



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTANDARIZACIÓN DE SUSTRATO-ECL NO COMERCIAL
EN ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES 5-HT_{5A} Y
DE MELATONINA EN LINFOCITOS POR WESTERN BLOT”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ALFREDO RODRÍGUEZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTANDARIZACIÓN DE SUSTRATO-ECL NO COMERCIAL
EN ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES 5-HT_{5A} Y
DE MELATONINA EN LINFOCITOS POR WESTERN BLOT”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALFREDO RODRÍGUEZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA _____

DIRECTOR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER _____

SINODAL

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH _____

SINODAL

I.Q. en AI. KARLA M. PADILLA OLVERA _____

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Serotonina	1
1.1.1 Receptores para serotonina	2
1.2 Melatonina	4
1.2.1 Receptores para melatonina	6
1.3 Presencia de Serotonina y Melatonina en Linfocitos	7
1.4 Western blot	9
1.5 Quimioluminiscencia	10
1.5.1 Quimioluminiscencia en la detección para Western Blot	12
1.6 Principios de detección por ECL	13
1.7 Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona)	15
1.7.1 Aplicaciones del luminol	16
1.8 Estandarización	17
1.8.1 Selectividad	18
1.8.2 Linealidad	19
1.8.3 Sensibilidad	20
1.8.4 Límites	21
1.8.5 Precisión	22
1.8.6 Exactitud	23
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 General	25
3.2 Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Materiales	26

4.1.1 Material Biológico	26
4.1.2 Materiales y equipos	26
4.1.3 Reactivos	27
4.2 Métodos	28
4.2.1 Extracción de proteínas	28
4.2.2 Cuantificación de proteínas	28
4.2.3 Preparación del sustrato-ECL no comercial	29
4.2.4 Western Blot	29
4.2.4.1 SDS-PAGE	29
4.2.4.2 Electrotransferencia de proteínas	30
4.2.4.3 Ensayo con quimioluminiscencia	31
4.2.4.4 Estandarización del sustrato-ECL no comercial en análisis Western Blot	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Curva de Calibración	32
5.2 Cuantificación de proteínas	32
5.3 Western Blot	33
5.4 Estandarización de sustrato-ECL no comercial	34
6. DISCUSIONES	37
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características principales de las familias de receptores para 5-HT.	3
2	Características del uso clave de AP y HRP como anticuerpos secundarios conjugados.	13
3	Parámetros de determinación según el tipo de método a estandarizar.	18
4	Diluciones para la preparación de la curva de calibración.	29
5	Concentración proteica de las muestras de linfocitos.	33
6	Análisis de costos comparativo del sustrato-ECL no comercial con sustratos ECL comerciales.	34
7	Resultados de la prueba de Tukey.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de la serotonina.	1
2	Síntesis de la serotonina (5-Hidroxitriptamina).	2
3	Estructura química de la melatonina.	4
4	Síntesis de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).	5
5	Diagrama esquemático de cómo la melatonina podría actuar sobre el sistema IL-2/IL-2R como sustancia autocrina, intracrina y/o paracrina en CMSPH.	8
6	Pasos Básicos para el análisis por Western Blot.	9
7	Diagrama de la colocación de la quimioluminiscencia en los procesos fotofísicos más típicos.	11
8	Principio de detección quimioluminiscente en Western Blot.	14
9	Mecanismo simplificado de la reacción del luminol.	15
10	(A) Comportamiento de la curva; (B) Curva de calibración.	20
11	Curva de calibración. Utilizando BSA como patrón de referencia.	32
12	Fotografía del Western Blot de los receptores de serotonina 5-HT _{5A} y de melatonina.	33
13	Western blot de los receptores de serotonina 5-HT _{5A} y de melatonina, revelados con 3,3-diaminobencidina.	34
14	Comparación de sustratos-ECL. (A) Sustrato-ECL comercial. (B) Sustrato-ECL no comercial.	35
15	Densitometría de la expresión de los receptores 5-HT _{5A} y de melatonina en linfocitos humanos.	36

RESUMEN

Desde hace tiempo, se han desarrollado continuamente sistemas de detección de quimioluminiscencia que hoy en día están entre los más ampliamente utilizados para aplicaciones de Western Blot. El sistema más comúnmente utilizado es la detección enzimática de quimioluminiscencia, basado en anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante que comercialmente se conoce como ECL, sustrato que en la actualidad tiene un costo elevado, razón por lo cual es de suma importancia el desarrollo de nuevas alternativas de sustratos-ECL no comerciales; aunado a esto, es imprescindible que sean estandarizados debido a que de esta manera se aseguraría que los resultados arrojados por éstos sean precisos y confiables. Debido a estos motivos señalados se llevó a cabo el desarrollo de un sustrato-ECL no comercial, el cual fuera rentable económicamente, el cual se evaluó y estandarizó mediante el análisis de la expresión de los receptores de serotonina 5-HT_{5A} y de melatonina expresados en linfocitos humanos mediante Western Blot. Los resultados mostraron estadísticamente que el sustrato-ECL no comercial desarrollado no tiene diferencia significativa con respecto a un sustrato-ECL comercial evaluado en las mismas condiciones, las cuales fueron de 2 minutos de exposición al sustrato-ECL y 2 minutos de incubación con la placa fotográfica en el cassette. Así mismo se evaluaron los costos de producción de ambos, teniendo un ahorro económico de hasta 90% en el sustrato-ECL no comercial con respecto al comercial. Por lo tanto la utilización del sustrato-ECL no comercial es recomendable en su utilización como alternativa a los sustratos comerciales.

1. ANTECEDENTES

1.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) (Figura 1) es una diamina neurotransmisora que actúa a través de receptores de membrana del sistema nervioso central (SNC).

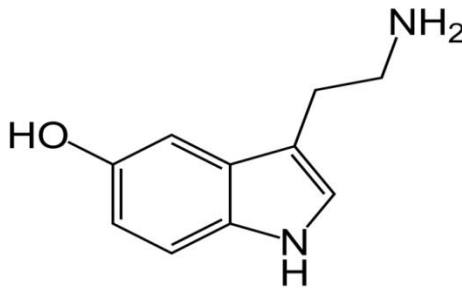


Figura 1. Estructura química de la serotonina.

La mayor síntesis de serotonina en los mamíferos se encuentra dentro del intestino; ésta es producida principalmente por las células enterocromafines. También se almacena dentro de plaquetas en la sangre. En las especies de mamíferos, la serotonina en cerebro surge de grupos especializados de los cuerpos celulares conocidos como los núcleos del Rafé, los cuales se encuentran en la formación reticular del tronco cerebral (Nichols y Nichols, 2008).

La biosíntesis de la serotonina comienza con la hidroxilación del aminoácido esencial L-triptófano; éste es introducido a través de la barrera hematoencefálica usando el transportador de aminoácidos, en donde compite con otros aminoácidos como la fenilalanina, leucina y metionina. La actividad de la enzima triptófano hidroxilasa en la síntesis de la serotonina es importante, ya que es el primer paso y el factor limitante de la velocidad en la biosíntesis de 5-HT. Se lleva a cabo la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano mediante la oxidación por la enzima triptófano hidroxilasa, seguida por una descarboxilación mediada por la

descarboxilasa aromática del L-aminoácido, convirtiéndolo en 5-hidroxitriptamina (serotonina) como se muestra en la Figura 2 (Berger y col., 2009).

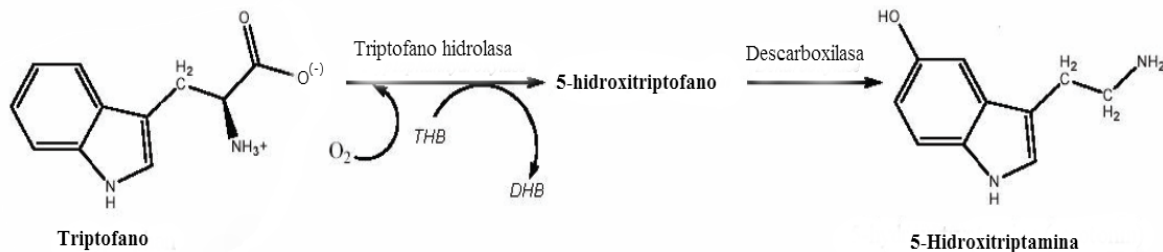


Figura 2. Síntesis de la serotonina (5-Hidroxitriptamina) (Modificado de Pytliak y col., 2011).

La serotonina tiene una relevancia médica y fisiológica amplia e importante, prácticamente en todos los principales sistemas orgánicos, incluyendo el cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal (GI) y genitourinario, así como en el sistema nervioso central. Además interviene en la percepción sensorial, comportamientos tales como la agresión, el apetito, el sueño, el estado de ánimo, el sexo, la cognición y la memoria. Las funciones del neurotransmisor son evaluadas a través del estudio de sus receptores (Roth, 2006).

1.1.1 Receptores para serotonina

En los últimos 20 años, han sido identificados en gran cantidad de mamíferos. La familia de receptores de serotonina es la más grande familia de receptores acoplados a proteínas G. Hasta el momento se han logrado identificar al menos 14 receptores diferentes de 5-HT, los cuales han sido clasificados de manera bioquímica y farmacológica en siete familias (5-HT₁₋₇). El único receptor que no se encuentra acoplado a proteínas G es el receptor 5-HT₃, debido a que éste es un canal iónico (Cuadro 1). Una vez que es activado el receptor por el ligando, la serotonina, éste sufre cambios conformacionales y activa las cascadas de transducción de señales del interior celular (Nichols y Nichols, 2008).

Cuadro 1. Características principales de las familias de receptores para 5-HT.

Familia	Subtipo	Vía de señalización	Expresión en el SNC
5-HT ₁	5-HT _{1A}	G _i /G ₀	Extendida en cerebro (principalmente hipocampo, corteza y núcleo del Rafé).
	5-HT _{1B}	G _i /G ₀	Extendida en cerebro (principalmente ganglios basales y la corteza).
	5-HT _{1D}	G _i /G ₀	Ganglios basales, hipocampo y la corteza.
	5-HT _{1E}	G _i /G ₀	Corteza, núcleo estriado y claustró
	5-HT _F	G _i /G ₀	Núcleo del Rafé dorsal, hipocampo, corteza, claustró, núcleo caudado, tronco encefálico.
5-HT ₂	5-HT _{2A}	G _{q11}	Corteza, claustró, hipocampo, hipotálamo, ganglios basales.
	5-HT _{2B}	G _{q11}	Cerebelo, área septal, hipotálamo, amígdalas.
	5-HT _{2C}	G _{q11}	Plexos coroideos, corteza, hipocampo, amígdalas, núcleo estriado, sustancia negra.
5-HT ₃	Pentámero de 5-HT ₃ ; A (homopentamérico), B, C, D, E (heteropentaméricos).	Canal iónico	Extendida en cerebro (principalmente área postrema, núcleo del tracto solitario, complejo vagal dorsal, sistema límbico).
5-HT ₄	5-HT ₄	G _s	Ganglios basales, corteza, área septal, hipocampo.
5-HT ₅	5-HT _{5A}	G _i /G ₀	Hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza, tálamo, núcleo estriado, puente de Varolio.
	5-HT _{5B}	-----	Habénula, hipocampo (roedores), Pseudogen (humanos).
5-HT ₆	5-HT ₆	G _s	Extendida en cerebro (principalmente en núcleo estriado, amígdalas, hipocampo).
5-HT ₇	5-HT ₇	G _s	Tálamo, hipocampo, corteza, amígdalas.

Abreviaciones: SNC, sistema nervioso central (Berger y col., 2009; Pytliak y col., 2011).

1.2 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 3) es una hormona sintetizada a partir del neurotransmisor serotonina; además es una molécula ubicada y ampliamente distribuida en la naturaleza con una actividad potencial nocturna en organismos unicelulares, plantas, hongos y animales vertebrados (Hardeland y Poeggeler, 2003).

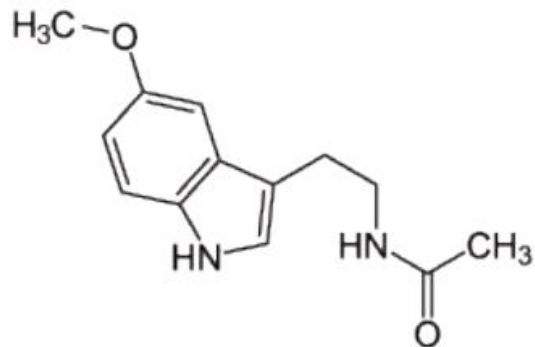


Figura 3. Estructura química de la melatonina.

En la mayoría de los vertebrados, incluyendo los seres humanos, la melatonina se sintetiza principalmente en la glándula pineal y es regulada por el ciclo medio ambiente luz/oscuridad a través del núcleo supraquiasmático. Los pinealocitos funcionan como "transductores neuroendocrinos" al secretar melatonina durante la fase oscura del ciclo de luz/oscuridad, por lo tanto la melatonina se denomina a menudo "hormona de la oscuridad". La melatonina es secretada principalmente por la noche y forma una parte central de la regulación del sueño, así como en un número importante de las actividades de otros ciclos corporales. La melatonina se dedica exclusivamente a la señalización "hora del día" y la "época del año" (por lo tanto se considera que ayudará a ambos relojes y funciones de calendario) para todos los tejidos y es por ello que es considerado como el cuerpo de marcapasos cronológico o 'Zeitgeber' (Pandi-Perumal y col., 2006).

La maquinaria enzimática para la biosíntesis de la melatonina en pinealocitos fue identificada por primera vez por Axelrod en 1974. Su precursor, el triptófano, es tomado de la sangre y se convierte, a través del intermediario 5-hidroxitriptófano a serotonina. La serotonina es acetilada para formar N-acetilserotonina por la acción de la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), que en la mayoría de los casos, representa la enzima limitante de la velocidad en la síntesis. N-acetilserotonina se convierte en melatonina por la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa. Este mecanismo es mostrado en la figura 4 (Pandi-Perumal y col., 2006).

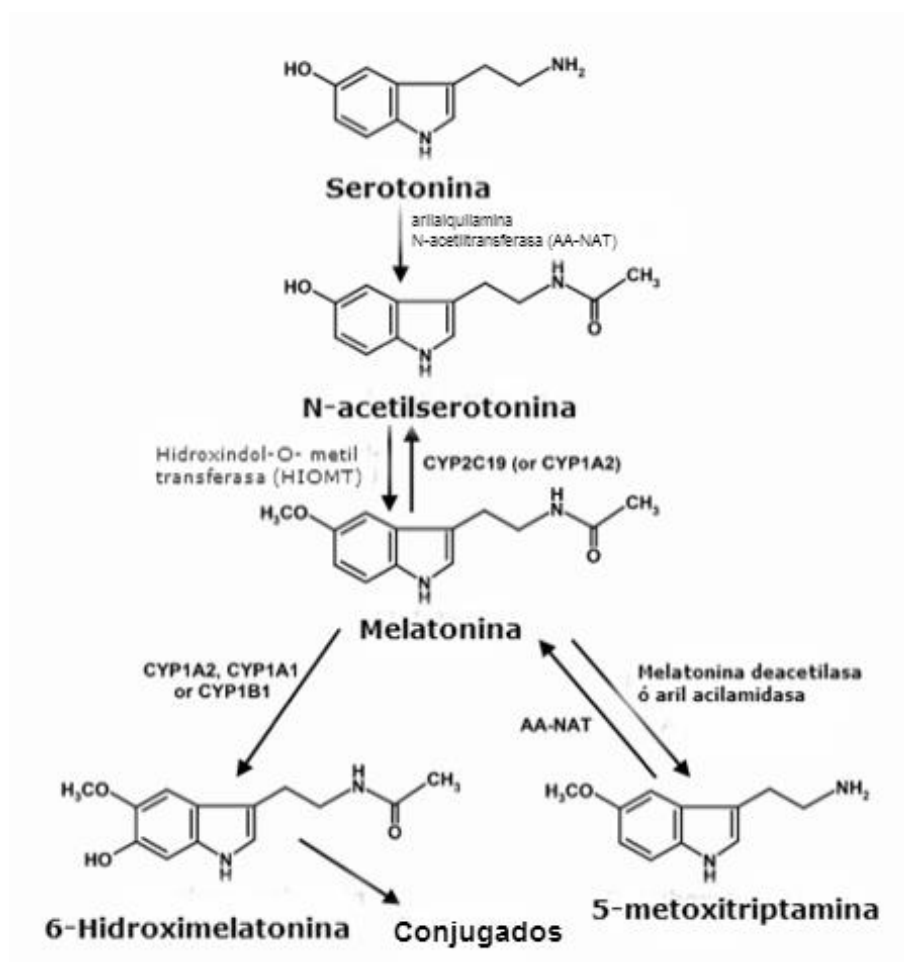


Figura 4. Síntesis de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Modificado de Pandi-Perumal y col., 2006).

La melatonina participa en diversas funciones fisiológicas. Además de sus funciones de cronometraje, la melatonina es un antioxidante eficaz que elimina los radicales libres y regula varias enzimas antioxidantes (Tan y col., 2003). La melatonina tiene un efecto protector sobre el hígado contra el estrés oxidativo, con una reducción en ratas con cirrosis y en ratas con envejecimiento (Rosa y col., 2010; Mauriz y col., 2007)

1.2.1 Receptores para melatonina

Las principales acciones de la melatonina están mediadas por los receptores de membrana MT_1 y MT_2 . Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G que contienen los siete dominios transmembrana típicos. Estos receptores son responsables de efectos cronobiológicos en el sistema nervioso central, el marcapasos circadiano. MT_2 actúa principalmente mediante la inducción de cambios de fase y MT_1 actúa en la actividad de la supresión de disparo neuronal. MT_1 y MT_2 se expresan también en los órganos y las células periféricas, y contribuyen en acciones inmunológicas o para el control vasomotor. MT_1 parece mediar la vasoconstricción principalmente, mientras que MT_2 principalmente causa vasodilatación. Un efecto primario frecuentemente observado es G_i -dependiente, el cual decrece en AMPc. En otros efectos, G_0 está involucrado. La disminución en AMPc puede tener efectos posteriores pertinentes, por ejemplo en el Ca^{2+} activado por canales de K^+ . Un tercer sitio de unión, inicialmente descrito como MT_3 , ha sido posteriormente caracterizado como la quinona reductasa 2. La quinona reductasa participa en la protección contra el estrés oxidativo mediante el bloqueo de reacciones de transferencia de electrones de quinonas. La melatonina también se une con relevante, pero más baja afinidad a calmodulina. La inhibición directa de la transición del poro de permeabilidad mitocondrial, por acción de la melatonina puede indicar que otro sitio de unión mitocondrial está implicado, aunque en la actualidad esto no se ha confirmado. Aunque la protección antioxidante por la melatonina se basa en los mecanismos receptores, en cuanto a la expresión de

genes se refiere, para algunas otras acciones antioxidantes no se requieren receptores (Pandi-Perumal y col., 2006).

1.3 Presencia de Serotonina y Melatonina en Linfocitos

Se ha descrito que existe un transporte activo de 5-HT con características farmacológicas específicas en los linfocitos humanos en reposo (Faraj y col., 1994); ésto fue confirmado posteriormente debido a que se reportó que los linfocitos humanos contienen un transportador de la serotonina de alta afinidad y que el número de linfocitos transportadores de serotonina se redujo significativamente en pacientes con depresión mayor, en comparación con los controles (Lima y Urbina, 2002).

Además se ha demostrado que los linfocitos pueden almacenar y sintetizar 5-HT (Resler y col., 2008). Otra posibilidad es que "capturan" 5-HT en los sitios inflamatorios después de su liberación de las plaquetas o después de la estimulación de las terminaciones nerviosas noradrenérgicas en los tejidos linfoides, donde los contactos directos entre los terminales y las células inmunes se han descrito (Mossner y Lesch, 1998). Se ha demostrado que los linfocitos expresan receptores de serotonina 5HT_{1B}, 5HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₆, 5-HT₇, subtipos de receptores que probablemente son sustratos de diferentes actividades (Stefulj y col., 2000). Un estudio de Marazziti y col. (2001) demostró la presencia de mRNA específico para los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} en linfocitos en reposo en tres grupos de personas: controles sanos, pacientes con trastornos obsesivos-compulsivos o bipolares.

Por otro lado, se ha confirmado la presencia de la melatonina en un gran número de sitios extrapineales. En relación con el sistema inmunológico, la melatonina se ha localizado en el timo y células tales como mastocitos, leucocitos eosinófilos, plaquetas y células endoteliales (Kvetnoy, 1999). Posteriormente se ha descrito que los linfocitos humanos cultivados sintetizan y liberan grandes cantidades de melatonina que podrían actuar, además de su efecto endocrino, como una

sustancia intracrina, autocrina y/o paracrina para la coordinación local de la respuesta inmune (Carrillo-Vico y col., 2004). Se ha demostrado que los linfocitos no solo sintetizan la melatonina, si no que esta melatonina endógena es biológicamente activa, ya que está implicada en la regulación de la expresión de IL-2/IL-2R a través de un mecanismo de acción en la que están implicados receptores, tanto en la membrana y en receptores nucleares, mostrado de manera resumida en la figura 5 (Carrillo-Vico y col., 2005).

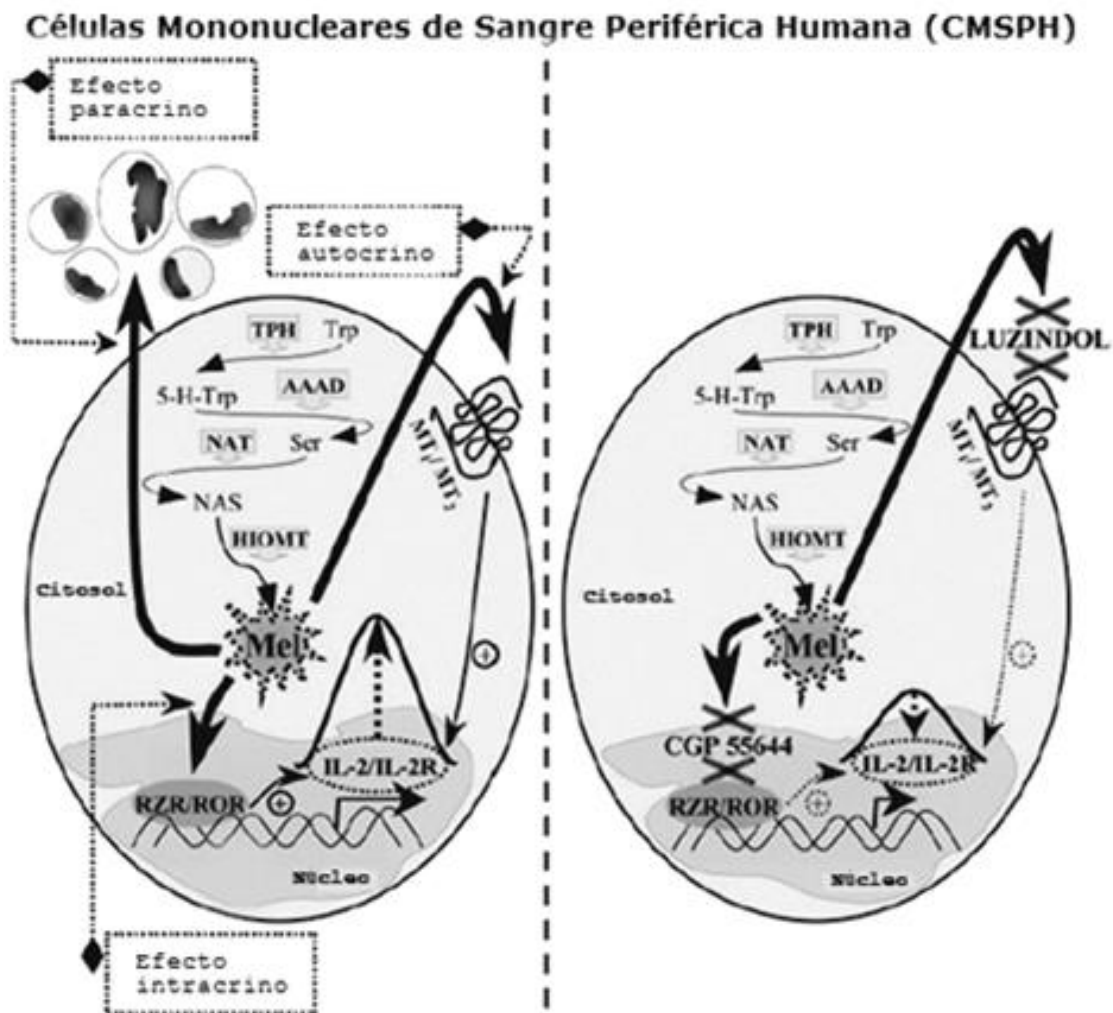


Figura 5. Diagrama esquemático de cómo la melatonina podría actuar sobre el sistema IL-2/IL-2R como sustancia autocrina, intracrina y/o paracrina en CMSPH (Modificado de Carrillo-Vico y col., 2005). Abreviaciones: AAAD, Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; HIOMT, Hidroxindol-O-metiltransferasa; NAT, Serotonina-N-acetiltransferasa; 5-H-Trp, 5-Hidroxitriptófano; Trp, Triptófano; Ser, Serotonina; Mel, Melatonina.

1.4 Western blot

El Western blot es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un compuesto tisular). Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana absorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin y col., 1979; Renart y col. 1979). Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia, quimioluminiscencia entre otras técnicas. De esta manera, se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

Esta técnica es hoy en día imprescindible en varios campos de la biología, como la biología molecular, la bioquímica, la biotecnología o la inmunología. Existe toda una industria especializada en la venta de anticuerpos monoclonales y policlonales, contra decenas de miles de proteínas diferentes.

Aunque los detalles de los protocolos de Western Blot pueden variar de una aplicación a otra, con adaptaciones a las características específicas de las proteínas y el nivel de información requerido, todos siguen un conjunto de pasos básicos comunes, como se muestra en la figura 6.



Figura 6. Pasos Básicos para el análisis por Western Blot (Modificado de General Electric Company, 2011).

Existe una variedad de sistemas de detección, basados en quimioluminiscencia, quimiofluorescencia, detección de fluorescencia, cromogénica o radioisotópica. Reactivos cromogénicos y radioisotópicos se han utilizado ampliamente durante muchos años, pero han disminuido en popularidad debido a problemas de seguridad con el manejo de isótopos radiactivos y la baja sensibilidad con reactivos cromogénicos. Como resultado de estos problemas, se han desarrollado técnicas quimioluminiscentes y quimiofluorescentes, así como de fluorescencia, y éstas son ahora generalmente los métodos de elección para la detección, debido a su mayor sensibilidad y rango dinámico más amplio.

1.5 Quimioluminiscencia

La quimioluminiscencia, que es el fenómeno observado cuando el producto vibracional excitado de una reacción exergónica se relaja a su estado basal con una emisión de fotones, se puede definir en términos simples como: reacciones químicas que emiten luz (Weeks y Svehla, 1992). La reacción química produce energía en cantidad suficiente (aproximadamente 300 kJ mol^{-1} para la emisión de luz azul y 150 kJ mol^{-1} para la emisión de luz roja) para inducir la transición de un electrón de su estado basal a un estado electrónico excitado. Esta transición electrónica es acompañada a menudo por vibraciones y cambios rotacionales en la molécula. En moléculas orgánicas, las transiciones de los electrones se presentan de un enlace π hacia un orbital antienlace π^* ($\pi \rightarrow \pi^*$) o de un enlazante a un orbital antienlace π^* ($n \rightarrow \pi^*$), los cuales son más frecuentes. El retorno del electrón al estado basal con la emisión de un fotón se llama así quimioluminiscencia.

Después de que la molécula es excitada, ésta es sometida a distintas reacciones químicas, las cuales pueden inducir una pérdida de energía en el electrón, mediante la desactivación por colisión, conversión interna o cruce entre sistemas. Estos procesos sin radiación son indeseables desde un punto de vista analítico cuando compiten con quimioluminiscencia como es mostrado en la figura 7.

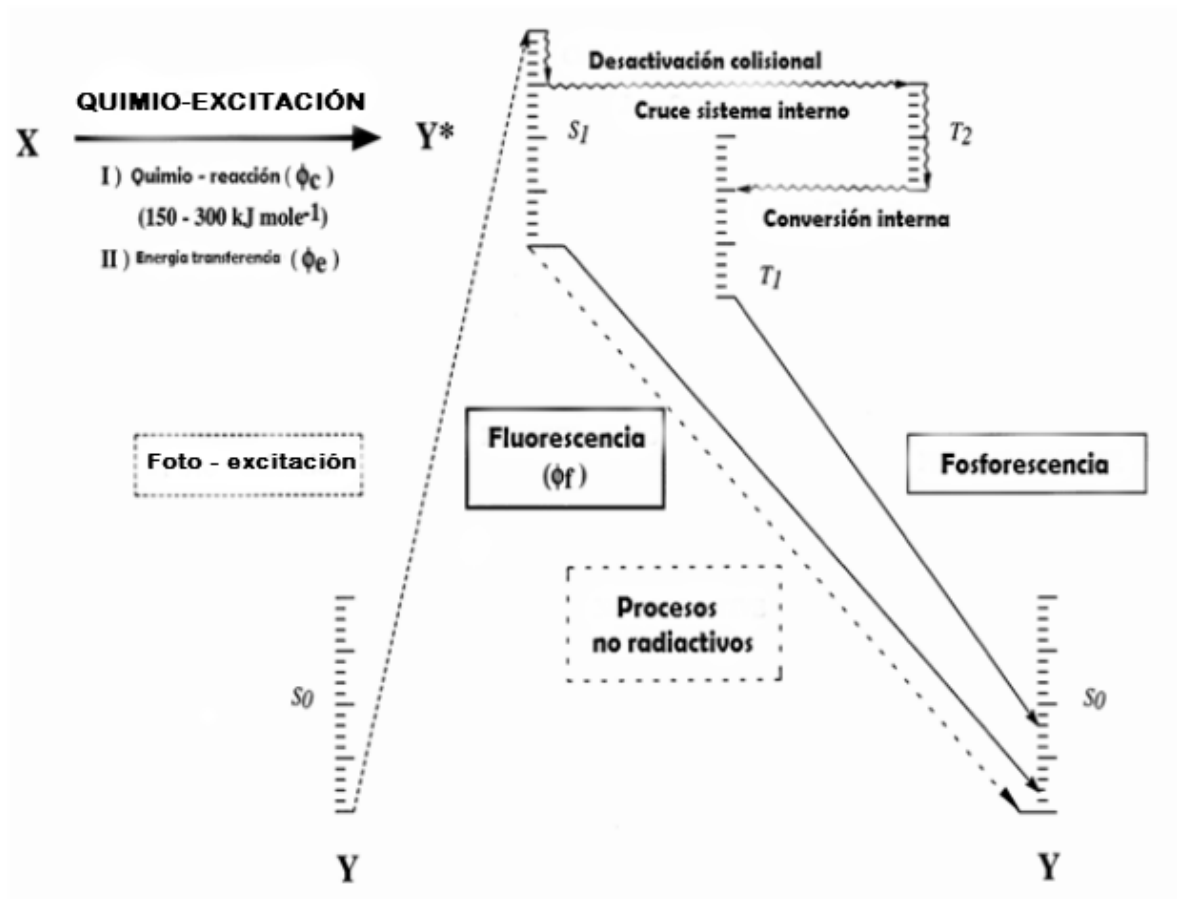


Figura 7. Diagrama de la colocación de la quimioluminiscencia en los procesos fotofísicos más típicos (Modificado de Dodeigne y col., 2000).

Distintos tipos de animales luminosos se han conocido desde la antigua civilización griega, pero la quimioluminiscencia “artificial” fue descrita por primera vez en 1877 por Radziszewski quien observó la emisión de luz amarilla cuando el oxígeno se burbujea en una solución etanólica alcalina de 2,4,5-trifenilimidazol (lofina). Cincuenta años más tarde, en 1928, Albrecht informó de las propiedades luminiscentes de 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona (luminol). Los beneficios de los métodos quimioluminiscentes incluyen los límites de detección ultra-sensibles (attomol-zeptomol), ensayos rápidos, y una amplia gama de aplicaciones analíticas.

1.5.1 Quimioluminiscencia en la detección para Western Blot

Los métodos enzimáticos de detección, tales como quimioluminiscencia y quimiofluorescencia requieren la adición de un reactivo que emita luz cuando reaccione con una enzima conjugada a un anticuerpo secundario. Por otra parte, éstos métodos enzimáticos, basados en la fluorescencia de detección, no requieren reactivos adicionales después de la unión del anticuerpo secundario marcado.

Desde principios de 1990, se han desarrollado continuamente sistemas de detección de quimioluminiscencia que ahora están entre los más ampliamente utilizados para aplicaciones de Western Blot. Hoy en día, diferentes reactivos de detección de quimioluminiscencia están disponibles, con la mejor opción en función del objetivo del experimento.

El sistema más comúnmente utilizado es la detección enzimática de quimioluminiscencia, basado en anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés Horseradish peroxidase) que catalizan la oxidación del luminol en presencia de peróxido, resultando en la emisión de luz. HRP tiene varias ventajas sobre otras enzimas tales como la fosfatasa alcalina (AP) (Cuadro 2), siendo que estas dos son de las más utilizadas hoy en día. HRP puede ser fácilmente conjugada a anticuerpos o estreptavidina (que se une con una afinidad extraordinariamente alta a la biotina, un conjugado de uso común) y se puede utilizar con diferentes reactivos quimioluminiscentes. Se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar HRP basados en reactivos de detección para obtener una mayor sensibilidad de detección, la intensidad de luz más fuerte y señales de larga duración.

Cuadro 2. Características del uso clave de AP y HRP como anticuerpos secundarios conjugados.

Propiedades	AP	HRP
Tamaño	$M_r = 140,000$	$M_r = 40,000$
Precio	Alto	Bajo
Estabilidad	Inestable debajo 0°C	Estable debajo 0°C
No. Sustratos	Pocos	Muchos
Cinética	Lento	Rápido
pH Optimo	8 a 10	5 a 7

1.6 Principios de detección por ECL

Uno de los sistemas utilizados para la detección por ECL, más claramente entendidos es el anticuerpo secundario conjugado con HRP/peróxido de hidrógeno, el cual se une a un anticuerpo primario, específicamente unido a la proteína diana en la membrana. Después de la adición de un reactivo de detección de peróxido de luminol, la enzima HRP cataliza la oxidación del luminol en condición acida a neutra, mediante una reacción de múltiples pasos. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol está en un estado excitado, que después se descompone a su estado basal a través de la emisión de luz en una vía de baja intensidad a 428 nm, que puede ser detectado, mediante una corta exposición a una película autoradiográfica sensible a la luz azul, por ejemplo Hyperfilm ECL. Un aumento de quimioluminiscencia (Whitehead y col., 1979) se consigue mediante la realización de la oxidación del luminol por el HRP en presencia de potenciadores químicos tales como fenoles. Esto tiene como efecto el aumento de la producción de luz emitida de aproximadamente 1000 veces y se extiende el tiempo de emisión de luz, lo que es más fácil de detectar, y por lo tanto el aumento de la sensibilidad de la reacción en un proceso conocido como aumento de quimioluminiscencia (ECL por sus siglas en inglés Enhanced chemiluminescence).

Se pueden utilizar varios potenciadores, pero los más efectivos son fenoles modificados, especialmente *p*-yodofenol, que aumenta la velocidad de rotación de HRP y ayuda en la transferencia de radicales de oxígeno al luminol. La intensidad de la señal es el resultado de la serie de reacciones de moléculas de la enzima y por lo tanto es proporcional a la cantidad de anticuerpo, que está relacionada a su vez con la cantidad de proteína en la mancha (Figura 8). La luz producida por este potenciador de reacciones quimioluminiscentes tiene picos después de 5-20 minutos y se desintegra lentamente a partir de entonces con una vida media de aproximadamente 60 minutos.

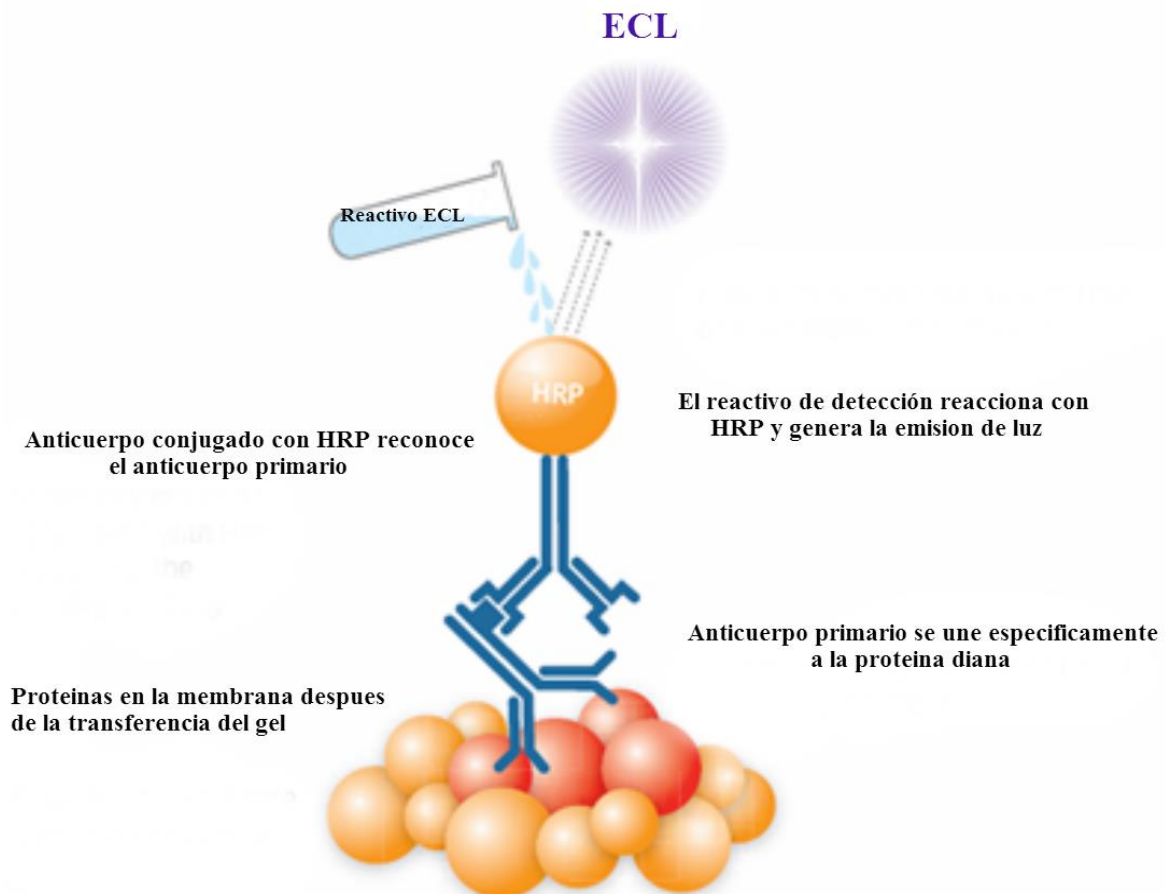


Figura 8. Principio de detección quimioluminiscente en Western Blot (Modificado de General Electric Company, 2011).

1.7 Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona)

La luminiscencia se define como la emisión de luz resultante de la disipación de energía a partir de una sustancia en un estado excitado. En quimioluminiscencia, la excitación se efectúa mediante una reacción química.

Los derivados del luminol reaccionan siguiendo un esquema de reacción que se muestra simplificado en la figura 9. El intermediario α -hidroxiperoxido obtenido por la oxidación del anillo heterocíclico es importante para la emisión de luz resultante. El patrón de descomposición de este compuesto intermediario que conduce al estado excitado y la emisión de luz es único y depende sólo del pH del sistema. En contraste, el primer paso es fuertemente dependiente de la composición del medio (Merényi y col., 1990).

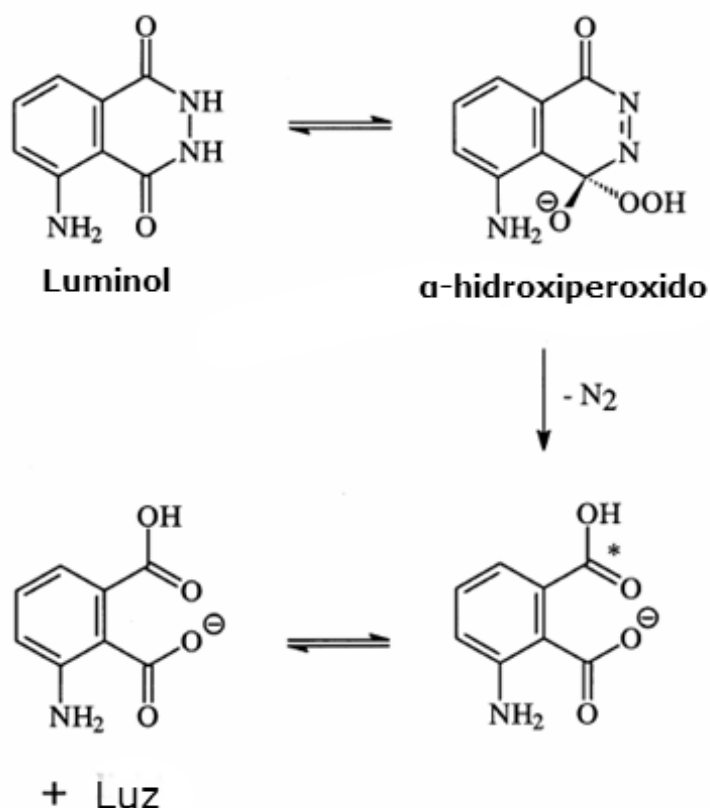


Figura 9. Mecanismo simplificado de la reacción del luminol (Modificado de Merényi y col., 1990).

En medio aprótico (dimetil sulfóxido o dimetil formamida), sólo se requiere el oxígeno y una base fuerte para la quimioluminiscencia (Schroeder y Yeager, 1978). En disolventes próticos (agua, mezclas disolvente-agua y alcoholes), diversos derivados de oxígeno (oxígeno molecular, peróxidos, anión superóxido) pueden oxidar derivados de luminol pero la catálisis ya sea por enzimas o por catalizadores minerales es requerida (Roswell y White, 1978). Desde el comienzo, se han propuesto muchos catalizadores (Rongen y col., 1994; Schroeder y Yeager, 1978), entre ellos enzimas como microperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de rábano picante, catalasa, xantina oxidasa (Radi y col., 1990). Recientemente, la peroxidasa bacteriana de *Arthromyces ramosus* ha sido propuesta debido a que se caracteriza por una alta rotación, además que incrementa cien veces la sensibilidad (Kim y col., 1991).

Medios que contienen carbonato y bicarbonato son más eficaces para la detección de concentraciones bajas de peroxidasa (Semenkova y col., 1991). La peroxidasa de rábano picante es potenciada por varios fenoles concretamente derivados del 6-hidroxi-benzotiazol también llamados "luciferinas sintéticas" o fenoles *para*-sustituidos (por ejemplo, *p*-yodofenol, ácido *p*-hidroxicinámico, *p*-fenilfenol, *p*-hidroxibifenilo) (Thorpe y Kricka, 1986; Thorpe y col., 1985). Recientemente, una nueva clase de potenciadores se ha propuesto: ácido 4-fenilbórico que es más eficaz con la isoenzima básica de peroxidasa de rábano (tipo VI A) (Kricka y Ji, 1995). Se ha observado que este último potenciador ha encontrado sinergismo con el *p*-yodofenol (Kricka y Ji, 1996).

1.7.1 Aplicaciones del luminol

El luminol, isoluminol y sus análogos se han aplicado en un campo muy amplio, incluyendo inmunoensayos o no inmunoensayos de diagnóstico y técnicas de seguimiento, así como biosensores.

En el laboratorio clínico de rutina, se utiliza hoy en día para ensayos con sondas de inmunoensayo y DNA, en forma de un marcador quimioluminiscente o como una

reacción de detección quimioluminiscente por un marcador enzimático. En investigación, las técnicas de detección quimioluminiscente se utilizan para medir las enzimas expresadas por genes reporteros, luminiscencia celular, de transferencia de proteínas (Western blotting) y ácidos nucleicos (Northern Southern).

El análisis de proteínas Western blot (Khan y col., 2003), transferencia de Southern de DNA y transferencia de Northern de RNA, se consideran técnicas importantes en la investigación quimioluminiscente. Se han desarrollado ensayos de punto final para cada uno de estos tipos de ensayo. Estos incluyen reactivos potenciadores como por ejemplo: luminol y acridan, para los conjugados de peroxidasa y 1,2-dioxetanos, así como reactivos acridan para los conjugados de fosfatasa alcalina. Una clase prometedora de compuestos se basa en el núcleo piridopiridazina (Ji y col., 1996). Estos compuestos proporcionan una emisión de luz más intensa en comparación con el luminol, aunque la emisión de luz de fondo se incrementa también.

1.8 Estandarización

Estandarizar un método analítico consiste en verificar y documentar que éste nos conduzca, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. La estandarización de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en la gran área del aseguramiento de la calidad, permite conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria, a la vez que confieren un grado elevado de comparación entre los resultados de los análisis químicos.

La estandarización de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados arrojados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la estandarización de un método, lo que se busca es poder determinar con fundamentos estadísticos que el método es adecuado para los fines previstos.

Desde hace varios años, los estudios de estandarización de métodos, directrices y procedimientos se han centrado principalmente en métodos cuantitativos de análisis. Como resultado, ha crecido una gran bibliografía, la cual define los parámetros de rendimiento, discute procedimientos y describe los estudios teóricos.

En relación a los parámetros de estandarización, éstos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método, como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Parámetros de determinación según el tipo de método a estandarizar.

PARÁMETRO A EVALUAR	CARACTERÍSTICA(S)	MÉTODO CUALITATIVO	MÉTODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
Selectividad	Identificación del analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
Linealidad	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
Limites	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
Precisión	Repetibilidad	No	Sí	Sí	Sí
Exactitud	Porcentaje de recuperación	No	Si	Si	Si
Veracidad	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
Robustez	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
Aplicabilidad	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

1.8.1 Selectividad

La selectividad es el grado en que un método puede cuantificar al analito en presencia de interferentes. Estos interferentes normalmente o frecuentemente se encuentran en la matriz de interés. La prueba de selectividad puede diseñarse de acuerdo al método.

Una prueba de selectividad comúnmente utilizada, consiste en analizar un mínimo de tres testigos reactivos, tres blancos de matriz y tres muestras o estándares de concentración conocida del analito de interés.

Se deben comparar las lecturas (señales de medición) obtenidas para cada caso, y observar si existen variaciones entre los blancos de matrices y estándares o muestras con analito. Si se encuentran diferencias significativas, éstas deberán ser identificadas y en lo posible eliminadas.

1.8.2 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra analizada.

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración (eje de las abscisas) frente a la respuesta (eje de las ordenadas), que se conoce como función respuesta (normalmente llamada recta de calibrado). Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido, se recomienda abarcar valores desde cercanos al cero hasta valores superiores al de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 5 valores).

Luego de realizar el gráfico, se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal (Figura 10 A). Después de establecer el comportamiento lineal del método, se deberá realizar la curva de trabajo o curva de calibración (Figura 10 B) y graficar los datos de concentración de los estándares de calibración (X) y la lectura observada (Y).

Se evalúan los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el punto de corte con el eje de las Y (L_0). Se calcula la ecuación de la regresión lineal con la siguiente fórmula: $Y = mX + L_0$

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación.

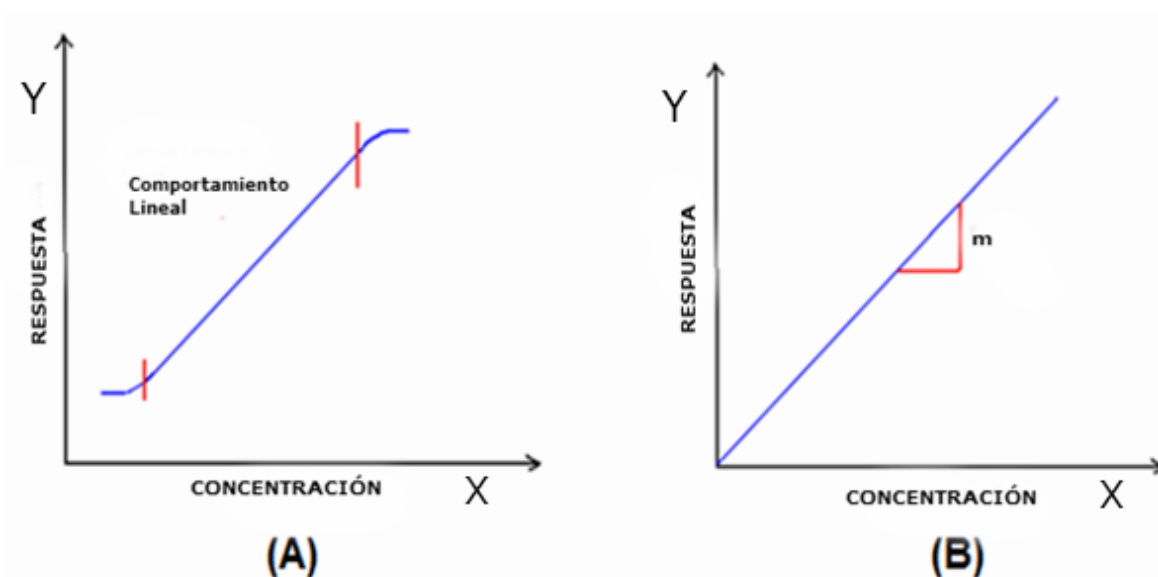


Figura 10. (A) Comportamiento de la curva; (B) Curva de calibración.

1.8.3 Sensibilidad

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición.

En una regresión lineal, la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. Ésta se calcula de la siguiente manera: $m = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i / n)}{\sum X_i^2 - ((\sum X_i)^2 / n)}$

Donde n es igual a número de datos analizados.

El valor de sensibilidad obtenido (m) deberá permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura.

1.8.4 Límites

Para la evaluación de los límites, se deben tener en consideración los siguientes parámetros: Valor crítico (LC), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

Valor crítico (LC): Es el valor de la concentración o cantidad neta que en caso de superarse dará lugar, para una probabilidad de error dada α , a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior al contenido en el material testigo.

$$LC = t (1-\alpha; \nu) (S_0)$$

Dónde:

t = t de Student

$1-\alpha$ = probabilidad b

ν = Grados de libertad

S_0 = Desviación estándar de las lecturas del blanco matriz o testigo reactivo.

Buscar t de Student teórico en tabla, para grados de libertad (ν) y el porcentaje de seguridad deseada ($1-\alpha$) para un error α . Usualmente se trabaja con un valor de 0.05.

Límite de detección (LOD): Es la concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad ($1-\beta$), a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en material testigo.

$$LOD = 2t (1-\alpha; \nu) (S_0)$$

Límite de cuantificación (LOQ): Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) generalmente de 6% o 10%. El LOQ se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$LOQ = 10S_0$$

Para todas las determinaciones de los límites, se recomienda para su cálculo, por lo menos seis mediciones de blanco matriz o testigo reactivo.

1.8.5 Precisión

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados.

- Repetibilidad: Se tiene precisión bajo las condiciones de repetibilidad, cuando los resultados de los análisis del método se obtienen idénticos al análisis en condiciones diferentes, ya sea por condiciones de laboratorio, operadores, uso de distintos equipos, reactivos, entre otros.

Para determinar la precisión de la repetibilidad intralaboratorio (R_i) (es decir, la precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un material de referencia, una vez por cada semana o el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos.

También se puede determinar registrando al menos 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando al menos una condición analítica (ejemplo: operador, aparato, reactivos y largo intervalo de tiempo) de un analito en un material de referencia. Calcular la desviación estándar (S_{R_i}) y el porcentaje de coeficiente de variación ($CV_{R_i}\%$).

1.8.6 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método (valor experimental), y el valor verdadero.

En la estandarización de una sustancia, la exactitud puede ser determinada mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar de referencia) o por comparación de los resultados del método con los resultados de un segundo método bien caracterizado cuya exactitud se haya comprobado o definido.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

Los documentos de la ICH (por sus siglas en inglés, International Conference Harmonization) recomiendan que la exactitud sea evaluada utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado. También se puede trabajar utilizando un mínimo de tres concentraciones de soluciones estándar que cubran el rango de trabajo y se evalúa el porcentaje de recuperación obtenido utilizando el método a evaluar. Se preparan muestras independientes por triplicado a cada nivel de concentración. Para llevar a cabo el cálculo del porcentaje de recuperación, se requiere contar con los datos de la cantidad de principio activo agregado a cada muestra.

2. HIPÓTESIS

El sustrato-ECL no comercial tendrá estadísticamente la misma efectividad que el sustrato-ECL comercial en el análisis de la expresión de receptores 5-HT_{5A} y de melatonina en linfocitos.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Estandarizar el sustrato-ECL no comercial en análisis por Western Blot.

3.2 Específicos

- Preparar el sustrato-ECL no comercial con base de Luminol.
- Determinar la efectividad del sustrato-ECL no comercial comparado con el sustrato-ECL comercial en su utilización en análisis por Western Blot.
- Determinar la expresión del receptor 5-HT_{5A} en linfocitos por Western Blot.
- Determinar la expresión del receptor de melatonina en linfocitos por Western Blot.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

Se utilizaron muestras de sangre periférica de pacientes sanos. Las muestras se procesaron con la técnica Ficoll-Diatrizoato para la extracción de linfocitos. Las muestras de linfocitos se separaron en alícuotas de 500 μ l y se almacenaron en tubos Eppendorf a 4°C hasta su utilización.

4.1.2 Materiales y equipos

Guantes de Látex

Vacutainer con aguja

Ligadura

Tubos con EDTA

Tubos ensaye 15x100

Gradilla

Tubos Eppendorf 1.5 mL

Tubos Falcon 15 mL

Tubos Falcon 50 mL

Agitador magnético

Termómetro

Agitador Vortex

Micropipetas 10, 20, 200 y 1000 μ L

Puntas para micropipeta

Plato Caliente

Membranas

Equipo para SDS-PAGE Bio-Rad

Equipo para electrotransferencia Bio-Rad

Placas fotográficas para revelado

Densitómetro Bio-Rad

Hypercassette para revelado

4.1.3 Reactivos

Ficoll 400

PBS 1X

PBT 0.5

Cloruro de sodio

Fosfato monopotásico

Fosfato disódico

Tween 20

Luminol (5-amino-2, 3-dihidro-1,4-ftalazinediona)

Peróxidasa de rábano picante

Tris (hidroximetil) aminometano (Tris)

Ácido *p*-cumarico

Ácido Clorhídrico (1M y 5M)

Kit ECL Marca General Electric

Anticuerpo primario Actina hecho en cabra

Anticuerpo primario 5-HT_{5A} hecho en conejo

Anticuerpo primario Melatonina hecho en conejo

Anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra conjugado con HRP

Anticuerpo secundario anti-cabra hecho en conejo conjugado con HRP

β-mercaptoetanol

Poliacrilamida

Dodecilsulfato sódico (SDS)

Metanol

Revelador

Fijador

Leche descremada para bloqueo Bio-Rad

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de proteínas

Una vez que se obtuvieron las muestras de linfocitos, éstas se pesaron y se les agregaron 5mL de amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl pH 9.0-9.5) por cada gramo de tejido.

El tejido se homogenizó en un politrón durante 30 segundos en posición '1'. Se adicionaron los inhibidores de proteasas. La extracción se completó durante una hora a 4 °C, con agitación magnética (en un recipiente de hielo). Concluida la hora, se centrifugó durante 15 minutos a 10,000 rpm con una microcentrifuga.

4.2.2 Cuantificación de proteínas

Después de obtener los homogenizados de linfocitos, se realizó una cuantificación de proteína total contenida en cada una de las muestras, utilizando el ensayo para proteínas Bio-Rad basado en el método de Bradford.

Se prepararon 5 diluciones por triplicado de una proteína estándar (BSA – 0.1 µg/mL) a partir de la cual se elaboró la curva de calibración; las diluciones que se elaboraron, se muestran en el Cuadro 4. El rango lineal para BSA es de 1.2 a 10 µg/mL. El colorante que se empleó fue una solución ácida de azul brillante de Coomassie.

Se cuantificaron las proteínas de las muestras, midiendo 800 µL de cada muestra y se agregaron 200 µL de colorante a cada una. La cuantificación se realizó en ensayos por triplicado y la muestra se diluyó 1:10. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y su absorbancia fue leída a 595 nm.

Con las absorbancias obtenidas y haciendo uso de la curva de calibración que se elaboró, se obtuvieron las concentraciones de las proteínas de las muestras.

Cuadro 4. Diluciones para la preparación de la curva de calibración.

TUBOS	BSA ($\mu\text{g/mL}$)	Estándar (0.1 mg/mL)	BSA	H ₂ O (μL)	Reactivo de Bradford Bio-Rad (μL)
Blanco	0	0		800	200
1	2.5	25		775	200
1	2.5	25		775	200
2	5	50		750	200
2	5	50		750	200
3	10	100		700	200
3	10	100		700	200
4	20	200		600	200
4	20	200		600	200

4.2.3 Preparación del sustrato-ECL no comercial

Se llevó a cabo la preparación del sustrato-ECL no comercial, con la mezcla 1:1 de las soluciones que se elaboraron: Solución A (Luminol, Tris-HCl 1 M pH 8.5, ácido *p*-cumarico) y Solución B (Peróxido de Hidrogeno 30%, Tris-HCl 1 M pH 8.5).

4.2.4 Western Blot

4.2.4.1 SDS-PAGE

Se llevó a cabo la separación de proteínas de concentraciones conocidas de las muestras, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se calculó el volumen necesario para tener 50 μg de proteína en cada pozo; este volumen se completó con el amortiguador de la muestra para tener 15 μL en los pozos. Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos.

Se trabajó con geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras. Se utilizaron peines de 15 pozos en los cuales se colocaron las muestras (15 μ L) y los marcadores de peso molecular (10 μ L) dispuestos en los pozos de cada extremo. Las muestras se corrieron con un voltaje constante de 100 V los primeros 20 minutos y 150 V durante el tiempo necesario para que la muestra llegara hasta el final del gel.

4.2.4.2 Electrotransferencia de proteínas

Una vez que fueron separadas las macromoléculas en función de su diferente peso molecular, se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. Se les aplicó un campo eléctrico de 200 mA durante una hora; de esta manera las proteínas migraron fuera del gel de poliacrilamida hasta la superficie de la membrana donde se quedaron fuertemente adheridas, así de esta manera el patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida no cambió al ser transferido hacia la membrana.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1X para retirar los restos de poliacrilamida y después se bloqueó la membrana para evitar la unión inespecífica a la superficie de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés. La membrana se dejó durante una hora en leche (Bio-Rad) preparada al 3% en PBT 0.5. Después de bloquear la membrana se realizaron otros tres lavados en PBS 1X.

Se prosiguió, incubando toda la noche con el anticuerpo primario hecho en conejo diluido 1:500 en leche al 1% en PBT 0.5, éste en el caso de la determinación del 5-HT_{5A}; se incubó con el anticuerpo primario hecho en conejo para el caso del receptor de melatonina. Transcurrido ese tiempo, se hicieron tres lavados en PBS 1X, para posteriormente dejar incubando la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo para ambos receptores 5-HT_{5A} y melatonina durante dos horas. Enseguida se realizaron tres lavados más en PBS 1X para proceder al ensayo con quimioluminiscencia. Las determinaciones del receptor de serotonina y los de melatonina se realizaron en western blot de forma separada.

4.2.4.3 Ensayo con quimioluminiscencia

El ensayo con quimioluminiscencia (ECL) se realizó en un cuarto totalmente oscuro. Se prepararon las siguientes diluciones: fijador 35 mL en 160 mL H₂O destilada y 35 mL revelador en 160 mL de H₂O destilada.

Se midieron volúmenes iguales (8 mL de c/u) de las soluciones 1 y 2 del kit para ECL, se mezclaron y las membranas se sumergieron durante 1 minuto en dicha mezcla; se realizó la misma mezcla de volúmenes (8 mL de c/u) de las soluciones A y B para el sustrato-ECL no comercial. Éstos se evaluaron por separado. Se utilizaron placas de revelado KODAK BIOMAX y la lámpara KODAK ADJUSTABLE SAFELIGHT MODEL B.

Se presionó la membrana de nitrocelulosa contra la placa de revelado en el HYPERCASSETTE durante dos minutos. Luego, se tomó la placa con pinzas y se sumergió en el revelador, después en el fijador y por último se enjuago con agua destilada; se sumergió un minuto en cada solución. Después del enjuague, se obtuvieron como resultados las placas con patrones de bandeo. Estas bandas fueron evaluadas por medio de un análisis densitométrico con el software Quantity One de Bio-Rad.

4.2.4.4 Estandarización del sustrato-ECL no comercial en análisis Western Blot

Para la estandarización del sustrato-ECL no comercial, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$, en el programa estadístico Minitab 16, comparándolo con los resultados de las muestras evaluadas con el sustrato-ECL comercial; esto se hizo en dos receptores diferentes (5-HT_{5A} y melatonina).

5. RESULTADOS

5.1 Curva de Calibración

Se realizó una curva de calibración con BSA (Figura 11) para calcular la concentración proteica de las extracciones de linfocitos.

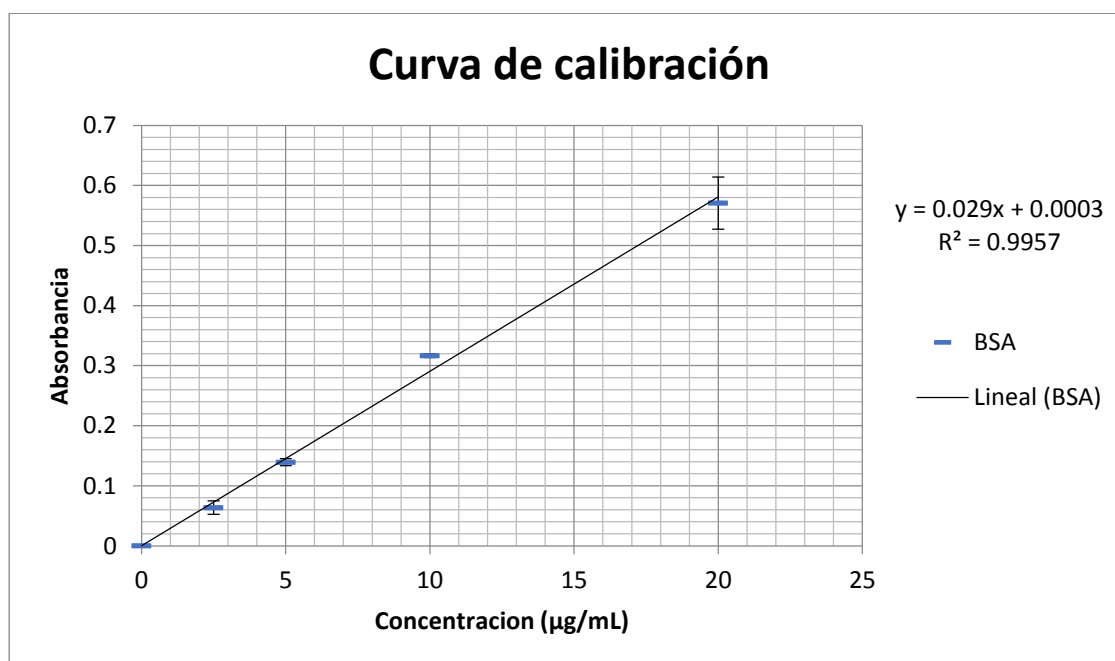


Figura 11. Curva de calibración. Utilizando BSA como patrón de referencia.

5.2 Cuantificación de proteínas

Se realizó el cálculo de la concentración proteica de las extracciones de linfocitos, con la curva de calibración realizada; los resultados se expresaron en µg de proteína total por µL de muestra (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración proteica de las muestras de linfocitos.

Muestra	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
MS1	3.65 ± 0.07
MS2	3.66 ± 0.04
MS3	2.97 ± 0.12
MS4	0.83 ± 0.06
MS5	3.66 ± 0.11

5.3 Western Blot

El análisis de la expresión de los receptores de serotonina 5-HT_{5A} y de melatonina, se obtuvieron mediante la técnica de western blot revelado con el sustrato-ECL no comercial mostrado en la figura 12; además se muestran los resultados revelados mediante 3,3-diaminobencidina en la figura 13, esto se realizó como técnica confirmatoria de la expresión de los receptores. Se muestran las bandas representativas de 6 experimentos, donde 3 experimentos corresponden al revelado del receptor de serotonina 5-HT_{5A} y 3 corresponden al receptor de melatonina.

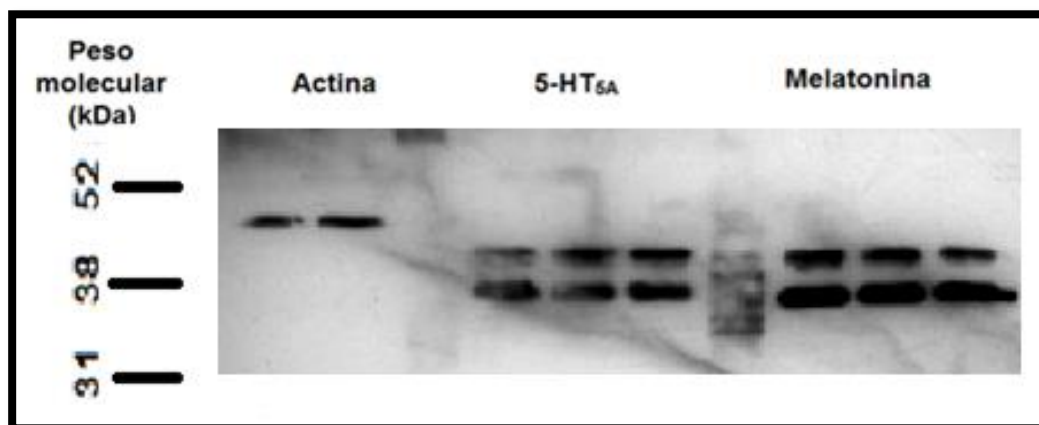


Figura 12. Fotografía del Western Blot de los receptores de serotonina 5-HT_{5A} y de melatonina, revelados con sustrato-ECL no comercial. Abreviaciones: kDa, KiloDalton.

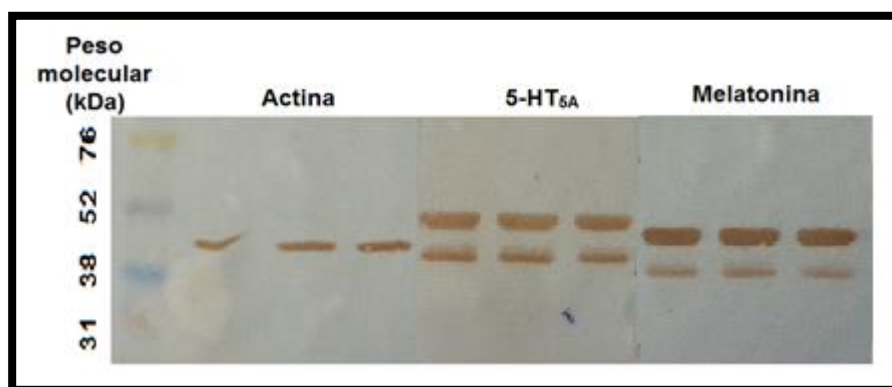


Figura 13. Western blot de los receptores de serotonina 5-HT_{5A} y de melatonina, revelados con 3,3-diaminobencidina. Abreviaciones: kDa, KiloDalton

5.4 Estandarización de sustrato-ECL no comercial

Se realizó un análisis de costos comparativo del sustrato-ECL no comercial con el sustrato-ECL no comercial (Cuadro 6), para determinar si era rentable su utilización comparada con el precio del sustrato-ECL comercial, del cual se compararon 3 marcas registradas, se tomaron en cuenta los costos de agosto 2013.

Cuadro 6. Análisis de costos comparativo del sustrato-ECL no comercial con sustratos ECL comerciales.

Sustrato-ECL	Componente/Marca	Costo	Volumen Total	Volumen por revelado	Revelados Totales	Costo por revelado
No comercial	Luminol	\$567	2.5 g	20 mL***	563**	\$1.01
	acido <i>p</i> -cumarico	\$235	1 g			\$0.17
	H ₂ O ₂ al 30%	\$557	500 mL			\$0.01
	Tris-HCl	\$812	500 g			\$0.51
	DMSO	\$959	100 mL			\$1.44
	TOTAL		\$3,130			
Comercial	General Electric	\$5,237	500 mL	20 mL*	250*	\$20.95
	Thermo Scientific	\$2,465	250 mL	20 mL*	125*	\$19.72
	Promega	\$2,652	250 mL	20 mL*	125*	\$21.22

*Las especificaciones del sustrato-ECL comercial indican que por cada 20 mL de sustrato para revelar, se pueden revelarse un máximo de 10 placas; por ello el cálculo de revelados totales.

**El sustrato-ECL no comercial revela una placa por cada 20 mL de preparación.

***El volumen total de sustrato-ECL no comercial es llevado a 20mL con H₂O destilada.

Se realizó el revelado de los experimentos de la expresión de los receptores 5-HT_{5A} y de melatonina, manteniendo los mismo tiempos de exposición de la membrana en el sustrato-ECL no comercial y con el sustrato-ECL comercial, el cual fue de 2 minutos; se determinó el mismo tiempo de incubación en el HYPERCASSETTE; obteniendo un bandeo similar en ambos casos, ligeramente más marcado en el caso del sustrato-ECL comercial; sin embargo el ruido de fondo generado por el sustrato-ECL no comercial es menor en comparación al comercial; lo cual nos permite diferenciar de mejor forma las bandas de las proteínas (Figura 14).

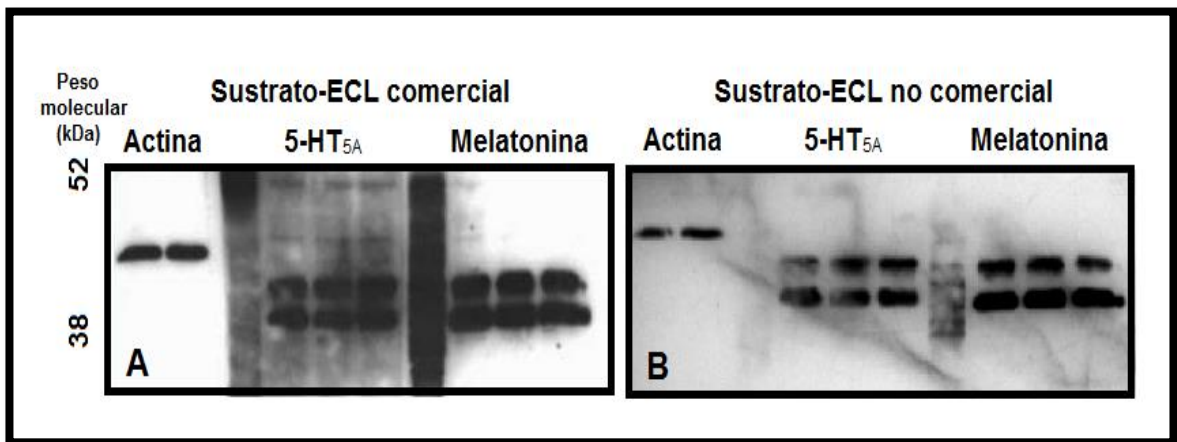


Figura 14. Comparación de sustratos-ECL. (A) Sustrato-ECL comercial. (B) Sustrato-ECL no comercial. Abreviaciones: kDa, KiloDalton.

Para realizar las densitometrías (Figura 15) se utilizó el programa Quantity-One de Bio-Rad y el análisis estadístico (Cuadro 7) se elaboró con el programa Origin 8.5.1. Para el cálculo de las UADO (Unidades Arbitrarias de Densidad Optica) se normalizó usando como referencia el nivel mínimo de expresión en cada uno de los análisis diferentes.

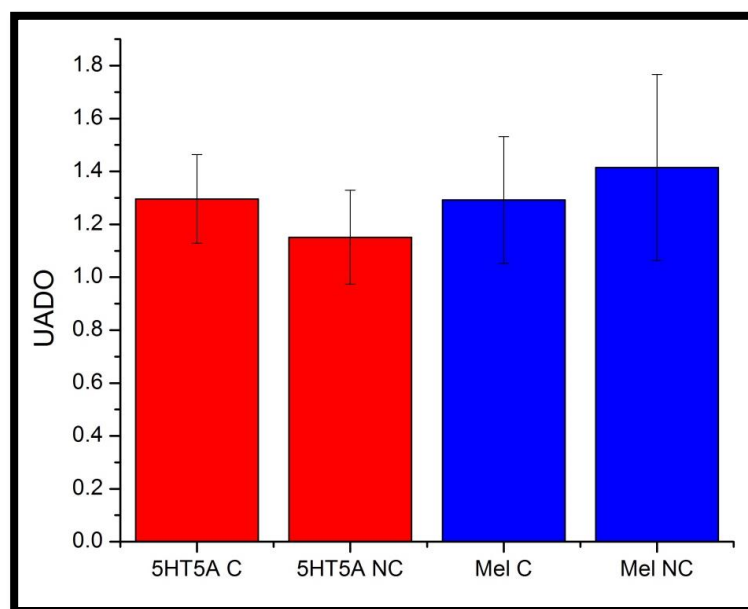


Figura 15. Densitometría de la expresión de los receptores 5-HT_{5A} y de melatonina en linfocitos humanos. Abreviaciones: C, Sustrato-ECL comercial; NC, sustrato-ECL no comercial; UADO, unidades arbitrarias de densidad óptica; las barras de error indican la desviación estándar.

Se realizó la comparación de los sustratos-ECL, al tener un tratamiento de los receptores diferentes, las comparaciones se hicieron de manera independiente; es decir, una comparación en el análisis del receptor 5-HT_{5A} y otra comparación en el análisis del receptor de melatonina. Teniendo como resultado que la diferencia entre el sustrato-ECL comercial y el sustrato-ECL no comercial en el análisis de receptor 5-HT_{5A} es de 12%; y en el del receptor de melatonina es de 9%, lo cual muestra que estadísticamente no existe diferencia significativa en la utilización de los sustratos-ECL.

Cuadro 7. Resultados de la prueba de Tukey.

C/NC	DP	EEP	Valor de q	Probabilidad	Alfa	Sig.	LIC	LSC
5-HT _{5A}	0.1447	0.1727	3.16	0.094	0.05	0	-0.3171	0.0278
MT	-0.1224	0.3011	0.74	0.401	0.05	0	-0.1784	0.4233

Sig. Igual a 0 indica que la diferencia de promedios no es significativa en alfa de 0.05. Abreviaciones: C, comercial; NC, no comercial; MT, melatonina; DP, diferencia de promedios; EEP, error estándar del promedio; Sig. Diferencia significativa; LIC, límite inferior de control; LSC, límite superior de control.

6. DISCUSIONES

Mediante la técnica de Western blot se obtuvieron las bandas con un peso molecular entre 38 y 54 kDa, lo cual indica que las bandas presentes son correspondientes a los receptores de serotonina 5-HT_{5A} y de melatonina, debido a que se ha demostrado que en humanos el peso molecular de los receptores son de ≈41kDa para 5-HT_{5A} (Dutton y col., 2008) y de ≈39-40kDa para el receptor de melatonina (Dubocovich y Markowska, 2005).

Se usó como control la curva de calibración realizada mediante Bradford para evaluar la concentración proteica y tener la certeza de que el contenido era el suficiente para llevar a cabo el análisis de Western blot; además se realizó un control con la expresión de actina en los linfocitos, debido a que la variabilidad de actina en linfocitos no es considerable, solo cuando se presentan enfermedades directamente relacionadas como es el caso de la leucemia linfoide crónica, además la expresión de actina en linfocitos constituye una parte importante del contenido total de proteínas (Stark y col., 1982). Por lo que, el empleo de la actina como un control interno o de referencia (que es conocido como genes “housekeeping”) tiene la finalidad de hacer que el análisis de expresión proteica del gen sea más preciso y fiable, ya que, corrige los errores técnicos como las variaciones en la carga proteica o la variación de la eficacia de la transferencia (Ferguson y col., 2005), por tal motivo se utilizó la cuantificación basada en Bradford como control de carga proteica. Sin embargo, ha crecido la evidencia que los “housekeeping” que comúnmente se usan (por citarse unos de ellos: β-actina, β-tubulina e hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) pudieran ser controles inadecuados, ya que en ciertas condiciones fisiológicas se genera una variación en la expresión de las proteínas de referencia (Jonge y col., 2007). En linfocitos, se ha observado que la construcción del citoesqueleto de actina está regulado por IL-3 y Rac1 (Romanova y col., 1999), lo cual esta complementado con la actividad de la cofilina encargada de mejorar la polimerización de la actina mediante el actin-severing, y generar nuevos monómeros de actina a través de la despolimerización

de la F-actina; y la actividad de la F-plastina que estabiliza las estructuras de los filamentos de actina por medio de su actividad actin-bundling (Samstag y col., 2003); por tales motivos nos es segura la eficiente expresión de actina dentro de las muestras de linfocitos, ya que de no existir tal proteína la vida linfoide se vería interrumpida y se hubiese visto reflejada en una nula expresión proteica, principalmente de actina; lo cual hizo fiable la utilización de la actina como un control de expresión proteica de las muestras linfoides y normalización de este trabajo.

La expresión del receptor de serotonina 5-HT_{5A} en las muestras de linfocitos humanos, en los resultados obtenidos en este trabajo, refuerzan lo investigado por Maratzziti y col., 2001, quienes determinaron la expresión de mRNA de serotonina 5-HT_{5A} en pacientes humanos; sin embargo muestra que podrían existir diferencias significativas en la expresión de dicho receptor en linfocitos humanos y en linfocitos de rata, debido a que un análisis realizado por Stefulj y col., 2000, quienes trabajaron con ratas wistar o sprague dawley macho, no encontraron expresión de mRNA de serotonina 5-HT_{5A} en muestras de linfocitos; lo cual pone al descubierto que podrían existir cambios en la expresión del receptor 5-HT_{5A}, mediados por diferentes mecanismos en linfocitos humanos, los cuales no actúan en los linfocitos de rata.

En cuanto a la expresión del receptor de melatonina, se demostró que está presente en linfocitos humanos, teniendo correlación con lo reportado por Carrillo-Vico y col., 2004; quien demostró y sugirió un mecanismo para la síntesis de la melatonina, así como su efecto paracrino, intacrino y autocrino, después de ser sintetizado en linfocitos humanos, el efecto autocrino se ve reflejado en el mismo linfocito, teniendo un efecto sobre los receptores de melatonina MT₁ y MT₂, en los cuales tiene un efecto sobre la expresión de IL-2 (Carrillo-Vico y col., 2005); por otra parte esto nos aporta una idea más clara sobre la expresión de serotonina dentro de los linfocitos, debido a que está implicado en la síntesis de melatonina, como se mostró en el marco de los antecedentes en la figura 4 (Pandi-Perumal y col., 2006), por lo tanto se podría pensar que la síntesis de melatonina esta

mediada por la síntesis interna de serotonina, toda vez que éste es su precursor en la síntesis, aunque esto no se vería limitado ya que la síntesis de melatonina en los linfocitos se podría realizar a partir de la serotonina que es captada por linfocitos de transporte, como lo reportó Lima y Urbina, 2002.

El tener la certeza de la expresión de los receptores 5-HT_{5A} y de melatonina en linfocitos humanos, nos permitió utilizar estos resultados, para la evaluación experimental y estadística sobre la eficiencia del sustrato-ECL no comercial a fin de estandarizarlo en la metodología de Western Blot, teniendo como control el sustrato-ECL comercial, y con ello realizar la comparación, en eficacia para el revelado de las membranas de poliacrilamida y la sensibilidad mostrada por ambos sustratos, así de esta forma determinar si el sustrato-ECL no comercial tendría estadísticamente la misma efectividad que el sustrato-ECL comercial.

Previo al análisis estadístico se realizó un análisis económico para determinar si la utilización del sustrato-ECL no comercial era rentable en cuanto a su costo de producción comparado al sustrato-ECL que comercialmente se utiliza para la realización del análisis de Western Blot; en dicho análisis económico se determinó, que la utilización del sustrato-ECL no comercial es recomendable, debido a que tiene un impacto de ahorro monetario de 80 a 90% frente al precio del sustrato-ECL comercial.

En el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los análisis de los receptores, realizados con el sustrato-ECL comercial y el sustrato-ECL no comercial al tiempo de 2 minutos de exposición en el sustrato y en el cassette de incubación, sin embargo las variables presentadas en el análisis hacen referencia a que los tiempos pueden determinar la efectividad del compuesto, ya que una exposición prolongada puede provocar más ruido de fondo en el análisis o una mejor visualización de las bandas, pero dependerá de la muestra analizada, por que como se observó en los dos análisis, la densidad óptica presentada en los receptores 5HT_{5A} fue independiente de la presentada por el receptor de melatonina. De tal forma que el tiempo de exposición en el sustrato

será fundamental para tener una buena calidad en el revelado de las muestras, tal como lo observo Mruk y Cheng en el 2011, quienes realizaron la comparación de un ECL como alternativa barata ante los kit's comerciales, quien determino que su tiempo ideal era de 90 segundos con muestras de BSA. Quien también demostró que el tiempo es un factor fundamental para la metodología fueron Haan y Bhmann (2007), quienes observaron que en un tiempo prolongado de exposición al sustrato-ECL se tendría una excesiva cantidad de ruido de fondo, por lo cual determinaron un tiempo ideal de 1 a 2 minutos de exposición.

De tal forma que la utilización del sustrato-ECL no comercial es recomendable como alternativa al uso de sustrato-ECL comercial, en el análisis por Western Blot; debido a que estadísticamente son equivalentes, y su costo es más barato.

7. CONCLUSIONES

- Se formuló el sustrato-ECL no comercial para el análisis por Western Blot.
- Es efectiva la utilización del sustrato-ECL no comercial en el análisis por Western Blot comparado con el sustrato-ECL no comercial.
- El receptor 5-HT_{5A} se expresa en linfocitos humanos.
- El receptor de melatonina se expresa en linfocitos humanos.
- Se estandarizó la utilización del sustrato-ECL no comercial para el análisis de receptores 5-HT_{5A} y melatonina en linfocitos humanos en análisis por Western Blot.

8. REFERENCIAS

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded Biology of serotonin. *Annu Rev Med* **2009**;60:355-366.

Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: posible role as intracrin, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* **2004**;18:537-539.

Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. Human Lymphocyte-Synthesized Melatonin Is Involved in the Regulation of the Interleukin-2/Interleukin-2 Receptor System. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**;90(2):992-1000.

Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Review: Chemiluminescence as diagnostic tool. *E Science* **2000**;51:415-439.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT₁ and MT₂ Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* **2005**; 27(2):101-110.

Dutton AC, Massoura AN, Dover TJ, Andrews NA, Barnes NM. Identification and functional significance of *N*-glycosylation of the 5-HT_{5A} receptor. *Neurochemistry International*. **2008**;52:419-425.

Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. Expression of a highaffinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol*. **1994**;16:561-567.

Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: A preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. **2005**;5:566-571.

General Electric Company. Western Blotting: Principles and Methods, Suecia, Octubre 2011. GE: Healthacare Bio-Sciences AB, **2011**.

Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of Immunological Methods*. **2007**;318:11-19.

Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*. **2003**;34:233-241.

Ji X, Kondo K, Aramaki Y, Kricka LJ. Effect of Enhancers on the Pyridopyridazine-Peroxide-HRP Reaction. *J Biolumin Chemilumin*. **1996**;11:1-7.

Jonge HJM, Fehrmann RSN, Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, Vries EGE, Zee AGJ, Meerman GJ, Elst A. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE*. **2007**;9:1-5.

Khan I, Siddique I, Al-Awadi FM, Mohan K, Can J. Role of Na⁺/H⁺ exchanger isoform-1 in human inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol*. **2003**;17:31-36.

Kim BB, Pisarev VV, Egorov AM. A comparative study of peroxidases from radish and *Arthromyces ramosus* as labels in luminol-mediated chemiluminescent assays. *Anal Biochem*. **1991**;199(1):1-6.

Kricka LJ, Ji X. 4-phenylboronic acid: A new type of enhancer for the horseradish peroxidase catalyzed chemiluminescent oxidation of luminol. *J Biolumin Chemilumin*. **1995**;10:49-54.

Kricka LJ, Ji X. Super Enzyme Immunoassay for Thyroid Stimulating Hormone Using a New Synergistic Enhanced Chemiluminescent Endpoint. *J Biolumin Chemilum*. **1996**;11:137-147.

Kvetnoy IM. Extrapineal Melatonin: Location and Role within Diffuse Neuroendocrine System. *Histochem J*. **1999**;31:1-12.

Marazziti D, Ori M, Nardini M, Rossi A, Nardi I, Cassano GB. mRNA expression of serotonin receptors of type 2C and 5^a in human resting lymphocytes. *Neuropsychobiology*. **2001**;43:123-126.

Mauriz JL, Molpeceres V, García-Mediavilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J. Pineal Res.* **2007**;42:222-230.

Merényi G, Lind J, Eriksen TE. Luminol chemiluminescence: chemistry, excitation, emitter. *J Biolumin Chemilumin.* **1990**;5:53-56.

Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun.* **1998**;12:249-271.

Mruk DD, Cheng CY. Enhanced Chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis.* **2011**;1(2):121-122.

Nichols D, Nichols C. Serotonin receptors. *Chemical Reviews.* **2008**;108:1614-1641.

Lima L, Urbina M. Serotonin transporter modulation in blood lymphocytes from patients with major depression. *Cell Mol Neurobiol.* **2002**;22:797-804.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Review: Melatonin: Nature's most versatile biological signal. *The FEBS Journal.* **2006**;273:2813-2838.

Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felsoci M. Review: Serotonin receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiol Res.* **2011**;60:15-25.

Radi R, Rubbo H, Thomson L, Prodanov E. Luminol chemiluminescence using xanthine and hypoxanthine as xanthine oxidase substrates. *Free Radical Bio Med.* **1990**;8:121-126.

Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1979**;76(7):3116-3120.

Resler G, Lavie R, Campos J, Mata S, Urbina M, Garcia A, Aptiz R, Lima L. Effect of folic acid combined with fluoxetine in patients with major depression on plasma homocysteine and vitamin B12 and serotonin levels in lymphocytes. *Neuroimmunomodulation*. **2008**;15:145-152.

Romanova LY, Alexandrov IA, Blagoskloony MV, Nordan RP, Garfield S, ACS P, Nguyen P, Trepel J, Blumberg PM, Mushinski JF. Regulation of actin cytoskeleton in lymphocytes: PKC- δ Disrupts IL-3-Induced membrane ruffles downstream of Rac1. *Journal of Cellular Physiology*. **1999**;179:157-169.

Rongen HA, Hoetelmans RM, Bult A, van Bennekom WP. Chemiluminescence and immunoassays. *J Pharm Biomed Anal*. **1994**;4:433-462.

Rosa DP, Bona S, Simonetto D, Zettler C, Marroni CA, Marroni NP. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats. *Arq Gastroenterol*. **2010**;47(1):72-78.

Roswell DF, White EH. The chemiluminescence of luminol and related hidrazides. *J Biolumin Chemilum* **1978**;57:409.

Roth BL. The serotonin receptors: From molecular pharmacology to human therapeutics. 2a Edición. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. **2006**.

Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*. **2003**;73:30-48.

Schroeder HR, Yeager FM. Chemiluminescence Yields and Detection Limits of Some Isoluminol Derivatives in Various Oxidation Systems. *Anal Chem*. **1978**;50:1114.

Semenkova GN, Novikova TM, Cherenkevich SN, Drapeza AI. Chemiluminescence in the peroxidase oxidation of luminol with hydrogen peroxide in various media. *Lab Delo*. **1991**;11:13-15.

Stark R, Liebes LF, Nevrla D, Conklyn M, Silber R. Decreased actin content of lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **1982**;59:536-541.

Stefulj J, Jernej B, Cicim-Sain L, Rinner I, Schauenstein K. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain Behav Immun*. **2000**;14: 219-224.

Tan D, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autacid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res*. **2003**;34:75-78.

Thorpe GHG, Kricka LJ. Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods on Enzymology* **1986**;133:331-353.

Thorpe GHG, Kricka LJ, Moseley SB, Whitehead TP. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxidase reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* **1985**;31: 1335-1341.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **1979**;76:4350-4354.

Weeks I, Svehla G. Chemiluminescence Immunoassay. *Wilson and Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*. E Science **1992**;29:1.

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter JN, Thorpe GHG. Analytical Luminescence: Its Potential in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* **1979**;25:1531-1546.