualizar si había un incremento o no en la concentración de anticuerpos en cada inmunización de cada conejo, se realizó un análisis basada en la dilución obtenida por el título de anticuerpos más alto contra el número de inmunizaciones realizadas por conejo, por inmunización. En la Figura 15 se muestra dicho análisis mediante un gráfico. Las líneas naranja y verde representan a los conejos N1C1 Y N2C2 inmunizados con el péptido amino₄₋₃₂, negra y rosa a los conejos CC1 y CC2 inmunizados con el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃ y azul y rojo a los conejos N2C1 y N2C2 inmunizados con el PepAmino₁₁₋₂₄.

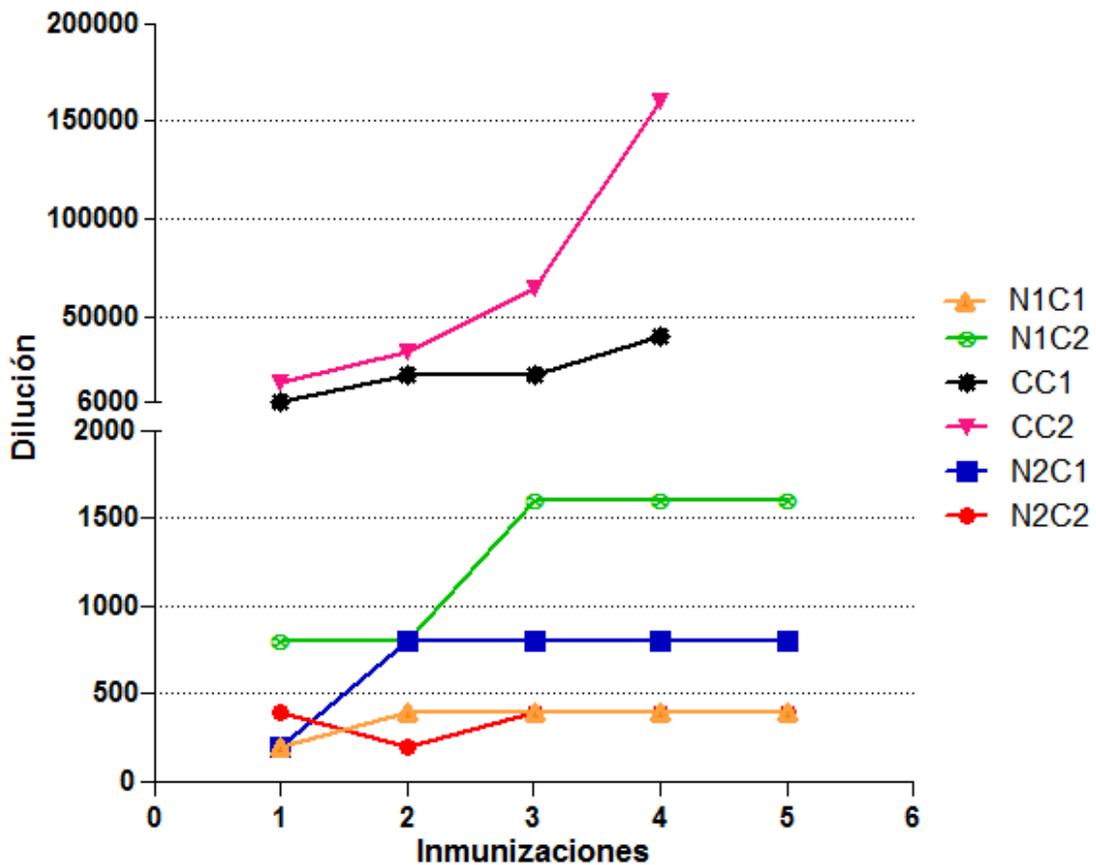
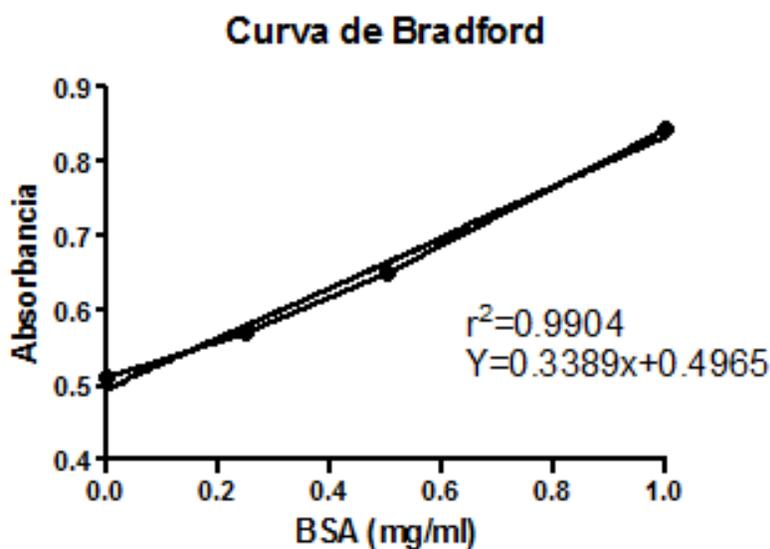


Figura 15. Análisis de las inmunizaciones basado en la dilución del título más alto contra el número de inmunizaciones realizadas por conejo. Las líneas naranja y verde representan a los conejos N1C1 y N1C2 inmunizados con el péptido amino₄₋₃₂, negra y rosa a los conejos CC1 y CC2 inmunizados con el péptido carboxilo₄₇₉₋₅₀₃ y azul y rojo a los conejos N2C1 y N2C2 inmunizados con el PepAmino₁₁₋₂₄.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, se prosiguió a realizare una inmunodetección en fase sólida con extractos proteicos totales de corteza cerebral de rata posnatal 60 días (p-60).

5.4. Extracción de proteínas con Tris-HCl.

El trasportador SNAT2 se encuentra expresado abundantemente en varios tejidos como hígado, músculo, intestino, corazón, cerebro, etc. Por tal motivo, se seleccionó corteza cerebral de tres ratas, cada una se usó como una réplica. Se extrajeron las proteínas mecánicamente con solución amortiguadora Tris-HCl. Estas muestras fueron cuantificadas por el método de Bradford. La Figura 16 muestra la curva de cuantificación realizada.



| Muestra | Concetración mg/ml | Absorbancia ingresada | Dilución realizada |
|---------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| p60-1 | 7.666961739 | 0.756333333 | 1/10 |
| p60-2 | 5.876856497 | 0.695666667 | 1/10 |
| p60-3 | 6.998131209 | 0.733666667 | 1/10 |

Figura 16. Curva estándar de Bradford. Cuantificación de extractos proteicos de corteza cerebral de rata usados para la inmunodetección en fase sólida.

Posteriormente, se realizó la inmunodetección en fase sólida con una concentración de 25 µg/ml y 12.5 µg/ml de extracto proteico total de corteza cerebral de rata. Las membranas obtenidas en la transferencia se revelaron con tinción de rojo Ponceau y estas se usaron como control de carga.

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, se incubaron las membranas con suero total a una dilución previamente estandarizado, 1:250 para N1C1, 1:50 para N1C2 y N2C1, 1:1000 para N2C2, 1:125 para CC1 y 1:5000 para CC2.

En la Figura 17 se muestra los resultados obtenidos en la inmunodetección en fase sólida de cada uno de los sueros, en conjunto con su control de carga. Cada imagen se especifica la dilución y la concentración proteica usada, así mismo se identifica el peso de las bandas obtenidas y del marcador de peso molecular.

Se puede observar que CC2, N1C1, N2C2 muestran una banda a 55 kDa, detectando al transportador SNAT2 ya que su peso es de 56 kDa. Por otro lado, CC1 muestra una banda de 100 kDa, N1C2 a 35 kDa, N2C1 menor a 55kDa y N2C2 muestra una banda a 25 kDa. En el Cuadro tres, se sintetizan los resultados obtenidos en la inmunodetección en fase sólida.

Cuadro 3. Resultados obtenidos de la inmunodetección en fase sólida, dilución, concentración proteica usada y bandas obtenidas.

| Suero | Dilución usada | Concentración proteica | Bandas obtenidas |
|-------|----------------|------------------------|------------------|
| CC1 | 1:125 | 25 µg | 100 KDa |
| CC2 | 1:5000 | 12.5 µg | 55 kDa |
| N1C1 | 1:250 | 25 µg | 55 kDa |
| N1C2 | 1:50 | 25 µg | 35 kDa |
| N2C1 | 1:50 | 25 µg | Menor a 55 kDa |
| N2C2 | 1:1000 | 25 µg | 55 y 25 kDa |

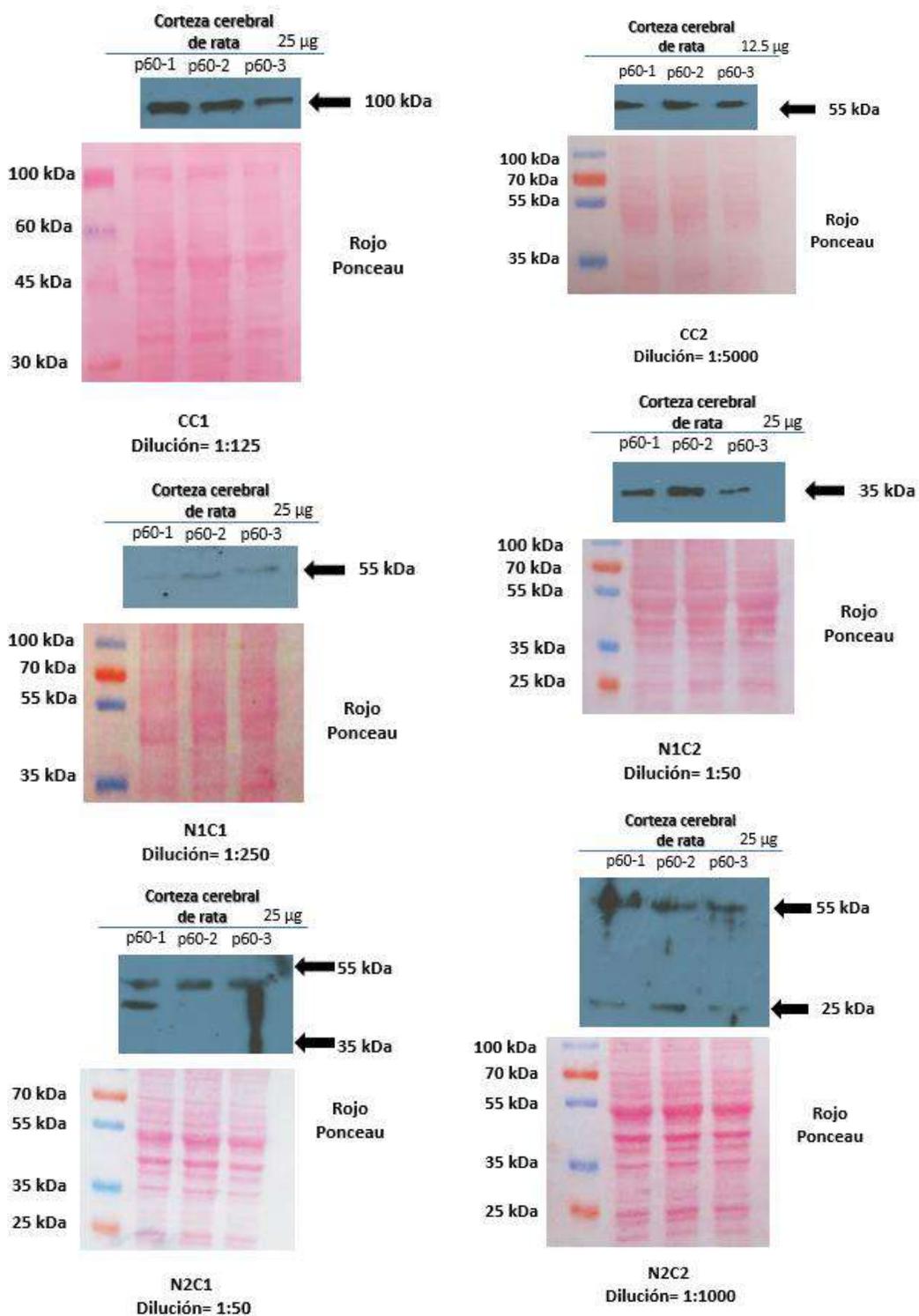


Figura 17. Evaluación de especificidad hacia el transportador SNAT2 con suero total. Se evaluó el suero de cada conejo con extractos proteicos totales de corteza cerebral de rata. Se tiene como control la membrana teñida con rojo Ponceau.

Con base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el suero total de CC2 para los siguientes experimentos, debido a que se obtuvo una banda específica a 55 kDa a una baja concentración proteica y a una dilución alta.

5.5. Especificidad de reconocimiento del transportador SNAT2, de los anticuerpos del suero CC2 en un modelo celular.

La forma de determinar la especificidad de los anticuerpos producidos por el conejo CC2 para detectar al transportador SNAT2 mediante un modelo celular *in vivo*, a través de la sobreexpresión del transportador en células HEK293. Para ello se usaron dos estrategias: 1) choque osmótico sin transfección, 2) mediante choque osmótico y transfección con ADN plasmídico SNAT2 pcDNA3HASNAT2. Se realizó la extracción de proteínas de membrana, se cuantificó y se cargó una concentración proteica de 50 µg/ml tanto de los extractos celulares y como control de expresión corteza cerebral de rata, en un gel de poliacrilamida. La membrana obtenida se incubó a una dilución 1:500 de CC2. En la Figura 18 se muestran bandas únicas en a un peso de ~60 kDa de los tres extractos proteicos.

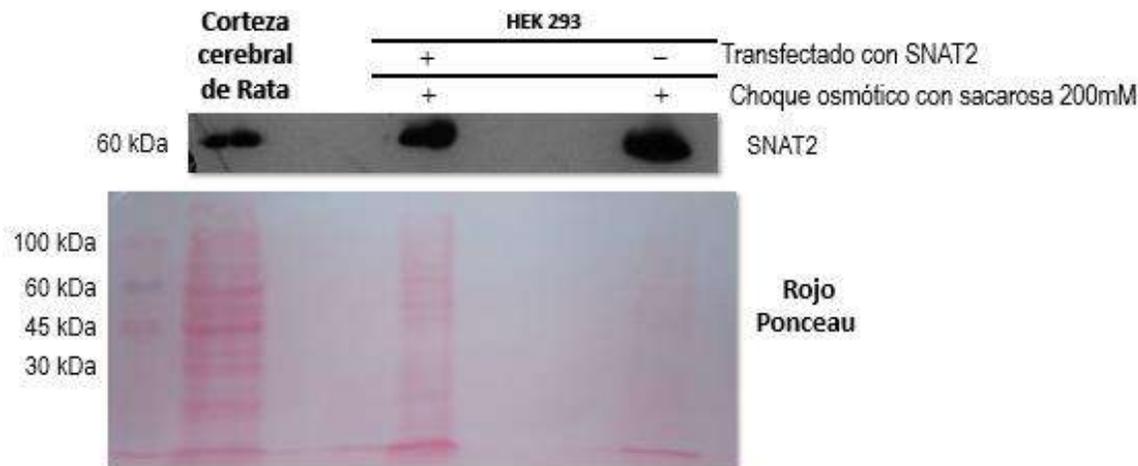


Figura 18. Análisis de expresión de SNAT2 en tejido y cultivo celular. Inmunodetección en fase sólida con extracto proteico total de corteza cerebral de rata y sobre expresión de SNAT2 en células HEK293 por enriquecimiento de membrana.

5.6. Purificación de anticuerpos por precipitación de sales.

Al determinar que el suero del conejo CC2 muestra una gran especificidad en detectar SNAT2 en extractos proteicos de tejido y celular, se prosiguió con la purificación de anticuerpos por precipitación de sales. Posteriormente se evaluó su especificidad a través de una inmunodetección en fase sólida con extractos proteicos de hígado de rata, extraídas con solución RIPA. Como se observa en la Figura 19, el suero purificado sigue mostrando una banda única a un peso de 55kDa con la misma concentración proteica a una dilución 1:5000.

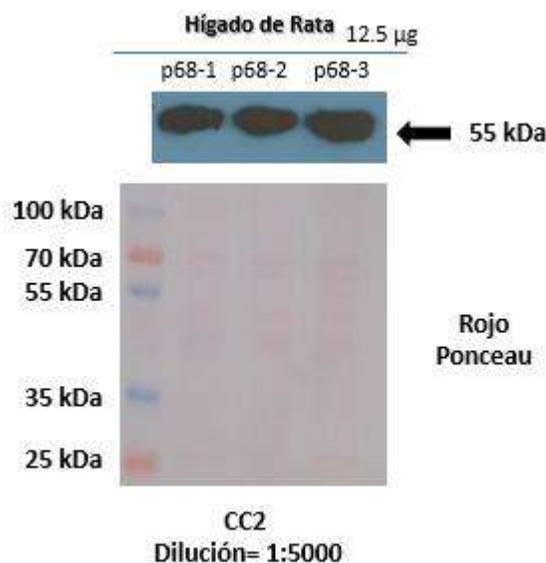


Figura 19. Análisis de la especificidad de reconocimiento por suero anti- SNAT2 purificado CC2 en extracto proteico total de hígado de rata.

5.7. Inmunofluorescencia en células HEK293.

Tras confirmar que el suero purificado de CC2 presenta bandas únicas con los diferentes métodos de extracción de proteínas de tejido y de células. Se prosiguió a realizar una inmunofluorescencia con células HEK293 con sobre expresión del transportador con choque osmótico (incubación con sacarosa 200mM durante 8 hrs a 37 °C y 5% de CO₂), con el fin de determinar sí, los anticuerpos purificados pueden detectar la expresión del transportador. Se evaluó la especificidad de anticuerpo

primario sin secundario ($1^{\circ}/-$), secundario sin primario ($-/2^{\circ}$) y ambos anticuerpos ($1^{\circ}/2^{\circ}$) para las células tratadas con choque osmótico y sin choque osmótico, estas fueron reveladas por inmunofluorescencia. En la Figura 20 se puede observar la expresión del transportador distribuida homogéneamente en toda la membrana celular con y sin choque osmótico, así mismo se denota que no existe inespecificidad del anticuerpo primario y secundario.

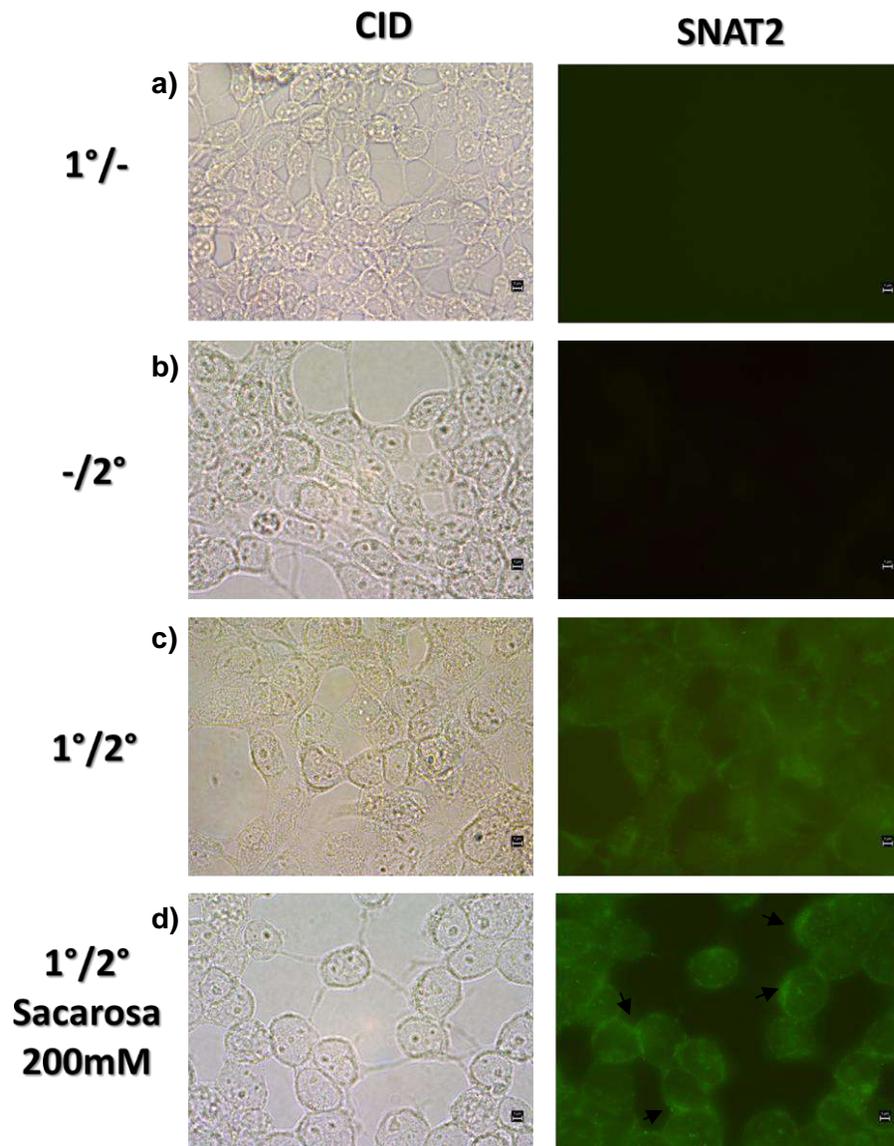


Figura 20. Inmunofluorescencia de suero SNAT2 en células HEK293 tratadas con y sin sacarosa 200mM. (Verde: SNAT2, CID: Microscopía de contraste por interferencia diferencial).

Dado los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia, los datos fueron confirmados a través de una inmunodetección en fase sólida con extractos proteicos celulares con y sin choque osmótico a una concentración de 5.5 μg y una dilución 1:5000 del suero CC2 purificado. Como puede observarse en la Figura 21, se muestran bandas únicas en los extractos celulares con y sin choque osmótico. Esto confirma que el suero CC2 detecta con afinidad y sensibilidad al transportador SNAT2.

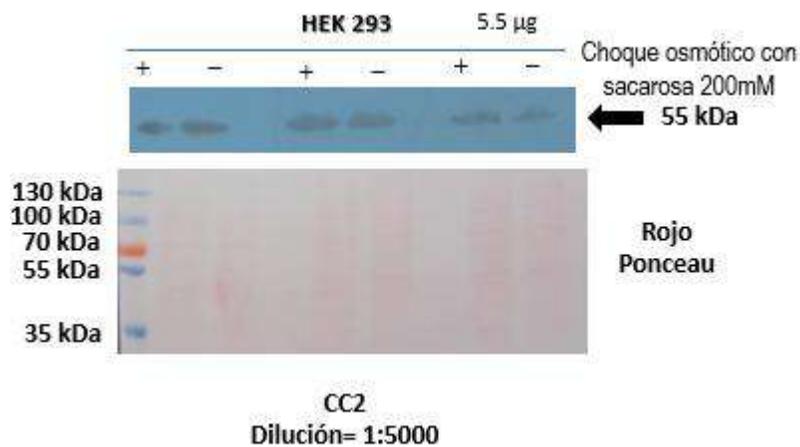


Figura 21. Inmunodetección en fase sólida de células HEK293 con y sin tratamiento con sacarosa 200mM.

6. DISCUSIÓN

A partir de los años 70s, los anticuerpos se han usado como una herramienta para facilitar el estudio molecular de proteínas funcionales en varios estados fisiológicos y patológicos mediante distintas técnicas de inmunomarcaje. Desde entonces, se han desarrollado procedimientos para mejorar la producción de los mismos, como el aumento de la especificidad definiéndola artificialmente (Mohan y col., 2014). Un ejemplo es, generar anticuerpos capaces de reconocer zonas particulares de la proteína de interés a partir del diseño de péptidos sintéticos. Por tal motivo, y dado que nuestro laboratorio está enfocado en comprender la función y regulación del transportador SNAT2, surgió la necesidad de generar una nueva herramienta que nos ayude a estudiar la presencia, localización y desregulación en distintos tejidos.

Históricamente, varios grupos de investigadores enfocados en el estudio de este transportador, han optado por producir anticuerpos diseñando péptidos de la región que quieren estudiar. En particular en el 2000, Yao y colaboradores produjeron un anticuerpo que reconocía la región N-terminal (aminoácidos 1-65) con el fin de determinar si esta región del transportador se encontraba de forma intracelular o extracelular, concluyendo que se retiene en el citoplasma. En el 2001, Hyde y colaboradores reportaron el desarrollo de anticuerpos a partir de dos diferentes epítopes de SNAT2 de rata, localizados en la región intracelular N-terminal y el bucle extracelular entre los dominios transmembranales 7 y 9. Con el fin de determinar la expresión del transportador en respuesta a la privación de aminoácidos en células de mioblasto de ratón (L6) mediante inmunodetección en fase sólida. Estos datos fueron confirmados por Hundal en el 2009.

Para nuestro grupo de investigación, era prioritario contar con un anticuerpo que reconociera la región C-terminal, que se ha descrito exhibe sensibilidad al pH y otro en la región N-terminal como modulador proteosomal (Baird y col., 2006; Nardi y col., 2015). Para lo cual se diseñaron péptidos sintéticos a través de análisis bioinformáticos con servidores como TMHMM©, BCEpred©, ProtScale, ABCpred©. Con este abordaje, se pudieron identificar tres secuencias aminoacídicas con

potencial antigénico que cumplen con los parámetros idóneos de hidrofobicidad y capacidad antigénica, así como no localizarse en una región transmembranal. A estos péptidos se les denominó: 1) PepAmino₄₋₃₂, 2) PepAmino₁₁₋₂₄ y 3) PepCarb₄₇₉₋₅₀₃.

Una vez que se identificaron, seleccionaron y sintetizaron las secuencias antigénicas, fueron conjugados con adyuvante para eficientizar la activación del sistema inmune. Para ello se utilizó Montanide ISA71VG, dado que, por su composición, prolonga el tiempo de exposición del antígeno en forma de depósito en el lugar de la administración, permitiendo atraer a las células inmunitarias; esto sin causarle daño alguno al animal. Tal como lo describe Klimba y colaboradores en el 2015, a través de sus ensayos, demostrando que el adyuvante Montanide ISA71VG induce bajas concentraciones de IL-1 β (es una citoquina que expresan los macrófagos y monocitos, ante un daño tisular o inflamación) en comparación con el adyuvante completo de Freud. Sin embargo, Montanide ISA71VG, induce altos títulos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 en comparación con el adyuvante ISA206.

Una vez inmunizados los conejos Nueva Zelanda, se determinaron los títulos de anticuerpos que observamos en la Figura 12, 13 y 14. Los conejos N1C1, N1C2, N2C1 y N2C2 no tuvieron respuestas inmunológicas. Posiblemente por el diseño y/o por las propiedades físico-químicas del péptido que no tiene capacidad de activar eficientemente el sistema inmune. Tal como describe Zinkernagel en 1977, las propiedades del péptido activan una respuesta adaptativa y posteriormente memoria inmunológica, permitiendo que, ante una segunda inmunización, se dé en mayor cantidad la generación de anticuerpos. Los bajos títulos de anticuerpos, también dependen de las características intrínsecas del animal y su sistema inmune, así como su constitución genética, tal como describe Skawarczynski y Toth en el 2016.

En contraste, los conejos CC1 y CC2, muestran altos títulos de anticuerpos. Sin embargo, difieren a pesar de ser inmunizados con el mismo péptido, lo cual es ciertamente normal, debido que se tratan de dos individuos donde su respuesta depende de una interacción completa entre su sistema inmunitario y el agente

inmunizante. Esta diferencia puede ser generada por estrés e inclusive, su variedad genética, pudiendo ser responsables de la variabilidad en el título de anticuerpos (Leenaars y col., 1999).

Una vez determinada la sensibilidad de los anticuerpos de cada suero, se prosiguió a evaluar la especificidad en la detección del transportador SNAT2 a través de inmunodetección en fase sólida con extractos proteicos de corteza cerebral de rata; en donde se ha reportado la expresión de este transportador con gran abundancia (Rodríguez y col., 2010). Se lograron detectar bandas de 55 kDa con el suero CC2, N1C1 y N2C2, así mismo, una banda de 35 kDa con el suero N1C2. La variación en el peso molecular del transportador puede explicarse como la existencia de distintos grados de maduración de SNAT2, tal como Hyde y colaboradores plantearon en el 2001. Ya que, al aislar tres fracciones enriquecidas de membranas plasmática, endosomal e interna, detectaron bandas de 60 kDa en membrana plasmática, la cual asociaron a la forma madura y funcional del transportador, y otras cercanas a 48 kDa en membranas internas, asociadas a la forma inmadura del transportador. Posteriormente, Nardi y colaboradores en 2015 demostraron que estas diferencias en el peso del transportador estaban asociadas a su estado de glicosilación, al eliminar la forma madura de SNAT2 con un tratamiento con PNGasa F, una amidasa que permite eliminar la glicosilación en proteínas. Estos estudios fueron abordados nuevamente en 2017 por Krokowsky y colaboradores, quienes realizaron ensayos con: 1) Tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación, en el cual observaron un aumento en la forma no glicosilada de SNAT2 con peso cercano a los 38 kDa, y 2) con Brefeldina A, un inhibidor de la formación de vesículas COPI, en el cual detectaron un aumento de la forma inmadura y N-glicosilada del transportador en retículo endoplasmático. De esta forma, demostraron la existencia de distintos niveles de maduración de SNAT2, los cuales presentan: 1) una forma de bajo peso molecular inmadura sin presencia de glicosilaciones, 2) una forma inmadura la cuál presenta N-glicosilaciones adquiridas en el retículo endoplasmático y 3) una forma madura totalmente glicosilada la cual ha terminado su tráfico a través del aparato de Golgi.

El suero CC1 detecta una banda de 100 kDa, posiblemente puede ser una proteína que no está relacionada con SNAT2. Sin embargo, se realizó un BLAST (por sus siglas en inglés, Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia peptídica con el que fue inmunizado el conejo, para establecer una posible relación entre el peso de la banda con alguna proteína asociada a este péptido. Al analizar los resultados, observamos que la región carboxilo de SNAT2 sobre la que fue diseñado el péptido, comparte 100% de homología con la proteína tirosina cinasa 2 β , la proteína cinasa relacionada a la adherencia focal y el receptor lipoproteico estimulado por lipólisis. Coincidentemente todas expresadas en cerebro, extractos con el cual fueron probados. Pero, no hay coincidencia con el peso molecular que presentan estas proteínas, ya que las dos primeras pesan 27 kDa y el receptor lipoproteico de 63 kDa, por lo cual descartamos una inespecificidad de reconocimiento de los anticuerpos generados por el conejo CC1. Por otra parte, el suero N2C2 muestra una banda de 25 kDa probablemente asociado a un producto de degradación del transportador. Sin embargo, se tendrían que realizar una secuenciación para asegurarnos.

El suero CC2 muestra gran especificidad y afinidad en la detección del transportador SNAT2 por inmunodetección en fase sólida, con capacidad de detectar a esta proteína en extractos totales con una concentración de 12.5 μ g, mientras que los otros sueros tenían su límite de detección arriba de 25 μ g.

Dada las características del suero CC2, se decidió analizar su especificidad para detectar SNAT2 a través de un estudio bajo condiciones controladas *in vitro*, con el fin de inducir la sobre expresión artificial y controlada del transportador en la línea celular HEK293 utilizando dos estrategias: 1) mediante transfección transitoria con fosfato cálcico usando DNA plasmídico pcDNA3HASNAT2, 2) se indujo un ambiente de estrés osmótico en las células para estimular la síntesis *de novo* del transportador, descrito por Kashiwagi en el 2009. Como control se utilizó el extracto proteico de corteza cerebral de rata. Como observamos en la Figura 18, el suero reconoce a SNAT2 en las dos estrategias de sobre expresión artificial, coincidiendo sus pesos con el control.

Posteriormente, se decidió purificar el suero del conejo CC1, con el objetivo de remover proteínas que pudieran ocasionar uniones inespecíficas en otros ensayos. Para ello se realizó la purificación con sales de sulfato de amonio propuesto por Harlow y Lane en 1988. Esta estrategia permite precipitar inmunoglobulinas, proteínas solubles y proteínas de alto peso molecular, separándolas de moléculas insolubles como lípidos y lipoproteínas.

Para confirmar que la purificación se realizó de forma correcta, y que no hubo alteraciones en la estabilidad de los anticuerpos asociados a cambios de pH, se realizó una inmunodetección en fase sólida. En la Figura 19, se observa que los anticuerpos purificados anti SNAT2 mantienen su estabilidad y especificidad sobre extractos proteicos en hígado de rata.

Una vez que los anticuerpos se purificaron y fue evaluada su capacidad de reconocer al transportador, se decidió analizar su utilidad en un ensayo *in situ* por inmunofluorescencia en células HEK293, sobre expresando al transportador mediante choque osmótico. Dado que, de las tres formas descritas para regular la sobreexpresión de SNAT2 en cultivos celulares: deprivación de aminoácidos, estrés osmótico y respuesta a insulina (McDowell y col., 1998; Franchi-Gazzola y col., 1999; Franchi-Gazzola y col., 2004), la estrategia de choque osmótico es la que presenta niveles expresión significativamente mayores respecto a las otras dos (Kashiwagi y col., 2007). En la Figura 20a y b, observamos que no hay fluorescencia inespecífica generada por el anticuerpo primario o secundario. En la Figura 20c la expresión del transportador en condiciones basales está distribuida de forma homogénea en contraste con la Figura 20d, en la que observamos claramente un aumento de la concentración y una distribución en la membrana citoplasmática en respuesta al tratamiento. Concordando con la localización descrita por Hatakana y colaboradores en el 2006, a través de análisis enfocados en evaluar la movilidad y síntesis del transportador en respuesta a insulina con células de fibroblasto de ratón 3T3-L1. Finalmente, los resultados de la inmunofluorescencia fueron corroborados a través de una inmunodetección en fase sólida, como se muestra en la Figura 21.

Con los resultados obtenidos, podemos afirmar que los anticuerpos generados por el conejo CC2 muestra gran especificidad y afinidad en la detección del transportador SNAT2 tanto en tejidos como en cultivos celulares, independiente del método para extracción de proteínas. Presentando versatilidad en distintas técnicas de inmunodetección, ya que ha sido demostrado que puede usarse en inmunodetección en fase sólida e inmunofluorescencia. Por lo tanto, se ha producido una herramienta molecular para contribuir en el estudio de identificación y expresión de la regulación del transportador SNAT2.

7. CONCLUSIÓN

La secuencia peptídica PepCarb₄₇₉₋₅₀₃ localizada en la región C-terminal es antigénica y presenta alta inmunogenicidad, siendo capaz de activar eficientemente el sistema inmune, promoviendo la producción de anticuerpos.

El conejo CC2 inmunizado con el péptido PepCarb₄₇₉₋₅₀₃ generó altos títulos de anticuerpos, con capacidad para reconocer específicamente al transportador SNAT2 tanto *in vitro* como *in situ*.

8. REFERENCIAS

- Abbas** AK, Litchman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 7th edición. España: Editorial Elsevier. **2012**; 110-350.
- Abbas** AK, Litchman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 9th edición. España: Editorial Elsevier. **2018**; 5-11, 106-107.
- Alberts** B, Johnson A, Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. **2002**; 180-190.
- Aucouturier** J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. **2001**; 19(17-19):2666-72.
- Avruch** J, Long X, Ortíz-Vega S, Rapley, Papageorgiou A, Dai A. Amino acid of TOR complex 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. **2009**; 296(4): E592-E602.
- Baird** F, Bett K, MacLean C, Tee A, Hundal S, Taylor P. Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in *Xenopus* oocytes. *American Journal of Physiology*. **2009**; 297(3): E822-E829.
- Banchereau** J and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **1998**; 245-252.
- Boyce** JA, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol*. **2013**; 101-109.
- Burns** R. Immunochemical Protocols 3th edition. Totowa: Human Press, **2015**; 318.
- Chaplin** D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2009**; S3-S23.
- Chaudhry** FA, Reimer RJ, Edwards RH. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *Journal of Cell Biology*. **2002**; 157: 349–355.
- Chaudhry** FA, Schmitz D, Reimer RJ, Larsson P, Gray AT, Nicoll R, Kavanaugh M, Edwards RH. Glutamine uptake by neurons: interaction of protons with system A transporters. *The Official Journal of the Neuroscience*. **2002**; 22:62–72.
- Chen** Y-Y, Rosario FJ, Shehab MA, Powell TL, Gupta MB, Jansson T. Increased ubiquitination and reduced plasma membrane trafficking of placental amino acid transporter SNAT-2 in human IUGR. *Clinical Science*. **2015**;129(12):1131-1141.

Colas C, Man-Un P, Schlessinger A. SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery. *Med. Chem. Commun.* **2016**; 7: 1069-1081.

Dahl SG, Sylte I, Ravna AW. Structures and models of transporter proteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **2004**; 309: 853-860.

Droppa-Almeida D, Franceschi E, Padilha FF. Immune-Informatic Analysis and Design of Peptide Vaccine From Multi-epitopes Against *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Bioinformatics and Biology Insights.* **2018**; 12.

Franchi- Gazzola R, Gaccioli F, Bevilacqua E, Visigalli R, Dall'Asta V, Sala R, Varoqui H, Erickson JD, Gazzola GC, Bussolati O. The synthesis of SNAT2 transporters is required for the hypertonic stimulation of system A transport activity. *Biochimica et biophysica acta.* **2004**; 15;1667(2):157-66.

Franchi- Gazzola R, Visigalli R, Bussolati O, Dall'Asta V, Gazzola GC. Adaptive Increase of Amino Acid Transport System A Requires ERK1/2 Activation. *The journal of Biological Chemistry.* **1999**; 274, 28922-28928.

Fredriksson R, Nordström K, Stephansson O, Hägglund M, Schiöth H. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Letters.* **2008**; 582(27): 3811-3816.

Freund J, Casal J, Hismer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1937**; 37:509.

Granados A. Inmunología. Apuntes para estudiantes de biomedicina. México: Editorial Prado. **2018**; 29-34.

Hagglund M. Characterization of amino acid transporters in the brain [monografía en internet]. Upsala: Upsala University: Department of neurosciences. **2013** [consultado 2016 noviembre 3]; 1:55. Disponible en: <https://uu.diva-portal.org/smash/get/diva2:679434/FULLTEXT01.pdf>

Harlow E, Lane D. Antibodies a laboratory manual. 2nd edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory. **1988**; 55-135.

Hediger M A, Romero M F, Peng J B, Rolfs A, Takanaga H, Bruford E A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pfluegers Arch.* **2004**; 447: 465–468.

Howard GC and Bethell DR. Basic methods in antibody production and characterization. Boca Raton: Editorial CRC Press. **2009**; 1-288.

Hundal HS, Taylor PM. Amino acid transceptors: gate keepers of nutrient exchange and regulators of nutrient signaling. American Journal Physiology Endocrinology Metabolism. **2009**; 296: 603-613.

Hyde R, Chistie GR, Litherland GJ, Hajduch E, Taylor PM, Hundal HS. Subcellular localization and adaptative up-regulation of System A (SNAT2) amino acid transporter in skeletal muscle cells and adipocytes. Biochem J. **2001**; 355:563-8.

Involvement of transporter recruitment as well as gene expression in the substrateinduce adaptive regulation of amino acid transport system A. Biochem Biophys Acta- Biomembr. **2001**; 1512:15-21.

Janeway CA, Travers P, Walport M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Editorial Garland Science. **2001**; 11-16.

Jang SI, Kim DK, Lillehoj HS, et al. Evaluation of Montanide™ ISA 71 VG Adjuvant during Profilin Vaccination against Experimental Coccidiosis. Marques ETA, ed. PLoS ONE. **2013**; 8(4): e59786.

Jimenez LF, Merchant H. Biología celular y molecular. México: Editorial Pearson Educación de México S.A de C.V. **2003**.

Kashiwagi H, Yamazaki K, Takekuma Y, Ganapathy V, Sugawara M. Regulatory mechanisms of SNAT2, an amino acid transporter, in L6 rat skeletal muscle cells by insulin, osmotic shock and amino acid deprivation. Amino acids. **2009**; 36(2):219-30.

Klimba A, Michels L, Glowalla E, Tosetti B, Krönke M, Krut O. Montanide ISA 71 VG is Advantageous to Freund's Adjuvant in Immunization Against S. Aureus Infection of Mice. Scandinavian Journal of immunology. **2015**; 81(5):291-7.

Krokowski D, Jobava R, Guan B, Farabaugh K, Wu J, Majumder M, Hatzoglou M. Coordinated regulation of the neutral amino acid transporter SNAT2 and the protein **Leenaars** M, Hendricksen C, Leeuw W, Carat F, Delahaut P, Fischer R, Halder M, - Hanly WC, Hartinger J, Hau J, Lindbland E, Nicklas W, Outschoor I, Steward-Tull D. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals: The report and recommendations of ECVAM/FELASA workshop 35 in Utrecht, Netherland.

Federation of European Laboratory Animal Science Associations. **1999**; 27(1): 97-102.

Leenaars M, Hendricksen C. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. Institute of Laboratory Animal Resources Journal. **2005**; 46(3):269-79.

Li W, Joshi MD, Singhanian S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. Vaccines. **2014**; 2(3):515-536.

Ling R, Bridges CC, Sugawara M, Fujita T, Leibach FH, Prasad PD, Ganapathy V.

Lipman N, Jackson LR, Trudel LJ, Wels-García F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. Institute of Laboratory Animal Resources Journal. **2005**; 46(3):258-68.

Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, García FW. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR Journal. **2005**; 46: 258-268.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4ta.edicion. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. **2011**; 245-270.

Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. Eur J Physiol. **2004**; 447: 784-795.

Martínez-Paniagua C. Efectos funcionales de la fosforilación de SNAT2 en células granulares de cerebelo de rata. Tesis de maestría, CINVESTAV-Zacatenco. **2013**: 37-59.

Masopust D and Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. Nature. **2013**; 13(5): 309-320.

McDowell H, Eyers P, Hundal H. Regulation of system A amino acid transport in L& rat skeletal muscle cells by insulin, chemical and hyperthermic stress. FEBS. **1998**; 441 (1998) 15-19.

Mohan C, Das C, Long K. An introduction to antibodies and their applications. 3ra. Edición. Alemania: MD Millipore. **2014**; 1-10.

Nardi F, Hoffmann TM, Stretton C, Cwiklinski E, Taylor PM, Hundal HS. Proteasomal modulation of cellular SNAT2 (SLC38A2) abundance and function by unsaturated fatty acid availability. *Journal of Biological Chemistry*. **2015**; 290(13):8173-8184.

Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Toward a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. **2011**, 11:823-836.

Owen JA, Punt J, Strandford SA. *Kuby Inmunología*. 7ma edición. México: McGraw Hill. **2014**; 654-656.

phosphatase subunit, GADD34, promotes adaptation to increased extracellular osmolarity. *Journal of Biological Chemistry*. **2015**; 290(29): 17822-17837.

Prieto M, Barbarroja J, García C, Moserrat J. Linfocitos B. *Medicine- Programa de Formación Médica Continua*. **2013**; 11(28): 1710-1719.

Rodríguez A, Berumen L, Zafra F, Giménez C, García- Alcocer MG. Expression of the SNAT2 amino acid transporter during the development of rat cerebral cortex. *International Journal of Developmental Neuroscience*. **2011**; 29(7):743-8.

Rojas- Espinosa O. *Inmunología (de memoria)*. México: Editorial Panamericana. **2006**; 27-58.

Saier M. A functional- phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular biology reviews*. *MMBR*. **2000**; 64(2): 354-411.

Schiöth HB, Roshanbin S, Hägglund MG, Fredriksson R. Evolutionary origin of amino acid transporter families SLC32, SLC36 and SLC38 and physiological, pathological and therapeutic aspects. *Mol Aspects Med*. **2013**; 34: 571– 585.

Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **2010**;125: S41-S52.

Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ*. **2011**; 19(4):197-206.

Skwarczynski M, Toth I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chemical Science*. **2016**; 7(2):842-854.

Taylor PM. Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2014**; 99:223S–230S.

Varoqui H, Erickson J D. Selective up-regulation of system a transporter mRNA in diabetic liver. *Biochem and Biophysical Research Communications*. **2002**; 290 (3): 903–908.

Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. **2011**; 7: S1.

Williams AF and Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Rev Immunol*. **1988**; 6:381-405.

Woof JM, Kerr MA. IgA function- variations on a theme. *Immunology*. **2004**; 113(2):175-177.

Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *Journal of Biological Chemistry*. **2000**; 275 (30): 22790–22797.

Zinkernagel R, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Künding T, Hengartner H. Antigen localization regulates immune responses in a dose-and time.dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunologicals Review*. **1977**; 156:199-209.

9. ANEXO

9.1. Aprobación del Comité de Bioética

 Universidad Autónoma de Querétaro  Facultad de Ciencias Naturales

Comité de Bioética

Querétaro, Qro., 23 Octubre 2015.

DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
PROFESOR INVESTIGADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Estimado: DRA. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

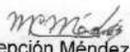
Nos permitimos hacer de su conocimiento que el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales dio la siguiente resolución del proyecto de Investigación del cual usted es responsable:

| Titulo | Resolución |
|--|-----------------|
| "Producción de anticuerpos monoclonales contra el transportador de aminoácidos neutros SNAT2." (93FCN2015) | Aprobado |

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

COMITÉ EJECUTIVO

Atentamente,


Dra. María Concepción Méndez Gómez Humarán
Comité de Bioética
Facultad de Ciencias Naturales

2