

Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) Cuernavaca,
Morelos.

Maestría en Ciencias de Salud Pública con área de
concentración en Enfermedades Infecciosas.

Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas
(CISEI)

**Para obtener de grado de Maestría en Ciencias se
presenta la tesis:**

“Obtención de anticuerpos monoclonales contra la proteína
HP0537 de *Helicobacter pylori* de la cepa 26695”

Alumno: QFB Rafael Torres Montiel

Director de Tesis: Dr. Germán R. Aguilar Gutiérrez

Asesor: Dra. María Del Carmen Rodríguez Gutiérrez

Asesor: Dra. Yolanda López Vidal

Agradecimientos:

Por el apoyo técnico:

Laboratorio 3 Planta Baja INSP-CISEI

Dr. Germán R. Aguilar Gutiérrez
(Director de tesis)

QI. Sara Y. Bahena Reyes

Biol. Ruth Morales Corona

Biol. Luis A. Toledo Clements

Biol. Adriana Orozco Salgado

Dra. Norma Angélica Galicia (L5PA
INSP-CISEI)

M en C. Rocío S. Argotte Ramos
(L1PB INSP-CISEI)

Departamento de Microbiología y
Parasitología UNAM

QFB. Karen Flores Moreno

QFB. María Fernanda Cornejo
Granados

Asesores:

Dra. María del Carmen Rodríguez
Gutiérrez

Dra. Yolanda López Vidal

Jurado:

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Dra. Margarita Camorlinga Ponce

Dra. Carmen Maldonado Bernal

Dr. Marcos Flores Encarnación

A todos y cada uno de mis familiares que me apoyaron, pero en especial a mis padres y hermanos:

Mi padre: Ing. Rafael Torres Nolasco

Mi madre: Sra. Ma. Lilia Montiel Cortés

Hermano: Ing. Joel Torres Montiel

Hermana: Lic. Claudia Torres Montiel

Compañeros de generación de maestría “Los Infecciosos”:

Prisma Paredes, Miguel A. Ortiz, Luz E. Ochoa, Lillian Mejía y Perla Tinoco

Financiamiento:

A CONACYT por la beca que se me otorgó para la manutención y estancia en la ciudad de Cuernavaca, Morelos

Al Proyecto: CONACYT V51136-M

Índice

1. Resumen.....	Página 1
2. Abstract.....	Página 3
3. Introducción.....	Página 5
3.1 Aspectos microbiológicos.....	Página 6
3.2 Epidemiología de la infección.....	Página 6
3.3 Factores de virulencia y patogenicidad de <i>H. pylori</i>	Página 8
3.4 Características de <i>cag</i> -PAI.....	Página 9
3.5 Características del Sistema de secreción tipo IV (T4SS).....	Página 11
3.6 Importancia de la generación de Anticuerpos Monoclonales en la caracterización de moléculas efectoras.....	Página 14
4. Planteamiento del problema.....	Página 18
5. Justificación.....	Página 18
6. Hipótesis.....	Página 18
7. Objetivos.....	Página 19
8. Material y método.....	Página 19
8.1 Clonación del gen <i>hp0537</i> en un vector de expresión.....	Página 20
8.2 Producción y Purificación de proteína recombinante HP0537.....	Página 23
8.3 Inmunización de ratones BALB/C.....	Página 28
8.4 Obtención de anticuerpos monoclonales.....	Página 29
8.5 Tamizaje de anticuerpos monoclonales.....	Página 30
9. Resultados.....	Página 37

10. Discusión.....	Página 52
11. Conclusiones.....	Página 58
12. Bibliografía.....	Página 59
13. Anexo: Tamizaje de anticuerpos por ELISA	

1. Resumen

Las cepas de *H. pylori* que contienen la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), están asociadas al desarrollo de enfermedades gástricas graves.

cagPAI tiene un tamaño aproximado de 40 kb y codifica para 32 proteínas; entre las que se encuentran aquellas que constituyen un sistema de secreción tipo IV (T4SS) y la proteína asociada a la citotoxina (CagA).

El T4SS es utilizado por *H. pylori* para translocar a CagA hacia el interior de las células blanco, en donde actúa como intermediaria en diversas vías de señalización, resultando en la activación de promotores de citocinas pro-inflamatorias, procesos mitogénicos y antiapoptóticos, así como la destrucción de uniones intercelulares.

De las 32 proteínas codificadas en *cagPAI*, 14 son esenciales para la translocación de CagA y la inducción de IL-8 por la célula hospedera. 10 de éstas han sido caracterizadas, y se sabe que son homologas a proteínas del sistema VirB/D del T4SS de *A. tumefaciens*, las otras 4 (HP0537, HP0522, HP0541 y HP0531) no se les ha asignado función. Un análisis bioinformático previo, realizado por nuestro grupo de investigación, ha determinado que 3 de éstas 4 proteínas (HP0537, HP0541 y HP0522) tienen homología a proteínas VirB5 de otras especies, incluyendo la reportada en *H. pylori* (HP0539).

La proteína HP0537 consta de 376 aminoácidos, y tiene un peso molecular de 44 Kda. Tras la clonación del gen *hp0537* en *E. coli* BL-21, se indujo la expresión de la proteína HP0537 encontrada en la fracción insoluble del lisado celular, esta fracción fue empleada para la obtención de proteína recombinante enriquecida.

La proteína HP0537 enriquecida fue empleada como inmunógeno para la obtención de anticuerpos anti-HP0537 en ratones BALB/C; Se obtuvieron 15 hibridomas capaces de generar anticuerpos monoclonales, que son sensibles para la detección de la proteína HP0537. De estos 15 hibridomas, al menos 7 son capaces de generar anticuerpos monoclonales, que no dan reacción cruzada con ninguna otra proteína expresada en *H. pylori*, incluyendo a otras

proteínas homologas a VirB5 (HP0522, HP0541 y HP0539). Por lo que podemos afirmar que estos 7 hibridomas producen anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína HP0537. Debido a que estos 7 hibridomas generan anticuerpos monoclonales que son sensibles y específicos a la proteína HP0537, establecemos que son candidatos para ser empleados en ensayos de inmunolocalización.

2. Abstract

The strains of *H. pylori* containing the *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) are associated with development of severe gastric diseases.

cagPAI has a size of approximately 40 kb and encodes for 32 proteins; among which are those that constitute a system of secretion type IV (T4SS) and Cytotoxin Associated Protein (CagA).

T4SS is used by *H. pylori* to translocate CagA into target cells, where it acts as an intermediary in many signaling pathways, resulting in the activation of pro-inflammatory and cytokines promoters, mitogenic and antiapoptotic processes and the destruction of intercellular junctions.

cagPAI encoded 32 proteins, 14 are essential for CagA translocation and induction of IL-8 by the host cell. 10 from these have been characterized and are known to be homologous to proteins system *virB / D* of *A. tumefaciens* T4SS the other 4 (HP0537, HP0522, HP0541 and HP0531) are not assigned function. A previous bioinformatic analysis, carried out by our team has determined that 3 of these 4 proteins (HP0537, HP0541 and HP0522) have VirB5 homology to proteins of other species including that reported in *H. pylori* (HP0539).

The HP0537 protein consists of 376 amino acids, and has a molecular weight of 44 kDa. After cloning the gene *hp0537* in *E. coli* BL-21 was induced the HP0537 protein expression found in the insoluble fraction cell lysate, which was used to obtain enriched recombinant protein.

The HP0537 protein was used as an immunogen for obtaining anti-HP0537 antibody in BALB /C. 15 Hybridomas were obtained, capable of generating monoclonal antibodies, which are sensitive for the detection of HP0537 protein. Of these 15 hybridomas, at least 7 are capable of generating monoclonal antibodies, which do not give reaction crossed with any other protein expressed in *H. pylori*, including VirB5 homologous to other proteins (HP0522, HP0541 and HP0539). As we can say that these 7 hybridomas producing monoclonal antibodies protein specific for HP0537. Because these 7

hybridomas generate monoclonal antibodies that are sensitive and specific to HP0537 protein, we set that are candidates for use in immunolocalization assays.

3. Introducción.

A finales del siglo XIX y principios del XX, varios investigadores reportaron la presencia de microorganismos en forma de espiral, que colonizaban el estomago de animales. Mientras que varios patólogos observaron la presencia de organismos con las mismas características en pacientes que desarrollaban úlceras pépticas y cáncer gástrico.¹ En 1979, los médicos australianos J. Robin Warren y Barry J. Marshall, iniciaron experimentos con la finalidad de aislar al microorganismo que colonizaba el estomago humano. Fue en 1982 cuando finalmente lograron aislar al microorganismo, ahora conocido como *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), tras la incubación prolongada de medios de cultivo provenientes de biopsias estomacales de pacientes que cursaban con desordenes gástricos².

Para probar que *H. pylori* es capaz de infectar el estomago humano, el Dr. Barry J. Marshall desarrolló una gastritis transitoria, tras la ingestión de un cultivo de esta bacteria; la gastritis fue tratada con una terapia basada en doxiciclina y sales de bismuto.^{1,2} Este experimento fue la primera evidencia de que la infección por *H. pylori* está asociada con el desarrollo de desordenes gástricos. Los experimentos realizados por los Drs. J. Robin Warren y Barry J. Marshall los hicieron merecedores del premio Nobel de Medicina en el año 2005.¹

Hoy en día, la infección por *H. pylori* es considerada como la principal causa en el desarrollo de gastritis aguda y crónica, y está asociada al desarrollo de enfermedades gástricas graves como úlcera péptica (duodenal y gástrica), linfoma asociado al tejido linfoide de la mucosa gástrica (MALT por sus siglas en inglés) y adenocarcinoma gástrico.³ Debido a la asociación de la infección con el desarrollo de cáncer gástrico, la Agencia Internacional de Investigación Sobre Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) ha clasificado a esta bacteria como agente carcinogénico tipo I.^{2,3}

3.1 Aspectos microbiológicos.

La clasificación taxonómica de *H. pylori*, de acuerdo al Manual de Bergey de clasificación sistemática del 2004 es:

Dominio: *Eubacteria*

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Epsilonproteobacteria*

Orden: *Campylobacterales*

Familia: *Helicobacteraceae*

Género: *Helicobacter*

Especie: *pylori*

H. pylori es una bacteria Gram-negativa que mide de 2 a 4 μm de largo por 0.5 a 1 μm de ancho. Aunque usualmente tiene forma de espiral puede adoptar una forma de "barra" o cocoide en un cultivo prolongado o después de un tratamiento antimicrobiano; estas formas son incapaces de duplicarse, por lo que no puede propagarse una vez que ha adoptado esa forma. Tiene de 2 a 6 flagelos unipolares y carece de fimbrias de adhesión.^{1,2}

3.2 Epidemiología de la infección

Se ha establecido que *H. pylori* ha co-evolucionado con el humano por más de 100,000 años, y no se le conoce otro reservorio importante.³ Pese a las condiciones adversas que tiene el estómago, *H. pylori* es capaz de colonizarlo y hacerse persistente, puesto que cuenta con mecanismos para ello. Por esta razón, la bacteria es capaz de colonizar cualquier porción de este órgano y establecer sus nichos en la superficie del epitelio gástrico.⁴

Actualmente más del 50% de la población mundial se encuentra infectada por esta bacteria ⁵. Sin embargo, la distribución no es homogénea de un país a otro, especialmente cuando se considera el estatus socio-económico: en

países desarrollados la prevalencia de la infección es menor que en países en vías de desarrollo ⁶. En México, la prevalencia de la infección es del 66% y se ha sugerido que la infección es adquirida principalmente durante la infancia ^{5,7,8}.

La vía de transmisión de la infección es de persona a persona, y aunque no se sabe de manera precisa cuáles son los mecanismos, el aislamiento de la bacteria en ciertas muestras biológicas de pacientes infectados y la presencia de material genético de la bacteria en el agua y los alimentos, dan lugar a la hipótesis de que los mecanismos de transmisión más viables son las vías oral-oral y fecal-oral⁷.

Una vez que se presenta la infección, la primera manifestación es una gastritis; que es un proceso inflamatorio que ocurre en el epitelio gástrico. Cuando la gastritis se encuentra en su etapa inicial, es considerada como aguda, conforme pasa el tiempo y persiste el proceso inflamatorio, se cataloga como gastritis crónica⁹.

Una vez que se ha desarrollado gastritis crónica en un individuo infectado, puede haber una recuperación espontánea o persistir con la gastritis por tiempo indefinido y dar origen a enfermedades graves como úlcera duodenal, úlcera gástrica, linfoma MALT y adenocarcinoma gástrico.¹⁰

El potencial patogénico de la bacteria no es el único factor que predispone al desarrollo de las enfermedades mencionadas, otros factores como las características genéticas del hospedero, el uso de medicamentos paliativos o antibióticos, hábitos alimenticios, consumo de tabaco y condiciones socio-económicas son importantes en el desenlace de la infección. Por esta razón, la infección por *H. pylori* está considerada como un factor necesario, pero no suficiente para el desarrollo de enfermedades gastroduodenales graves en individuos susceptibles. ¹⁰

Se ha observado mayor riesgo en desarrollar enfermedad grave cuando la infección es adquirida en edades tempranas (durante la infancia), y continúa de manera prevalente hasta la edad adulta y edad avanzada. La evolución de la infección depende de muchos factores, pero se ha encontrado un comportamiento muy particular que está relacionado con los niveles de

secreción de ácido clorhídrico. Si durante el curso de la infección se mantienen los niveles de secreción de ácido normales, el individuo se mantiene asintomático. Sin embargo, cuando los niveles de secreción de ácido son altos, las enfermedades que se desarrollan, con mayor frecuencia, son la úlcera duodenal y el linfoma MALT. Pero, cuando los niveles de secreción de ácido son bajos, las enfermedades más frecuentes son la úlcera gástrica o la metaplasia gástrica; esta última representa la antesala al desarrollo de adenocarcinoma gástrico.⁹

3.3 Factores de virulencia y de patogenicidad de *H. pylori*.

Cualquier microorganismo, que tenga la capacidad de colonizar a un determinado hospedero, debe estar dotado de mecanismos que le permitan la supervivencia y la capacidad de llegar al sitio en donde se pueda establecer para recibir nutrientes y para reproducirse. En busca de conseguir esos objetivos, hay microorganismos (los llamados patógenos) que desarrollan la capacidad de dañar a su hospedero, y con ello, el desarrollo de enfermedades¹¹.

H. pylori cuenta con una gran variedad de factores de virulencia que le permiten colonizar, persistir y ocasionar daño al epitelio gástrico. Para colonizar, cuenta con la enzima ureasa, que le permite soportar las condiciones adversas de pH que se presentan en la luz del estómago. La ureasa genera amonio a partir de la urea del hospedero, el cual es utilizado por la bacteria para formar un microambiente que amortigua el pH ácido del estómago.⁹

La luz del estómago no tiene las condiciones ideales para el crecimiento de la bacteria, por este motivo, debe migrar hacia donde encuentre mejores condiciones; para ello cuenta con flagelos y con la proteína quimiotáctica, que le confieren la capacidad de orientar su migración a la superficie del epitelio gástrico (pH cercano al neutro). Aproximadamente el 20% del total de bacterias que colonizan el estómago se encuentran unidas en la superficie del epitelio gástrico mediante adhesinas que se unen a glicoproteínas de éste; entre las adhesinas principales encontramos a SabA, BabA, AlpA, AlpB, HopZ y HopO.¹²

El daño al epitelio se presenta después de que la bacteria se ha establecido en la superficie del epitelio mismo, mediante dos proteínas, que han sido el blanco de múltiples estudios, estas moléculas son la citotoxina VacA y la proteína asociada a la citotoxina (CagA).^{11,12}

La citotoxina VacA es producida con un tamaño de 140 kDa, y para llegar a su forma madura primeramente debe ser escindida a un tamaño de 88 kDa. Posteriormente, la proteína es subdividida en 2 regiones: una región de 33 kDa que le confiere la capacidad de insertarse a la membrana de la célula hospedera, y una región de 55 kDa que se piensa que juega un papel importante en el reconocimiento de la célula hospedera.^{13,14}

El gen que codifica para la citotoxina VacA (*vacA*) está conformado por tres regiones principales: una región de secuencia señal (s), una región intermedia (I) y una región media (m). Estas regiones están sujetas a una gran diversidad alélica entre cepas de *H. pylori*, que les confieren mayor o menor potencial de virulencia.¹⁵

3.4 Características de la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*).

Más del 60% de las cepas de *H. pylori* poseen una isla de patogenicidad *cag* (*cag-PAI*), y su presencia está relacionada con la producción de citocinas proinflamatorias IL-8, IL-1 β , IL-6 y TNF α por parte de la célula hospedera, que activa células efectoras de la respuesta inmune, cuya acción puede llevar a la acumulación de sustancias reactivas de Oxígeno (ROS)^{18,19}, por lo que se ha observado que individuos infectados con cepas portadoras de la *cagPAI* tienen más probabilidad de desarrollar enfermedades gastroduodenales graves.¹⁷

Cag-PAI tiene un tamaño aproximado de 40 kb y se ha propuesto que fue adquirida por transferencia horizontal al poseer un porcentaje de G-C diferente a la del resto del genoma (39%, cromosoma; 35%, *cagPAI*)^{20, 21}. *cag-PAI* está formada por aproximadamente 32 genes, entre los que se encuentra el gen que codifica a la proteína asociada a la citotoxina (CagA) y genes que codifican a proteínas que conforman un sistema de secreción tipo IV (T4SS).²²

La función del T4SS en *H. pylori* es la translocación de CagA hacia el interior de células blanco, por lo que se le puede considerar como una micro-jeringa

que le sirve a la bacteria para depositar, de manera específica, una molécula efectora al interior de la célula diana.²²

Una vez translocada CagA, actúa como molécula intermediaria en diversas vías de señalización. CagA puede o no ser fosforilada en el interior de la célula hospedera por cinasas de la familia Src. Cuando no es fosforilada, CagA participa en vías de señalización interactuando con proteínas cinasas y con NF- κ B, que tienen como resultado la activación de promotores de producción de citocinas pro-inflamatorias, procesos mitogénicos y antiapoptóticos, además de que también participa en la destrucción de uniones intercelulares (Figura 1)^{23,24}.

CagA es translocado a través del T4SS; En el interior de la célula hospedera, actúa en diversas vías de señalización

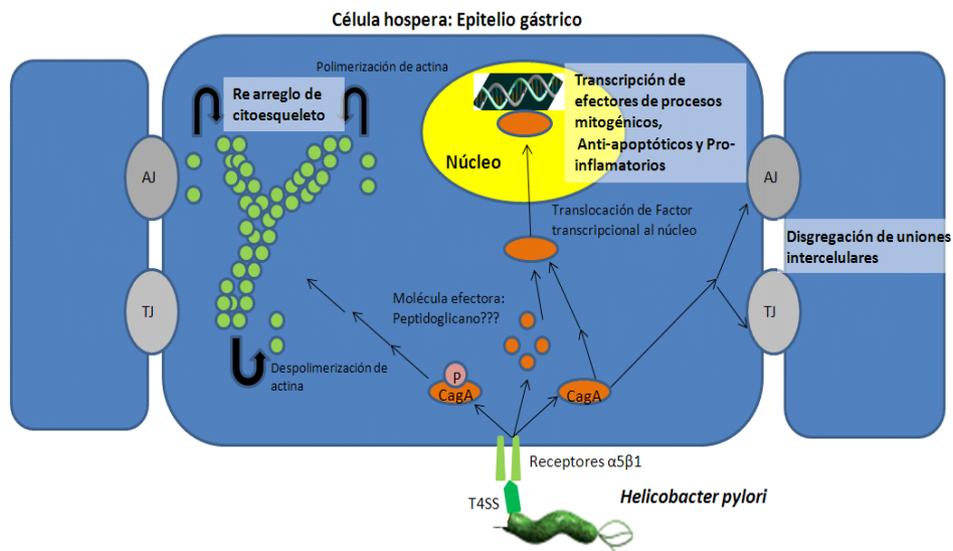


Figura 1. Una vez que ha sido translocada, CagA por el T4SS de *H. pylori*, participa en vías de señalización relacionadas con el reordenamiento del citoesqueleto, procesos mitogénicos y anti-apoptóticos, producción de citocinas pro-inflamatorias y disociación de las uniones intercelulares (AJ= Uniones Adherentes y TJ= Uniones Estrechas)³.

La proteína CagA es fosforilada en sitios con secuencias de Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) que son reconocidos por cinasas de la familia Src. Las proteínas cinasas de la familia src están compuestas por 6 dominios funcionales: un dominio SH4 que contiene la señal de localización en la membrana, un dominio "único" que le permite acoplarse a un receptor específico, dominios SH1, SH2 y

SH3 que son los sitios catalíticos de la actividad tirosina cinasa y un sitio regulatorio en el extremo carboxilo terminal. Es precisamente el dominio SH2 de la proteína src que reconoce los dominios EPIYA de CagA para fosforilarla. CagA fosforilada participa en vías de señalización relacionadas con el rearrreglo del citoesqueleto que darán lugar a cambios morfológicos en la célula hospedera denominado “fenotipo de colibrí”^{23,24,25}

3.5 Características del sistema de secreción tipo IV (T4SS).

De acuerdo a su función, existen 3 tipos de T4SS diferentes, expresados en diversas especies de bacterias Gram negativas: 1) los que median la transferencia de plásmidos o transposones de DNA entre un amplio rango de especies bacterianas y células eucariontes, 2) los que regulan la adquisición de DNA de alguna fuente extracelular y, 3) los que sirven de puente para translocar moléculas efectoras a células eucariontes durante el curso de una infección^{26,27}. El T4SS de *H. pylori*, que está codificado en *cagPAI*, es considerado dentro del tercer grupo descrito.

Muchas bacterias Gram-negativas, incluyendo a *H. pylori*, conservan un T4SS similar al que presenta la bacteria patógena de plantas *Agrobacterium tumefaciens*, el cual está constituido por 12 proteínas: 11 proteínas denominadas VirB que van de VirB1-VirB11 y una proteína acopladora denominada VirD4.²⁶

En general, el T4SS de *A. tumefaciens* es considerado como prototipo para describir el ensamblaje, que consiste de un pillus extracelular conformado por una subunidad mayor VirB2 y una subunidad menor VirB5; tres proteínas con actividad NTPasa, que proporcionan la energía para el ensamble del T4SS y para la translocación de la molécula efectora: VirB4, VirB11 y VirD4. También está conformado por proteínas que se encuentran ancladas a la membrana interna VirB10, VirB6 y VirB8, y proteínas que se encuentran ancladas en la membrana externa VirB7 y VirB9. Las proteínas que se encuentran ancladas a la membrana interna y externa interactúan en el periplasma para conformar el poro de translocación o “núcleo”.^{26,27}

La importancia de cada una de las proteínas que componen al T4SS en *H. pylori* se ha estudiado a través de la eliminación o mutación de los genes que constituyen la *cagPAI*, lo que ocasiona defectos en el ensamblaje de este T4SS y se inhibe la translocación de CagA a la célula hospedera y la producción de IL-8. El resultado de estos experimentos permitió identificar 14 a proteínas de la *cagPAI* implicadas en la translocación de CagA y la secreción de IL-8: HP0522, HP0524, HP0525, HP0527, HP0528, HP0529, HP0530, HP0531, HP0532, HP0537, HP0539, HP0541, HP0544 y HP0546 (Figura 2).²⁹

Mutaciones en *cag PAI* que afectan la inducción de la secreción de IL-8 y la translocación de CagA

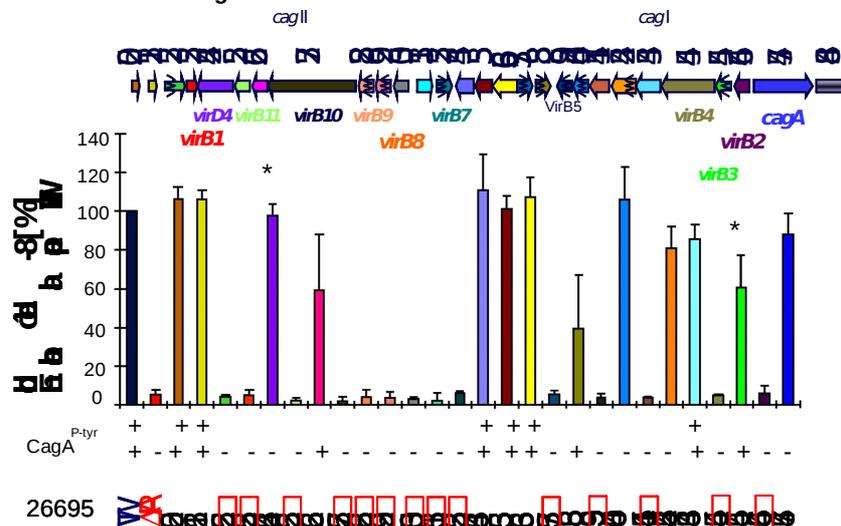


Figura 2. Se han hecho estudios de los genes de la *cagPAI*, a través de su eliminación o mutación, para determinar su relevancia en la patogénesis de *H. pylori* cepa 26695; son 14 los genes (enmarcados en rojo) que son esenciales para la translocación y fosforilación de CagA, y la inducción de IL-8.²

En *A. tumefaciens*, las proteínas que interactúan directamente con la célula diana, son aquellas que conforman al pillus de translocación del T4SS (VirB2 y VirB5)³¹. En *H. pylori* se ha observado, en ensayos *in vitro*, que la proteína HP0539, descrita como ortóloga de VirB5, reconoce e interactúa con receptores $\alpha 5\beta 1$ de las células AGS proveniente de tejido con adenocarcinoma gástrico humano. El reconocimiento se da debido a que la proteína HP0539 contiene dominios de Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) que reconocen al receptor $\alpha 5\beta 1$ y desencadenan una cascada de señalizaciones que empieza

con la activación de la Cinasa de Adhesión Focal (FAK, Focal Adhesion Kinase, por sus siglas en inglés), quien a su vez fosforila a la proteína Cinasa src. La src activada es capaz de reconocer a los sitios EPIYA de la toxina CagA y fosforilarla en el residuos de tirosina (Figura 3).³²

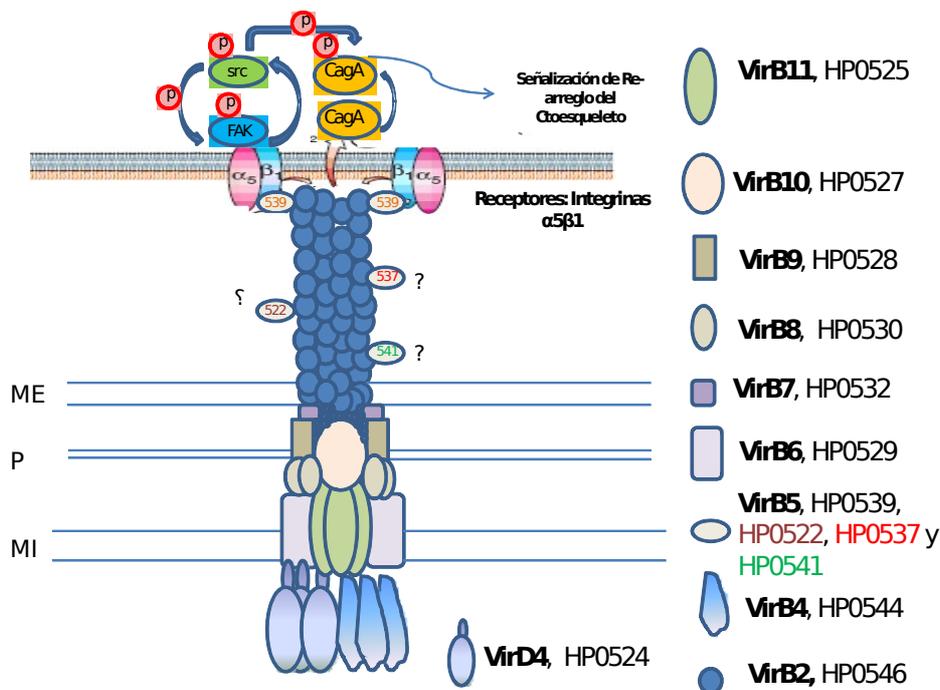


Figura 3. El T4SS de *H. pylori* está conformado por proteínas que están codificadas en la *cag*-PAI. Todas ellas tienen homología a proteínas del sistema VirB/D de *A. tumefaciens*. La proteína HP0539 contiene regiones RGD, que reconocen a los receptores $\alpha_5\beta_1$. Esta interacción activa FAK y a SRC, quien a su vez fosforila a CagA para llevar a cabo la vía de señalización que tiene como desenlace el re-arreglo del citoesqueleto (ME= Membrana Externa, P= Periplasma y MI= Membrana Interna).³²

En nuestro grupo de investigación se han identificado, a través de un análisis bioinformático, 3 nuevas proteínas además de HP0539, que comparten homología con proteínas VirB5 de otras especies: HP0522, HP0537 y HP0541. Estas tres proteínas están codificadas en la *cag*PAI y son esenciales en la translocación de CagA y la inducción de la producción de IL-8, pero aún no se ha caracterizado su función y su exacta localización en el T4SS de la bacteria.

3.6 Importancia de la generación de Anticuerpos Monoclonales para la caracterización de moléculas efectoras.

Los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas) son proteínas sintetizadas por linfocitos B, en respuesta a la presencia de moléculas foráneas (llamados antígenos). Los antígenos, que son capaces de inducir la producción de anticuerpos, pueden ser carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o proteínas.

33

La interacción de un anticuerpo con un antígeno es la base de todas las técnicas inmunoquímicas.³⁴ La región de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo se denomina epítipo; un antígeno proteico, puede tener epitopes que estén conformados por secuencias de aminoácidos continuas y no continuas. El reconocimiento de los epitopes continuos, de un antígeno proteico, no está afectado por el grado de desnaturalización de dicha proteína, mientras que, los epitopes no continuos dependen de que el antígeno proteico mantenga íntegra su conformación nativa.^{34,35}

Cuando se realiza una inmunización, con el objeto de producir anticuerpos frente a un antígeno, se produce una gran variabilidad de inmunoglobulinas que poseen función de anticuerpo frente a los diferentes epítipes del antígeno. Esta producción de inmunoglobulinas es de tipo policlonal, debido a que son muchas y muy diversas clonas linfocitarias las que se activan y diferencian para la producción de anticuerpos. Sin embargo, los antiseros así obtenidos, aunque se han utilizado ampliamente y han sido de gran interés en el conocimiento de la biología y la bioquímica de las inmunoglobulinas (inmunoprecipitaciones e inmunoblotting), ofrecen serias dificultades para su uso, debido a la gran heterogeneidad estructural y funcional que poseen.^{36,37}

Los anticuerpos monoclonales son derivados de una sola línea de linfocitos B, descendientes de una sola y única célula madre fusionada con una célula tumoral. Un anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer a un solo tipo de epítipo de un antígeno. Con respecto a los anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales tienen ventaja en que presentan mayor especificidad al reconocer al Antígeno que se investiga, presenta mayor

homogeneidad en su comportamiento en los ensayos a los que están destinados, y su producción se puede dar ilimitadamente.³⁸

Los anticuerpos monoclonales son extensamente utilizados en la investigación biomédica, en el diagnóstico de enfermedades y en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cancerosas.^{38,39}

En diagnóstico clínico, debido a que los anticuerpos monoclonales son muy específicos, son empleados en la detección de hormonas, vitaminas, citocinas, drogas, agentes infecciosos, alérgenos, marcadores tumorales y de infarto. Las técnicas de laboratorio en que se emplean para el diagnóstico clínico son en ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas, por sus siglas en inglés), citometría, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, etc.⁴⁰

Las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales consisten en su capacidad de erradicar ciertas infecciones y destruir células, incluidas las tumorales, mediante distintos mecanismos. Por esta razón, son excelentes sustancias para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, procesos cancerígenos o en trasplantes para evitar el rechazo. Existen varios anticuerpos monoclonales aprobados para su uso en determinadas enfermedades.⁴¹

En la investigación biomédica, que es lo que concierne a este proyecto, sirven como herramienta molecular para la identificación de genes, la activación de enzimas, conocimiento de la estructura molecular y morfogénesis, y en general, la caracterización de proteínas^{42,43}. Para el caso específico de la proteína HP0537 de *H. pylori* cepa 26695, el objetivo de la obtención de anticuerpos monoclonales Anti-HP0537 es para realizar ensayos de inmunolocalización, que nos permita determinar su exacta localización en la bacteria durante su interacción con células hospederas.

De forma general, la secuencia de eventos para la producción de anticuerpos monoclonales incluye: la inmunización de un animal de experimentación (la mayoría de las veces son ratones de la cepa BAL/C), la fusión celular entre linfocitos B (del animal inmunizado) con células de mieloma, la selección de

células híbridas que fueron fusionadas exitosamente y el tamizaje de los sobrenadantes de los hibridomas que producen el anticuerpo deseado.^{38,39}

La inmunización es el paso inicial para la producción de anticuerpos, las técnicas de inmunización consisten en la aplicación del antígeno a nivel sistémico (inyecciones intraperitoneales), o directamente a nivel local con inyecciones en nódulos linfáticos. Con la inmunización sistémica, se pueden obtener anticuerpos policlonales producidos en el suero de los ratones inmunizados, y también se pueden obtener anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos del bazo.^{37, 38, 39}

La inmunización local tiene la desventaja, con respecto a la sistémica, de que la producción de anticuerpos a nivel sérico es muy baja, por lo que no es el mejor método para producir anticuerpos policlonales. Sin embargo, el tiempo necesario para tener listos los nódulos linfáticos para la producción de anticuerpos monoclonales (17 días), es menor que el tiempo que se necesita en la inmunización sistémica para tener listo al bazo (de 7 a 8 semanas).⁴⁴

La fusión consiste en el uso de un agente químico llamado polietilenglicol (PEG) para fusionar las membranas plasmáticas de dos células; los linfocitos B (obtenidos de los animales inmunizados) con células de mieloma. La fusión tiene como objetivo la generación de hibridomas, que pueden ser propagados para producir cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales.^{38,39}

Como resultado de la fusión se obtendrán hibridomas entre linfocitos-linfocitos, células de mieloma-células de mieloma y linfocitos-células de mieloma. Para seleccionar solamente aquellas fusiones entre linfocitos-células de mieloma, se aprovecha que estos hibridomas son capaces de crecer en medio HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina); debido a que la línea mielomatosa se ha hecho resistente a la 8- azaguanina porque carece de la enzima HGPRT (hipoxantin-guanidin-fosforibosil-transferasa), la síntesis de su DNA la tiene que realizar a través de la vía *de novo*. La aminopterina del medio HAT bloquea la síntesis *de novo* de nucleótidos, por lo que las células de mieloma sin hibridar no sobreviven en presencia de este fármaco. Esta característica permite eliminar las células de mieloma sin hibridar o que no fusionaron con linfocitos

B, mientras que los híbridos seguirán creciendo, porque poseen la enzima HGPRT aportada por los linfocitos.^{44,45}

El tamizaje realizado a los hibridomas obtenidos representa el paso final de la obtención de anticuerpos monoclonales, y aquí se elegirán las clonas que reconocen de forma específica al antígeno que se investiga. El principal objetivo de un procedimiento para el tamizaje de anticuerpos es descartar aquellas clonas no deseadas, que presentan baja o nula sensibilidad al reconocer al antígeno en estudio.⁴⁶

La sensibilidad está conceptualizada como la capacidad de un ensayo para clasificar correctamente una muestra positiva (Muestra verdadero positivo). La sensibilidad que puede presentar un anticuerpo está afectada directamente por la afinidad y avidéz que ésta presenta al reconocer al antígeno en estudio. La afinidad está conceptualizada como la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítotope en el antígeno en estudio; la afinidad puede estar afectada por factores tales como la temperatura, el pH y el tipo de solvente en donde se lleva a cabo la interacción.³⁴

La avidéz está conceptualizada como la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo, y está gobernada por 3 principales factores: La afinidad del anticuerpo al antígeno, la carga que presentan tanto el anticuerpo como el antígeno en la reacción, y el arreglo espacial de la interacción antígeno-anticuerpo.^{35,38,39}

La especificidad está conceptualizada como la capacidad de un ensayo para clasificar correctamente una muestra negativa (Muestra verdadero negativo). Y en el caso de la generación de anticuerpos, implica certificar que aquellos hibridomas que hemos seleccionado por su capacidad de reconocer al antígeno bajo estudio, no reconozca a otra molécula diferente, o que presente reacción cruzada con otros componentes.^{34,35}

4. Planteamiento del problema

Un nuevo modelo bioinformático para la búsqueda de proteínas homólogas VirB/D en el genoma de *H. pylori* 26695 permitió la identificación de tres nuevas proteínas VirB5 dentro de la *cagPAI*. Estas proteínas (HP0522, HP0537, HP0541), al igual que HP0539, son indispensables para translocación de CagA y la inducción de la secreción de IL-8 en las células del epitelio. Dichas proteínas comparten motivos conservados además de poseer semejanzas estructurales. Sin embargo, a la fecha se desconoce su función y su exacta localización en el T4SS. Para determinar la localización de la proteína HP0537 mediante experimentos de inmunolocalización, es necesaria la generación de anticuerpos monoclonales.

5. Justificación.

En los últimos años, han sido investigados intensamente los mecanismos moleculares y celulares utilizados por *H. pylori* para desestabilizar las funciones de las células hospederas que desencadena neoplasias.

La *cagPAI* de *H. pylori* es un excelente modelo para estudiar los sistemas de cascadas de señalización que inducen la transformación celular.

Por lo que el estudio de moléculas indispensables para la función del T4SS, como HP0537 es importante, ya que al establecer su función y su localización en este sistema, aportará mayor conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria.

6. Hipótesis

Los anticuerpos obtenidos reconocerán a la proteína HP0537 como parte del T4SS de *H. pylori*, ya que comparte motivos y semejanzas estructurales con las proteínas VirB5 reportadas.

7. Objetivos

General.

- Obtener anticuerpos que reconozcan de manera específica a la proteína HP0537.

Particulares

- Obtener proteína recombinante HP0537
- Obtener anticuerpos contra la proteína HP0537
- Determinar si los anticuerpos generados son sensibles y específicos a la proteína HP0537.

8. Material y método.

Para cubrir los objetivos establecidos para este proyecto, se propuso la estrategia metodológica de cinco pasos (esquematisados en la figura 3):

1. Clonación del gen *hp0537* en un vector de expresión
2. Producción y purificación de la proteína recombinante HP0537
3. Inmunización de ratones BALB/C con la proteína obtenida.
4. Obtención de anticuerpos monoclonales contra la proteína HP0537
5. Tamizaje de los anticuerpos monoclonales obtenidos para determinar sensibilidad y especificidad.

Metodología: Cinco pasos

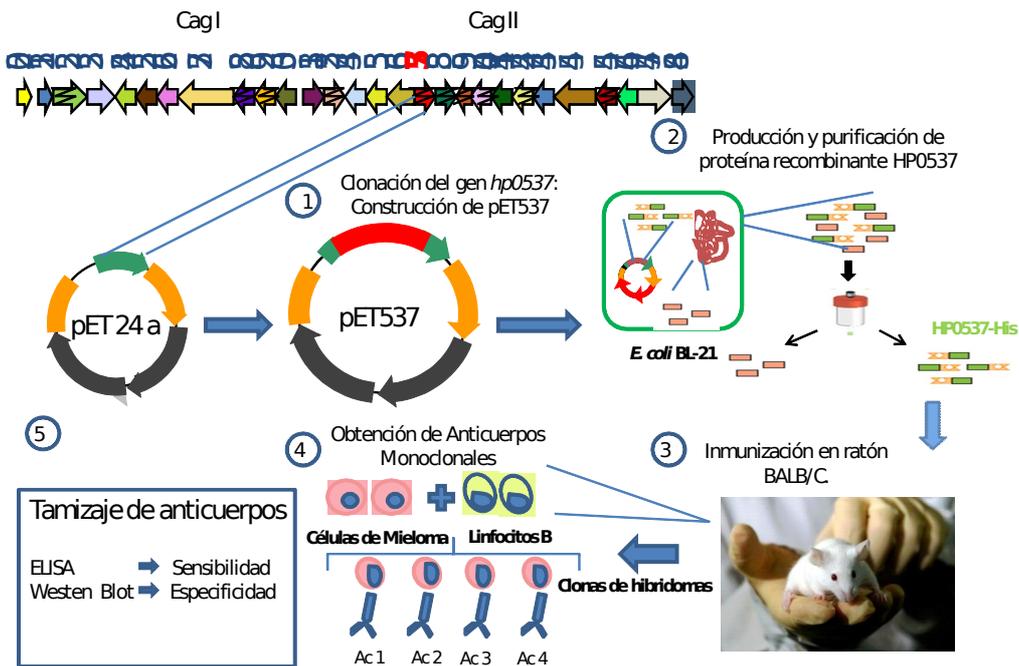


Figura 4. Esquema de 5 pasos para la obtención de anticuerpos monoclonales Sensibles y Específicos a la proteína HP0537: 1) Clonación del gen *hp0537* en un vector de expresión, 2) Producción y Purificación de la proteína recombinante con *E. coli* BL-21 y una columna comercial (GE His-trap), 3) Inmunización de ratones BALB/C con proteína recombinante HP0537, 4) Obtención de hibridomas productores de Anticuerpos Monoclonales contra HP0537 y 5) Tamizaje de los anticuerpos obtenidos a través de ELISA (sensibilidad) y Western Blot (Especificidad).

8.1 Clonación del gen *hp0537* en un vector de expresión.

Para la clonación del gen *hp0537*, se utilizó el vector de expresión pET 24 a (+) de Novagen (esquematisado en la figura 5). Este vector de expresión tiene los siguientes componentes:

- 1) Un origen de replicación específico para *E. coli*.
- 2) Un casete que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina.
- 3) Una región denominada "Origen f1", que confiere la capacidad de propagación del vector a través del bacteriófago f1.
- 4) Un región denominada "poli-linker", en donde se lleva a cabo la inserción del gen de interés, mediante la acción de enzimas de restricción; esta región contiene múltiples sitios reconocibles por diversas enzimas de

restricción. La transcripción del gen se lleva a cabo por la enzima T7RNA polimerasa, por lo que el hospedero debe contener esta enzima para expresar el gen de interés.

- 5) Una secuencia que etiqueta, en el extremo carboxilo terminal, a la proteína de interés con una marca de 6 histidinas.
- 6) Una región que codifica a la proteína Lac I, que actúa como represor del promotor del gen de interés. La inclusión de ésta proteína representa un punto de regulación de la expresión del gen de interés.

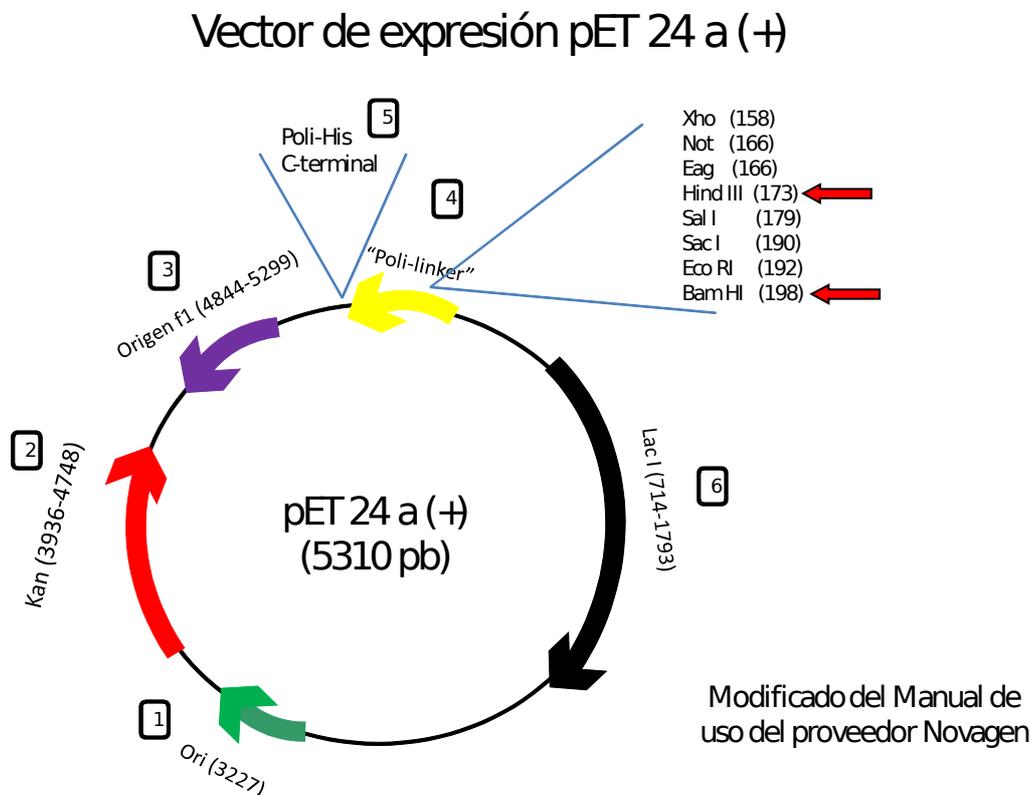


Figura 5. Vector de Expresión pET 24 a (+) Novagen. Este vector de expresión está compuesto por: 1) Origen de replicación en *E. coli*, 2) Casete de resistencia a Kanamicina, 3) Origen f1, 4) Región Poli-linker (Las flechas en rojo indican las enzimas de restricción elegidas para la inserción del gen (*hp0537*), 5) Una región que codifica a una etiqueta de 6 histidinas y 6) Una región que codifica a la proteína LacI.

Se diseñaron y sintetizaron un par de oligonucleótidos (delantero y reverso) para la amplificación del gen *hp0537* de *H. pylori* cepa 26695.

Oligonucleótido delantero: 5'...TT GGC **GGA TCC** CTT GCA AAA ATC GTT TTT AGC...3'

Oligonucleótido reverso: 5'...CCC **AAG CTT** TTC AAA GGG ATT ATT CTT GGC...3'

En el diseño de los oligonucleótidos, se contemplaron los sitios reconocibles para las enzimas de restricción *Hind III* y *Bam HI*, mismas que fueron empleadas para la inserción del gen *hp0537* al pET 24 a (+); se eligieron estas enzimas de restricción porque no comprometen la integridad del gen *hp0537*(secuencia ilustrada en la figura 6), es decir, nuestro gen de interés no contiene sitios que reconozcan éstas enzimas.

Gen *hp0537* de *H. pylori* cepa 26695

```
1 atgcttgc aaatcgttt tagctcattg gttgcgtttg gagttttgtc ggctaagtgc
61 gagcagtttg gttcattttt caacgagata aaaaaagaac aagaagaagt ggctgcaaaa
121 gaagacgctc ttaaggctcg caagaagctc ttaaacaata cgcatgattt cttagaagac
181 ttgattttta gaaaacaaaa aatcaaagag cttatggatc atagagctaa agttcattca
241 gacttagaaa acaaatataa aaaagaaaaa gaggcctctag agaaagagac aagaggtaaa
301 atccttactg ctaagtcaaa ggcttatggg gatttggagc aagccttaaa agataaccct
361 ctctatagga aacttcttcc taacccttat gcctatgttt taaaccaaga aacattcacc
421 aaagaagata gggagcgttt gagttattac taccgccagg tgaaaacgag cagtattttt
481 aaaaaacca cgcctaccac taaagataag gctcaggctt tgcttcaaat ggggtgtttt
541 tcttttagatg aagaacaaaa caaaaaagcg agccgattag ctttatctta caagcaagcg
601 attgaagaat attccaataa cgtttctaat ttattgagca gaaaagaatt ggataatata
661 gatttattact tacagcttga aagaaacaag tttgactcca aagcaaaaaga tattgctcaa
721 aagctacta acacgcttat ttttaattcg gaacgcttgg cgtttagcat ggcgattgat
781 aagatcaatg agaaataact aaggggctat gagggttttt ctaacttgtt gaaaaatgtc
841 aaagatgatg tgaattgaa tactctgact aaaaatttta ccaatcaaaa attgagtttc
901 gcacaaaaac aaaaattgtg tttgttgggt ttagacagct tcaattttga taccoaatcc
961 aaaaaatcta tattaataaa gactaatgaa tacaatattt tcgtagatag cgtcctatg
1021 atgagcgaca aaaccactat gcaaaaagaa cactacaaga tatttaattt cttcaaaaaca
1081 gtggtttctg cataccgaaa caatgttgcc aagaataatc ctttgaata g
```

Figura 6. El gen *hp0537* esta compuesto por 1131 pb y codifica a la proteína HP0537: no contiene sitios reconocibles por las enzimas de restricción *Hind III* y *BamHI*.

De acuerdo al proveedor (Fermentas), la enzima de restricción *Hind III*, con número de catálogo ER0501, tiene sitios de restricción en la secuencia 5'... A^AGCTT...3' y 3'...TTCGA^A...5' (enmarcado en el oligonucleótido delantero en color amarillo). Las condiciones en las que se obtiene una actividad óptima

de esta enzima son: a 37 °C de temperatura, en el buffer “Tango Yellow 1X” durante 1 hora de incubación. Mientras que, la enzima de restricción *Bam HI*, con número de catálogo ER0051, tiene sitios de restricción en la secuencia 5’... G[^]GATCC---3’ y 3’...CCTAG[^]G...5’ (Enmarcado en el oligo reverso en color azul). Las condiciones en las que se obtiene una actividad óptima de esta enzima son: a 37 °C de temperatura, en el buffer “Tango Yellow 1X” durante 1 hora de incubación.

Siendo que, ambas enzimas de restricción comparten las mismas características de uso, se expuso al vector de expresión pET 24 a (+) a 37 °C en buffer “Tango Yellow 1X de Fermentas” en presencia de las enzimas de restricción *Hind III* y *BamHI*, la incubación se realizó por un período de 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó el producto de la amplificación del gen *hp0537* de *H. pylori* cepa 26695, para su ligación al vector de expresión. En este proceso, se obtuvo el vector de expresión pET537.

8.2 Producción y purificación de proteína recombinante HP0537

8.2.1 Expresión de la proteína HP0537 en *E. coli* BL-21

Como hospedero para la expresión y purificación de la proteína HP0537, se utilizó una cepa de *E. coli* BL-21 del kit comercial “BL-21-AI One Shot Chemecally Competent *E. coli*”. Las células de este kit contienen una inserción cromosomal de un gen que codifica a la T7RNA polimerasa dentro del locus *araB* de operón *araBAD*, por lo que la expresión de la T7RNA polimerasa está regulada positivamente por la adición de L-arabinosa.

El vector de expresión pET537 fue incorporado a *E. coli* BL-21 a través de la metodología de transformación para células quimiocompetentes descrita en el manual Molecular cloning⁴⁷:

Se utilizó un vial del kit comercial BL-21-AI One Shot Chemecally competent *E. coli*; la presentación de cada vial del proveedor viene aforada a un volumen de 100 µl. Se adicionaron 10 µL de pET537 en solución (con una concentración de 19.9 ng/µl) al vial con *E. coli* BL-21. Para permeabilizar a las células

empleadas, se aplicó un choque térmico de 42 °C por 90 segundos. La solución resultante de la transformación se cultivó en una placa de agar LB, con una concentración de 25 ug/mL de Kanamicina, y se incubó a 37 °C durante 17 horas.

Cabe señalar que, a la par de que se realizó la transformación de *E. coli* BL-21 con el pET537, se realizó otra transformación en *E. coli* BL-21 con el pET 24 a (+) sin inserción, con la finalidad de trabajar con una cepa que nos pudiera servir como control negativo.

Al final del proceso de transformación se obtuvo una placa en donde crecieron varias colonias, de las cuales, se escogieron al azar 3 (denominadas arbitrariamente como A,B y C), para evaluar su capacidad de expresar proteína recombinante HP0537.

Para evaluar las condiciones de inducción de la expresión de la proteína HP0537 en *E. coli* BL-21, transformada con el vector de expresión pET537, se realizaron cultivos en Medio LB líquido, a partir de las 3 colonias elegidas de la placa resultante de la transformación⁴⁸:

El Medio LB líquido contenía Kanamicina a una concentración de 25 µg/mL, y se incubó a 37°C, hasta alcanzar una Densidad Óptica (DO) de 0.4, determinado a una longitud de onda de 600 nm; la muestra se trabajó en dos alícuotas de igual volumen (3 ml cada una); la primer alícuota correspondió al control negativo de inducción (SI), y la otra fue inducida (I) a través de la adición de IPTG y L-Arabinosa hasta alcanzar las siguientes concentraciones: IPTG 1mM y L-arabinosa 0.02%.

A partir de la adición de IPTG y L-arabinosa, se incubaron las muestras por 1 hora, 2 horas y 3 horas, con la finalidad de determinar el tiempo óptimo de inducción (el control negativo se incubó durante 2 horas más).

Transcurrido el tiempo de inducción correspondiente a cada muestra, se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos.

Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 100 µl de solución PBS 1X SDS 1%. Ésta suspensión se calentó a

96 °C durante un período de 10 minutos. El producto de este proceso corresponde al lisado celular de fracción total.

Un volumen de 12µl del lisado celular se mezclaron con 3 µl de buffer de carga (Laemmli 3X) para cargar los pozos de un gel de poliacrilamida al 16%. Se montó un dispositivo para electroforesis de proteínas. Los geles de poliacrilamida se realizaron por duplicado; con la finalidad de obtener la imagen de un gel teñido con azul de coomassie, y otro para realizar transferencia en membrana de PVDF para realizar un Western Blot⁴⁹.

El western Blot se realizó empleando un solo anticuerpo anti-his, el cual, detectó la presencia de la proteína recombinante HP0537, puesto que se expresa con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal⁴⁹.

8.2.2 Localización de la proteína HP0537 en los lisados de *E. coli* BL-21; Fracción Soluble (FS) y Fracción Insoluble (FI)

Para determinar en cuál de las dos fracciones del lisado celular, Fracción soluble (FS) y Fracción Insoluble (FI), se localizó la proteína HP0537 tras su expresión, se realizó el siguiente ensayo:

Se incubaron cultivos de LB con Kanamicina (25µg/ml) de *E. coli* transformada con pET537, hasta alcanzar una D.O de 0.4, determinado a una longitud de onda de 600 nm. la muestra se trabajó en dos alícuotas de igual volumen (3 ml cada una); la primer alícuota correspondió al control negativo de inducción (SI), y la otra fue inducida (I) a través de la adición de IPTG y L-Arabinosa hasta alcanzar las siguientes concentraciones: IPTG 1mM y L-arabinosa 0.02%.

Para obtener fracción soluble y fracción insoluble de lisis celular, se empleó un sonicador, en donde se aplicaron 3 pulsos de 10 segundos cada uno, a una frecuencia de 20 Khz y una potencia de 250 Wats. Después de la sonicación, se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante de la centrifugación corresponde a la fracción soluble de la lisis celular.

La pastilla formada por la centrifugación, corresponde a la fracción insoluble del lisado celular; ésta pastilla se suspendió en 250 µl de solución PBS 1X SDS

1%, ésta suspensión se calentó a 96 °C durante 10 minutos. 12 ul de las muestras de lisado celular (FS y FI) se mezclaron con 3 ul de buffer de carga (laemli 3X) para cargar los pozos de un gel de poliacrilamida al 12%. Se montó un dispositivo para electroforesis de proteínas⁴⁹. La electroforesis y el Western Blot se realizaron de la misma forma en que se trabajaron las lisis celulares de la fracción total.

8.2.3 Purificación de proteína recombinante HP0537.

La purificación de la proteína recombinante se realizó utilizando la columna His-Trap GE. Ésta columna retiene aquellas proteínas que contienen la etiqueta de 6 Histidinas en el extremo carboxilo terminal. Dichas Histidinas interaccionan con el Niquel del interior de la columna (Figura 7).

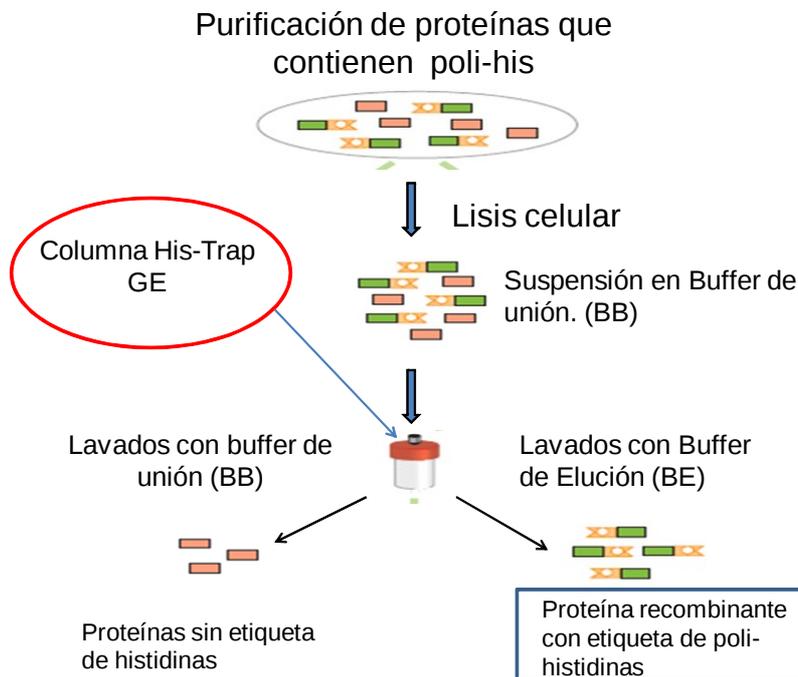


Figura 7. Purificación de proteína recombinante marcada con poli-his en el extremo carboxilo terminal, con el uso de columna His-Trap GE; El proceso de purificación inicia con la lisis celular de la muestra en una suspensión con Buffer de Unión (BB), ésta suspensión se hace pasar a través de la columna His-Trap GE, y se realizan lavados con el mismo BB para arrastrar a todas aquellas proteínas que no contienen etiqueta de poli-his, finalmente, la columna se lava con Buffer de Elución para arrastrar a la proteína recombinante con la etiqueta de poli-his^{52,53}.

Para el uso de esta columna, se emplearon dos soluciones: el buffer de unión (BB) que contiene baja concentración de Imidazol (30 mM), y el Buffer de Elución que contiene alta concentración de Imidazol (500 mM)^{50,51}.

La purificación de la proteína recombinante se realizó siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Se utilizó la colonia A de la placa resultante de la transformación de *E. coli* BL-21 con pET537 para obtener un cultivo, en LB líquido con Kanamicina 25 µg/ml, que se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O de 0.4 determinado a 600 nm.
- 2) Se indujo con IPTG 1mM y L-arabinosa 0.02% la expresión de la proteína HP0537 y se incubó la mezcla a 37 °C durante 3 horas.
- 3) Transcurridas las 3 horas de incubación, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se decantó.
- 4) La pastilla se resuspendió en 15 ml de Buffer de unión. Para la lisis celular, se utilizó un sonicador aplicando 6 pulsos de 30 segundos cada uno, a una frecuencia de 20 Khz y una potencia de 250 Wats.
- 5) Después de la sonicación, se centrifugó la muestra a 4000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante de la centrifugación, correspondiente a la fracción soluble de la lisis celular, se decantó.
- 6) La pastilla se resuspendió en Buffer de Unión con Tween 20 al 2% (BB+); ésta suspensión representa a la fracción insoluble del lisado celular, en donde se encuentra la proteína HP0537^{52,53}.
- 7) La Fracción Insoluble del lisado celular se hizo pasar a través de la columna de Niquel (His-Trap GE)^{52,53}.
- 8) Se realizaron lavados a la columna con 40 ml de BB+; esto, con la finalidad de arrastrar y eliminar a todas aquellas proteínas que no contienen la etiqueta de Histidinas.
- 9) Se realizaron lavados a la columna con 15 ml de Buffer de Elución con Tween 20 al 2% (BE+); El Buffer de elución tiene alta concentración de

imidazol, y se utilizó con la finalidad de desplazar la interacción Histidinas-Niquel de la columna, para captar una solución con proteína recombinante HP0537.

10) Los lavados resultantes del proceso de purificación se evaluaron a través de electroforesis de proteínas y Western Blot, realizados de la misma forma que en los ensayos de “Expresión de la proteína HP0537”.

8.3 Inmunización de ratones BALB/C.

Para la generación de anticuerpos monoclonales, se utilizó la metodología descrita por Niebhur et al⁴⁴, en donde se inmunizaron dos ratones BALB/C hembras, de 7 semanas de edad con 30 µg de proteína recombinante, dividida en 6 dosis. La administración del antígeno fue vía subcutánea en las dos patas traseras de cada ratón. La inmunización, para cada uno de los ratones empleados, se realizó bajo el siguiente esquema:

Esquema de Inmunización en ratones BALB/C para la obtención de Anticuerpos Monoclonales contra HP0537

Número de días previas a la fusión	Número Inmunización	Contenido de inmunización	Observaciones
17 días	1ra Inmunización	Antígeno + Adyuvante de Freund Completo	Obtención de suero antes de la inmunización (Control negativo)
14 días	2da Inmunización	Antígeno + Adyuvante de Freund Incompleto	Animales sanos
10 días	3ra Inmunización	Antígeno en PBS 1X.	Animales sanos
7 días	4ta Inmunización	Antígeno en PBS 1X	Animales sanos
3 días	5ta Inmunización	Antígeno en PBS 1X	Obtención de suero (1er control positivo)
1 días	6ta Inmunización	Antígeno en PBS 1X	Animales sanos
Día 0	Fusión		Obtención de suero (2do control positivo)

Como se observa en el esquema, la inmunización se aplicó a los días 17, 14, 10, 7, 3 y 1 días previos a la fusión. Previo al inicio de éste esquema, se tomo una muestra de sangre de cada uno de los ratones; éstas representaron el control negativo en los ensayos de tamizaje de los anticuerpos obtenidos.

Una de las principales características de la inmunización local es que, a diferencia de la inmunización sistémica, los niveles de anticuerpos contra el antígeno de interés en el suero son muy bajos. De cualquier forma, se tomaron muestras después de la 5ta inmunización (a los 3 días previos a la fusión) y otra más previo al sacrificio de los animales (el día de la fusión).

8.4 Obtención de anticuerpos monoclonales

Material:

- Etanol al 70%
- PBS estéril y pre-calentado
- DMEM pre-calentado conteniendo 25 mM de HEPES sin suplementos.
- Polietilenglicol (PEG) al 50%.
- Cultivo celular con 2.7×10^8 células de Mieloma P3-X63-Ag8 (ATCC CRL 1580) para fusionar linfocitos obtenidos de 4 nódulos linfáticos. De acuerdo al proveedor, esa línea celular corresponde a linfoblastos de ratones que cursan con mieloma.

1. Los dos ratones fueron sacrificados para la obtención de 4 nódulos linfáticos que fueron disgregados. Los linfocitos, obtenidos a partir de la disgregación de los nódulos linfáticos, fueron mezclados con las células de mieloma y se resuspendieron en medio DMEM-HEPES en un tubo de 50 ml.

2. Se centrifugaron los linfocitos y las células de mieloma durante 5 min a 200 g.
3. La pastilla resultante del centrifugado se dispersó cuidadosamente, y se agregó 1 ml de PEG a 37 °C en un período de 1 min (gota a gota) mientras se agitaba cuidadosamente. Pasado este período, se continuó agitando por un minuto más.
4. Se diluyó el PEG cuidadosamente con la adición de DMEM-HEPES a 37°C, agregado gota a gota (1 mL en 30 s), y se incrementó la velocidad de adición (3 mL en 30 s) y finalmente, se llenó a un volumen final de 20 mL.
5. Se centrifugaron las células, y después se suspendieron en DMEM-HEPES con HA, y se colocaron en placas. Estas placas se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 4 días, el exceso de células de mieloma murieron, y 8 días después, las colonias de la fusión de hibridomas estuvieron listas para el tamizaje.

8.5 Tamizaje de anticuerpos monoclonales

8.5.1 Ensayos de Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA): para determinar si los anticuerpos generados son sensibles.

La sensibilidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos fue evaluada a través de Ensayos por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) directo, en donde, se utilizó como “tapizado” a la proteína recombinante HP0537. Como anticuerpo primario se utilizó cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas que se obtuvieron de los ratones inmunizados, y como anticuerpo secundario un anti-mouse comercial (anti-mouse HRP Sigm Aldrich) que viene marcado con la enzima peroxidasa, que cataliza una reacción cromógena en presencia de la solución reveladora Tetrametilbenzidina (TMB Invitrogen), para detectar la interacción Antígeno-Anticuerpo.

Material.

- Placas de 96 pozos para ELISA
 - Tubos Eppendorf
 - Micropipeta multicanal
 - Cámara húmeda
 - Placa para cargar micropipeta multicanal.
 - TMB
 - Lector de placas de ELISA
 - Buffer de carbonatos: 3.03 g de Na₂CO₃ y 6.0 g de NaHCO₃; para 1 Lt de solución, ajustado a pH de 9.5.
 - Para bloquear los pozos de las placas de ELISA, se preparó una solución de 1% de Albúmina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS1x.
 - Para los lavados, se utilizó una solución de Tween al 0.05%.en PBS 1x
1. Se diluyó el antígeno (Proteína recombinante HP0537) en el buffer de fosfatos, hasta llegar a una concentración final de 10 µg/mL en el buffer de Carbonatos. Agregar 50 µL a cada pozo de la placa para ELISA con la pipeta multicanal.
 2. Se cubrieron las placas apilando una sobre otra. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
 3. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el sobrenadante de los pozos de la placa. Se realizaron 3 lavados de los pozos utilizando PBS con Tween 20 al 0.05%; Cada uno de los lavados se realizaron con 5 minutos de agitación.

4. Después de los lavados, se agregaron 200 μ l de solución para bloquear (BSA 1% en PBS) por cada pozo.
5. Se cubrieron las placas apilando una sobre otra. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
6. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el sobrenadante de los pozos de la placa. Se realizaron 3 lavados de los pozos utilizando PBS con Tween 20 al 0.05%; Cada uno de los lavados consta de 5 minutos de agitación
7. Se agregaron 100 μ l de anticuerpo primario; se utilizó como anticuerpo primario el sobrenadante que se obtuvo a partir de los cultivos de los hibridomas.
8. Se Cubrieron las placas apilando una sobre otra. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
9. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el sobrenadante de los pozos de la placa. Se realizaron 3 lavados a los pozos utilizando PBS con Tween 20 al 0.05%; Cada uno de los lavados se realizó con 5 minutos de agitación
10. Se agregaron 100 μ l de anticuerpo secundario (anti-ratón IgG) a la concentración recomendada por el fabricante (Sigma Aldrich, conjugado con peroxidasa, a una concentración 1:30000).
11. Se cubrieron las placas apilando una caja sobre otra. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas.
12. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó el sobrenadante de los pozos de la placa. Se realizaron 3 lavados a los pozos, utilizando PBS con Tween 20 al 0.05%; Cada uno de los lavados se realizó con 5 minutos de agitación
13. Se agregaron 100 μ L de solución con sustrato (TMB) por cada pozo. Se incubaron las placas por 30 minutos a temperatura ambiente.

14. Transcurridos los 30 minutos, se agregaron 100 μ L de HCl 1 N para detener la reacción.

15. Se leyeron las placas a 450 nm en el lector de ELISA.

8.5.1 Ensayos de Western Blot; para determinar si los anticuerpos generados son específicos a la proteína HP0537

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos generados por los hibridomas obtenidos, se realizaron Western Blot (siguiendo la metodología descrita en la "producción y purificación de proteína HP0537"), a partir de la proteína recombinante HP0537, de lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformada con el pET537 y de lisados celulares en *H. pylori*:

a) Western Blot a partir de proteína recombinante HP0537

Un total de 7.9 μ g de proteína HP0537 se mezcló con buffer de carga (Laemli 3x) para montar un gel de poliacrilamida al 12%, del cual, se realizó una transferencia a una membrana de PVDF. La membrana transferida fue cortada en varias tiras (un total de 17 tiras), correspondiendo cada una de ellas a muestras que se indican a continuación:

1. Una de las tiras fue utilizada como control negativo: ésta tira fue expuesta en una solución del suero pre-inmune de los ratones empleados en la obtención de los anticuerpos monoclonales, por lo que en la muestra no debe haber presencia de anticuerpos contra HP0537.
2. Otra de las tiras fue empleada como control positivo: Ésta fue expuesta en una solución con anti-histidina (Sigma Aldrich, concentración 1:5000); debido a que la proteína recombinante HP0537 está etiquetada con 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal, ésta tira representará la señal que se busca en el resto de los sobrenadantes provenientes de los hibridomas.
3. Las otras 15 tiras, fueron expuestas en cada uno de los sobrenadantes provenientes de las clonas denominadas 1,2,3,5,6, 1E8,1F1, 1H2, 2A6, 3E1, 4C5, 7A2 y 7J8.

Cada una de estas muestras representaron el anticuerpo primario; con excepción del control positivo que solamente fue expuesto a la solución con anti-histidina. Las tiras se incubaron con su anticuerpo primario a 4 °C durante 17 horas.

Como anticuerpo secundario se utilizó el anti-ratón (Sigma Aldrich conjugado con peroxidasa, a una concentración 1:30,000 en PBS 1x). La incubación de las tiras en el anticuerpo secundario fue a 4 °C durante 2 horas.

b) Western Blot a partir de lisados celulares de fracción total de *E. coli* BL-21 transformada con pET537.

Un cultivo de *E. coli* transformada con pET537, se llevó a una D.O de 0.4 determinado a 600 nm, se agregó IPTG y L-arabinosa para inducir la expresión de la proteína HP0537. Se obtuvo el lisado celular de fracción total de ésta muestra y se realizaron electroforesis y transferencia a membrana de PVDF empleando el método ya descrito.

La membrana obtenida de la transferencia fue cortada en varias tiras (un total de 9 tiras), correspondiendo cada una de ellas a muestras que se indican a continuación:

1. Una de las tiras fue utilizada como control negativo: ésta tira fue expuesta en una solución del suero pre-inmune de los ratones empleados en la obtención de los anticuerpos monoclonales, por lo que en la muestra no debe haber presencia de anticuerpos contra HP0537.
2. Otra de las tiras fue empleada como control positivo: Ésta fue expuesta en una solución con anti-histidina (Sigma Aldrich, concentración 1:5000); debido a que la proteína recombinante HP0537 está etiquetada con 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal, ésta tira representará la señal que se busca en el resto de los sobrenadantes provenientes de los hibridomas.

3. Las otras 7 tiras, fueron expuestas en cada uno de los sobrenadantes provenientes de las clonas denominadas 1,2,3, 2A6, 4C5, 7A2 y 7J8.

Cada una de estas muestras, representan el anticuerpo primario, con excepción del control positivo, que solamente fue expuesto a la solución con anti-histidina, pues éstos anticuerpos ya vienen conjugados con peroxidasa. Las tiras se incubaron con su anticuerpo primario a 4 °C durante 17 horas.

El anticuerpo secundario empleado fue el Anti-Mouse (Sigma Aldrich conjugado con peroxidasa, a una concentración 1:30,000 en PBS 1x). La incubación de las tiras en el anticuerpo secundario fue a 4 °C durante 2 horas.

c) Western Blot a partir de lisados celulares de diversas cepas de *H. pylori*

Las cepas que se utilizaron en estos ensayos tienen las siguientes características:

- *H. pylori* cepa 26695, con número de proveedor ATCC 700392, proveniente de un aislamiento clínico de un paciente que cursaba con gastritis. Su genoma se encuentra completo en el banco de genes (Gene Bank) con el registro AE000511. Ésta cepa mantiene íntegra la Isla de Patogenicidad cag (cag-PAI (+)), por lo que es capaz de expresar todos los genes que ahí vienen codificados.²⁰
- *H. pylori* cepa 26695 mutante del gen hp0537, fue obtenida en nuestro laboratorio. Ésta cepa fue certificada y se determinó que la expresión del gen *hp0537* se encuentra interrumpida, y que no presentó efectos polares en genes “corriente abajo” (Datos no mostrados).
- *H. pylori* cepa 8822, con número de proveedor ATCC 51932, proviene de un aislamiento clínico. Su genoma completo aún no se encuentra reportado en el banco de genes (Gene Bank), sin embargo, está reportado que ésta cepa carece de la Isla de Patogenicidad cag (cag-PAI (-)).

Las cepas de *H. pylori* empleadas fueron cultivadas de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas; Una atmosfera de CO₂ al 10%, temperatura de crecimiento de 37 °C y pH de 7.0^{1,2}

Para la obtención de colonias, se hicieron cultivos en cajas Petrí con agar soya tripticaseína y sangre de carnero. El tiempo de incubación fue de 22 horas.

Para obtener lisados celulares, se propagaron las colonias obtenidas a medio de cultivo de brucela líquido con ciclodextrina al 0.5%. La incubación del medio de cultivo para la lisis se realizó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 630 nm. Una vez alcanzada la Densidad Óptica deseada, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 15 minutos. Después de la centrifugación, se decantó el sobrenadante, y se resuspendió la pastilla con 100 µl de solución PBS 1X SDS 1%. Ésta suspensión se calentó a 96 °C durante un período de 10 minutos. La suspensión resultante correspondió al lisado celular de fracción total, mismo que fue empleado para la electroforesis y transferencia a membrana de PVDF, siguiendo el protocolo ya descrito.

La membrana obtenida fue cortada en varias tiras (un total de 21 tiras), correspondiendo cada una de ellas a muestras que se indican a continuación:

1. Siete tiras, que contenían la transferencia del lisado celular de *H. pylori* cepa 8822, sirvieron para descartar que, los Anticuerpos Monoclonales generados, reconocieran de manera inespecífica proteínas codificadas fuera de *cag-PAI*.
2. Siete tiras, que contenían el lisado celular de *H. pylori* cepa 26695 mutante del gen *hp0537*, sirvieron para descartar que, los Anticuerpos Monoclonales generados, reconocieran de manera inespecífica proteínas homologas a VirB5 (HP0539, HP0522 y HP0541).
3. Siete tiras, que contenían la transferencia del lisado celular de *H. pylori* 26695, correspondieron a las muestras para verificar la señal correspondiente a la proteína HP0537.

Cada una de estas tiras fueron expuestas a los sobrenadantes de las clonas 1, 2, 3, 2A6, 4C5, 7A2 y 7J8. Y representaron al anticuerpo primario. Las tiras se incubaron con su anticuerpo primario a 4 °C durante 17 horas.

El anticuerpo secundario empleado fue el Anti-Mouse (Sigma Aldrich conjugado con peroxidasa, a una concentración 1:30,000 en PBS 1x). La incubación de las tiras en el anticuerpo secundario fue a 4 °C durante 2 horas.

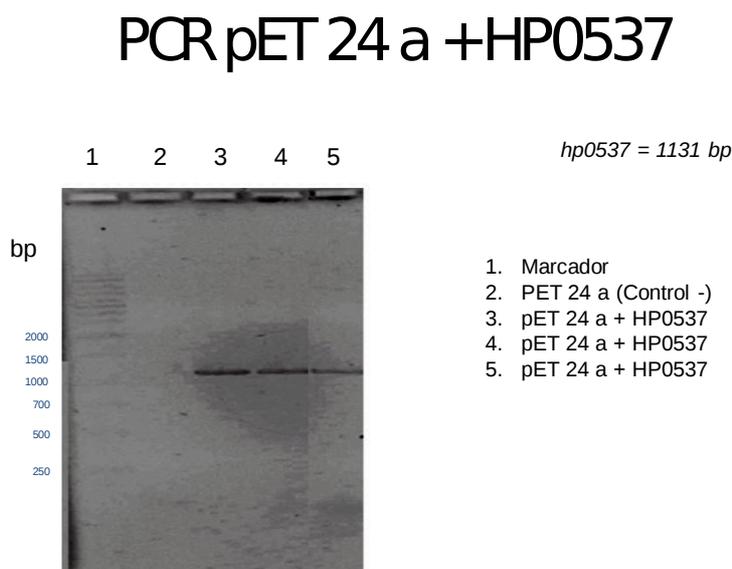
12. Resultados

Clonación del gen *hp0537* en el plásmido pET 24 a (+)

Con el fin de certificar la integridad del plásmido pET 24 a (+) con la inserción del gen *hp0537* (pET537), se realizó una PCR con los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *hp0537* en *H. pylori* cepa 26695. Los resultados obtenidos demostraron que el gen *hp0537* está integro y en fase de lectura en el vector de expresión.

El resultado de esa secuenciación es el siguiente:

A)



B)

```
5' ATGGGTCGCGGATCCCTTGCAAAAATCGTTTTAGCTCATTGGTTGCGTTTTGGAGTTTTGTCGGCTAATGTGGAGCAGTTTGGTTC
ATTTTTCAACGAGATAAAAAAAGACAAGAAGAAGTGGCTGCAAAAGAAGACGCTCTTAAGGCTCGCAAGAAGCTCTTAAACAATACG
CATGATTTCTTAGAAGACTTGATTTTTAGAAAACAAAAAATCAAAGAGCTTATGGATCATAGAGCTAAAGTTCTTTAGACTTAGAAA
ACAAATACAAAAAGAAAAAGGGCTCTAGAGAAAGAGACAAGAGGTAAAATCCTTACTGCTAAGTCAAAGGCTTATGGGGATTTGGA
GCAAGCCTTAAAAGATAACCTCTCTATAGGAAACTTCTTCTAACCTTATGCCTATGTTTTAAACCAGAAGAACTTCAACCAAGAA
GATAGGGAGCGTTTTGAGTTATTAACCCAGGTGAAAACGAGCAGTATTTTTAAAAAACCACCGCTACCACTAAAGATAAGGCTC
AGGCTTTGCTTCAAATGGGTGTGTTTTCTTAGATGAAGAACAACAAAAAGCGAGCCGATTAGCTTTATCTTACAAGCAAGCGAT
TGAAGAATATTTCAAATAACGTTTTCTAATTTATTGAGCAGAAAAGAATTTGGATAATATAGATTATTACTTACAGCTTGAAAGAAACAAG
TTTGACTCCAAGCAAAAAGATATTGCTCAAAGGCTACTAACCGCTTATTTTTAATTCGGAACGCTTGGCGTTTTAGCATGGCGATTG
ATAAGATCAATGAGAAATACCTTAAGGGGCTATGAGGCTTTTTCTAACTTGTGGAAAATGTCAAAGATGATGTGGAATTGAATACTCT
GACTAAAAATTTACCAATCAAAAATTGAGTTTCGCACAAAAACA AAAAATTGTGTTGTTGTTTGTAGACAGCTTCAATTTTGATACC
CAATCAAAAAA 3'
```

C)

Score = 1779 bits (963), Expect = 0.0
Identities = 963/963 (100%), Gaps = 0/963 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 16 CTTGCAAAAATCGTTTTAGCTCATTGGTTGCGTTTTGGAGTTTTGTCGGCTAATGTGGAG 75
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 4 CTTGCAAAAATCGTTTTAGCTCATTGGTTGCGTTTTGGAGTTTTGTCGGCTAATGTGGAG 63
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 76 CAGTTTGGTTCATTTTTCAACGAGATaaaaaaGAACAAGAAGAAGTGGCTGCAAAAGAA 135
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 64 CAGTTTGGTTCATTTTTCAACGAGATAAAAAAGAACAGAAGAAGTGGCTGCAAAAGAA 123
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 136 GACGCTCTTAAGGCTCGCAAGAAGCTCTTAAACAATACGCATGATTTCTTAGAAGACTTG 195
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 124 GACGCTCTTAAGGCTCGCAAGAAGCTCTTAAACAATACGCATGATTTCTTAGAAGACTTG 183
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 196 ATTTTTAGAAAACAAAAAATCAAAGAGCTTATGGATCATAGAGCTAAAGTTCTTTAGAC 255
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 184 ATTTTTAGAAAACAAAAAATCAAAGAGCTTATGGATCATAGAGCTAAAGTTCTTTAGAC 243
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 256 TTgaaaaacaaatcAAAAAagaaaaagaggctctagagaaagagacaagaggtaaaaTC 315
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 244 TTAGAAAACAAATACAAAAAGAAAAAGAGGCTCTAGAGAAAAGAGACAAGAGGTAATAATC 303
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 316 CTTACTGCTAAGTCAAAGGCTTATGGGATTTGGAGCAAGCCTTAAAGATAACCCCTCTC 375
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 304 CTTACTGCTAAGTCAAAGGCTTATGGGATTTGGAGCAAGCCTTAAAGATAACCCCTCTC 363
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 376 TATAGAAACTTCTTCTAACCCCTTATGCCTATGTTTTAAACCAAGAAACATTACCAAAA 435
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 364 TATAGAAACTTCTTCTAACCCCTTATGCCTATGTTTTAAACCAAGAAACATTACCAAAA 423
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 436 GAAGATAGGGAGCGTTTGAGTTATTAACCCAGGTGAAAACGAGCAGTATTTTTaaa 495
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 424 GAAGATAGGGAGCGTTTGAGTTATTAACCCAGGTGAAAACGAGCAGTATTTTTAAA 483
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 496 aaaaCACCCTACCACTAAAGATAAGGCTCAGGCTTTGCTTCAATGGGTGTGTTTTCT 555
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 484 AAAACACCCTACCACTAAAGATAAGGCTCAGGCTTTGCTTCAATGGGTGTGTTTTCT 543
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 556 TTAGATGAAGAACAAAAAAGCGAGCCGATTAGCTTTATCTTACAAGCAAGCGATT 615
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 544 TTAGATGAAGAACAAAAAAGCGAGCCGATTAGCTTTATCTTACAAGCAAGCGATT 603
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 616 GAAGAATATTTCAAATAACGTTTCTAATTTATTGAGCAGAAAAGAATTGGATAATATAGAT 675
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 604 GAAGAATATTTCAAATAACGTTTCTAATTTATTGAGCAGAAAAGAATTGGATAATATAGAT 663
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 676 TATTACTTACAGCTTGAAGAAACAAGTTTGACTCCAAGCAAAAAGATATTGCTCAAAG 735
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 664 TATTACTTACAGCTTGAAGAAACAAGTTTGACTCCAAGCAAAAAGATATTGCTCAAAG 723
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 736 GCTACTAACACGCTTATTTTTAATTCGGAACGCTTGGCGTTTAGCATGGCGATTGATAAG 795
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 724 GCTACTAACACGCTTATTTTTAATTCGGAACGCTTGGCGTTTAGCATGGCGATTGATAAG 783
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 796 ATCAATGAGAAATCTTAAGGGCTATGAGGCTTTTTCTAACTTGTGGAAAATGTCAAAA 855
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 784 ATCAATGAGAAATCTTAAGGGCTATGAGGCTTTTTCTAACTTGTGGAAAATGTCAAAA 843
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 856 GATGATGTGGAATTGAATACTCTGACTAAAAATTTACCAATCAAAAATTGAGTTTCGCA 915
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 844 GATGATGTGGAATTGAATACTCTGACTAAAAATTTACCAATCAAAAATTGAGTTTCGCA 903
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 916 CAAAAAATAAATGTTTGTGGTTTTAGACAGCTTCAATTTTATACCAATCAAAA 975
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 904 CAAAAAATAAATGTTTGTGGTTTTAGACAGCTTCAATTTTATACCAATCAAAA 963
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Query 976 AAA 978
| | |
Sbjct 964 AAA 966
```

Figura 8. A) PCR del pET537 en donde se amplificó el gen *hp0537*; esto demostró que el gen está integrado tras su inserción en el vector de expresión. B) Secuenciación del producto de PCR del pET537. C) Resultado de alineación por análisis en Blast de la secuenciación del producto de PCR del pET537 con el gen *hp0537*: la alineación tuvo como resultado la identidad de las dos secuencias del 100%.

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *hp0537* fueron capaces de reconocer y amplificar en la construcción del pET537 (figura 8A).

El producto de PCR obtenido a partir del pET537 se secuenció (Figura 8B), y se realizó un análisis, a través del software ORF Finding NCBI, en busca de los posibles marcos de lectura fuera de fase; al no encontrarlos, se determinó que el gen *hp0537* se encuentra en fase dentro de la construcción pET537 (Datos no mostrados).

El producto de PCR obtenido a partir del pET537 se alineó con el gen *hp0537* (secuencia reportada en el banco de genes GenBank), a través del software Blast NCBI (Figura 8C); el análisis arrojó una identidad del 100%.

Expresión de la proteína HP0537 en *E. coli* BL-21

La construcción pET537 fue utilizada para transformar la cepa BL-21 de *E. coli* bajo la premisa de que este plásmido contiene un casete que confiere resistencia a kanamicina, se utilizó como medio de cultivo agar de Luria-Bertani (LB) con este antibiótico para seleccionar aquellas clonas que fueron transformadas exitosamente.

Para verificar la expresión de la proteína HP0537 en la cepa BL-21 transformada, se seleccionaron al azar 3 colonias de la placa de LB con kanamicina (denominadas arbitrariamente como Colonia A, Colonia B y Colonia C) para realizar lisados celulares de fracción total. Dichos lisados fueron empleados para montar una electroforesis en gel de poliacrilamida al 16% para verificar el patrón de bandas de proteínas expresadas tras la inducción con IPTG 1mM y L-arabinosa 0.02% a diferentes tiempos; 1 hora, 2 horas y 3 horas. (Figura 9)

Inducción de la proteína HP0537; Lisado celular de fracción completa.

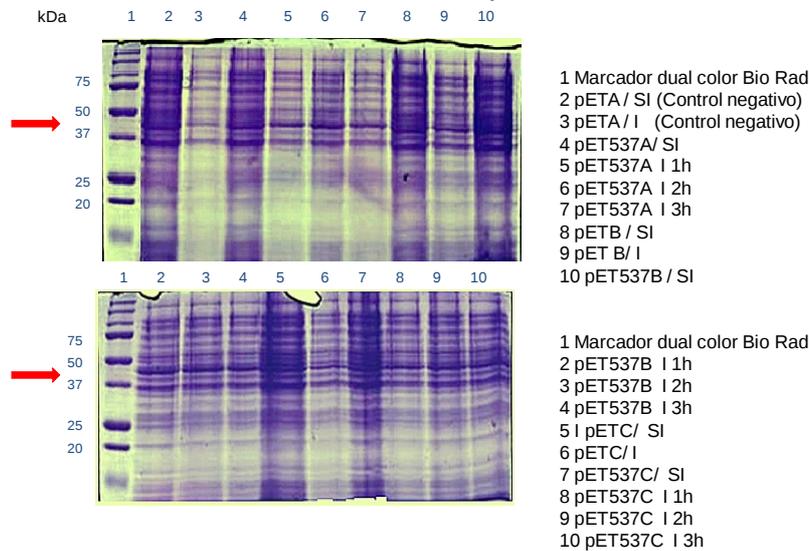


Figura 9. Geles de poliacrilamida 16% teñidos con azul deCoomassie. Electroforesis de lisado celular de fracción completa para buscar la expresión de la proteína HP0537: Las flechas en rojo indican la distancia a la que se debe encontrar la proteína HP0537 (44 KDa)

La tinción de gel con azul de Coomassie, a una concentración de poliacrilamida al 16%, no fue suficiente para apreciar la expresión de la proteína HP0537 (44 kDa) en cepas que han sido transformadas con el pET537, sin embargo, es útil para tener un fondo de comparación entre el patrón de bandas entre los controles negativos y la expresión de HP0537.

Para verificar la presencia de la proteína recombinante HP0537 en las cepas transformadas, se realizó la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF, para realizar ensayos de Western blot. Para ello se utilizó como único anticuerpo un anti-histidina IgG de caballo, este anticuerpo está acoplado con peroxidasa, el cual es capaz de reconocer, de manera específica, a la proteína recombinante HP0537 por su etiqueta de histidinas (ver Figura 10).

Inducción de la proteína HP0537; lisado celular de fracción completa (Transferencia Western Blot).

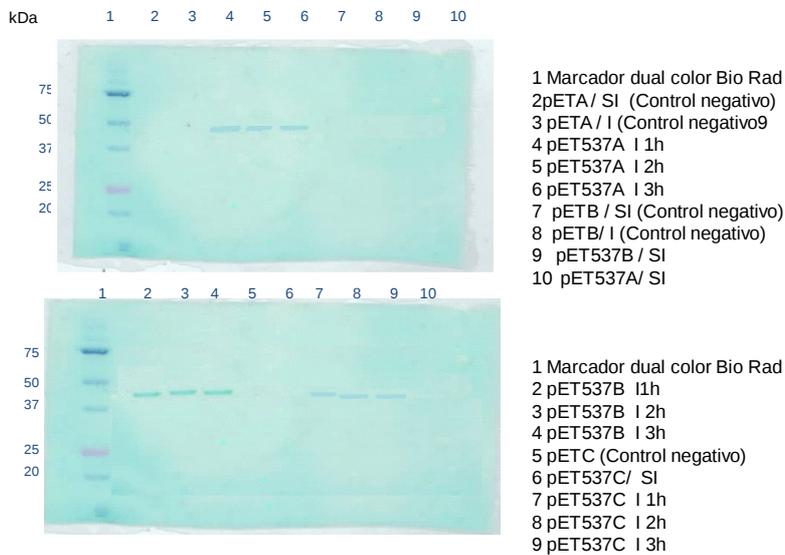


Figura 10. Western blot de la fracción completa de los lisados celulares; se reveló la presencia de la proteína HP0537 con la solución cromógena TMB Invitrogen.

Como se puede apreciar en la figura 10, los carriles cargados con los controles negativos, representados por cepas de *E. coli* BL-21 transformadas con el pET 24 a (+) sin inserción de gen (Carriles 2,3,7 y 8 de la membrana superior y carril 5 de la membrana inferior de la figura 10), no presentaron señal de reconocimiento por parte del anticuerpo anti-his. Tampoco presentaron esa señal de reconocimiento todos aquellos lisados celulares provenientes de cepas de *E. coli* BL-21 transformadas con el pET537 que no fueron inducidas con IPTG y L-Arabinosa (carriles 9 y 10 de la membrana superior y carril 6 de la membrana inferior de la figura 10).

Caso contrario al de los dos anteriores, fue el de las muestras correspondientes a los lisados celulares provenientes de cepas de *E. coli* BL-21 transformadas con el pET537 Inducidas con IPTG 1mM y L-Arabinosa 0.02%, en donde hubo presencia de señal de reconocimiento a la proteína recombinante HP0537 por parte del anticuerpo anti-his.

Para verificar en cuál de las fracciones del lisado celular se encuentra localizada la proteína recombinante en la cepa utilizada, se realizó una electroforesis de proteínas, en donde se disminuyó la concentración de poliacrilamida, del 16% al 12%, para mejorar la resolución del patrón de bandas.

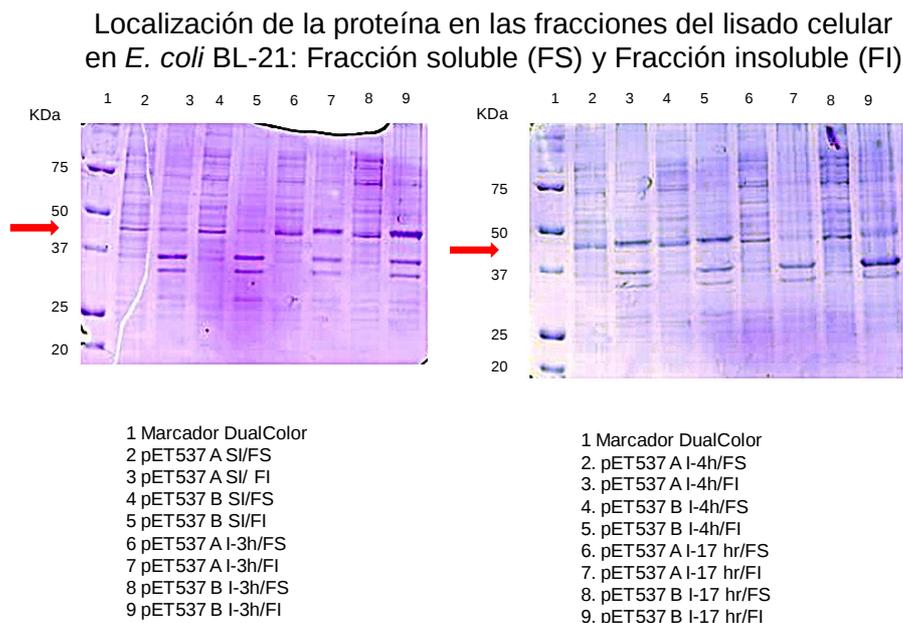


Figura 11. Electroforesis teñida con azul de Coomassie en donde se muestran las fracciones soluble e insoluble del lisado celular. Gel de poliacrilamida al 12%: Las flechas en rojo indican la distancia a la que se debe encontrar la proteína HP0537 (44 KDa)

Al disminuir la concentración de poliacrilamida al 12%, se observó una mejor resolución del patrón de bandas en las tinciones con azul de Coomassie. En el experimento realizado con las fracciones totales de los lisados celulares en *E. coli* BL-21, se demostró que los puntos de regulación con IPTG y L-Arabinosa son eficientes (Figuras 9 y 10), por lo que el uso de alícuotas sin inducir (SI) representaron nuestros controles negativos (carriles 2,3,4 y 5 del gel izquierdo de la figura 11). Ni en la fracción soluble ni en la fracción insoluble de los controles negativos, se aprecia la presencia de alguna banda con las características de HP0537 (44 KDa).

En cambio, las muestras inducidas con IPTG y L-Arabinosa presentan, tanto los lisados celulares de fracción soluble (carriles 6 y 8 del gel izquierdo y carriles 2 y 4 del gel derecho de la figura 11) como de fracción insoluble (carriles 7 y 9 del gel izquierdo y carriles 3 y 5 del gel derecho de la figura 11), una banda con las características de la proteína HP0537 (44 KDa). Esta banda se puede apreciar en la tinción de coomassie solo en las muestras inducidas por 3 y 4 horas; cuando la inducción llega a las 17 horas, parece que hay degradación.

Para determinar sí las bandas apreciables corresponden a la proteína recombinante HP0537 se realizó un Western blot, siguiendo los mismos pasos del lisado celular de fracción completa (Figura 12).

Localización de la proteína en las fracciones: soluble e insoluble

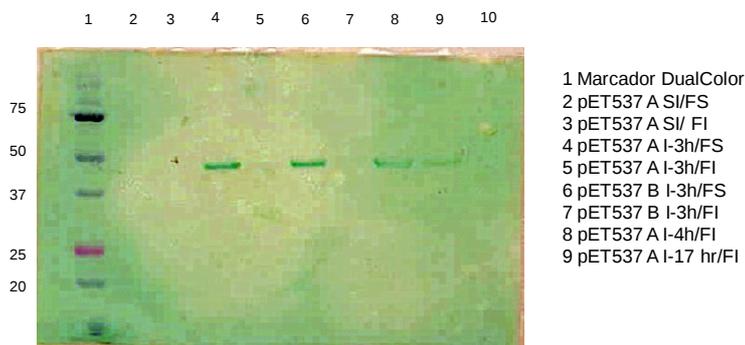


Figura 12. Wester blot de los lisados celulares para buscar la localización final de la proteína recombinante; Fracción soluble e Insoluble.

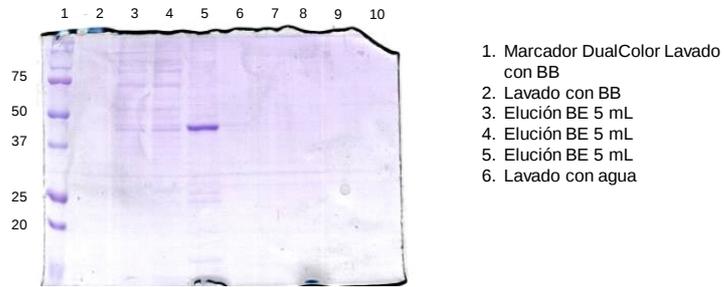
En la Figura 12 se observan varias bandas como producto de la reacción cromógena del TMB con la peróxidasa de los anticuerpos Anti-his; en todos los casos (tras la inducción por 3 horas, 4 horas y 17 horas), se pudo observar la expresión de la proteína en la fracción insoluble (carriles 4, 6, 8 y 9); mientras que en la fracción soluble no hubo señal de reconocimiento del anticuerpo anti-his. Este ensayo nos permite concluir que, tras su expresión, la localización

final de la proteína recombinante HP0537 en *E. coli* BL-21 fue la fracción insoluble del lisado celular. Y fue precisamente esta fracción la que se empleó para su purificación.

Purificación de la proteína recombinante HP0537

Para el uso de la columna de histidina (His-Trap GE) se realizaron lavados con Buffer de Unión (BB) y Buffer de Elución (BE) para recuperar proteína recombinante HP0537 enriquecida. Para determinar en cuál de esos lavados se recuperó a dicha proteína, se realizaron electroforesis y Western Blot. y se determinó que en el segundo volumen de elución (cada volumen es de 5 mL) se recupera en mayor proporción la proteína recombinante (Figura 13).

Purificación de Proteína recombinante HP0537



Purificación de proteína recombinante HP0537 (Western Blot)

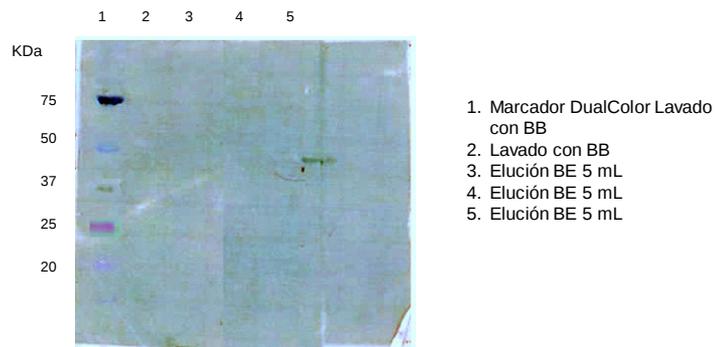


Figura 13. Electroforesis y transferencia (Western Blot) de las soluciones de lavados y elución obtenidos del proceso de purificación de proteína a través del uso de columna de Níquel

Para certificar que la proteína que se ha purificado está enriquecida, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% y teñida con plata.

Tinción de plata

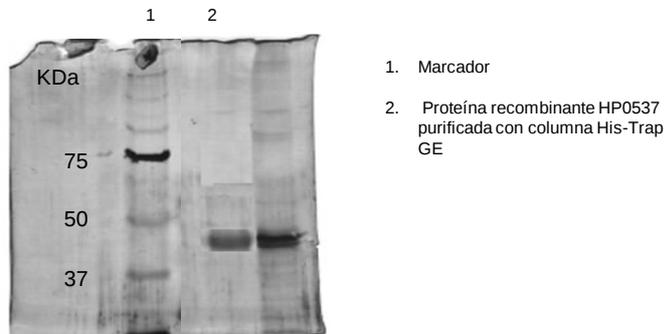


Figura 14. Electroforesis de proteínas con tinción de plata para certificar que, tras la purificación, la proteína recombinante HP0537 está enriquecida

En el carril 2 de la figura 13, se muestra las soluciones que contiene a la proteína enriquecida, no fue una fracción pura, al contener pequeñas cantidades de proteínas que expresa constitutivamente *E. coli* BL-21, sin embargo, esta fracción fue empleada en la inmunización de ratones para la obtención de linfocitos productores de anticuerpos y en los ensayos para el tamizaje de los anticuerpos (ELISA y Western Blot).

Obtención y tamizaje de anticuerpos monoclonales.

Para seleccionar hibridomas que fueron el resultado de la fusión entre células de mieloma y linfocitos, se empleó el medio HAT. La aminopterina, proporcionada por el medio mencionado, nos permitió eliminar a todos aquellos hibridomas que fueron el resultado de fusiones inespecíficas.

Un total de 1364 pozos fueron cultivados tras la fusión. De éstos, 258 sobrenadantes, provenientes de los cultivos, dieron señal de reconocimiento a la proteína HP0537 en ELISA (Clonas reactivas). Sólo 15 de las 258 clonas

reactivas sobrevivieron al efecto del medio HAT. A estas 15 clonas de hibridomas se les volvieron a practicar ELISAS, y volvieron a dar señal de reconocimiento a la proteína HP0537 en dicho ensayo, por lo que se estableció que estas 15 clonas de hibridomas son sensibles a la proteína HP0537 (Resultados en el Anexo 1 de la tesis).

Para determinar la especificidad de los anticuerpos generados por nuestras clonas de hibridomas, se realizaron ensayos de Western Blot con la proteína recombinante HP0537, empleando como anticuerpo primario cada uno de los sobrenadantes de los medios de cultivo de los hibridomas generados y como anticuerpo secundario un anti-mouse con peroxidasa acoplada.

Tamizaje por Western Blot de anticuerpos obtenidos de clonas de hibridomas; transferencia de proteína recombinante HP0537

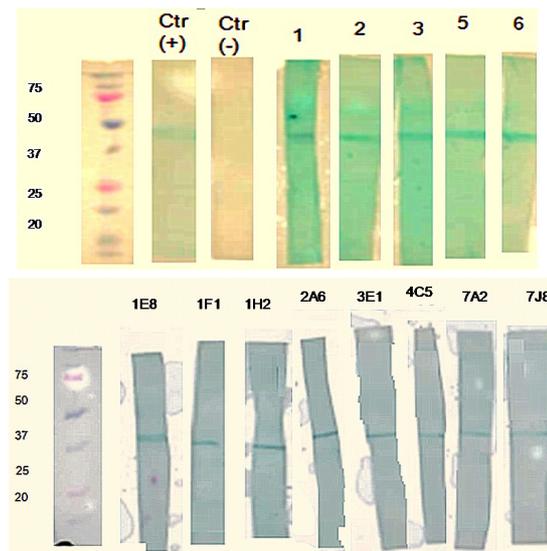


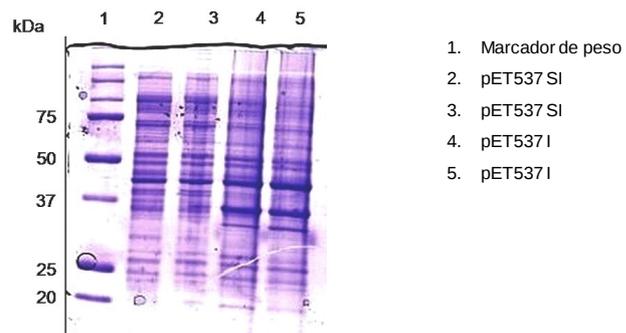
Figura 15. Tamizaje por Western Blot de 13 de las 15 clonas productoras de anticuerpos monoclonales; el control negativo consistió en el uso, como anticuerpo primario, del suero pre-inmune del mismo ratón del que se obtuvieron los linfocitos.

Se evaluaron 13 de las 15 clonas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína HP0537 (las que mayor intensidad de señal mostraron en los ELISA) a través de Western Blot. Las 13 clonas evaluadas dieron señal de reconocimiento a la proteína recombinante HP0537, y no se detectó diferente señal a los 44 kDa.

Con el fin de descartar que los anticuerpos generados en las clonas evaluadas no tuvieran reacción cruzada con alguna de las impurezas encontradas en la proteína recombinante HP0537 (evidenciadas por la tinción de plata), se eligieron 7 de los 13 sobrenadantes probados, para realizar ensayos Western Blot con lisados celulares de fracción total de *E. coli* BL-21 transformada con el pET537 e inducida con IPTG y L-Arabinosa.

a)

Lisado celular de *E. coli* BL-21 transformada con pET537



b)

Tamizaje de Anticuerpos Monoclonales a partir de lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformada con el pET537; inducción con IPTG y L-arabinosa

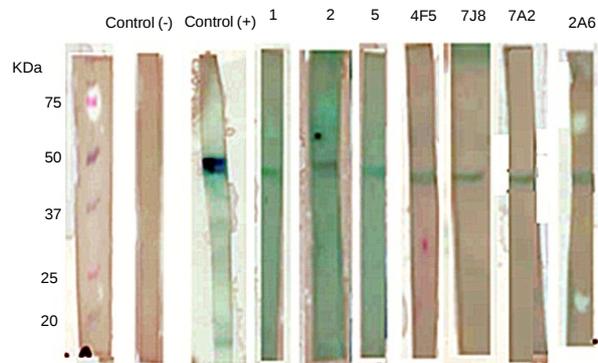


Figura 16. a) Gel de poliacrilamida 12% teñido con azul de Coomassie; Los carriles 2 y 3 fueron cargados con lisados celulares de fracción total de *E. coli* BL-21 transformada con pET537 sin inducir con IPTG y L-Arabinosa, mientras que los carriles 4 y 5 fueron cargados con lisados celulares de fracción total de *E. coli* BL-21 transformada con pET537 inducidos con IPTG 1mM y L-arabinosa 0.02% durante 3 horas. b) Western blot para determinar cualquier reacción cruzada por parte de los anticuerpos monoclonales obtenidos; el control positivo consistió del lisado celular Inducido con IPTG 1mM y L- arabinosa 0.02% durante 3 horas; el control negativo consistió del lisado celular sin inducir con IPTG y L-arabinosa. Ambos controles fueron expuestos a un solo anticuerpo Anti-his marcado con fosfatasa. Las muestras (sobrenadantes provenientes de los hibridomas) fueron evaluadas con lisados celulares de *E. coli* BL-21 inducidos con IPTG y L- arabinosa; en todos los casos, las muestras fueron empleados como anticuerpos primarios; como anticuerpo secundario se empleó Anti-ratón con fosfatasa acoplada.

De acuerdo al análisis bioinformático realizado por nuestro grupo de investigación, *H. pylori* cepa 26695 es capaz de expresar 4 proteínas homologas a VirB5 (HP0539, HP0537, HP0522 y HP0541) codificadas en *cag-PAI*. Debido a que éstas proteínas comparten dominios y semejanzas estructurales, existe la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales obtenidos, contra HP0537, tengan reacción cruzada con las otras tres proteínas homologas a VirB5. Para descartar los eventos mencionados, se realizaron ensayos de Western Blot a partir de lisados celulares de las cepas de *H. pylori* cepa 26695 (*cag-PAI*(+)), *H. pylori* cepa 8822 (*cag-PAI*(-)) y *H. pylori* cepa 26695 mutante del gen *hp0537* (Figuras 16 y 17).

Lisado celular, fracción total: *H. pylori*

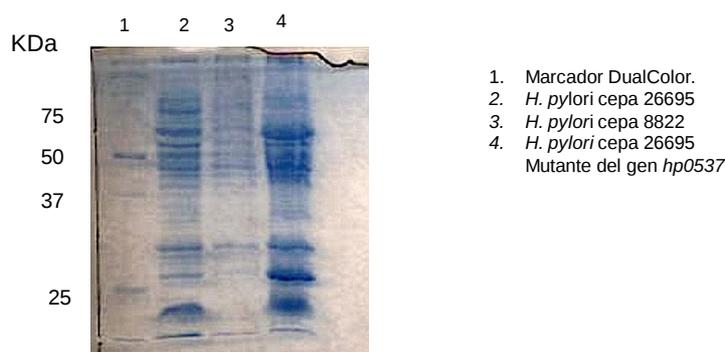


Figura 16. Gel de poliacrilamida al 12% de los lisados celulares de la fracción total de 3 cepas de *H. pylori*; la cepa 26695 contiene la *cag-PAI* completa (carril 2), la cepa 8822 carece de *cag-PAI* (carril 3), y una cepa 26695 interrumpida en el gen *hp0537* (carril 4).

Tamizaje de Anticuerpos Monoclonales contra
HP0537: Western Blot a partir de lisados celulares de
fracción total en diversas cepas de *H. pylori*

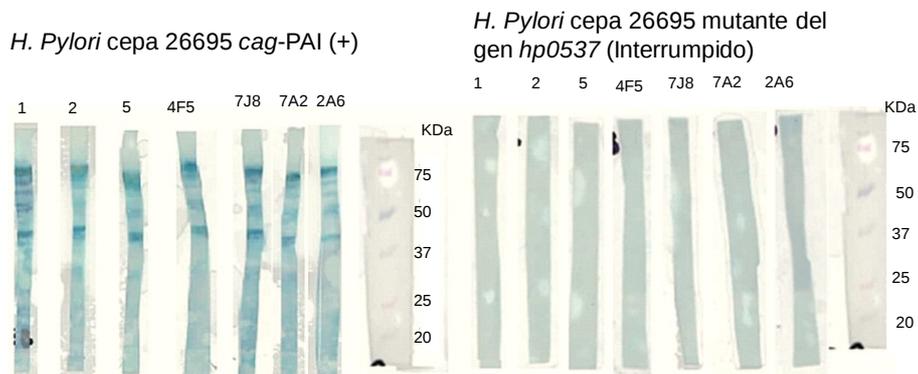


Figura 17. Western Blot de 7 de las 13 clonas que dieron señal contra la proteína HP0537; fueron retadas con lisados celulares de fracción total de de las cepas *H. pylori*: 26696, 8822 y 26695 mutada del gen *hp0537* (Interrumpido).

Las membranas con lisados celulares de *H. pylori* cepa 8822, no mostraron señal de reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Debido a que ésta cepa de *H. pylori* carece de *cag*-PAI, se deduce que los anticuerpos generados no reconocen proteínas de *H. pylori* codificadas fuera de *cag*-PAI.

Las membranas con lisados celulares de *H. pylori* cepa 26695 mutante del gen *hp0537* (interrumpido), no mostraron señal de reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales obtenidos. La cepa empleada en este ensayo, tiene la capacidad de expresar todos los genes de *cag*-PAI, con excepción de *hp0537*, por lo que representa un buen control para verificar que no se presente reacción cruzada, por parte de los anticuerpos obtenidos, con alguna de las proteínas VirB5 (HP0539, HP0522 y HP0541) codificadas en *cag*-PAI. En la figura 17 se observa que no existe señal de reconocimiento por parte de los anticuerpos obtenidos, por lo que nuestros anticuerpos no son capaces de establecer reacciones cruzadas.

Las membranas con lisados celulares de *H. pylori* cepa 26695, presentaron señal de reconocimiento por parte de los anticuerpos monoclonales obtenidos. Por lo que se establece que los anticuerpos generados solo reaccionan y reconocen en presencia de la proteína HP0537.

12 Discusión

La isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) de *H. pylori* ha sido el blanco de múltiples estudios, ya que datos epidemiológicos han arrojado evidencias de que aquellas cepas que contienen esa región son más virulentas^{54,55}. *cag*-PAI se ha estudiado en busca de dos objetivos principales:

El primero, con la finalidad de estudiar los genes codificados en esa región que son esenciales para inducir daño al hospedero: el estudio realizado por Fisher y col, fue determinante para demostrar que no todos los genes codificados en *cag*-PAI son esenciales para la inducción del daño al epitelio gástrico (tomando como parámetros la translocación de CagA y su fosforilación, además de la inducción de IL-8); tan solo son 14 los genes esenciales para que se desencadenen las cascadas de señalización implicadas en daño a epitelio gástrico: *hp0522*, *hp0523*, *hp0525*, *hp0527*, *hp0528*, *hp0529*, *hp0530*, *hp0531*, *hp0532*, *hp0537*, *hp0539*, *hp0541*, *hp0544* y *hp0546*^{29,56}

El segundo objetivo es el de diseñar un esquema que explique, de manera integral, cómo se ensambla el Sistema de secreción tipo IV en *H. pylori*, y cómo funciona este aparato; en base a la caracterización de moléculas codificadas en *cag*-PAI se están formulando hipótesis que expliquen el funcionamiento exacto del T4SS codificado en *cag*-PAI (*cag*-T4SS)⁵⁷.

A la fecha, se han podido caracterizar en su totalidad a las 12 proteínas que tienen homología al sistema VirB/D de *A. tumefaciens*; VirB1-HP0523, VirB2-HP0546, VirB3-HP0544, VirB4-HP0544, VirB5-HP0539, VirB6-HP0529, VirB7-HP0532, VirB8-HP0530, VirB9-HP0528, VirB10-HP0527, VirB11-HP0525 y VirD4-HP0524. Si se comparan estos datos con los de Fisher y col, se establece que de las doce proteínas homologas al sistema VirB/D, dos de ellas no son esenciales en la inducción de daño al epitelio gástrico por parte de *H. pylori*: VirB3-HP0544y VirD4-HP0524.^{57,58}

Todo lo mencionado anteriormente, da lugar a una hipótesis que es apoyada por varios investigadores, en donde se establecen que, de las 14 proteínas

esenciales en la patogénesis de *H. pylori* mediada por *cag*-PAI, 10 de ellas corresponden a proteínas que conforman al T4SS, mientras que las 4 restantes son proteínas “accesorias” o chaperonas⁵⁹.

En cuanto a la conformación del *cag*-T4SS, se han generado 2 hipótesis, en base a las proteínas caracterizadas, y a los hallazgos realizados en diferentes tiempos:

- 1) El *cag*-T4SS está conformado de forma idéntica a como se presenta en *A. tumefaciens*: proteínas que se encuentran localizadas en el citoplasma con actividad NTPasa, y que aportan la energía para el funcionamiento del aparato VirB4-HP0544, VirB11-HP0525 y VirD4-HPHP0524; proteínas que interaccionan y están ancladas en la membrana interna VirB6-059, VirB8-0530 y VirB10-HP0527; y proteínas que interaccionan en la membrana externa VirB7-HP0532 y VirB9-HP0528, todas éstas proteínas interaccionan en el periplasma para formar el “núcleo” del T4SS; por último, proteínas que conforman el pilus de translocación VirB2-HP0546 y VirB5-HP0539.^{23,31,32}
- 2) En el otro modelo propuesto para *cag*-T4SS, se piensa que las interacciones que suceden en el “núcleo” tienen un mayor grado de complejidad, y que participan mayor número de proteínas, incluyendo algunas que no guardan homología al sistema VirB/D de *A. tumefaciens*; en este modelo, se propone que la función de las proteínas HP0522 y HP0537 es darle estabilidad al T4SS al interaccionar con las proteínas VirB10-HP0527, VirB9-HP0528, VirB7-HP0532 y VirB2-HP0546.^{60,61} Y la característica que hace más interesante este modelo es el reporte de Rohde y col, en donde, a través de ensayos de inmunolocalización, determinaron que la proteína VirB10-HP0527 no solamente se encuentra anclada en el “núcleo” del *cag*-T4SS, sino que también conforma al pilus de translocación⁶².

Hasta el momento, el segundo modelo ha sido el más aceptado, ya que las evidencias indican que VirB2-HP0546, VirB5-HP0539 y VirB10-HP0527 conforman el pilus de translocación en cag-T4SS, aunque solo en VirB5-HP0539 y VirB10-HP0527 se ha podido corroborar esto a través de ensayos de inmunolocalización, pues no se han realizado éstos ensayos para VirB2-HP0546, o no han sido exitosos.^{30,61}

En nuestro grupo de investigación, proponemos un tercer modelo, basado en los resultados de un análisis bioinformático, en donde se encontró que las proteínas HP0522, HP0537 y HP0541, al igual que la reportada HP0539, guardan homología con proteínas VirB5 (Datos no mostrados). La presencia de 4 proteínas homologas a VirB5, hace al cag-T4SS redundante en cuanto a la expresión de proteínas que conforman al pilus de translocación. Esa redundancia le permitiría a *H. pylori*, no solamente interaccionar con receptores integrinas $\alpha 5\beta 1$ (receptor reconocible por VirB5-HP0539), también podría establecer interacción a través de otros receptores de superficie celular.

De poder demostrar que el modelo que proponemos es factible, tendríamos la oportunidad de corregir en la función que se pensaba tenían las proteínas HP0537 y HP0522 en el cag-T4SS, y se avanzaría significativamente en el conocimiento de la patogénesis de *H. pylori*.

La propuesta de nuestro grupo de investigación para apoyar el análisis bioinformático, empieza con el montaje de ensayos de inmunolocalización, en donde se espera que la proteína HP0537 sea parte constitutiva del pilus de translocación. Para realizar éstos ensayos, es necesaria la producción de anticuerpos que sean sensibles y específicos para la detección de la proteína HP0537 en un modelo de infección en células AGS. Y es por ello que nace este proyecto, de la necesidad de obtener esos anticuerpos.

Como se ha mencionado en la sección de la metodología, establecimos 5 pasos para la obtención de los anticuerpos monoclonales, que nos permite establecer los siguientes logros en este proyecto:

- El diseño y construcción del plásmido pET537, combinado con las características de la cepa empleada (*E. coli* BL-21), resultaron en un

sistema eficiente para la expresión y obtención de la proteína recombinante enriquecida. De acuerdo al grado de enriquecimiento que se tenga en la proteína purificada, se pueden aplicar para diversas metodologías, tales como una cristalografía para determinar su conformación tridimensional, o puede ser empleada como inmunógeno, para la generación de anticuerpos capaces de detectar su presencia en cualquier tipo de muestra. Un dato sobresaliente, que se obtuvo de los ensayos de inducción, fue que la proteína recombinante HP0537 se localiza en la fracción insoluble del lisado celular en *E. coli* BL-21, situación que demuestra que ésta proteína se encuentra embebida en la membrana celular, como sucede en *H. pylori*^{39,40}; y se hace énfasis en el dato porque en *H. pylori* se atribuye la localización de la proteína a una secuencia señal, que pareciera también es reconocida en el nuevo hospedero, *E. coli* BL-21.

- Si bien, la proteína que se obtuvo no está lo suficientemente enriquecida, como se muestra en la tinción de plata, sí la pudimos emplear como antígeno en la inmunización de ratones BALB/C, para la obtención de anticuerpos monoclonales. Esto se debe en gran parte a que la proteína HP0537 tiene potencial inmunogénico considerable.³⁹ El potencial inmunogénico de HP0537, no fue el único factor favorable para la obtención de nuestros anticuerpos monoclonales, pues el método de inmunización también ayudó en la eficiencia de la producción: Neihbur y col. mencionan en la publicación de su método, que es eficiente aún con el uso de antígenos con poco potencial inmunogénico, debido a que éste se deposita muy cerca del nódulo linfático en la inmunización. Y el resultado de la combinación de ambos factores (potencial inmunogénico de HP0537 y técnica de inmunización), es la gran eficiencia de la producción de clones de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales: de un total de 1,354 pozos cultivados, sobrevivieron 15 clones cuyos sobrenadantes dan señal de reconocimiento en presencia de la proteína HP0537, esto significa una eficiencia de 1.12% de clones de hibridomas, con la capacidad de generar anticuerpos sensibles a la proteína HP0537.

- Para descartar que alguna de las 15 clonas obtenidas pudieran dar señales inespecíficas (reacciones cruzadas con algún componente diferente de la proteína HP0537), se realizaron ensayos de Western Blot, los cuales, tienen gran especificidad (capacidad de detectar verdaderos negativos). En la figura 14, se observa que ninguno de los sobrenadantes de las 15 clonas dieron alguna señal de reconocimiento diferente de la que corresponde a la proteína HP0537 (44 kDa).
- Para aportar mayor validez de la especificidad de los anticuerpos generados, se realizaron Western Blot utilizando lisados celulares de *E. coli* BL-21 transformada con el vector de expresión pET537. Y como se puede apreciar en la imagen 15, no se detectó señal de reconocimiento diferente de la correspondiente a HP0537. Con esto se descarta que los anticuerpos generados tengan reacción cruzada con alguno de los componentes de *E. coli* BL-21, que fue el hospedero utilizado para la obtención de proteína recombinante.
- Debido a que *H. pylori* cuenta con 4 proteínas homologas a VirB5: HP0522, HP0537, HP0541 y la ya reportada y caracterizada HP0539, era necesario evaluar que los anticuerpos obtenidos no dieran reacción cruzada entre proteínas homologas. Para el ensayo, se emplearon 2 cepas como control negativo, de las que se obtuvieron lisados celulares de fracciones completas, que se expusieron, en ensayos de Western Blot, a los sobrenadantes de las 7 clonas evaluadas; El primer control negativo fue *H. pylori* cepa 8822, la cual, tiene la principal característica de carecer completamente de *cag*-PAI, el segundo control negativo fue *H. pylori* cepa 26695 mutado en el gen *HP0537* (interrumpido), esta cepa fue obtenida y certificada en nuestro grupo de investigación (es decir, no presenta efecto polar, situación que pudiera representar sesgos en el estudio). Ninguno de estos controles negativos dio señal de

reconocimiento apreciable tras la exposición a los anticuerpos generados. En cambio, cuando estos mismos anticuerpos fueron expuestos a lisados celulares con *H. pylori* cepa 26695, se encontró la señal de reconocimiento correspondiente a la proteína HP0537 (44 kDa).

Los resultados de estos ensayos permitieron establecer las siguientes características de nuestros anticuerpos obtenidos:

- 1) Dado que no hubo señal de ninguno de los anticuerpos frente a los lisados de *H. pylori* cepa 8822, entonces, nuestros anticuerpos no dan reacción en presencia de proteínas codificadas fuera de *cag-PAI*.
- 2) Dado que no hubo señal de ninguno de los anticuerpos frente a los lisados de *H. pylori* cepa 26695 mutada del gen *hp0537* (interrumpido) entonces, nuestros anticuerpos no dan reacción cruzada con otras proteínas homólogas a VirB5 (HP0522, HP0541 y HP0539), y reconocen solo a la proteína HP0537.

13 Conclusiones

- La construcción del vector de expresión pET537, en combinación con la cepa *E. coli* BL-21, son efectivos para la obtención de proteína recombinante HP0537
- La localización de la proteína HP0537 en *E. coli* BL-21 es en la membrana, de la misma forma en que se presenta en *H. pylori*, por lo que se establece que *E. coli* BL-21 es capaz de reconocer la secuencia señal de la proteína HP0537.
- Se obtuvieron 15 hibridomas capaces de generar anticuerpos monoclonales, que son sensibles para la detección de la proteína HP0537.
- De estos 15 hibridomas, al menos 7 son capaces de generar anticuerpos monoclonales, que no dan reacción cruzada con ninguna otra proteína expresada en *H. pylori*, incluyendo a otras proteínas homologas a VirB5 (HP0522, HP0541 y HP0539). Por lo que podemos afirmar que estos 7 hibridomas producen anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína HP0537.
- Debido a que estos 7 hibridomas generan anticuerpos monoclonales que son sensibles y específicos a la proteína HP0537, establecemos que los sobrenadantes, de estos hibridomas, representan anticuerpos candidatos para ser empleados en ensayos de inmunolocalización.

14 Bibliografía

1. Kusters JG. Van Vliet AHM y Kuipers JE. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* interaction. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 449-490
2. Aguilar GR, Ayala G. Fierros G. *Helicobacter pylori* recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. Salud Pública de México. 2001; 43(3): 237-247
3. Dunn BE. Cohen H. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4): 720-741
4. Malaty HM. Epidemiology of *H. pylori*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2007; 21(2): 205-214
5. Bruce MG and Maroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2008; 13(supp 1): 1-6
6. Paniagua-Contreras LG et al. Prevalencia de *Helicobacter pylori* y de los genotipos *VacA* y *CagA* en la saliva de pacientes con gastritis. Rev Med Hosp. Gen Mex. 2007; 70(3): 107-114
7. Camargo C. Lazcano E. et al. Determinants of *Helicobacter pylori* seroprevalence in mexican adolescent. Helicobacter. 2004; 9(2): 106-114
8. Torres J, Leal-Herrera Y et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. J. Infect. Dis. 1998; 178: 1089-1094.
9. Kikushi S. Dore MP. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2005; 10(supp 1): 1-4

10. Delport W. The transmission of *Helicobacter pylori*: The effects of analysis method and study population on inference. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2007; 21(2): 215-236
11. Scott Algood HM and Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interaction between *H. pylori* and host immune defenses. *Clin Microbiol rev*. 2006: 19(4); 597-613
12. Amiela RM and El-Omar EM. Host-bacterial interaction in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2008; 134; 306-323
13. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M. López-Vidal Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México*. 46(6); 538-548
14. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*. 2005: 3(4); 320-332
15. Blaser MJ and Artheron JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *The journal of clinical investigation*. 2004: 113(3); 321-333
16. Artheron JC et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in VacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1997: 112: 92-99
17. Censini S et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1996: 93; 14648-14653
18. Ding SZ Minohara Y Jun Fan X et al. *Helicobacter pylori* infection oxidative stress programmed cell death in human gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2007; 75(8); 4030-4039
19. Robinson K. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2007; 21(2): 237-259

20. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-547.
21. Marais A, Mendiz GL, Hazel SL and Mégraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: The genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999: 63(3); 642-674
22. Figueiredo C Machado JC and Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2005: 10 (suppl 1); 14-20
23. Backert S and Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 2008: 10(8); 1573-1581
24. Torres J and Backert S. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2008: 13(suppl 1); 13-17
25. Beckert S. Meyer TF. Type IV secretion system and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2006: 9(2); 207-217
26. Fronzes R, Christie PJ and Walksman G. The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2009: 7; 703-714
27. Alvarez Martinez CE, Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009: 73(4); 775-808
28. Yuan Q, Carles A, Gao C, Sivanesan D et al. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion system. *The journal of biological chemistry*. 2005: 280(28); 26349-26359
29. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology*. 2001: 42(5); 1337-1348.
30. Bourzac KM and Guillemin K. *Helicobacter pylori*-host cell interaction mediated by type IV secretion. *Cellular Microbiology*. 2005: 7(7); 911-919

31. Backert S, Fronzes R, Waksman G. VirB2 and VirB5 proteins: specialized adhesions in bacterial type-IV secretion system?. *Trends Microbiol.* 2008; 16(9); 409-413
32. Kwok T, Zabler D, Urman S et al. Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature.* 2007; 449; 862-867
33. Ausubel FM et al. Immunology. *Current Protocols In Molecular Biology.* 2003, Jhon Wiley & Sons, inc, pp 11.0.1-11.0.3
34. Harlow E and Lane D. Antibody-Antigen Interactions. *Antibodies: A Laboratory Manual.* 1988. CSH Press. pp 23-35
35. Sun Y et al. Avidity, Potency, and Croos-Reactivity of Monoclonal Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharide Serotype 6B. *Infect Immun.* 2001; 69(1); 336-344
36. Harlow E and Lane D. Immunizations. *Antibodies: A Laboratory Manual.* 1988. CSH Press. pp 53-114
37. Ausubel FM et al. Preparation of Polyclonal Antisera. *Current Protocols In Molecular Biology.* 2003, Jhon Wiley & Sons, inc, pp 11.12.1-11.12.2
38. Ward PA et al. Monoclonal Antibodies Production: A report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies, Institute for Laboratory Animal Research and National Research Council . 1999, National Academy Press Washington DC, pp 1-47
39. Harlow E and Lane D. Monoclonal Antibodies. *Antibodies: A Laboratory Manual.* 1988. CSH Press. pp 139-242
40. Payne WJ et al. Clinical Laboratory Applications of Monoclonal Antibodies. *Clin Microbiol Rev.* 1988; 1(3); 313-329
41. Salvana EM and Salata R. Infectious Complications Associated with Monoclonal Antibodies and Related Small Molecules. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22(2); 274-290

42. Mocarski ES et al. Precise localization of genes on large animal virus genome: use of λ gt11 and monoclonal antibodies to map the gene for a cytomegalovirus protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985: 82; 1266-1270
43. Steele M et al. Monoclonal Antibodies Specific for Hippurate Hydrolase of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2002: 40(3); 1080-1082
44. Niebuhr, K., Lingnau, A., Frank, R., and Wehland, J. Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 1998 2nd ed.vol. 2, San Diego, CA: Academic Press, 398–403.
45. Harlow E and Lane D. Growing Hybridomes. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988. CSH Press. pp 245-277
46. Harlow E and Lane D. Labeling antibodies. *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988. CSH Press. pp 283-312
47. E. F. Fritsch, J. Sambrook Maniatis, Thomas, Fritsch, E. F, Sambrook, Joseph. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. *Molecular cloning : a laboratory manual / T. Maniatis*. 1982. 3th ed Vol. 1 CSH Press, pp 1.1-1.105
48. E. F. Fritsch, J. Sambrook Maniatis, Thomas, Fritsch, E. F, Sambrook, Joseph. Expression of cloned genes in *Escherichia coli* *Molecular cloning: a laboratory manual / T. Maniatis*. 1982. 3th ed Vol. 1 CSH Press, pp 15.14-15.60
49. Heidcamp William. *Cell Biology Laboratory Manual*. Biology Department, Gustavus Adolphus College. 2009. <http://homepages.gac.edu/~cellab/contents.html>

50. GEHealthcare Bio-Science Corp. Purification of histidine-tagged recombinant proteins. Recombinant Protein Purification Handbook. 2000-2009. GE company, pp 25-99
51. GEHealthcare Bio-Science Corp. Purification of histidine-tagged recombinant proteins. Optimizing purification of histidine-tagged proteins. 2000- 2009. GE company, pp 103-109
52. GEHealthcare Bio-Science Corp. Membrane proteins. Purifying Challenging Proteins: Principles and methods. 2007. GE company, pp 9-49
53. GEHealthcare Bio-Science Corp. Inclusion bodies. Purifying Challenging Proteins: Principles and methods. 2007. GE company, pp 69-72
54. Haas G, Karaali G, Ebermayer K et al. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. Proteomics, 2002; 2; 313-324
55. Buster V, Torres V, McClain M et al. Protein-Protein among *Helicobacter pylori* Cag Proteins. J. Bacteriol. 2006 : 188 (13); 4787-4800
56. Cendron L, Couturier M, Angelin et al. The *Helicobacter pylori* CagD (HP0545, Cag24) protein is essential for CagA translocation and maximal induction of interleukin-8 secretion. J. Mol Biol. 2009; 386: 204-217.
57. Terradot L and Waksman G. Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. FEBS. 2011; 278: 1213-1222
58. Tegmeyer N et al. Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. FEBS. 2011; 278: 1190-1202
59. Cendron L and Zannoti G. Structural and functional aspects of unique type IV secretory components in the *Helicobacter pylori* *cag*-pathogenicity island FEBS. 2011; 278: 1223-1231

60. Giberman P, Josenhans C, Modley Y et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island . PLoS Genetics. 2010; 6 (8): 1-17
61. Rohde M et al. Characterization of the pilin ortholog of the Helicobacter pylori type IV cag pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. J Bacteriol. 2006; 188(16): 5865-5877
62. Pinto-Santini D and Salama N. Cag3 is a novel Essential Component of the Helicobacter pylori Cag Type IV System Outer Membrane Subcomplex. J. Bacteriol. 2009; 191 (23); 7343-7352

13. Anexo: Tamizaje de anticuerpos

Resultados de ELISA

Placa 1

0,07	0,07	0,07	0,11	0,21	0,33	0,37	0,37	0,4	0,22	0,16	0,09
0,08	0,07	0,08	0,18	0,18	0,24	0,24	0,23	0,16	0,09	0,07	0,08
0,08	0,08	0,14	0,17	0,26	0,22	0,26	0,14	0,1	0,07	0,07	0,08
0,07	0,08	0,17	0,3	0,32	0,2	0,23	0,09	0,07	0,07	0,07	0,14
0,1	0,1	0,18	0,32	0,3	0,25	0,13	0,07	0,07	0,07	0,07	0,19
0,1	0,18	0,17	0,22	0,21	0,16	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09	0,21
0,18	0,17	0,27	0,22	0,21	0,08	0,07	0,08	0,07	0,09	0,1	0,39
0,28	0,36	0,39	0,26	0,12	0,08	0,09	0,08	0,09	0,15	0,3	0,5
Promedio								0,12			

Placa 2

0,08	0,07	0,08	0,27	0,14	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,07
0,08	0,07	0,09	0,11	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
0,08	0,07	0,1	0,07	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,07
0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,13	0,07	0,07	0,16	0,06	0,09
0,09	0,14	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08
0,14	0,08	0,08	0,06	0,08	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
0,09	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07
0,11	0,09	0,09	0,07	0,09	0,08	0,08	0,09	0,13	0,08	0,23	0,25
Promedio								0,11			

Placa 3

0,07	0,07	0,15	0,35	0,34	0,09	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08
0,06	0,06	0,15	0,26	0,19	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,09
0,08	0,07	0,12	0,21	0,13	0,07	0,07	0,06	0,1	0,06	0,07	0,1
0,06	0,09	0,14	0,14	0,1	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08	0,07	0,09
0,07	0,1	0,16	0,13	0,08	0,07	0,07	0,08	0,06	0,06	0,07	0,07
0,06	0,09	0,12	0,11	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
0,12	0,11	0,11	0,09	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,12	0,06
0,12	0,21	0,08	0,08	0,08	0,07	0,06	0,04	0,11	0,13	0,2	0,23
Promedio								0,12			

Placa 7

0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08
0,19	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
0,26	0,11	0,11	0,13	0,15	0,13	0,1	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09
0,22	0,1	0,1	0,13	0,15	0,12	0,12	0,11	0,1	0,1	0,1	0,13
0,13	0,07	0,07	0,09	0,1	0,1	0,08	0,12	0,09	0,08	0,08	0,17
0,11	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,12	0,07	0,08	0,07	0,13
0,08	0,07	0,07	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,11	0,07	0,07	0,06
0,09	0,08	0,11	0,1	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,09
						Promedio		0,07			

Placa 8

0,09	0,18	0,22	0,13	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,1	0,13
0,08	0,08	0,16	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,11
0,08	0,11	0,22	0,18	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,08	0,16	0,27
0,08	0,12	0,33	0,22	0,11	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,16	0,12
0,09	0,13	0,37	0,42	0,25	0,07	0,06	0,07	0,07	0,15	0,16	0,11
0,1	0,19	0,39	0,39	0,18	0,07	0,06	0,06	0,07	0,1	0,17	0,12
0,15	0,27	0,35	0,38	0,18	0,07	0,06	0,07	0,08	0,13	0,22	0,12
0,27	0,36	0,54	0,44	0,17	0,07	0,06	0,07	0,11	0,14	0,23	0,17
						Promedio		0,12			

Placa 9

0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
0,12	0,08	0,07	0,1	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
0,17	0,1	0,12	0,14	0,15	0,16	0,12	0,09	0,08	0,07	0,08	0,11
0,17	0,11	0,09	0,13	0,15	0,16	0,17	0,13	0,11	0,09	0,1	0,22
0,14	0,07	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,1	0,12	0,09	0,07	0,15
0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,09
0,08	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09
0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,09	0,11	0,07	0,09
						Promedio		0,1			

Placa 10

0,08	0,08	0,17	0,5	0,33	0,09	0,14	0,06	0,08	0,07	0,11	0,16
0,07	0,1	0,14	0,17	0,12	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08	0,09	0,12
0,09	0,09	0,11	0,27	0,11	0,07	0,07	0,06	0,07	0,09	0,08	0,09
0,12	0,08	0,12	0,17	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,08	0,08	0,1
0,22	0,08	0,19	0,14	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,1
0,12	0,07	0,16	0,09	0,07	0,07	0,06	0,08	0,08	0,09	0,07	0,08
0,14	0,08	0,16	0,08	0,07	0,07	0,08	0,12	0,09	0,09	0,08	0,09
0,2	0,19	0,64	0,13	0,08	0,08	0,13	0,13	0,12	0,11	0,14	0,1
Promedio								0,12			

Placa 11

0,09	0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09
0,19	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
0,08	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,09	0,17	0,07	0,17	0,07	0,09
0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,17	0,07	0,07	0,07	0,11
0,09	0,12	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,16	0,07	0,08
0,09	0,07	0,07	0,17	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07
0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08
0,1	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,1	0,08	0,08	0,1
Promedio								0,09			

Placa 12

0,27	0,91	0,35	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,31	0,25	0,09
0,11	0,5	0,26	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,22	0,09	0,07
0,09	0,48	0,25	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,19	0,11	0,07
0,09	0,44	0,22	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,23	0,17	0,07
0,1	0,27	0,19	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,2	0,14	0,08
0,1	0,25	0,3	0,1	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,15	0,18	0,08
0,1	0,22	0,34	0,13	0,08	0,07	0,08	0,08	0,09	0,13	0,21	0,1
0,16	0,33	0,65	0,28	0,09	0,09	0,09	0,1	0,1	0,14	0,33	0,17
Promedio								0,12			

Placa 13

0,15	0,1	0,1	0,11	0,1	0,08	0,09	0,08	0,1	0,1	0,12	0,21
0,09	0,08	0,08	0,1	0,08	0,07	0,08	0,07	0,09	0,09	0,11	0,17
0,09	0,08	0,08	0,1	0,08	0,08	0,08	0,07	0,1	0,09	0,11	0,12
0,09	0,07	0,1	0,1	0,07	0,09	0,08	0,07	0,09	0,09	0,09	0,1
0,09	0,1	0,13	0,28	0,08	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08	0,11	0,11
0,1	0,1	0,11	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,1	0,13	0,1
0,08	0,1	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,1	0,1	0,1	0,11	0,12
0,12	0,14	0,13	0,13	0,1	0,1	0,13	0,09	0,12	0,13	0,12	0,14
Promedio								0,12	0,13	0,12	0,14

Placa 14

0,1	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08	0,1	0,09
0,08	0,08	0,09	0,09	0,1	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09
0,08	0,1	0,08	0,15	0,11	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,09
0,09	0,13	0,11	0,16	0,1	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,1
0,18	0,12	0,13	0,18	0,14	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08
0,28	0,12	0,15	0,1	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,08
0,26	0,11	0,15	0,09	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07
0,33	0,18	0,09	0,08	0,08	0,08	0,17	0,13	0,12	0,1	0,1	0,08
Promedio							0,09	0,12	0,1	0,1	0,08

Placa 15

0,08	0,07	0,15	0,1	0,31	0,14	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08
0,07	0,08	0,13	0,29	0,09	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,06	0,1
0,07	0,15	0,21	0,13	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,09	0,06	0,11
0,1	0,13	0,4	0,09	0,06	0,06	0,07	0,08	0,07	0,07	0,09	0,19
0,13	0,31	0,19	0,06	0,06	0,09	0,08	0,16	0,16	0,1	0,12	0,15
0,58	0,49	0,28	0,62	0,25	0,11	0,68	0,41	0,25	0,09	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Promedio									0,11	None	None

15 Clonas evaluadas

0,21	0,33	0,37	0,37	0,4	0,22	0,26	0,28	0,24	0,24	0,23	0,17
0,32	0,3	0,25	0,19	0,15	0,14	0,15	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Promedio				0,17							

	Control negativo	Suero de ratón pre-inmune
	Control positivo	Suero de ratón después de las 6 inmunizaciones.
	Clonas sobrevivientes y evaluadas por segunda vez por ELISA	

Dado que la inmunización en ratones BALB/C fue local, no se espera la presencia de una cantidad significativa de anticuerpos a nivel sistémico; eso explica la baja intensidad de la señal detectada en los controles positivos. Las muestras positivas fueron aquellas que mostraron valores de señal más intensa que el promedio de las señales que dieron los controles negativos.

Las 15 clonas obtenidas fueron nombradas, de manera arbitraria, de la siguiente forma: Clona 1, Clona 2, Clona 3, Clona 5, Clona 6, Clona 1H2, Clona 1E8, Clona 1F1, Clona 2A8, Clona 3E1, Clona 4C5, Clona 7A2, Clona 7J8, Clona 12B6 y Clona 14A2