

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS
54 EAST LAUREL STREET, CHICAGO, ILL. 60607



THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS
54 EAST LAUREL STREET, CHICAGO, ILL. 60607

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS
54 EAST LAUREL STREET, CHICAGO, ILL. 60607



T

QP603

.U7

V3

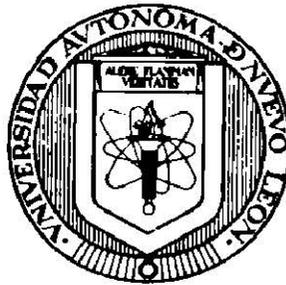
c.1



1080075348

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE HOMOLOGIA ENTRE URICASAS DE VERTEBRADOS
Y BUSQUEDA DE PROTEINAS HOMOLOGAS A LA URICASA EN EL
HUMANO POR ANALISIS DE INMUNORREACTIVIDAD CRUZADA.

T E S I S

QUE EN OPCION AL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA:

ALFREDO VARELA ECHAVARRIA

MONTERREY, N. L.

MAYO, 1988.

T
QP603
.U7
V3



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DETERMINACION DE HOMOLOGIA ENTRE URICASAS DE VERTEBRADOS
Y BUSQUEDA DE PROTEINAS HOMOLOGAS A LA URICASA EN EL
HUMANO POR ANALISIS DE INMUNORREACTIVIDAD CRUZADA.

T E S I S

QUE EN OPCION AL TITULO DE

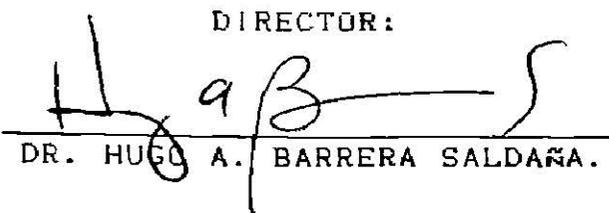
B I O L O G O

PRESENTA:

ALFREDO VARELA ECHAVARRIA

DIRECTOR:

COASESOR:


DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA.


M.C. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA.

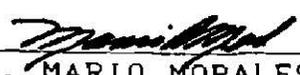
COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE


Q.B.P. CARLOS E. HERNANDEZ LUNA.

SECRETARIO

VOCAL


BIOL. MARIO MORALES VALLARTA.


BIOL. JORGE VERDUZCO MARTINEZ.

MONTERREY, N.L.

MAYO DE 1988.

La realización de este trabajo tuvo lugar en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y se llevó a cabo bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y el M.C. Roberto Montes de Oca Luna.

por supuesto,
a José Guadalupe y Magdalena

a Bernabé; hombre recto
y gran conversador

a Macario; poseedor de una
singular inteligencia

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Eduardo Aguirre Pequeño cuya visión y claridad ideológica han marcado de modo indeleble la historia de la Biología en México.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y al M. C. Roberto Montes de Oca Luna por el apoyo y la asesoría brindada. Al Q. B. P. Carlos E. Hernández Luna por sus orientaciones y críticas. A los Biólogos Jorge Verduzco Martínez y Mario Morales Vallarta por su colaboración en la comisión de Tesis.

A la Facultad de Medicina de la U. A. N. L. y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Por su contribución crítica a la composición final de este escrito, a los Biólogos: Ma. del Socorro Báez, Carlos H. Briseño de la Fuente, Carlos García Arizpe y Manuel L. González Garay.

A los miembros de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.

No en vano me he ataviado con ropaje
de amarillas plumas, como que por mí
ha nacido el sol.

Poema náhuatl.

CONTENIDO:

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	8
HIPOTESIS	11
OBJETIVOS	11
METODOS	12
a). Purificación de uricasa de rata	12
b). Obtención de extractos de hígado	14
c). Determinación de la actividad enzimática de la uricasa	15
d). Determinación de concentración de proteínas	16
e). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	17
f). Electroelución	19
g). Electroforesis en acetato de celulosa	20
h). Producción de anticuerpos	20
i). Determinación de producción de anticuerpos y titulación de los antisueros	21
j). Inmunoelectroforesis	22
k). Inhibición de la actividad de la uricasa por suero antiuricasa	23
l). Detección de la uricasa por inmunoelectrotransferencia	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES.	
Purificación de uricasa de rata	28
Producción de anticuerpos	28
Determinación de especificidad y sensibilidad del antisuero	30
Determinación de sensibilidad de la inmunoelectrotransferencia	34
Obtención de extractos de hígado	36

Estudios comparativos de las uricasas de vertebrados ..	38
Búsqueda en el humano de proteínas homólogas a la uricasa	40
Implicaciones evolutivas de la pérdida de la uricasa en los hominoideos	43
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	45
LITERATURA CITADA	46

RESUMEN

La uricasa, es una enzima peroxisomal que cataliza la oxidación del ácido urico a alantoína durante el catabolismo de las purinas. En vertebrados está presente en el hígado de la mayoría de las especies de peces, anfibios y mamíferos; pero su actividad enzimática está ausente en los hominoideos. En el presente trabajo se realizaron análisis por inmunolectrotransferencia en estudios comparativos tendientes a determinar homología entre uricasas de diferentes especies animales. Con la utilización de anticuerpos dirigidos contra uricasa de hígado de rata, se demostró por vez primera inmunorreactividad cruzada entre las uricasas presentes en hígados de especies de vertebrados en el rango de la escala evolutiva desde peces hasta primates (macaco). Los resultados indican que las uricasas de los peroxisomas hepáticos de las diferentes especies estudiadas tienen un origen evolutivo común. Esta conclusión es apoyada también por la localización tisular y subcelular idénticas y por la similitud en los pesos moleculares que exhiben esas uricasas. El estudio se extendió además al análisis de muestras de hígado humano. Usando el mismo procedimiento, pero con un sistema de detección más sensible (fosfatasa alcalina en lugar de peroxidasa), no se detectó inmunorreactividad del suero anti-uricasa de rata con alguna proteína de hígados humanos fetales o adultos. Esto sugiere que el evento mutacional responsable de la pérdida de actividad de uricasa durante la evolución de los hominoideos, no permite la producción de un RNA mensajero para uricasa traducible.

INTRODUCCION.

El avance que ha tenido la biología molecular en nuestros días ha permitido abordar desde otros enfoques y a diferentes niveles, problemas que como el de la evolución biológica habían sido estudiados en base a los caracteres fenotípicos conspicuos de los organismos.

Entendiendo la evolución como el reflejo de cambios hereditarios causados por mutaciones, por los efectos de la selección natural y la acción de la deriva genética, ha sido posible estudiarla a su nivel molecular. En este nivel, las mutaciones, como causa primaria de evolución (1), pueden ocurrir en las regiones de control o en las regiones estructurales de los genes, y su potencialidad de establecerse en el genoma se encuentra determinada por las consecuencias de esa alteración en la estructura y en la función de la proteína afectada (2-4).

En tiempos recientes se han desarrollado técnicas capaces de determinar las secuencias de los aminoácidos en las proteínas y de los nucleótidos en los genes. Tal logro ha permitido el análisis fino de genes y proteínas, y contra lo que se esperaba por los conocimientos en evolución morfológica (5, 6), se ha demostrado que la velocidad de sustitución de aminoácidos en proteínas homólogas de diferentes líneas filéticas, es aproximadamente constante (2). Tomando como referencia las divergencias evolutivas datadas a partir de estudios paleontológicos y con apoyo en la constancia aproximada en la tasa de evolución molecular, se llegó a la formulación de la hipótesis del reloj molecular (7). En base a esta hipótesis, ha sido posible determinar las relaciones filéticas entre organismos por la divergencia en la estructura primaria de proteínas y genes homólogos (4).

A diferencia de los análisis de secuencia de aminoácidos, un enfoque indirecto para el estudio de la evolución de proteínas lo constituye el uso de anticuerpos en ensayos de inmunorreactividad cruzada. El grado de inmunorreactividad cruzada refleja el grado de conservación evolutiva de las proteínas, pues está dada en función de la similitud estructural que éstas guarden entre sí.

Además de las alteraciones estructurales, las mutaciones pueden afectar la expresión genética a diferentes niveles. Así podemos tener alteraciones en la transcripción; el procesamiento, el transporte del RNA mensajero al citoplasma y su estabilidad; en los mecanismos de traducción y aún en mecanismos de regulación postraduccional (fig.1). Es evidente, entonces, que existen sitios múltiples en la regulación de la expresión genética (8), en los que las mutaciones pueden alterar el funcionamiento normal de los genes o causar su inactivación, dando lugar a genes no expresables que si no presentan copias funcionales en el genoma, los hemos denominado "genes fósiles".

Los cambios ocurridos en las regiones estructurales de los genes o en sus regiones de control están limitados en gran medida por sus consecuencias en el funcionamiento normal de la maquinaria metabólica de los organismos. De tal modo que si las altera-

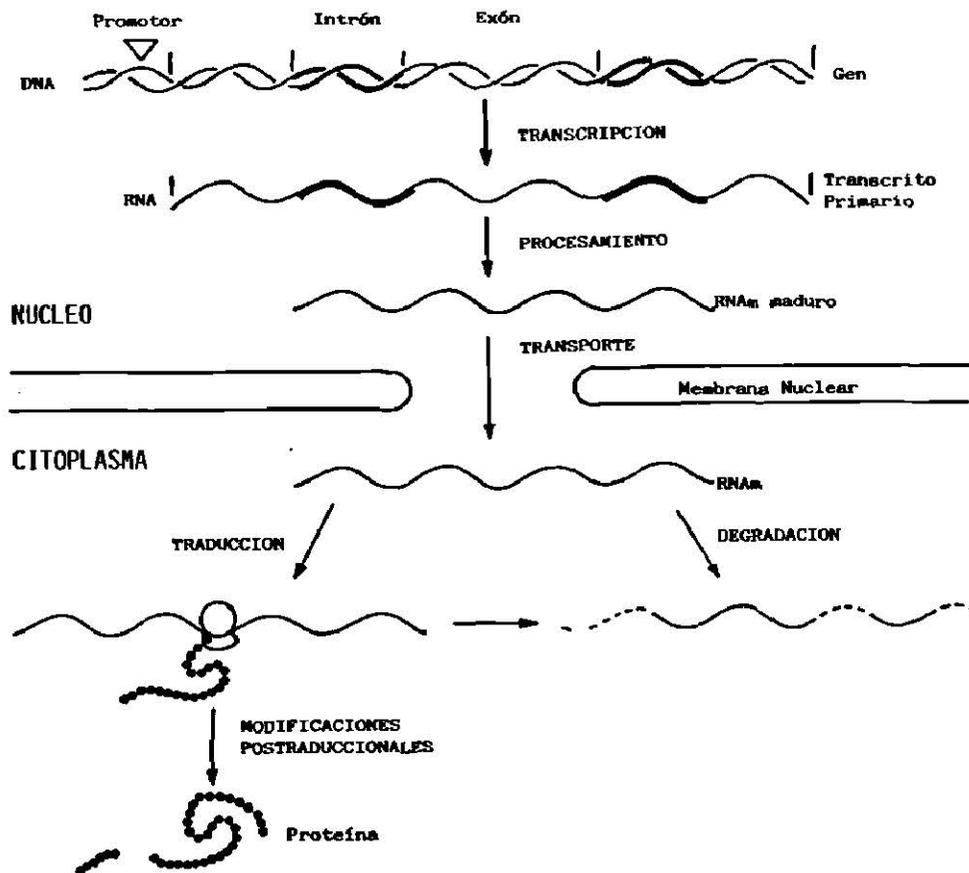


Figura 1. Flujo de la información genética. Modificado de Darnell et al. (8).

ciones producen efectos marcadamente desfavorables, serán eliminados por selección natural. Se tiene registro, no obstante, de segundas mutaciones, cuyo efecto compensatorio hace posible el establecimiento genético de mutaciones que por sí solas serían deletéreas (9).

En los vertebrados, la uricasa (Urato: oxígeno oxidoreductasa, E.C. 1.7.3.3.) es la enzima participante en la vía degradativa de las purinas que cataliza la conversión oxidativa del ácido úrico en alantoína (fig. 2). Su función es de especial importancia por sus implicaciones en los mecanismos de excreción de los desechos nitrogenados.

En los hominoideos, posiblemente un caso de inactivación o deleción genética causó la pérdida de la actividad de la uricasa (fig. 3)(10). Aunque se desconoce el mecanismo preciso por el que se perdió la actividad de la uricasa durante la evolución de este grupo de primates, se han postulado dos hipótesis acerca de las ventajas adaptativas que ello representa. En una de ellas se ha sugerido que el aumento en los niveles basales de ácido úrico por ausencia de la uricasa, ha propiciado un "salto" en la capacidad intelectual de los hominoideos en razón de que el ácido úrico, estructuralmente similar a la cafeína y teobromina, puede actuar como neuroestimulante (11). La otra hipótesis, que ha sido más ampliamente aceptada, establece que el incremento en los niveles séricos de ácido úrico ha contribuido a alargar la vida media de los hominoideos y a disminuir la incidencia de cáncer (12). Esta hipótesis se fundamenta en que el ácido úrico posee marcadas propiedades antioxidantes (13, 14), por lo que protege al organismo contra radicales libres, cuyo efecto en macromoléculas biológicas tiene implicaciones en la causa o patología del cancer

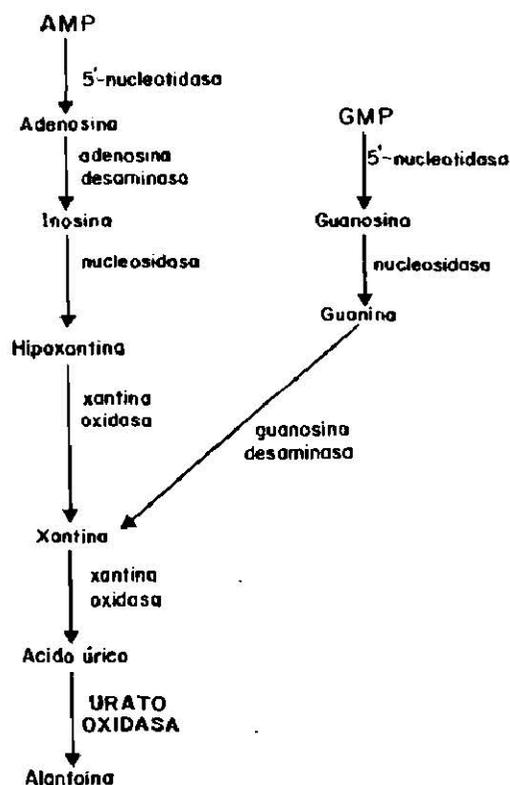


Figura 2. Catabolismo de las purinas. Modificado de Lehninger (59).

y en el envejecimiento (12).

El presente trabajo constituye una aproximación al entendimiento de los fenómenos involucrados en la pérdida de la uricasa en el humano. En él se analizaron por vez primera extractos de hígado humano fetal y adulto para determinar la presencia o ausencia de secuencias polipeptídicas homólogas a la uricasa de mamíferos. Además, se estudió la conservación evolutiva de la uricasa en los vertebrados por el análisis de sus propiedades antigénicas.

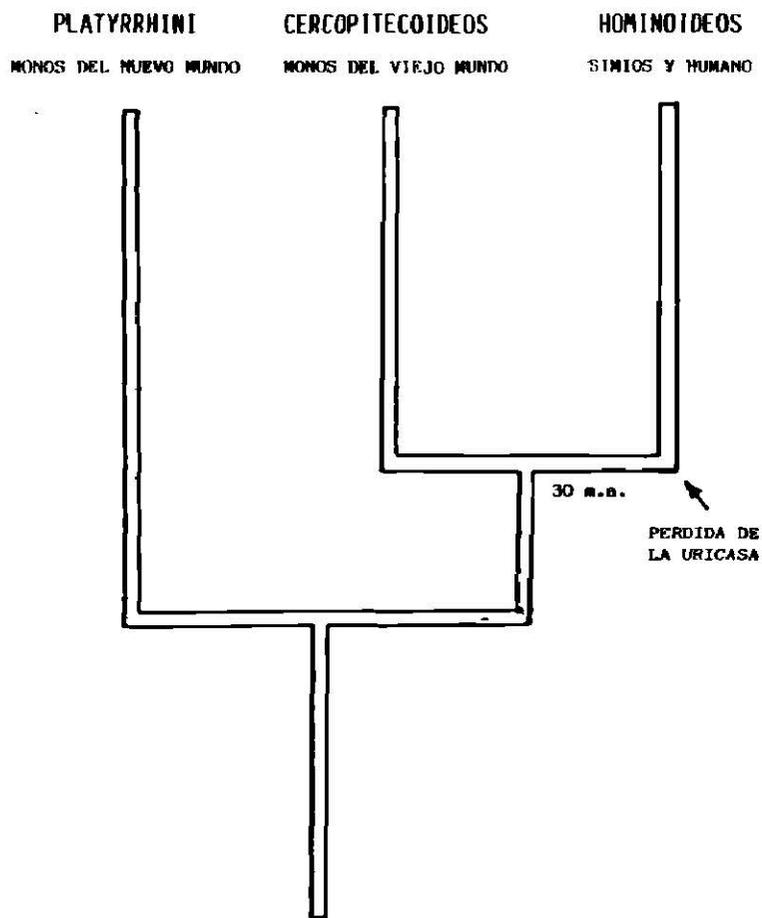


Figura 3. Filograma de los antropoideos.
m.a. = millones de años. Modificado de
Friedman et al. (10).

ANTECEDENTES.

La uricasa es una cuproproteína (15) que se localiza en los peroxisomas de las células hepáticas de la mayoría de los mamíferos. Se sintetiza en polisomas libres en el citoplasma (16) y se encuentra formando parte de un cristal o nucleóide (17) (fig. 4). En algunas especies la uricasa ha sido detectada también en el riñón (18, 19).

Entre los vertebrados, se ha detectado la presencia de la uricasa en peces (20), en anfibios (18, 21), en algunos reptiles acuáticos y en la mayoría de los mamíferos, con excepción de la chinchilla, el puercoespin americano (18) y los primates hominoideos (10, 22, 23).

Diversos estudios realizados con uricasas de varias especies, desde bacterias hasta mamíferos, han revelado que su peso molecular fluctúa alrededor de 120 Kilodaltones (Kd) para la forma nativa, la cual está constituida por cuatro subunidades cuyo peso individual es de aproximadamente 32 Kd (tabla 1). Lo anterior, aunado al hecho de que las uricasas estudiadas muestran la misma localización subcelular, y en el caso de los vertebrados la misma especificidad de tejido, puede ser indicativo de homología y de un alto grado de conservación de la estructura primaria de la enzima al través de la evolución. En experimentos con enfoque comparativo, se ha analizado la inmunorreactividad cruzada de antisueros dirigidos contra la uricasa de Rana catesbeiana, con las uricasas de algunos peces, anfibios y mamíferos en ensayos de doble inmunodifusión en gel (24). Con este sistema se pudo detectar reacción cruzada solamente con otras uricasas de anfibios; mas no con la de peces o mamíferos. Estos resultados no descartan

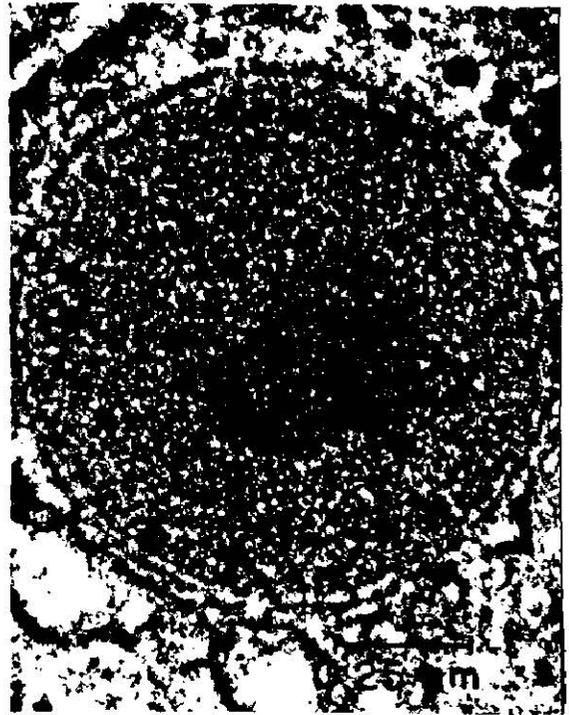


Figura 4. Peroxisoma de hígado de rata. Tomada de Lehninger (59).

Tabla 1. Pesos moleculares de uricasas de diferentes especies.

Especie	Peso molecular (Kd)		Referencia
	Tetramero	Monómero	
cerdo	125	32	Pitts et al. (44).
rata		32	Watanabe et al. (27).
bovino	125		Leone (55).
trucha	130	32.5	Kinsella et al. (20).
caballa	127		Noguchi et al. (56).
nódulos de soya		33	Larsen y Jochimsen (57).
<u>Bacillus</u> <u>fastidiosus</u>	140		Mahler (58).

*Peso molecular determinado en gel de poliacrilamida-SDS.

que exista homología entre las uricasas de esas clases de vertebrados, dada la baja sensibilidad del método utilizado.

Por otro lado, se ha demostrado una marcada correlación entre la presencia del cristal y la presencia de la actividad de uricasa (17, 25, 26); aunque existen datos aislados de especies que poseen actividad de la uricasa sin mostrar el cristal y viceversa (18). En este sentido, Watanabe y colaboradores (27) demostraron que existe en el cristal de peroxisomas de hepatocitos de rata, al menos una proteína distinta de la uricasa que forma la estructura del mismo, y que podría dar origen al cristal observado en algunas especies que carecen de la actividad de la enzima.

Por numerosos estudios, se sabe que las células hepáticas humanas poseen peroxisomas sin cristal, en concordancia con la ausencia de actividad de uricasa (10, 22, 23). Sin embargo, se han encontrado peroxisomas con inclusiones cristaloides en hígado fetal humano (28) y en hígado de enfermos con colestasis idiopática recurrente (29). Por haberse realizado estos hallazgos durante el desarrollo de investigaciones con propósitos diferentes al del presente trabajo, no se investigó acerca de la presencia de la uricasa en esos casos.

Aunque infructuosamente, se han utilizado diversos procedimientos para detectar la actividad de la uricasa en los hominói-

deos y en especial en el humano (10, 18). Sin embargo, no se han investigado hasta ahora los mecanismos moleculares cuya consecuencia es la ausencia de esa actividad. Friedman y colaboradores (10), utilizando un sensible ensayo radioquímico específico para la medición de la actividad de la uricasa, obtuvieron evidencias que sugieren que la pérdida de la enzima, o al menos la pérdida de la forma activa en los hominoideos, obedece a un evento mutacional único en el tronco ancestral que dio origen a los cinco géneros que forman al grupo.

Por los conocimientos acerca de los mecanismos de regulación de la expresión genética, se pueden postular tres posibles explicaciones para la ausencia de la actividad de uricasa en el humano:

- a) El humano perdió el gen que codifica para la uricasa.
- b) El gen de la uricasa está presente en el genoma humano; pero está inactivo por mutaciones en su mecanismo de expresión.
- c) El gen para la síntesis de uricasa es activo en el humano; pero produce una enzima inactiva por efecto de mutaciones estructurales.

El presente trabajo tuvo como uno de sus objetivos el de discriminar entre la tercera y las otras dos alternativas utilizando la técnica de la inmunoelectrotransferencia (30), con la que es posible la detección de formas mutantes inactivas de enzimas (31).

HIPOTESIS.

El presente trabajo partió de la suposición de la existencia de homología entre las uricasas del hígado de los vertebrados, lo cual es susceptible de demostrar mediante el análisis de sus propiedades antigénicas.

Además, dado que la ausencia de la actividad de la enzima en un organismo no excluye la presencia de secuencias génicas codificantes para ella, ni aún de alguna forma inactiva de la misma, es posible la presencia en el humano de una proteína homóloga a la uricasa demostrable por el análisis antigénico de extractos hepáticos humanos.

OBJETIVOS.

El primero de los objetivos de este trabajo fue el de determinar si existe homología entre las uricasas del hígado de diferentes vertebrados.

Un segundo objetivo que se persiguió fue el de determinar la presencia o ausencia de alguna proteína homóloga a la uricasa de rata en el hígado humano.

MÉTODOS.

Para determinar la homología entre las uricasas de las diferentes Clases de vertebrados que poseen la enzima, se realizaron ensayos de inmunorreactividad cruzada por inmunoelectrotransferencia, pues esta técnica permite el análisis de los antígenos por su peso molecular y provee una alta sensibilidad en la detección de proteínas. Con esta técnica se examinaron extractos de hígado enriquecidos en peroxisomas de especies de todas las clases del Phylum.

Para realizar los análisis inmunológicos, se purificó primeramente la uricasa a partir de hígado de rata, con esta proteína pura en su forma desnaturalizada se indujo la producción de anticuerpos por inmunización a conejos. Una vez obtenido, caracterizado y titulado, el suero anti-uricasa se utilizó para las inmunoelectrotransferencias.

De existir un producto del gen de la uricasa en el hígado humano, debería presentar muy probablemente secuencias aminoácidas comunes con las uricasas de otros mamíferos. Por lo anterior y con el conocimiento de la especificidad de las reacciones antígeno anticuerpo, se utilizó también la metodología de la inmunoelectrotransferencia para la búsqueda de proteínas homólogas a la uricasa de mamíferos en hígado humano fetal y adulto. Para ello se utilizó el mismo suero anti-uricasa citado en el párrafo anterior.

A continuación se describen los métodos utilizados para el logro de los objetivos propuestos.

a). Purificación de uricasa de rata.

Para la purificación de la uricasa se utilizaron hígados frescos de rata variedad Sprague-Dawley de animales con 24 horas de ayuno. Se siguió básicamente el procedimiento descrito por

Watanabe y Suga (32) que consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Homogenizar el hígado en el Potter-Elvehjem (fig. 5) en sacarosa 0.25 M (5 ml/gr) y añadir PMSF (foruro de fenil metil sulfonilo) a una concentración final de 1 mM partiendo de una solución 100 mM en etanol. La homogenización y los pasos subsecuentes deben realizarse a una temperatura de 0-4°C.
- 2.- Centrifugar a 3,300 x g durante diez minutos.
- 3.- Recentrifugar el sobrenadante a 12,500 x g por veinte minutos. De este paso se obtiene un precipitado que constituye la fracción de de Duve o fracción mitocondrial ligera (33).
- 4.- Resuspender el precipitado en amortiguador de boratos 0.1 M pH 9 conteniendo Tritón X-100 al 2% (3 ml de amortiguador por gr de tejido original).
- 5.- Agitar durante 12 horas en plancha magnética.
- 6.- Centrifugar a 27,000 x g durante treinta minutos.
- 7.- Resuspender en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 11 que contenga sacarosa al 0.25 M (3 ml/gr de tejido).
- 8.- Agitar durante una hora y centrifugar a 27,000 x g durante treinta minutos.
- 9.- Dializar el sobrenadante contra cinco litros de amortiguador Tris 0.01 M pH 8 durante 12 horas.
- 10.- Centrifugar a 7,700 x g durante veinte minutos.
- 11.- Resuspender el precipitado en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 11 y almacenar a -20°C en glicerol al 50%.

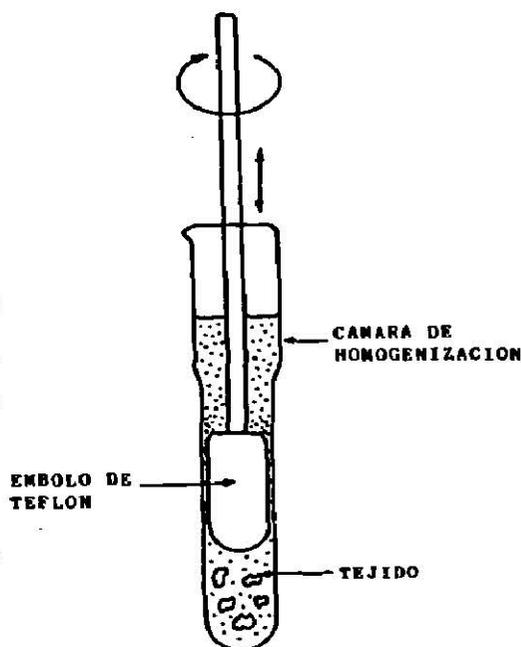


Figura 5. Homogenizador Potter-Elvehjem.

b). Obtención de extractos de hígado.

De las especies por estudiar se obtuvieron muestras de hígado para realizar los extractos que se utilizarían en la inmunoelectrotransferencia. Los hígados de carpa (Cyprinus carpio), bagre (Ictalurus punctatus), besugo (Aplodinotus grunians) y tilapia (Oreochromis sp.), se obtuvieron de ejemplares frescos colectados en la presa Cerro Prieto del Municipio de Linares, N.L., de donde fueron transportados en hielo hasta el laboratorio para su procesamiento.

La muestra de hígado de la tortuga acuática Pseudemys scripta var. Taylori, procede de un ejemplar colectado en Cuatrociénegas, Coah. y sacrificado en el laboratorio para su procesamiento.

Los hígados de pollo (Gallus gallus) y paloma (Columba livia) se obtuvieron en el rastro municipal y de ejemplares colectados en el área metropolitana de Monterrey respectivamente. Los hígados de pollo se transportaron en hielo y los de paloma se obtuvieron al sacrificar a los animales en el laboratorio.

El hígado de macaco o mono Rhesus (Macaca mulatta) se extrajo quirúrgicamente y bajo anestesia general a un ejemplar macho del bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L..

Las muestras de hígado humano fetal se obtuvieron de abortos espontáneos y las de adulto de autopsias practicadas a cadáveres recientes en el Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.. Debido a que es frecuente que en los casos de aborto el producto sea expulsado en estado de descomposición, se practicó examen histológico a las muestras (por personal del Departamento de Patología del mismo hospital) para descartar aquellas que mostraran signos de autólisis.

De cada una de las muestras por estudiar, se obtuvo la fracción de de Duve que contiene a los peroxisomas como se describe en el inciso a de esta misma sección (números 1 al 3) y se resuspendió en amortiguador de carbonatos 0.2 M pH 11. A una parte se añadió un volumen de glicerol y otra parte se disolvió en amorti-

guador de muestra para electroforesis, misma que se sometió a ebullición durante tres minutos. Las preparaciones se almacenaron a -20°C y 4°C respectivamente.

Para verificar el enriquecimiento en uricasa por su actividad específica de las muestras de especies que poseen la enzima, se obtuvieron además, extractos proteicos totales al someter los hígados a lo siguiente: homogenización en sacarosa al 0.25 M (2 ml/gr de tejido); adición de un volumen de agua destilada; homogenización y adición de 1/4 de volumen de amortiguador de carbonatos 1 M (pH 11). Al igual que con las fracciones de de Duve, se almacenaron alícuotas de cada extracto en glicerol al 50% y en amortiguador de muestra para electroforesis.

c). Determinación de la actividad enzimática de la uricasa.

La actividad de la uricasa en los homogenizados y extractos purificados de la enzima se determinó, como se describe enseguida, por la disminución de la absorbancia a 292 nm debida a la oxidación enzimática de el ácido úrico con la producción de alantoina.

El ensayo se realiza en amortiguador de boratos 0.05 M, pH 9, pues a esa concentración se permite una rápida degradación de compuestos intermediarios que absorben luz a 292 nm y que pueden alterar las lecturas (34). La reacción se inicia por la adición de la muestra a ensayar a 2 ml de amortiguador conteniendo ácido úrico a una concentración de 100 mM (15) y se mide la disminución de la densidad óptica ocurrida a los cinco y diez minutos de iniciada la reacción. La disminución de la densidad óptica es proporcional a la cantidad de ácido úrico degradado por acción de la enzima.

d). Determinación de concentración de proteínas.

La medición de la concentración de proteínas en extractos y muestras purificadas se hizo por medio del método de Lowry (35) y el modificado por Larson y colaboradores (36).

Procedimiento (Lowry).

- 1.- Hacer diluciones de la muestra y ajustarias a volúmenes de 100 ul. Usar como referencia cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (de 0 a 100 µg) en el mismo volumen para construir una curva de calibración.
- 2.- Añadir 1 ml del reactivo C que se prepara con un volumen del reactivo A (Sulfato de cobre 0.02 M y citrato de sodio 0.013 M) y cincuenta volúmenes del reactivo B (Carbonato de sodio 0.18 M e Hidróxido de sodio 0.1 M). Agitar y dejar en reposo durante 5 o 10 minutos.
- 3.- Añadir 100 ul del reactivo de Folin diluido en agua destilada (1:2).
Agitar vigorosamente y después de treinta minutos leer absorbancia a 740 nm. El reactivo de Folin, lo mismo que el reactivo C, se prepara al momento de usarse.

La modificación hecha al método de Lowry por Larson y colaboradores consiste en la adición de 100 ul de ditiotreitól (DTT) 20 mM después de tres minutos de añadido el reactivo de Folin, agitar rápidamente y leer enseguida la absorbancia a la misma longitud de onda. Esta modificación disminuye el tiempo del ensayo y aumenta su sensibilidad pues el DTT aumenta la velocidad de reducción del complejo fosfotungstato-molibdato del reactivo de Folin con la concomitante producción de el color azul. Esta modificación fue de utilidad cuando se determinó la concentración de muestras de uricasa purificada pues se requiere de menor cantidad de proteína para el ensayo.

e). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para el análisis de los homogenizados y extractos de uricasa se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (37). Se realizaron electroforesis verticales en geles discontinuos que consisten de un gel concentrador superior al 5% de poliacrilamida y uno de resolución inferior al 13 %.; partiendo en ambos casos de una solución madre de Acrilamida al 30% y N,N'-bis-metilenacrilamida al 0.8 %.

La concentración final de los reactivos incluidos en la preparación del gel se enlista a continuación y posteriormente se describe el procedimiento.

	Gel concentrador	Gel de resolución
Poliacrilamida	5.0 %	13.0 %
TRIS	125 mM	375 mM
	(pH 6.8)	(pH 8.8)
SDS	0.1 %	0.1 %
Persulfato de amonio	0.125 %	0.125 %
Tetrametilentiamina (TEMED)...	0.075 %	0.075 %

El gel se prepara al mezclar los siguientes reactivos en el orden indicado y a las cantidades requeridas para lograr la concentración final de la lista previa.

Agua destilada.

Tris 0.5 M (pH 6.8) con SDS al 0.4%.

Tris 1.5 M (pH 8.8) con SDS al 0.4%.

Acrilamida al 30% con bisacrilamida al 0.8%.

TEMED.

Persulfato de amonio al 50%.

Una vez añadidos los dos últimos reactivos (catalizadores) del gel de resolución, se vierte entre las placas de vidrio des-

engrasadas previamente y con separadores de 0.75 o 1.5 mm. Esta operación se realiza rápidamente para evitar la polimerización en el recipiente de mezcla. Enseguida se cubre la mezcla cuidadosamente dejando deslizar suavemente por las paredes una capa de agua de 2 cm de altura para evitar el efecto inhibitorio que sobre la polimerización tiene el oxígeno. Se espera al menos por 10 minutos para que polimerice la poliacrilamida y se retira el agua. Se prepara la mezcla del gel concentrador y se vacía en las placas sobre el gel de resolución introduciendo rápidamente el peine que sirve de molde para formar los pozos de aplicación de muestra. Una vez completa la polimerización se retira el peine y el separador inferior y se monta el gel en la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (Tris-base pH 8.3, 25 mM; glicina, 190 mM y SDS al 0.1%).

Para su aplicación al gel las muestras se ebulen durante tres minutos en un amortiguador de muestra con una concentración final de Tris-base de 0.13 M (pH 6.8), SDS al 2 %, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5 % y pironina o azul de bromofenol al 0.001 % como colorantes indicadores del frente de corrida. En este trabajo se usaron como marcadores de peso molecular albúmina bovina (66 Kd) albúmina de huevo (45 Kd), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (35 Kd), anhidrasa carbónica (29 Kd), tripsinógeno (24 Kd), inhibidor de tripsina (20 Kd) y α -lactalbúmina (14 Kd). A todas estas proteínas se les dio el mismo tratamiento descrito para la preparación de muestras.

Se aplican las muestras al gel y la electroforesis se inicia por la aplicación de corriente a un valor constante de 80 volts. Cuando la muestra ha penetrado totalmente en el gel concentrador se cambia a 100 volts y se continúa la electroforesis. Una vez que el colorante ha migrado hasta alcanzar una distancia de 1 cm de la base del gel, se interrumpe la corriente.

Los geles se tiñen por inmersión y agitación lenta en Azul de Coomassie R-250 al 0.25 % en solución decolorante (ácido acético, metanol y agua en proporción 1:5:4) y se destiñen también por agitación en varios cambios de solución decolorante hasta retirar el colorante no unido a proteína.

f). Electroelución.

Para tener la certeza de la pureza del antígeno utilizado para la producción de anticuerpos, se utilizó la electroelución (38) de la banda prominente de 32 Kd (peso molecular de las subunidades de uricasa) de un extracto semipurificado de uricasa de hígado de rata. La electroelución se hizo a partir de un gel de poliacrilamida-SDS con el procedimiento que se describe a continuación utilizando la cámara que se muestra en la figura 6.

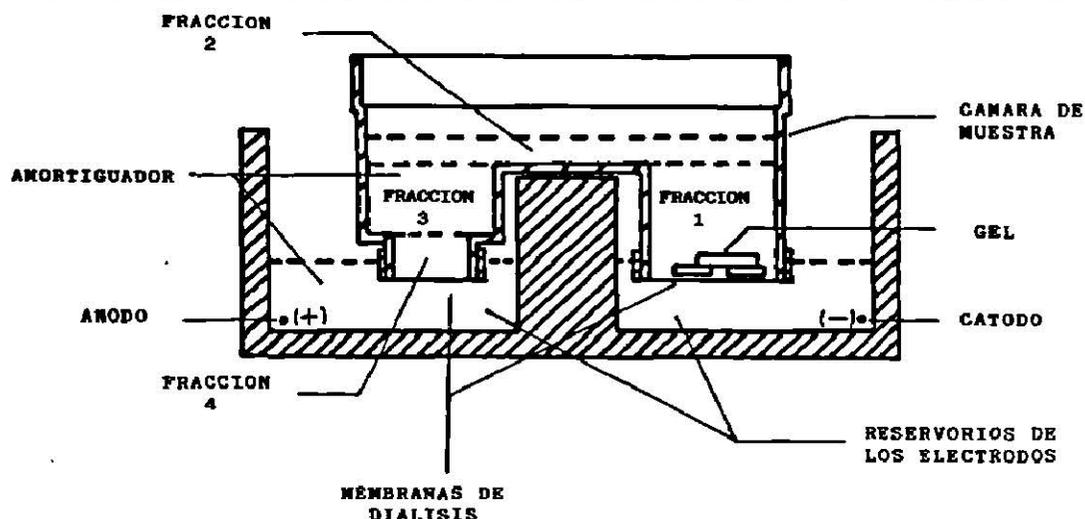


Figura 6. Sección transversal de la cámara de electroelución.
Modificado de ISCO Applications bulletin (38).

Procedimiento:

- 1.- Se somete a electroforesis a la uricasa purificada de rata en un gel preparativo de poliacrilamida-SDS (la mayor cantidad de muestra que se pueda resolver, aplicada a todo lo ancho del gel).
- 2.- Por la tinción de tiras verticales del gel, se delimita la zona donde se encuentra la banda de uricasa y se recupera ese fragmento eliminando las partes teñidas y el resto del gel.
- 3.- El gel que contiene a la uricasa se corta en trozos pequeños y se coloca en el compartimiento mayor de la cámara de muestra, se llena éste y el resto de la cámara con amortiguador de elución (Tris-acetato 10 mM, pH 8.6). Los reservorios de los electrodos se llenan con el mismo amortiguador sólo que con una concentración cuatro veces mayor.

- 4.- Se aplica energía a un voltaje constante de 120 Volts. durante 8 hs. Se invierte la corriente durante 5 minutos.
- 5.- Se retiran cuidadosamente las fracciones 2 y 3 de la cámara de muestra y se colecta la fracción 4 después de agitar suavemente con micropipeta procurando remover la proteína adherida a las paredes y a la membrana de diálisis. En esta última fracción se encuentra la proteína electroeluida.

g). Electroforesis en acetato de celulosa.

Para analizar la uricasa purificada por electroelución se realizó la electroforesis en acetato de celulosa (39) con el sistema y equipo Gelman (Gelman, Inc.). El procedimiento utilizado se describe a continuación.

Se aplicaron 6 μg (1 μl) de uricasa electroeluida dializada contra metanol al 20 % y 1 μl de suero humano normal a un gel de acetato de celulosa (Sephrapore 51040) y se realizó la electroforesis en amortiguador de Tris-barbital pH 8.8 (Gelman, Inc.) a 210 Volts por 25 minutos. Posteriormente el gel se secó a temperatura ambiente y se horneó a 80°C hasta que se transparentó totalmente. Para su tinción, el gel fue sumergido en Ponceau S al 0.5 % en ácido tricloroacético durante 10 minutos y enseguida se le hicieron dos lavados de diez minutos cada uno en ácido acético al 5 %.

h). Producción de anticuerpos.

Una vez obtenida la uricasa pura, se obtuvieron antisueros por inmunización a dos conejos variedad Nueva Zelanda. Se usó como inmunógeno a la uricasa de rata electroeluida y dializada contra dos litros de metanol al 20 % para eliminar el SDS y posteriormente contra dos litros de cloruro de sodio 0.1 M para eliminar el metanol. El esquema de inmunización utilizado se describe enseguida:

- 1.- **Primoimmunización.** Administrar 150 µg de uricasa con adyuvante completo de Freund por vía intradérmica en diferentes sitios del dorso del animal. La mezcla se realiza por la adición del antígeno en pequeñas porciones al adyuvante mientras se emulsifica con una jeringa de aguja gruesa hasta lograr una relación de volúmenes de 1:1.
- 2.- **Reimmunización .** Después de quince días aplicar 150 µg de uricasa con adyuvante incompleto de Freund por vía subcutánea en el dorso.
- 3.- **Inmunización de refuerzo.** Doce días después, inyectar en tres días consecutivos 40, 80 y 100 µg de uricasa soluble por vía intraperitoneal.
- 4.- **Sangrar a los cuatro días por las venas de la oreja y separar el suero.** Añadir azida de sodio a una concentración final de 0.1 % y descomplementarlo por incubación durante media hora a 56°C.

Una vez descomplementado, el suero se almacena en congelación o por períodos cortos a 4°C.

i). Determinación de producción de anticuerpos y titulación de los antisueros.

Para determinar si los sueros obtenidos contenían anticuerpos contra la uricasa se realizaron ensayos de doble inmunodifusión en gel de agarosa al 0.1 % en PBS (K_2HPO_4 , 10 mM, KH_2PO_4 , 10 mM y NaCl 150 mM a pH 7.4).

Para determinar la máxima dilución del antisuero que se puede utilizar para detectar a la mínima cantidad de antígeno (titulación), se realizó el procedimiento del ELISPOT ("Enzyme linked immunospot assay") (40). Este método consiste en aplicar directamente a un filtro de nitrocelulosa cantidades conocidas de antígeno en pequeños puntos, bloquearlo con albúmina y continuar el procedimiento del enzoinmunoensayo que se describe posteriormente (inciso 1), y que se utiliza además para determinar la monoespecificidad del anticuerpo producido.

j). Inmunolectroforesis.

Para analizar la especificidad del antisuero se realizaron pruebas de inmunolectroforesis como se describe a continuación:

Inmunolectroforesis de cohete. Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Laurell (41) modificado por Clarke y Freeman (42).

Se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% en amortiguador Barbital de sodio 38 mM (pH 8.6), pues a ese pH las inmunoglobulinas poseen carga neta igual a cero por lo que no migran durante la electroforesis. Se disolvió la agarosa por ebullición en el amortiguador y se añadió el suero anti-uricasa de rata (40 μ l/ml) cuando el gel hubo alcanzado una temperatura de 50°C. Después de agitar, se vertió el gel sobre placas de vidrio de 10 cm por 7 cm (20 ml/placa), se dejó gelificar y se colocó en cámara húmeda a 4°C durante 10 minutos. Los pozos de muestra se hicieron por succión con vacío con tubos de pequeño diámetro en el margen del gel que posteriormente se orientaría hacia el polo negativo. La muestra se aplicó disuelta en el amortiguador utilizado para la preparación del gel y la electroforesis se realizó en amortiguador barbital de sodio 77 mM (pH 8.6) sobre plancha refrigerada (10-14°C) y con puentes de papel filtro humedecido en amortiguador de corrida para el paso de la corriente. Se aplicó corriente de 20 mA (medidos en el gel) durante cuatro horas (durante la electroforesis, el antígeno migra a través del gel y se precipita al saturarse con los anticuerpos contenidos en éste).

El anticuerpo no inmunoprecipitado se lavó por inmersión y agitación suave en cloruro de sodio 0.1 M a 4°C. Posteriormente, el gel se prensó aplicando encima papel absorbente y algún objeto pesado y se rehidrató por inmersión en solución salina. Después de cinco ciclos de prensado-rehidratado se prensó nuevamente y se secó en horno a 70°C. Se tiñó en azul de Coomasie durante 24 horas y se lavó con solución decolorante. Se utilizó el colorante y la solución de lavado tal y como se describe en la sección de electroforesis de poliacrilamida.

Inmunolectroforesis cruzada (IEC).

Esta técnica es una variación de la que se describe en la sección anterior y consiste en la separación electroforética de los componentes de la muestra (antígenos) en un gel de agarosa sin antisuero (fig 7.), seguida de una electroforesis hacia un gel con el antisuero orientada perpendicularmente a la dirección de la primera corrida. Se realiza la electroforesis en la primera dimensión hasta que el colorante indicador azul de bromofenol (2 µl de una solución al 0.001% por pozo de muestra) ha alcanzado el extremo del gel, se añade posteriormente el gel con el antisuero en forma líquida y después de gelificar se realiza la corrida en la segunda dimensión.

Se realizó la IEC con los antisueros anti-uricasa de rata y con muestras de uricasa electroeluida para verificar en ellas la presencia de una sola proteína. Se usó uricasa electroeluida tal y como se obtuvo del proceso de purificación y otra muestra igual a la que se añadió metanol hasta lograr una concentración de 20% para remover el SDS y permitir la separación por sus cargas de otras proteínas del mismo peso molecular que pudieran estar contaminando la muestra.

La IEC se realizó en las condiciones y con las concentraciones de los reactivos mencionados en la sección previa, salvo las variantes especificadas.

k). Inhibición de la actividad de la uricasa por suero antiuricasa.

Con el antisuero obtenido se realizaron además ensayos de inhibición de la actividad de la uricasa como prueba confirmatoria de su especificidad. Se incubaron durante 12 horas a 37°C diferentes cantidades del antisuero con 10 µl de extracto de uri-

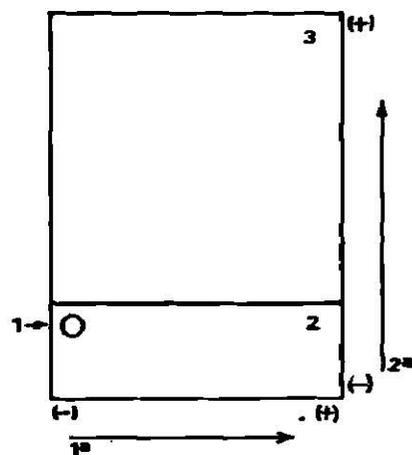


Figura 7. Esquema de la inmunolectroforesis cruzada. 1, pozo de aplicación de muestra; 2, gel sin antisuero; 3, gel con antisuero; 1º, primera corrida y 2º, segunda corrida.

casa de rata (51.24 mU) en 1.5 ml de amortiguador de boratos 0.05 M (pH 8). Posteriormente se determinó la actividad de uricasa como se describió en el inciso c de esta sección. En esta prueba se utilizó como testigo negativo suero de conejo no inmune.

1). Detección de la uricasa por inmunoelectrotransferencia.

En el ensayo para la detección de la uricasa en los extractos hepáticos de las diferentes especies, se utilizó la metodología de la inmunoelectrotransferencia (30), con ligeras modificaciones. En la figura 8 se esquematiza el procedimiento general de la técnica.

Electrotransferencia. Después de realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las muestras, se prosigue de la siguiente manera:

1.- Se monta el sistema de electrotransferencia colocando en secuencia del cátodo al ánodo lo siguiente:

Rejilla de plástico.

Esponja.

Papel filtro humedecido con amortiguador (3-4 hojas).

Gel (Sumergido previamente en amortiguador de transferencia durante diez minutos).

Filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Inc., poro de 0.2 μ m) humedecido en agua destilada durante cinco minutos y en amortiguador de transferencia durante el mismo tiempo.

Papel filtro humedecido con amortiguador (3-4 hojas).

Esponja.

Rejilla de plástico.

La manipulación de estos materiales debe hacerse con guantes de plástico y usando pinzas para el manejo del filtro de nitrocelulosa evitando toda contaminación con grasa y proteínas de la piel. El montaje se realiza en una charola con amortiguador de transferencia evitando la formación de bur-

bujas.

- 2.- Se sujetan las partes perfectamente con ligas de goma procurando que las rejillas ejerzan presión sobre las piezas del interior y se colocan en la cámara de electrotransferencia cubriéndolas totalmente con amortiguador de transferencia (Tris-base 20 mM, Glicina 153 mM y metanol al 20%).
- 3.- Se aplica la corriente y se deja transferir por doce horas a 110 Volts.
- 4.- Se retira el filtro de nitrocelulosa y se seca a temperatura ambiente.

Bloqueo. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos al filtro, se bloquea por incubación durante 12 horas en una solución con 2% de albúmina sérica bovina, 0.1% de gelatina y 0.1% de azida de sodio en TBS ("Tris buffered saline": Tris 50 mM pH 7.4 y cloruro de sodio 150 mM). Después del bloqueo se deja secar a temperatura ambiente.

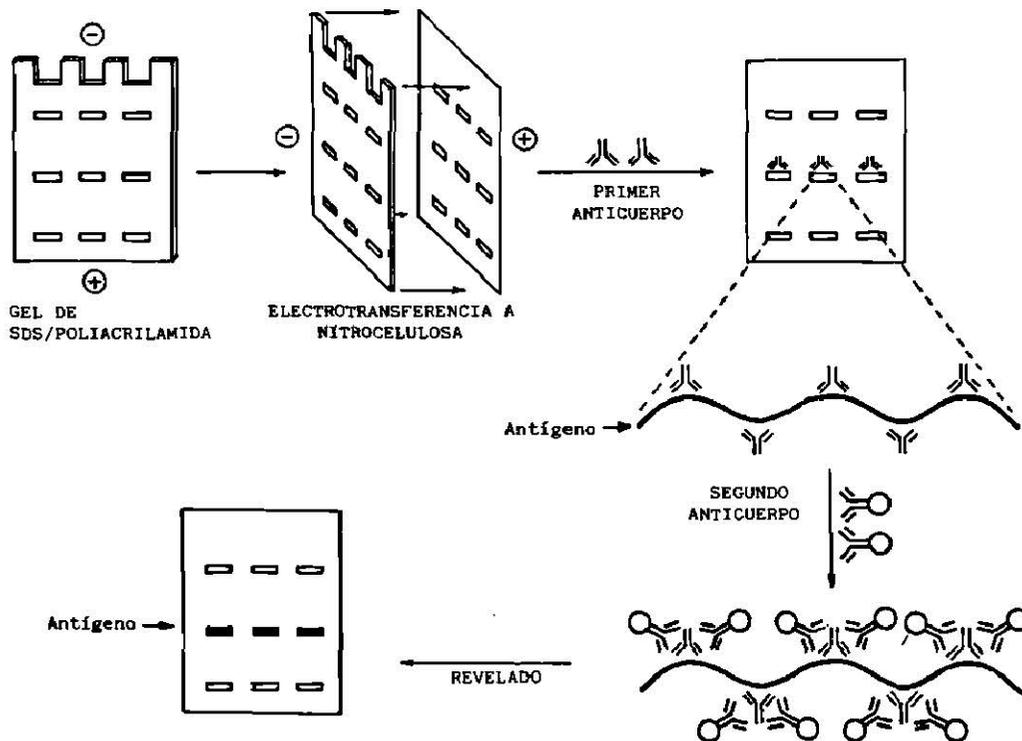


Figura 8. Esquema de la técnica de la inmunoelectrotransferencia.

Enzimoimmunoensayo con el conjugado de peroxidasa. Esta etapa del ensayo consta de la incubación con el primero y segundo anticuerpo y de el revelado inmunoenzimático. El procedimiento es el siguiente:

- 1.- Preincubar el filtro en TBST (Tween-20 al 0.05% en TBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Incubar con el primer anticuerpo (anti-uricasa) a una dilución de 1:250 en TBST durante 6 horas a 37°C.
- 3.- Eliminar el anticuerpo unido inespecíficamente con cuatro lavados de 15 minutos cada uno en TBST y uno del mismo tiempo en TBS.
- 4.- Incubar en solución de bloqueo durante una hora.
- 5.- Hacer un lavado en TBST durante 15 minutos.
- 6.- Incubar con el segundo anticuerpo (anticuerpos de chivo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplados a peroxidasa, BIORAD Laboratories, Ltd.) a una dilución 1:3000 en TBST durante 2 horas.
- 7.- Repetir una serie de lavados como en el paso 3.
- 8.- Revelar con la reacción de la peroxidasa en una mezcla que contenga 2 ml de la solución madre de 4-cloro-1-naftol (3 mg/ml en metanol), 40 µl de peróxido de hidrógeno al 3% y 10 ml de TBS. La reacción positiva se manifiesta al desarrollarse un color gris oscuro por la oxidación del cloro-naftol que se deposita en el filtro y es insoluble.
- 9.- Lavar enérgicamente el filtro en agua destilada, secarlo a temperatura ambiente y almacenarlo en la oscuridad.

Enzimoimmunoensayo con el conjugado de la fosfatasa alcalina. Se realizó con los extractos de hígado humano el inmunoensayo con anticuerpos de chivo anti-inmunoglobulinas de conejo acoplados con fosfatasa alcalina (SIGMA Chemical, Co.), sistema cuya sensibilidad es muy superior al de la peroxidasa. El procedimiento se describe enseguida:

Después de la incubación con el suero antiuricasa y el lavado en TBST como se describe previamente, los filtros se incuban en el conjugado de fosfatasa alcalina en una dilución 1:1000 y se

lavan nuevamente en TBST. Seguido de un lavado en TMS (Tris 100 mM pH 9.5; cloruro de magnesio 5 mM y cloruro de sodio 100 mM) por cinco minutos, los filtros fueron revelados en 10 ml del último amortiguador de lavado con 66 μ l de nitro-azul de tetrazolio al 50 % y 33 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato al 50 % (los dos últimos reactivos se preparan en dimetilformamida).

Una vez revelados, los filtros se lavan en agua destilada y se secan a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Purificación de uricasa de rata.

A partir de hígado de rata y de acuerdo al método de Watanabe y Suga (32), se obtuvo un extracto de uricasa con una actividad específica de 0.366 U¹/mg, lo que representa un enriquecimiento de la enzima de 66 veces con respecto al homogenizado total de hígado de rata. Por electroforesis y electroelución se purificó del extracto la banda de 32 Kd, peso que corresponde a las subunidades o monómeros que constituyen la uricasa. En la figura 9 se observa el análisis por electroforesis en gel de poli(acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) de los extractos en diferentes pasos de purificación. Se evidencia la progresiva eliminación de proteínas del extracto, hasta lograr finalmente la homogeneidad de la uricasa, después de su electroelución. Los resultados obtenidos en la electroforesis en acetato de celulosa corroboran la homogeneidad de la uricasa pues se obtuvo también una banda de proteína única (fig. 10).

Producción de anticuerpos.

La proteína (desnaturalizada) que se extrajo por electroelución de la banda de 32 Kd se utilizó para la producción de anticuerpos por inmunización en conejos siguiendo el patrón de inmunización descrito en la sección de métodos. Una vez concluida la inmunización, se obtuvieron los sueros de los conejos y se realizaron ensayos de doble inmunodifusión en gel para verificar la producción de anticuerpos. En la figura 11 se muestra el resultado de un ensayo en el que se utilizó uricasa pura y diferentes cantidades de los sueros obtenidos. En ella se pueden observar bandas de precipitación conspicuas, lo que indica la presen-

¹ Una unidad equivale a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de ácido úrico por minuto en amortiguador de boratos 50 mM (pH 9) con una concentración de sustrato de 100 mM.

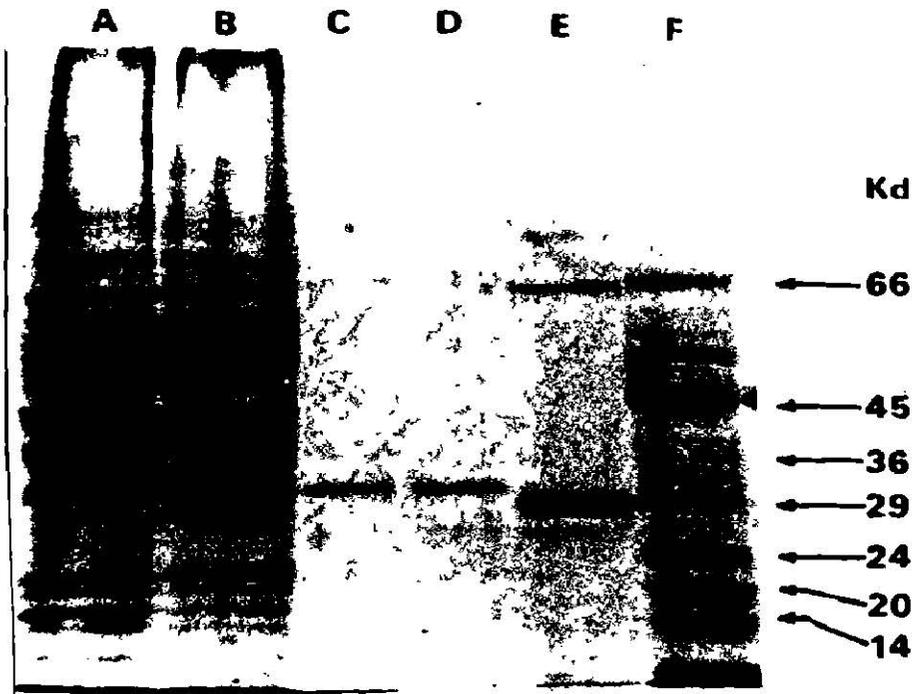


Figura 9. Análisis electroforético de los extractos de hígado de rata en los diferentes pasos de purificación de uricasa. Se analizaron en gel de poliacrilamida-SDS al 5%-13% las siguientes muestras: A, 150 ug de homogenizado celular total; A, 150 ug de fracción de de Duve; C, 15 ug de extracto semipurificado de uricasa; D, 2 ug de uricasa electroeluida; E 2 ug de uricasa de cerdo (SIGMA) y F, marcadores de peso molecular (SIGMA).

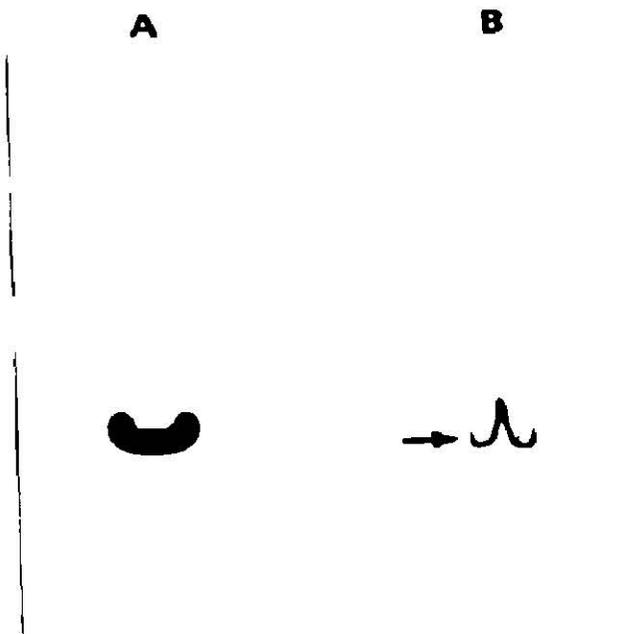


Figura 10. Electroforesis en acetato de celulosa. A, 1 ul de suero humano normal y B, 8 ug de uricasa pura.

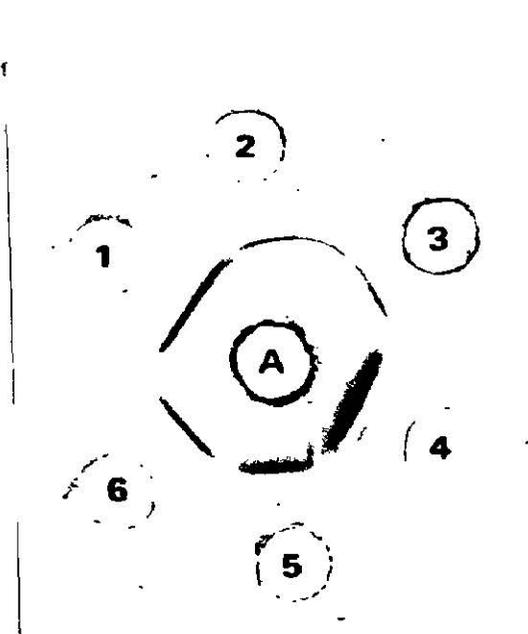


Figura 11. Análisis de doble inmunodifusión de sueros anti-uricasa de rata. Se usó como antígeno (A) uricasa electroeluida (4 μ g). En cada uno de los pozos 1-3 y 4-6 se colocaron 10 μ l de diluciones de dos diferentes sueros respectivamente. En 1 y 4 se colocó suero concentrado; en 2 y 5, dilución 1:2 y en 3 y 6 dilución 1:4.

cia de anticuerpos contra uricasa en los sueros utilizados. Con esta técnica se comprobó que los dos sueros poseían anticuerpos capaces de inmunoprecipitar uricasa. Posteriormente, por medio de la metodología del "ELISPOT" se seleccionó de entre los sueros obtenidos a aquél que presentó el título más alto de anticuerpos, esto es, aquél que con la máxima dilución pudo detectar la mínima cantidad de antígeno. En un ensayo de "ELISPOT" se logró la detección de hasta 1 ng del antígeno con una dilución del antisuero de 1:250 (fig. 12). El suero seleccionado corresponde al que se utilizó en la inmunodifusión que se muestra en la figura 11, pozos 1-3.

Como testigo negativo en este experimento se realizó un ELISPOT con suero no inmune y no se detectó señal positiva.

Como testigo negativo en este experimento se realizó un ELISPOT con suero no inmune y no se detectó señal positiva.

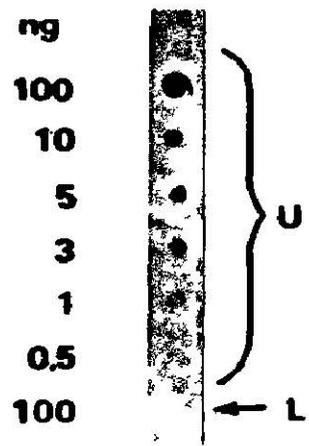


Figura 12. Titulación por "ELISPOT" del suero seleccionado para la inmunoelectrotransferencia revelado con el sistema de peroxidasa. En la figura, U corresponde a uricasa y L a lisozima (testigo negativo).

Determinación de especificidad y sensibilidad del antisuero.

Para analizar la especificidad de los anticuerpos y la posible presencia de otras proteínas en el antígeno utilizado en su producción, se realizó la inmunoelectroforesis cruzada (IEC). Para ello fue necesario determinar primeramente la cantidad óptima de antígeno (uricasa de rata electroeluida) a utilizar mediante pruebas de inmunoelectroforesis (IE) de cohete. En la figura 13 se muestra el resultado de una de las IE de cohete realizada con diferentes cantidades de antígeno. En ella se observa el aumento gradual del pico de inmunoprecipitación conforme se incrementa la cantidad de antígeno. La máxima cantidad aplicada a este gel fue de 6 µg, pero se optó por una cantidad ligeramente mayor para la IEC (8 µg) pues por efecto de la electroforesis en la primera

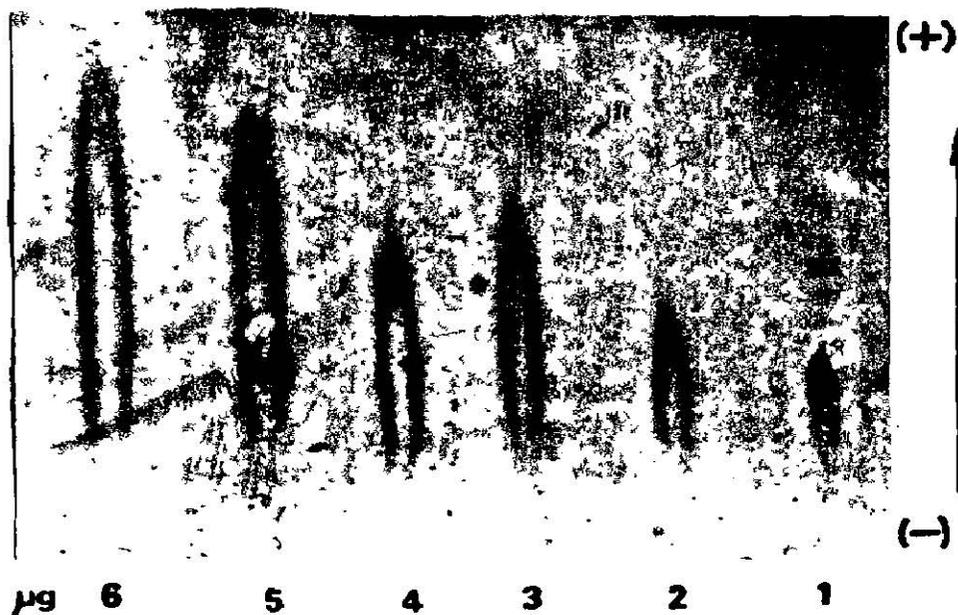


Figura 13. Inmunoelectroforesis de cohete. Se realizó con suero anti-uricasa y las cantidades de uricasa pura que se indican.

dimensión, la proteína entra al 2° gel en un frente más ancho, cosa que disminuye la altura del arco de precipitación. Posteriormente se realizó la IEC con la uricasa tal y como se obtiene de la electroelución, y se incluyó además en el mismo experimento una muestra de la uricasa electroeluida, pero disuelta en amortiguador de corrida con metanol al 20 %. Esto se hizo para remover el SDS de la proteína y así poder determinar si existía más de un polipéptido en el antígeno. De existir más de una proteína con el mismo tamaño pero diferente carga (cuyo efecto queda minimizado al ser cubiertas las proteínas por las cargas negativas del SDS), éstas se separarían en la primera dimensión, ya que la eliminación del SDS haría reaparecer el efecto de la carga eléctrica. Posteriormente, la inmunoprecipitación en el gel con los anticuerpos ayudaría a determinar su identidad. En ambos ensayos se obtuvieron arcos típicos de inmunoprecipitación únicos (fig. 14); aunque el obtenido con la muestra con metanol migró menos por razón de su menor carga negativa al estar desprovista del SDS. Estos resultados indican que el antígeno utilizado consiste de una sola proteína y por lo tanto indujo la producción de anticuerpos monoespecíficos.

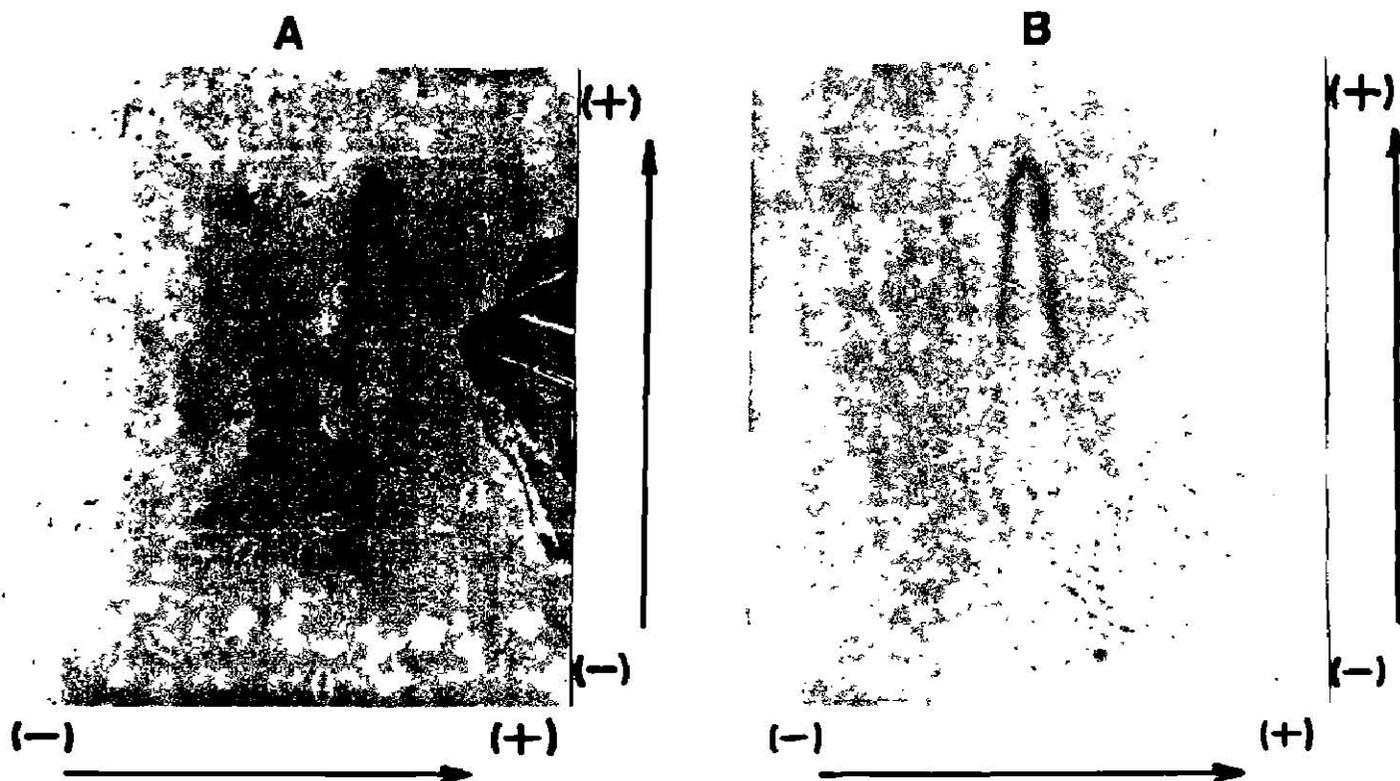


Figura 14. Inmunolectroforesis cruzada. Se realizó con suero anti-uricasa. Se aplicaron a los geles 8 ug de uricasa tal y como se obtiene de la electroelución (A) y otra muestra igual en metanol al 20% (B).

Al analizar la especificidad del antisuero en ensayos de inhibición de la actividad de la uricasa, se observó que el antisuero produce una disminución notable de la actividad específica de la enzima (fig. 15). Existe un incremento de la actividad enzimática aparente² con las cantidades iniciales de ambos sueros, aún por encima de la actividad inicial, seguido de una disminución marcada conforme se continúa la adición. Posterior a ese aumento y descenso descrito, la actividad de uricasa con el suero no inmune alcanza un nivel estacionario, mientras que la corres-

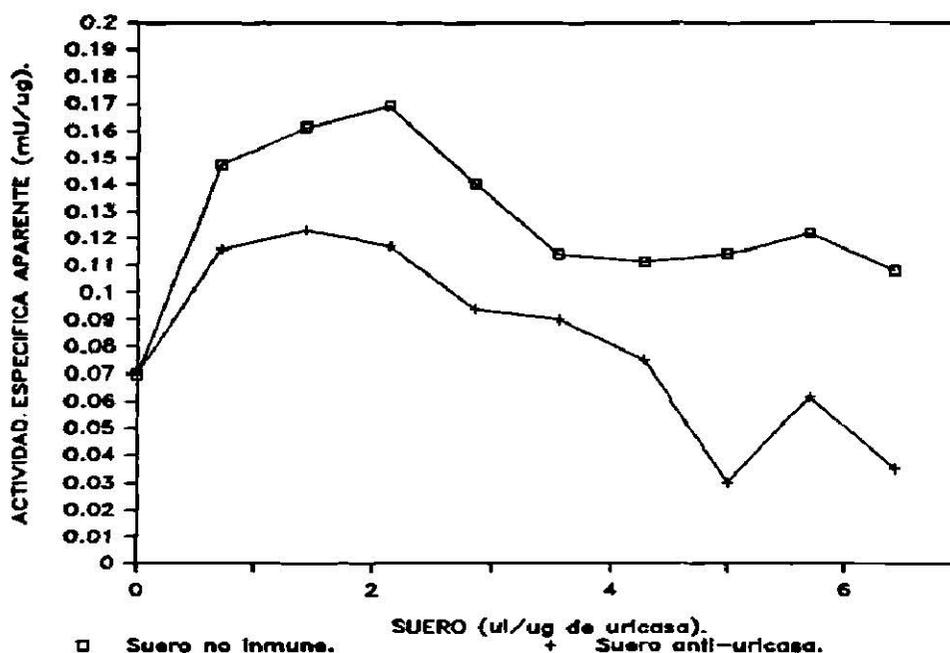


Figura 15. Inhibición de la actividad de uricasa por suero anti-uricasa.

pondiente al suero anti-uricasa desciende notoriamente tendiendo finalmente a una meseta. Es importante notar que en todos los puntos de la gráfica, los valores de la actividad con suero anti-uricasa son menores que sus contrapartes con suero testigo, y que se alcanza una considerable diferencia hacia el final de la curva. El comportamiento inicial refleja posiblemente dos factores de efectos opuestos que se presentan con la adición de los sueros. Es factible que el incremento aparente se deba a una "estabilización" de la enzima por efecto de la albúmina, que es la

². Actividad específica determinada después de la incubación con los sueros.

proteína de mayor abundancia en el suero y que se utiliza con ese fin en diversos ensayos enzimáticos. La disminución marcada que siguió a esa aparente estimulación de la actividad de uricasa, y que fue observada tanto con el suero inmune como con el no inmune, posiblemente se debe a la acción de proteasas o inhibidores presentes en el suero que pudieran inactivar de modo parcial a la uricasa. A pesar de las consideraciones anteriores es evidente que la uricasa sufre una inhibición de su actividad por reacción específica con los anticuerpos del suero anti-uricasa. Como se hizo notar previamente, la inhibición de la actividad de la uricasa con cantidades crecientes del antisuero tiende gradualmente a una meseta, en la que el incremento de suero produce un incremento cada vez menor en la inhibición. Este comportamiento corresponde a los valores cercanos a 6 μ l de suero por μ g de uricasa. Tal fenómeno parece aclararse si se considera que los anticuerpos están dirigidos contra la proteína desnaturalizada y por lo tanto no necesariamente deberían inhibir totalmente la actividad de la proteína nativa. Es probable que aún llegando a la saturación de todos los determinantes antigénicos que en la proteína nativa es capaz de reconocer el antisuero, el efecto inhibitorio sea sólo parcial, por lo que el incremento de la cantidad de antisuero después del punto de saturación no produce efectos inhibitorios adicionales.

Determinación de sensibilidad de la inmunolectrotransferencia.

Después de los experimentos de caracterización de los antisueros, se realizó una prueba destinada a determinar los límites de sensibilidad de la inmunolectrotransferencia con el antisuero seleccionado. Se aplicaron a un gel de poliacrilamida-SDS cantidades seriadas de uricasa de rata electroeluida. Se transfirieron a filtro de nitrocelulosa y posteriormente se realizó el inmunoensayo con el revelado basado en la reacción cromogénica de la peroxidasa. Con este método fue posible detectar hasta 3 ng del antígeno (Fig. 16), y además de la banda de 32 kd correspondiente

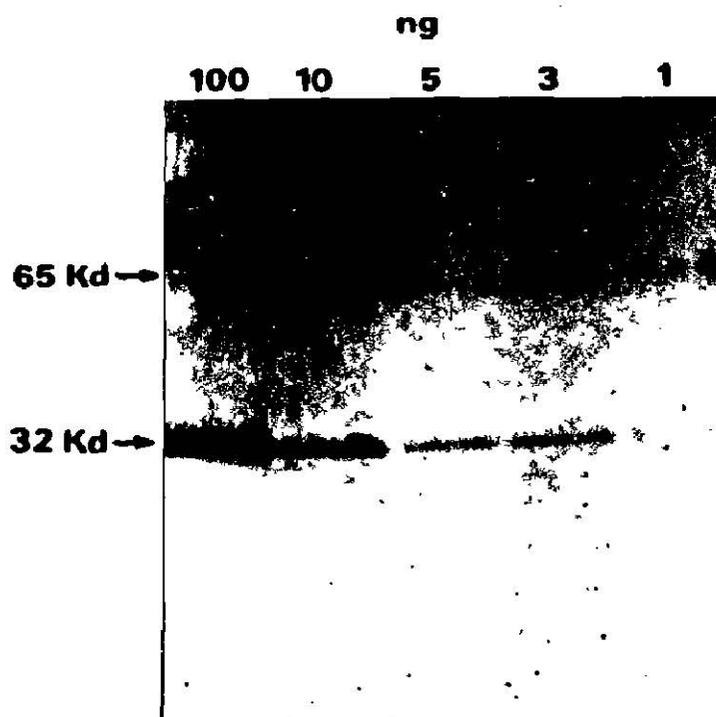


Figura 16. Titulación del suero anti-uricasa por inmuno electrotransferencia. Se realizó con el sistema de revelado de la peroxidasa y con las cantidades indicadas de uricasa.

al peso de las subunidades de la uricasa, se observó una banda de aproximadamente 65 Kd, cuya naturaleza se discute posteriormente.

Un requisito importante para la confiabilidad de los resultados obtenidos en el presente estudio, lo constituye la monoespecificidad del antisuero utilizado. A pesar de que el antisuero detectó en la muestra de uricasa pura una banda de aproximadamente 65 Kd, en adición a la de 32 Kd correspondiente al peso de las subunidades de uricasa (fig. 16), puede sostenerse aún la noción de monoespecificidad, en función de que: a) se utilizó como inmunógeno un péptido puro de 32 Kd como lo prueba el análisis electroforético en geles de poliacrilamida-SDS y acetato de celulosa; b) se obtuvieron arcos únicos de inmunoprecipitación en la inmunolectroforesis cruzada, aún y cuando el antígeno fue tratado con metanol para remover el SDS y c) el antisuero obtenido es capaz de inhibir la actividad de la uricasa hasta en un 40% con respecto a un suero testigo.

Una explicación a la inmunorreactividad de la banda de 65 Kd

es que ésta se haya originado por reasociación de dos subunidades de la enzima, para constituirse en un dímero cuyo peso molecular correspondería al observado para la banda en cuestión. Esta idea se sustenta en el hecho de que al purificar el péptido de 32 Kd por electroelución de un gel de poliacrilamida-SDS, almacenarlo en congelación y posteriormente aplicarlo a otro gel para un ensayo de inmunoelectrotransferencia, se obtiene nuevamente la forma de 65 Kd (fig. 16). Este fenómeno ha sido observado también con la uricasa nódulo-específica del frijol (43). Por otro lado, en ensayos con uricasa de cerdo, se ha demostrado que la enzima es relativamente resistente a la acción de agentes desnaturalizantes como el SDS y clorhidrato de guanidina (44), lo que hace factible la existencia de fuerzas hidrofóbicas tales que faciliten la reasociación de dos o más subunidades en agregados estables.

Obtención de extractos de hígado.

Para el análisis comparativo de las uricasas de diferentes especies de vertebrados, se obtuvieron extractos de hígado de especies de todas las Clases del Phylum, a los que se les determinó la actividad específica de la uricasa por la medición de la actividad de la enzima y la concentración de proteínas.

Se observó un notable incremento en la actividad específica de la enzima con la obtención de la fracción de de Duve a partir de los extractos totales. Este paso de enriquecimiento de uricasa en los extractos, causó un incremento concomitante en la señal generada por la reacción uricasa-antiuricasa en la inmunoelectrotransferencia, como lo muestra la figura 17 con los extractos de hígado de rata. En la Tabla 2 se muestran las actividades específicas de uricasa de todos los extractos realizados.

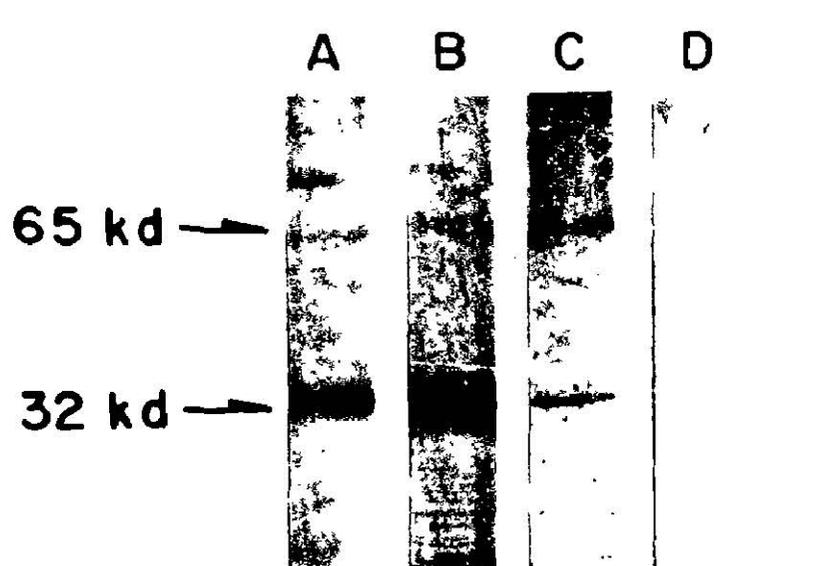


Figura 17. Caracterización del suero anti-uricasa de rata por inmunolectrotransferencia de extractos de hígado de rata. Después de separar las muestras en un gel de poliacrilamida-SDS y transferirlas a nitrocelulosa, se realizó el inmunoensayo con el sistema de la peroxidasa. Las muestras son: A, homogenizado total (200 μ g); B, fracción de de Duve (200 μ g); C, uricasa pura (5 ng) y D, fracción de de Duve de pulmón de rata (200 μ g).

Tabla 2. Actividad específica de uricasa en los extractos de hígado de las especies analizadas.

Muestra de hígado	Actividad específica (U*/mg x 10 ⁻³)**.	
	Extracto total	Fracción de de Duve
besugo	8.7	56.2
bagre	13.4	41.6
carpa	18.7	55.7
tilapia	15.8	45.0
rana	1.0	3.4
rata	5.5	21.4
macaco	---	2.6

*U es igual a la cantidad de enzima que degrada 1 μ mol de ácido úrico por minuto en amortiguador de boratos (pH 9) con una concentración del sustrato de 100 mM.

**Los resultados son la media de los valores obtenidos de tres ejemplares de cada especie analizados, con excepción del macaco del que se analizó sólo un ejemplar. Con las muestras de tortuga, paloma, pollo y humano se obtuvieron resultados negativos que no se incluyen en la tabla y que concuerdan con los antecedentes existentes para esas especies.

Estudios comparativos de las uricasas de vertebrados.

Una vez seleccionado y titulado el antisuero y habiendo obtenido los extractos de hígado de las especies por estudiar, se procedió al análisis por inmunoelectrotransferencia de esas muestras. Cuando se analizaron los extractos de hígados de peces, de la rana y del macaco, se observó reacción positiva con bandas de aproximadamente 32 Kd, y al igual que en el ensayo con uricasa de rata, también se hizo evidente la banda de 65 Kd (fig. 18). En ensayos similares con extractos hepáticos de aves y reptiles, no se observó reacción alguna (resultados no mostrados). Estas observaciones coinciden con la conocida ausencia de actividad de uricasa en estas clases de vertebrados.

Estos resultados constituyen también un apoyo a la explicación del origen de la banda de 65 Kd, pues, de modo uniforme, aparece sólo en las muestras de aquéllas especies que poseen uricasa y que presentan también reacción positiva con el péptido de 32 Kd. Aún más, la banda de 65 kd no aparece en el testigo negativo (extracto de pulmón de rata).

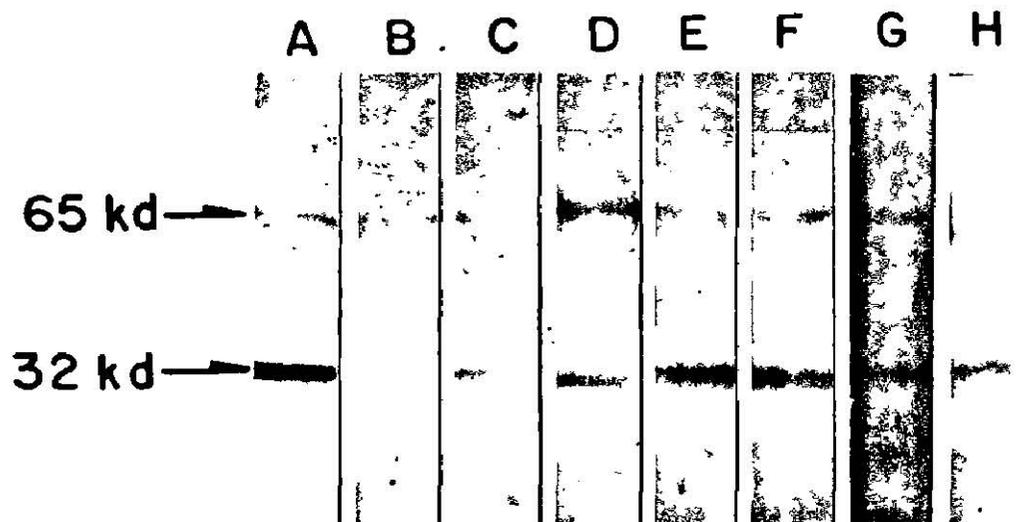


Figura 18. Análisis comparativo por inmunoelectrotransferencia de las fracciones de de Duve de hígados de diferentes vertebrados. Se realizó la inmunotransferencia con el sistema de revelado de la peroxidasa. Las muestras (200 µg de c/u) son: A, rata; B, testigo negativo (pulmón de rata); C, carpa; D, bagre; E, vesugo; F, tilapia; G, rana y H, macaco. Los resultados mostrados en esta figura son representativos de experimentos diferentes, que incluyeron siempre muestras de hígado y pulmón de rata como testigo positivo y negativo respectivamente.

El hecho de que los anticuerpos anti-uricasa de rata muestren reacción cruzada con la uricasa de vertebrados de otras clases como peces, rana y macaco sugiere un origen evolutivo común para esas enzimas, pues para que ésta sea posible se requiere que las proteínas posean un grado de similitud en sus secuencias de aminoácidos que puede ser explicada satisfactoriamente sólo por provenir de un ancestro común. Además de la inmunorreactividad cruzada, existen otras similitudes entre estas uricasas que refuerzan la idea de homología y son: 1) idéntica localización tisular, 2) misma compartimentalización subcelular, 3) pesos moleculares muy similares (tanto en su forma nativa como en su forma desnaturalizada) y 4) solubilidad máxima y óptima actividad enzimática óptima en medios alcalinos cercanos al pH 9 (20). Por otro lado, es de esperarse que la uricasa, como otras enzimas de importancia en el metabolismo, debería mostrar conservación evolutiva, si, como se ha propuesto (45), la velocidad de evolución de las proteínas está condicionada por la importancia de su función.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Fujiwara, y colaboradores (24), quienes usando anticuerpos contra la uricasa nativa de Rana catesbeiana en ensayos de doble inmunodifusión en gel, lograron detectar reacción cruzada con las uricasas de otros anfibios; mas no con las de peces o mamíferos. Tal discrepancia es explicable a la luz de los resultados de los trabajos realizados por Prager y Wilson (46, 47). Estos investigadores concluyeron, realizando pruebas de microfijación de complemento, que la reacción inmunológica cruzada es posible entre proteínas nativas que difieren en no más de 40% en sus secuencias aminoácidas; por lo que la carencia de inmunorreactividad cruzada no puede tomarse como indicio de no homología.

Los hallazgos de inmunorreactividad cruzada entre uricasas de peces, anfibios y mamíferos descritos en este trabajo, constituyen la primera demostración de este fenómeno entre uricasas de especies evolutivamente distantes. Esto es atribuible a la alta sensibilidad del método utilizado en el presente trabajo, en comparación con el empleado por Fujiwara y colaboradores. Otro fac-

tor de importancia en la detección de inmunorreactividad, lo constituye el haber utilizado anticuerpos que fueron producidos contra la uricasa de rata en su forma desnaturalizada. Resulta muy probable que en esta conformación, la uricasa haya expuesto al sistema inmune de los conejos un mayor número de determinantes antigénicos en comparación con la proteína nativa. Estos nuevos epitopes, que normalmente se encuentran ocultos en la parte interna hidrofóbica de la molécula, forman parte de la región en las proteínas que mayor estabilidad evolutiva presenta (46). Por lo anterior, el uso del antígeno en su forma desnaturalizada resultó en la producción de un antisuero que favoreció el estudio comparativo de las uricasas de vertebrados.

Búsqueda en el humano de proteínas homólogas a la uricasa.

Tal como se estableció en los antecedentes, los estudios previos relacionados a la búsqueda de la uricasa en el humano y el resto de los hominoideos, se han enfocado sólo en la detección de la actividad de la enzima; sin embargo, los avances en biología molecular han revelado la existencia de múltiples niveles durante el flujo de la información genética en los que las mutaciones pueden inactivar a los genes. Con esta consideración, se puede decir que la ausencia de la actividad de la enzima no excluye la posibilidad de la existencia de una forma inactiva de uricasa producto de un gen mutante. Para averiguar si el humano poseía algún producto proteico inactivo relacionado a la uricasa se analizaron por inmunoelectrotransferencia extractos de hígados humanos fetales y adultos, empleando para ello el sistema inmunoenzimático de la peroxidasa. En estos experimentos se observaron bandas que por su baja intensidad no fueron atribuidas a reacción inmuno-específica (fig. 19), y para descartar la posibilidad de que fueran artefactos del ensayo o producto de inespecificidad, se utilizó el sistema de detección de la fosfatasa alcalina con una sensibilidad de hasta 50 pg en un ELISPOT, es decir,

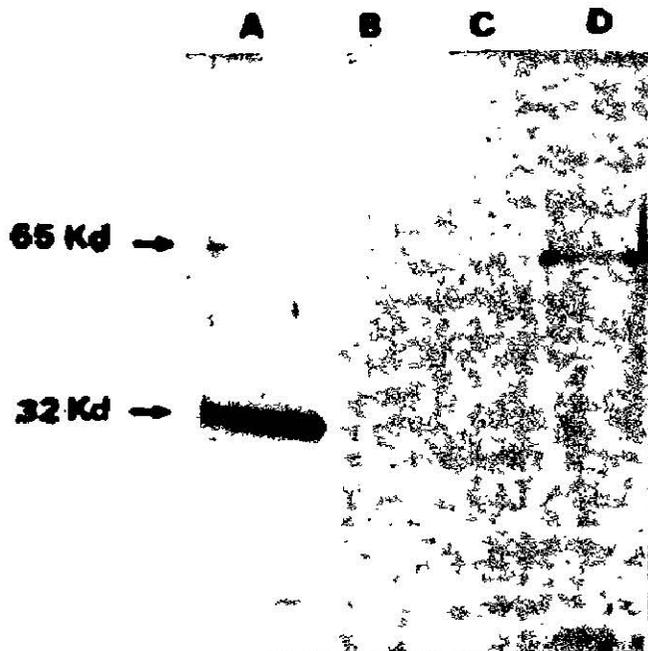


Figura 19. Análisis de las fracciones de de Duve de hígado humano fetal y adulto. Las siguientes muestras (200 µg c/u) fueron procesadas por inmunoelectrotransferencia con el sistema de revelado de la peroxidasa: A, hígado de rata; B, pulmón de rata; C, hígado humano fetal y D, hígado humano adulto.

veinte veces más sensible que la reacción con peroxidasa (fig. 20). En la figura 21 se observa el resultado de la inmunoelectrotransferencia con fosfatasa alcalina donde es clara la ausencia de bandas de reacción positiva. En la parte superior de los carriles aparece una banda que no parece ser específica pues aparece también en el testigo negativo (carril 2) y en las zonas entre carriles. Estos resultados indican, al menos dentro de los límites de sensibilidad del método utilizado, que en el humano no existe alguna

proteína evolutivamente relacionada con la uricasa. Si en el humano se produjera alguna forma inactiva de uricasa, ésta guardaría, muy probablemente, similitud estructural estrecha con la uricasa de macaco. Como el antisuero utilizado es capaz de reconocer a esta última, aún con el sistema de revelado de la peroxidasa, resulta muy probable entonces, que de estar presente la uricasa inactiva en el humano, ésta sería detectada utilizando el poderoso método de revelado de la fosfatasa alcalina. Estos resultados concuerdan con la ausencia de actividad de uricasa en el humano informada previamente y corroborada en este trabajo, y sugieren que el evento mutacional que dió por resultado la actual



Figura 20. Titulación por "ELISPOT" del suero anti-uricasa con el sistema de revelado de la fosfatasa alcalina. En la figura se muestran las cantidades de uricasa pura aplicadas al filtro de nitrocelulosa.

ausencia de uricasa en el humano no permite la producción de un RNA mensajero traducible. Esta ausencia pudo resultar de la pérdida del gen que codifica para la uricasa o de una mutación regulatoria que haya bloqueado su transcripción.

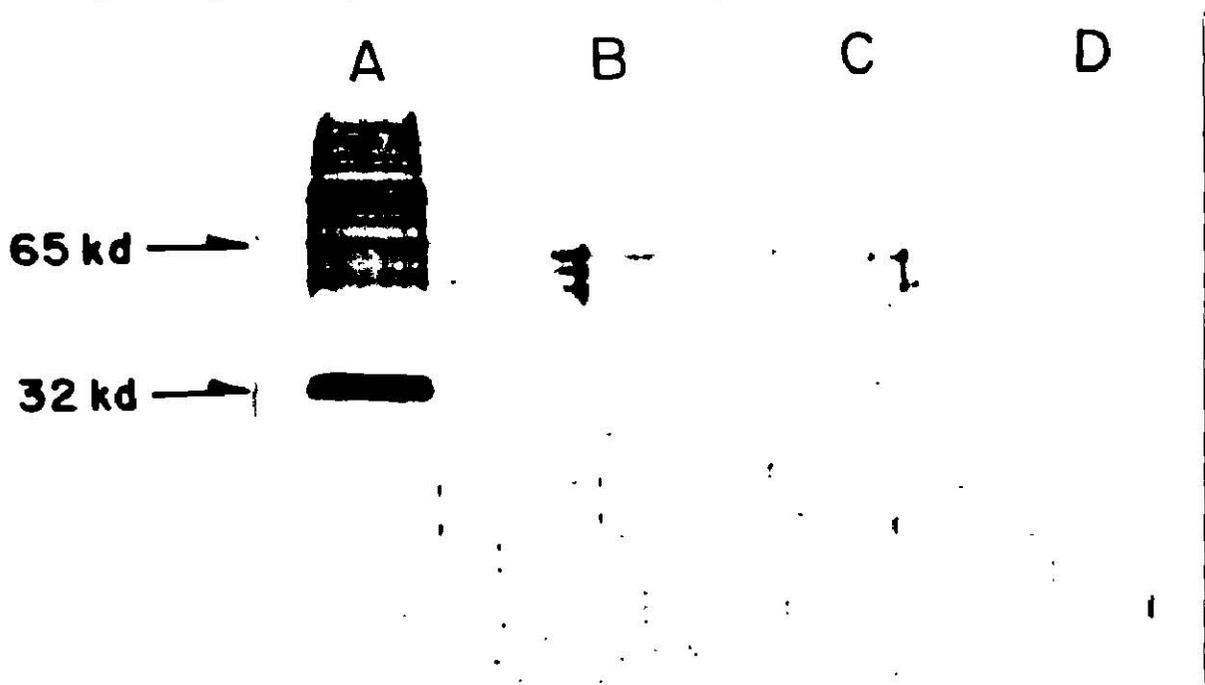


Figura 21. Análisis de las fracciones de de Duve de hígado humano por inmunolectrotransferencia con el revelado de fosfatasa alcalina. Las muestras son: A, hígado de rata (9 µg); B, pulmón de rata (200 µg); C, hígado humano fetal (370 µg) y D, hígado humano adulto (390 µg).

Recientemente, Lee y colaboradores (48), lograron la clonación molecular del DNA complementario al RNA mensajero para la uricasa porcina. Al utilizar éste como sonda para analizar DNA humano por la técnica de Southern (49) obtuvieron resultados que demuestran que en el genoma humano existen secuencias homólogas a las del gen de la uricasa de cerdo. Sin embargo un análisis similar practicado a los RNAs de hígado humano, no reveló señal positiva alguna, descartando la expresión de esas secuencias génicas homólogas a las del gen para la uricasa de cerdo. Esta evidencia apunta hacia la idea de que el supuesto evento mutacional propuesto por Friedman y colaboradores como causa del silenciamiento del gen de la uricasa en hominoideos, consistió de una mutación que impide su expresión.

Implicaciones evolutivas de la pérdida de la uricasa en los hominoideos.

La mutación causante de la inactivación de la uricasa en los hominoideos ha contribuido de modo determinante en el incremento de los niveles de ácido úrico en la sangre, que en el humano alcanzan valores cercanos a los de saturación. Sabido es que como consecuencia de esta acumulación de ácido úrico, el humano está predispuesto a padecer gota, síndrome de Lesh-Nyhan y otras afecciones asociadas con hiperuricemia (50). Sin embargo, a pesar de este efecto adverso, se ha demostrado que el ácido úrico es un poderoso antioxidante y captador de radicales libres (13,14), cuyas propiedades y altos niveles plasmáticos, lo constituyen en el principal antioxidante en el humano (12). Con base en ello es lógico pensar que al disminuir los daños causados por los radicales libres en macromoléculas estructurales, funcionales e informacionales, el ácido úrico contribuyó a reducir la incidencia de cáncer y a aumentar el promedio de vida del humano (12,51). Es pues, ésta, una posible explicación a la fijación de la mutación que hizo a nuestra especie perder la actividad de la uricasa.

Finalmente, resulta interesante considerar otro aspecto relevante en la evolución de los primates; a saber, la posible relación entre la pérdida de la capacidad de síntesis del ácido ascórbico en el ancestro de los antroppoideos (52,53) y la pérdida de la uricasa en los hominoideos (10). Dado que el ácido ascórbico es otro antioxidante de importancia y su síntesis se vió impedida al perder nuestros ancestros la capacidad de producir L-gulonolactona oxidasa (53), el aumento del ácido úrico posiblemente compensó, al menos parcialmente, la deficiencia del ascorbato como protector contra radicales libres (12,51).

La conceptualización del ácido úrico como un compuesto que juega un papel benéfico, aunque haya sido considerado tradicionalmente como producto de desecho, coincide con ideas recientes sobre la participación de ciertos productos metabólicos de desecho en importantes mecanismos de protección (54). Un buen ejemplo de lo anterior es el caso de la bilirrubina, producto final del catabolismo de las hemoproteínas, cuyos niveles aumentados son,

de modo similar que con el ácido úrico, condición necesaria para varias patologías; pero que posee además, propiedades antioxidantes notables (54).

Al igual que con otros sistemas biológicos que comparten funciones similares, es factible establecer relaciones entre los mecanismos antioxidantes, ya sean enzimáticos o mediados por metabolitos. El conocimiento de esos nexos, conllevaría a reconsiderar los sistemas antioxidantes de protección contra radicales libres y a clarificar sus implicaciones en la evolución de los organismos que los poseen.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Por los resultados obtenidos se puede concluir que las uricasas de las especies estudiadas guardan relaciones de homología entre sí, fenómeno que bien podría extenderse a las uricasas del hígado de todos los vertebrados que poseen esta enzima. Los resultados de inmunorreactividad cruzada sugieren además que la uricasa es una enzima cuya estructura primaria está bien conservada al través de la evolución de los vertebrados.

Con respecto a los análisis hechos con muestras humanas, se concluye que el humano no posee, ni en el estadio fetal, ni en el adulto, alguna proteína evolutivamente relacionada a la uricasa del hígado de otros mamíferos .

Los conocimientos hasta ahora obtenidos, hacen suponer que si bien el evento causante de la pérdida de la actividad de la uricasa en los hominoideos, no causó la pérdida del gen que codifica para esa enzima; ha dado lugar a un gen inactivo en transcripción, que por lo tanto no produce una proteína semejante a la uricasa. Sin embargo, aún no es posible determinar cuál fue la causa del silenciamiento del gen, que no obstante puede ser considerada como una mutación de consecuencias favorables para el humano.

Estudios como el presente que abarquen a todas las especies de ese grupo de primates, el análisis detallado de las secuencias detectadas por Lee y colaboradores en el humano y su búsqueda en el resto de los hominoideos, sería una gran contribución a la comprensión de las bases moleculares involucradas en la pérdida de la actividad de uricasa al través de la evolución de los simios y el humano.

Por otro lado, el estudio de la fisiología comparada de los mecanismos de reducción de los radicales libres, entre los que se involucran enzimas como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y compuestos antioxidantes como ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina, β -caroteno y tocoferol (51,54) representa un importante campo con implicaciones evolutivas evidentes.

Literatura citada.

- 1.- Grant, V.. 1977. Organismic evolution. W. H. Freeman and Co. San Francisco. pp. 30-31.
- 2.- Kimura, M.. 1983. The neutral theory of molecular evolution. En: Evolution of genes and proteins. M. Nei y R. K. Kohen (Eds.). Sinauer Associates Inc. Mass. pp 209-233.
- 3.- Otha, J. y M. Kimura. 1971. Functional organization of genetic material as product of molecular evolution. Nature 233: 118-119.
- 4.- Wilson, A. C.. 1985. The molecular basis of evolution. Sci. Am. 253(4): 148-157.
- 5.- Lewin, R. 1988. Molecular clocks turn a quarter century. Science. 239: 561-563.
- 6.- Zuckerlandl, E.. 1987. On the molecular evolutionary clock. J. Mol. Evol. 26: 34-46.
- 7.- Zuckerlandl, E. and L. Pauling. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Evolving genes and proteins, V. Bryson and H. J. Vogel (eds.). Academic press, New York, pp. 97-116.
- 8.- Darnell, J.; H. Lodish y D. Baltimore. 1986. Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. W. H. Freeman and Co.. pp. 465-515.
- 9.- Kimura, M.. 1985. The role of compensatory neutral mutations in molecular evolution. J. Genet. 64(1): 7-19.
- 10.- Friedman, T. B.; G. E. Polanco; J. Appold y J. E. Mayle. 1985. On the loss of uricolytic activity during primate evolution. I. Silencing of urate oxidase in a hominoid ancestor. Comp. Biochem. Physiol. 81B: 653-659.
- 11.- Drowan, E.. 1955. The origin of man. Nature 175: 683-684.
- 12.- Ames, B. N.; R. Cathcart; E. Schwiers y P. Hochstein. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical caused aging and cancer: a hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 6858-6862.
- 13.- Meadows, J.; R. C. Smith y J. Reeves. 1986. Uric acid protects membranes and linolenic acid from ozone induced oxidation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137: 536-541.
- 14.- Davies, K. J. A.; A. Sevanian; S.F. Muakkassah-Kelly y P. Hochstein. 1986. Uric acid-iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. Biochem. J. 235: 747-754.

- 15.- Baum, B.; G. Hubster y H. R. Mahler. 1956. Studies on uricase. II. The enzyme-sustrate complex. Biochem. Biophys. Acta 22: 514-527.
- 16.- Goldman, B. M. y G. Blobel. 1978. Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5066-5070.
- 17.- Badhuin, P.; H. Beaufay y C. de Duve. 1975. Combined biochemical study of particulate fractions from rat liver. J. Cell. Biol. 26: 219-243.
- 18.- Hruban, Z. y M. Rechcigl, Jr.. 1969. Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry and physiology. International review of citology. Academic Press Inc., N. Y.. 149-159.
- 19.- Truszkowski, R., 1930. CXLVIII. Uricase and its action. IV. Preparation and properties of ox-kidney uricase. Biochem. J. 24: 1359-1370.
- 20.- Kinsella, J. E.; B. German y J. Shetty. 1985. Uricase from fish liver: isolation and some properties. Comp. Biochem. Physiol. 82B: 621-624.
- 21.- Truszkowski, R. y C. Glodmanowna. 1933. LXXXI. Uricase and its action. VI. Distribution in various animals. Biochem. J. 27: 612-614.
- 22.- Wells, H. G. y G. T. Caldwell. 1914. The purine enzymes of the orang-utan (Simia satirus) and chimpanzee (Anthropopithecus troglodytes). J. Biol. Chem. 18: 157-164.
- 23.- Sorensen, L. B.. 1959. Degradation of uric acid in man. Metabolism. 13:687-703.
- 24.- Fujiwara, S.; H. Ohashi y T. Noguchi. 1987. Comparision of intraperoxisomal localization form and properties of amphibian (Rana catesbeiana) uricase with those of other animal uricases. Comp. Biochem. Physiol. 86B (1): 23-26.
- 25.- Afzelius, B. A.. 1975. The occurrence and structure of microbodies. J. Cell. Biol. 26: 835-843.
- 26.- Shnitka, T. K.. 1966. Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity. J. Ultrastruc. Res. 16: 598-625.
- 27.- Watanabe, T.; T. Suga y H. Hayashi. 1977. Studies on peroxisomes. VIII. Evidence for framework protein of the cores of rat liver peroxisomes. J. Biochem. 82: 607-609.

- 28.- de la Iglesia, F. A.; E. A. Porta y W. S. Hartrof. 1966. Histochemical urate oxidase activity and microbodies in nonhuman primate liver. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 685-687.
- 29.- Biempica, L.; S. Gutstein e I. M. Arias. 1967. Morphological and biochemical studies of begining recurrent cholestasis. *Gastroenterology* 52: 521-525.
- 30.- Towbin, H.; T. Staehelin y J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 76: 4350-4354.
- 31.- Coomes, M. W. y T. E. Smith. 1987. The use of immunoblotting to study mutant enzymes. *Biotechniques* 5(4): 354-360.
- 32.- Watanabe, T. y T. Suga. 1978. A simple method for rat liver urate oxidase. *Anal. Biochem.* 89: 343-347.
- 33.- de Duve, C.; B. C. Pressman; R. Gianeto; R. Wattiaux y F. Appelmanns. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60: 604-617.
- 34.- Priest, D. G. y D. M. Pitts. 1972. Reaction intermediate effects on the spectrophotometric uricase assay. *Anal. Biochem.* 50: 195-205.
- 35.- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 183: 265-276.
- 36.- Larson, E.; B. Howlett y A. Jagendorf. 1986. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination. *Anal. Biochem.* 155: 243-248.
- 37.- Laemmli, U. K.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 38.- ISCO Applications bulletin. Isco Inc. Nebraska. No. 42.
- 39.- Kohn, J.. 1973. *Clin. Chim. Acta.* 2:297.
- 40.- Monroe, D.. 1985. The solid-phase enzyme-linked immunospot assay: current and potential applications. *BioTechniques.* 222-229.*
- 41.- Laurell, C. B.. 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* 10: 358-361.

- 42.- Clarke, H. G. M. y T. Freeman. 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. *Clin. Sci.* **35**: 403-413.
- 43.- Sánchez-Flores, F.. Comunicación personal.
- 44.- Pitts, O. M.; D. G. Priest y W. W. Fish. 1974. Uricase. Subunit composition and resistance to denaturants. *Biochemistry* **13**: 888-892.
- 45.- Kimura, M.. 1979. The neutral theory of molecular evolution. *Sci. Am.* **241**: 94-104.
- 46.- Prager, E. M. y A. C. Wilson. 1971. The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. I. Microcomplement fixation studies. *J. Biol. Chem.* **246**: 5978-5989.
- 47.- Prager, E. M. y A. C. Wilson. 1971. The dependence of immunological cross-reactivity upon sequence resemblance among lysozymes. II. Comparison of precipitin and microcomplement fixation results. *J. Biol. Chem.* **46**: 7010-7017.
- 48.- Lee, C. C.; X. W. Wu; R. A. Gibbs; R. G. Cook; D. M. Muzny y C. T. Caskey. 1988. A novel procedure for generating cDNA probes directed by amino acid sequence: cloning of Urate Oxidase. *Science*, **239**: 1288-1291.
- 49.- Southern, E. M.. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- 50.- Wyngaarden, J. B.. 1983. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. En: *The metabolic basis of the inherited disease*, R. S. Laufer, E. Warren y Donna McIvor (Eds.). McGraw-Hill, Inc., N. Y., pp 1043-1114.
- 51.- Ames, B. N.. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, **221**: 1256-1264.
- 52.- Chatterjee, I. B.. 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, **182**: 1271-1272.
- 53.- Sato, P. y S. Udenfriend. 1978. Scurvy-prone animals, including man, monkey and Guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch. Bioch. Biophys.* **187(1)**: 158-162.
- 54.- Stoker, R.; Y. Yamamoto; A.F. McDonagh; A. N. Glazer y B.N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance. *Science*, **235**: 1043-1046.
- 55.- Leone, E.. 1955. *Methods in enzymology*. **2**: 485.

- 56.- Noguchi, T.; Y. Takada y S. Fujiwara. 1979. Degradation of uric acid to urea and glioxylate in peroxisomes. J. Biol. Chem. 254: 5272-5275.
- 57.- Larsen, K. y B. U. Jochimsen. 1986. Expression of nodule specific uricase in soybean callus tissue is regulated by oxygen. EMBO J. 5: 15-19.
- 58.- Mahler, J. L.. 1970. A new bacterial uricase for uric acid determination. Anal. Biochem. 38:65-84.
- 59.- Lehninger, A. L.. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., New York. pp.634-636.

