



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES  
CONTRA LA PROTEÍNA Pic DE *Escherichia coli*  
ENTEROAGREGATIVA Y SU REACTIVIDAD CONTRA  
PROTEÍNAS AUTOTRANSPORTADORAS**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA  
AHOLIBA GARCÍA PICÓN**



**UNAM  
CUAUTITLÁN**

**ASESORES: DR. JORGE MATEO VILLASECA FLORES  
Q.F.B. OLGA MATA RUIZ  
CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

DEPARTAMENTO DE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Producción de Anticuerpos Monoclonales contra la Proteína

Pic de Escherichia coli Enteroagregativa y su Reactividad

contra Proteínas Autotransportadoras".

que presenta la pasante: Aholiba García Picón

con número de cuenta: 301193894 para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Septiembre de 2009.

PRESIDENTE

MC. Andrea A. Becerril Osnaya

VOCAL

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

SECRETARIO

Dr. Jorge Mateo Villaseca Flores

PRIMER SUPLENTE

Dr. Andrés Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE

QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil

**“PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA  
LA PROTEÍNA Pic DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA Y SU  
REACTIVIDAD CONTRA PROTEÍNAS  
AUTOTRANSPORTADORAS”**



**UNAM**



**InDRE**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, 3er piso, Torre de Investigación, del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México; y en el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES:**

**Dedico este trabajo con todo mi amor y cariño a mis padres María de Jesús Picón Rangel y Bonifacio García Hernández, a quienes admiro y amo profundamente. Gracias por amarme y por apoyarme en todas las etapas de mi vida. Papá, tu autoridad es ahora fértil; Mama tu apoyo es inmenso, mi gratitud es el prestigio que ante mis ojos ustedes han ganado. LOS AMO.**

### **A MIS HERMANOS:**

**Gerardo, Carlos, Ariel y Leví; por todos los momentos compartidos, su apoyo y por el amor que nos une.**

### **PARA ALGUIEN ESPECIAL:**

**DANIEL, gracias por estar conmigo, por todo tu apoyo, por ser como eres, por regalarme lo bueno de ti... Por que durante esta etapa de mi vida recibí muchas alegrías a tu lado, te dedico este trabajo con todo mi amor. Te amo mi niño, contigo he aprendido y he conocido intensos sentimientos, eres la alegría de mi corazón y siempre que te miro, mi alma sonrío y me lleno de emoción por tener a mi lado a una persona como tu.**

**DE FORMA MUY ESPECIAL:**

**Al Dr. Jorge M. Villaseca Flores, por todo su apoyo en la dirección y realización de esta tesis.**

**A la Q.F.B. Olga Mata Ruiz, por su amistad, apoyo y constantes indicaciones que lograron llevar a buen término esta tesis.**

**A la M. en C. Yolanda Medina Flores, por su amistad, apoyo y por impulsarme a participar en este proyecto, así como por los comentarios a este trabajo.**

**Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez, por su apoyo y opinión del trabajo.**

**A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO:**

**Por que todos ellos de alguna manera, en algún momento, me apoyaron;**

**Al M. en C. Juan Carlos Carpio Pedroza, por su apoyo en la realización de la fusión celular y por todos sus acertados comentarios y sugerencias.**

**A la Q.F.B Araceli Zavala, por su apoyo en todo lo relacionado a cultivo celular y por sus valiosos comentarios y sugerencias a este trabajo.**

**A la M. en C. América del Pilar Mandujano, por su amistad, apoyo y sugerencias en la revisión del mismo.**

**A la M. en C. Araceli Rodríguez, por su amistad, apoyo y sugerencias a este trabajo.**

**A la M. en C. Edith Medina, por sus observaciones y sugerencias en la revisión de este trabajo.**

**Al Sr. Mario Valdivia, por su amistad y apoyo técnico en la realización de esta trabajo.**

**A la Sra. Patricia Moreno Durán, por su apoyo técnico en la purificación de las proteínas.**

**A Antonio Meza, por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.**

**A MIS SINODALES:**

**Los Profesores, M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya, Dra. Susana E. Mendoza Elvira, Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil, Dr. Andrés Romero Rojas, quienes revisaron y participaron con sus comentarios y sugerencias en el presente trabajo.**

## ÍNDICE

pág.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.2 Mecanismos de patogenicidad y clasificación	1
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigenica (ETEC)	2
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> Enteropatogenica (EPEC)	2
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	3
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	3
1.2.5 <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	4
1.3 SPATE (Serine Protease Autotransporter of <i>Enterobacteriaceae</i> )	5
1.3.1 Pic (Proteína Involucrada en la Colonización al intestino)	8
1.4 Las inmunoglobulinas	9
1.5 Los anticuerpos monoclonales	12
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1 Obtención de Proteínas Autotransportadoras	19
4.1.1 Cepas bacterianas	19
4.1.2 Purificación de la proteína Pic	19
4.1.3 Cuantificación de Proteínas por Reactivo de Bradford	20
4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	20
4.2 Producción de anticuerpos monoclonales	21

4.2.1 Inmunización y sangrado	22
4.2.2 Determinación del título de anticuerpos por ELISA	23
4.2.3 Cultivo celular	24
4.2.4 Fusión celular	25
4.2.4.1 Preparación de las células de bazo	25
4.2.4.2 Preparación de las células de mieloma	25
4.2.5 Selección y mantenimiento de híbridos en cultivo	26
4.2.6 Clonación de hibridomas	27
4.2.7 Caracterización de los Anticuerpos Monoclonales	28
4.2.7.1 Determinación de clases de Anticuerpos	28
4.2.8 Determinación de Reacciones Cruzadas	28
4.2.8.1 Inmunoelectrotransferencia (IET)	28
5. RESULTADOS	30
5.1 Purificación de Pic y de las otras proteínas autotransportadoras	30
5.2 Inmunización	33
5.3 Fusión celular	34
5.4 Clonación	34
5.5 Determinación de clase de los AcMos	36
5.6 Determinación de Reacciones Cruzadas	37
5.7 Reactividad de los Anticuerpos Monoclonales a Pic	38
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	43
8. REFERENCIAS	44



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Características de las Inmunoglobulinas de ratón.	11
<b>Tabla 2.</b> Esquema de inmunización de los ratones	22
<b>Tabla 3.</b> Calendario para realizar cambio de medio de cultivo a las células.	27
<b>Tabla 4.</b> Resumen de la purificación de Pic	31
<b>Tabla 5.</b> Resumen de la purificación de las otras toxinas empleadas en la determinación de reacciones cruzadas.	32
<b>Tabla 6.</b> Resumen de resultados de la fusión	34
<b>Tabla 7.</b> Clonas obtenidas del híbrido 52F7	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patrón de adherencia agregativa a células en cultivo HEp-2.	4
<b>Figura 2.</b> Estructura básica de las proteínas autotransportadoras.	7
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de secreción Tipo V, de las SPATE	7
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica de un anticuerpo como una IgG.	9
<b>Figura 5.</b> Esquema general de la producción de anticuerpos monoclonales	14
<b>Figura 6.</b> Diagrama que muestra las vías de novo para la síntesis de nucleótidos	15
<b>Figura 7.</b> Esquemización de la técnica de ELISA.	24
<b>Figura 8.</b> Proceso de purificación de Pic. SDS-PAGE al 6%. Precipitación con sales.	30
<b>Figura 9.</b> Proceso de purificación de las proteínas autotransportadoras en SDS-PAGE al 6%.	31
<b>Figura 10.</b> Respuesta inmune humoral del ratón	33
<b>Figura 11.</b> Híbridos obtenidos contra la Proteína Pic	34
<b>Figura 12.</b> Clonas obtenidas contra Pic	35
<b>Figura 13.</b> Determinación del tipo de clase de los AcMo's por ELISA.	36
<b>Figura 14.</b> Reconocimiento de la proteína Pic por diferentes anticuerpos monoclonales.	37
<b>Figura 15.</b> Resultados del ensayo de ELISA para la determinación de reacciones cruzadas del AcMo anti-Pic contra las proteínas Pet y Sat	38
<b>Figura 16.</b> IET que muestra las reacciones cruzadas que presenta el AcMo 52F7F7C5 con las proteínas autotransportadoras.	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>52F7F7C5</b>	Anticuerpo monoclonal anti-Pic
<b>ACF</b>	Adyuvante Completo de Freud
<b>AIF</b>	Adyuvante Incompleto de Freud
<b>AcMo</b>	Anticuerpo Monoclonal
<b>AcMo's</b>	Anticuerpos Monoclonales
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
<b>ELISA</b>	Ensayo Inmunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbant Assay)
<b>Fab</b>	Fragmento que se une al antígeno (fragment antigen binding)
<b>Fc</b>	Factor cristizable
<b>H</b>	Cadena pesada
<b>HAT</b>	Hipoxantina Aminopterina Timidina
<b>HT</b>	Hipoxantina Timidina
<b>Hep-2</b>	Línea celular tipo epitelial derivada de carcinoma de laringe
<b>HGPRT</b>	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
<b>IET</b>	Inmunolectrotransferencia
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Ig A</b>	Inmunoglobulina A
<b>Ig D</b>	Inmunoglobulina D
<b>Ig E</b>	Inmunoglobulina E
<b>Ig G</b>	Inmunoglobulina G
<b>Ig M</b>	Inmunoglobulina M

<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>L</b>	Cadena Ligera
<b>LT</b>	Toxina termolábil
<b>M</b>	Molar
<b>MDa</b>	MegaDaltons
<b>MI</b>	Mililitros
<b>NC</b>	Nitrocelulosa
<b>Nm</b>	Nanómetros
<b>PBS</b>	Solución Salina de Fosfatos
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>Pet</b>	Toxina codificada por plásmido ( <b>P</b> asmid encoded toxin)
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PI</b>	Preimmune
<b>Pic</b>	Proteína involucrada en colonización al intestino ( <b>P</b> rotein involved intestinal colonization)
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>pp.</b>	Precipitado
<b>RPMI-1640</b>	Medio de cultivo para células linfoides desarrollado por el Instituto Roswell Parque Memorial
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SLT</b>	Toxina termoestable semejante a la de Shiga
<b>SN</b>	Sobrenadante
<b>SPATE</b>	Proteínas autotransportadoras de serina proteasa de <i>Enterobacteriaceae</i> ( <b>S</b> erine <b>P</b> rotease <b>A</b> utotransporter of <i>Enterobacteriaceae</i> )
<b>ST</b>	Toxina termoestable
<b>TK</b>	Timidina cinasa
<b>VT</b>	Verotoxina
<b>X63Ag8.653</b>	Línea celular de mieloma de ratón (Ag8)

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) es un patógeno intestinal, causa diarrea persistente y diarrea con sangre; principalmente en niños de países en desarrollo. La adherencia y la producción de toxinas se consideran entre los más importantes mecanismos de patogenicidad de la bacteria. La proteína involucrada en la colonización intestinal Pic, es una toxina producida por EAEC y *Shigella flexneri* 2<sup>a</sup>. Esta molécula pesa alrededor de 110 kDa y posee actividad de mucinasa, resistencia al suero, actividad de hemaglutinina, participa en la ruptura de hemoglobina y en menor grado rompe fodrina. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas autotransportadoras de serina proteasa de *Enterobacteriaceae* (SPATE) que se han relacionado con virulencia bacteriana.

En este trabajo se describe la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) contra la proteína Pic de EAEC y su reactividad contra otras proteínas autotransportadoras. La proteína Pic se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de la clona p56 por medio de precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico. Con la proteína Pic se inmunizaron ratones Balb/c para obtener títulos altos de anticuerpos, los cuales fueron determinados por ELISA. Para la obtención de hibridomas productoras de AcMo anti-Pic, células esplénicas de ratones hiperinmunes se fusionaron con células de mieloma X63Ag8.653 (Ag8), utilizando polietilenglicol. Los híbridos resultantes de la fusión fueron seleccionados metabólicamente con medio HAT. Células productoras de anticuerpos anti-Pic fueron detectados probando el sobrenadante del cultivo de los hibridomas por ELISA. Las células positivas se clonaron y subclonaron por dilución limitante. Mediante inmunoelectrotransferencia (IET) se determinó que las clonas reconocían la proteína Pic de 110 kDa. Los AcMo generados mostraron ser de la clase IgG. Se seleccionó una clona (52F7) y se indujo líquido de ascitis en ratón, del cual se purificó el AcMo por cromatografía de afinidad en Protein A-Sepharose. Al determinar la reactividad de este AcMo con otras proteínas autotransportadoras se encontró que presenta reacciones cruzadas con las proteínas Pet, Sat, EspC y con una proteína de alto peso molecular de la cepa EAEC 2403. Estos resultados indican que este anticuerpo reconoce un epítopo que es compartido o similar dentro de esas proteínas autotransportadoras. Estos anticuerpos pueden ser de utilidad en la detección de proteínas autotransportadoras presentes en diferentes grupos patógenos de *E. coli*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Escherichia coli*

*E. coli* es un bacilo corto Gram negativo, no esporulado generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Frecuentemente presenta una cápsula y algunas cepas producen colonias mucoides. Es un anaerobio facultativo, crece en medios de cultivo simples y sintéticos en presencia de glicerol o glucosa, como única fuente de carbono y energía. Fermenta la glucosa y produce ácido y gas. El cultivo en medio líquido de cepas lisas producen una turbiedad uniforme, mientras que las cepas rugosas presentan un sobrenadante claro, con un depósito granular de crecimiento. Sobre medios sólidos, las colonias son circulares y lisas, con borde bien definido. En medio conteniendo eritrocitos lavados, se observa alfa o beta hemólisis, relacionados con la producción de hemolisinas. Este microorganismo es un predominante de la microbiota del colon humano, ya que coloniza el tracto digestivo dentro de las primeras horas de vida y establece una asociación benéfica con su hospedero (1).

## 1.2 Mecanismos de patogenicidad y clasificación.

*E. coli* es inocuo cuando esta confinado al lumen intestinal; su hábitat natural, sin embargo, cuando el huésped se encuentra en estados de debilidad o inmunosupresión, o cuando la bacteria sale del tracto gastrointestinal y coloniza otros órganos, pueden causar enfermedad. A semejanza de muchos patógenos de mucosas, *E. coli* causante de enfermedad en el intestino, sigue una secuencia de infección, y sus mecanismos básicos de patogenicidad son de tres tipos: 1) Adherencia, esta permite que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino; 2) Producción de proteínas bacterianas (toxinas); estas son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino. Dependiendo de las características de éstas; su efecto puede ser la estimulación de secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas), entre otros; 3) Invasión, éste mecanismo permite la reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, con esta propiedad la bacteria evade los mecanismos de protección del hospedero. La participación de cada uno de estos eventos celulares conduce al daño de órganos y/o tejidos del hospedero (2).

Considerando su distribución, epidemiología, los factores de virulencia y los síndromes clínicos que ocasionan, han permitido clasificar a *E. coli* en los grupos: Enterotoxigénico (ETEC), enteropatógeno (EPEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasor (EIEC) y enteroagregativo (EAEC) (3-4).

### **1.2.1 *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

Las cepas ETEC elaboran al menos uno de los dos grupos de enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Las cepas ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en países en vías de desarrollo, así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo; síndrome conocido como diarrea del viajero. (5).

### **1.2.2 *E. coli* Enteropatógena (EPEC)**

Estudios con microscopía electrónica revelan que las cepas EPEC se adhieren a la membrana del enterocito de manera íntima, observándose destrucción importante de las vellosidades intestinales, causando un esfacelamiento del epitelio intestinal (6).

Diversos estudios muestra que existen cuando menos tres tipos de adherencia de *E. coli*, observados en células en cultivo HEp-2: 1) Localizada, caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular (7); 2) Difusa, cuando las bacterias se adherían a toda la superficie celular y 3) Agregativa, cuando las bacterias formaban acúmulos, con una apariencia de ladrillos apilados tanto en la superficie celular, como en el vidrio de la preparación (8,9).

Diferentes estudios señalan que las cepas de *E. coli*, con adherencia de tipo localizado, se aíslan significativamente con mayor frecuencia de niños con diarrea secretora aguda (10-12).

### **1.2.3 *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

EHEC incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo 0157:H7; considerado como prototipo de este grupo (14). EHEC se asocia con la etiopatogenia de la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. Las cepas responsables de estos cuadros tienen la capacidad para elaborar una o más citotoxinas semejante a la de Shiga (SLT), por la característica que tiene una de las variedades de cruzar antígenicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y, el término de verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero.

### **1.2.4 *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

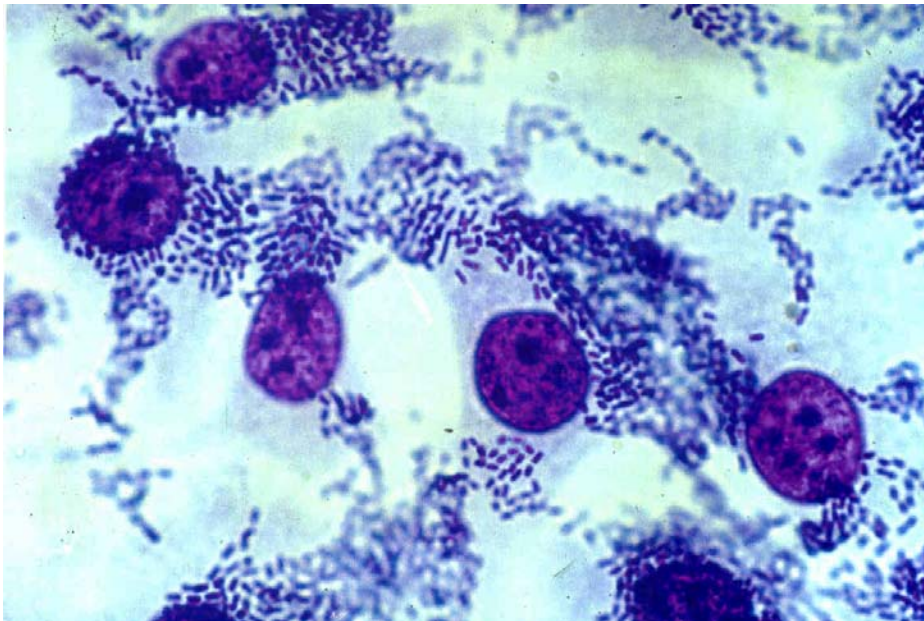
Las cepas EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patogénicas relacionadas con las del genero *Shigella*, agente etiológico de la disentería bacilar. A semejanza del genero *Shigella*, las cepas EIEC son generalmente lisina descarboxilasa negativas, no móviles y no fermentadores de lactosa (14).

Para que estas bacterias invadan y se multipliquen en el interior de las células, se requiere que posean un lipopolisacárido liso, ya que las cepas rugosas son incapaces de producir queratoconjuntivitis en la cornea de cobayo (Prueba de Sereny) (15).

Las características clínicas de la enfermedad se manifiestan por fiebre, severo dolor abdominal, diarrea acuosa, que sugiere la producción de algún tipo de enterotoxina, seguido de diarrea tipo disentería con sangre y moco.

### 1.2.5 *E.coli* Enteroagregativa (EAEC)

Las cepas EAEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presenta en células HEp-2 en cultivo (16-17). Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilados (“stacked brick”), que se observa tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación (Figura 1). La adherencia agregativa está relacionada con la presencia de un plásmido de 65 MDa (17).



**Figura 1.** Patrón de adherencia agregativa a células en cultivo HEp-2. Las bacterias se adhieren tanto a la superficie del citoplasma de la célula como al vidrio de la preparación formando empalizadas (100x).

El grupo EAEC ha adquirido relevancia en los últimos años por considerársele responsable de cuadros de diarrea persistente (duración de 14 días o más), diarrea aguda (duración de hasta 13 días) y diarrea con sangre, en niños de diversas regiones geográficas, principalmente de países en vías de desarrollo (17-22). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe asociación entre el aislamiento de EAEC y la presencia de diarrea, comparado con lo observado en individuos sanos ( $p < 0.05$ ) (23).



Las características clínicas de la infección intestinal por EAEC muestran una diarrea acuosa con moco, fiebre en bajo grado y en ocasiones vomito. La presencia de sangre en heces se ha reportado en un poco mas de la tercera parte de pacientes con diarrea asociada a EAEC (19). Voluntarios infectados con la cepa EAEC 042 (044:H18) presentaron diarrea escasa, con moco, sin sangre ni leucocitos fecales ocultos; en este estudio se observo que todos los voluntarios permanecieron sin fiebre y que el periodo de incubación de la bacteria era de 8-18 horas (24).

Para explicar el mecanismo por el cual EAEC causa diarrea, se ha recurrido a la observación de pacientes infectados, se han realizado estudios con voluntarios, se han utilizado modelos con animales y se han realizado ensayos *in vitro*. Con los resultados obtenidos, se ha propuesto un modelo hipotético que comprende tres estados. El I, involucra la adherencia inicial de la bacteria a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco, a través de estructuras fimbriadas, fimbrias de adherencia agregativa I (AFF/I), II (AFF/II) y III (AFF/III). En la etapa II, se plantea la participación de un proceso que incrementa la producción de moco, el depósito de una capa gruesa de moco en la que está incrustada la bacteria, formando una biopelícula. El estado III, propone la elaboración de toxinas y/o la inflamación (sugerido por las evidencias histológicas y moleculares), lo cual conduce al daño de la mucosa intestinal (1, 23).

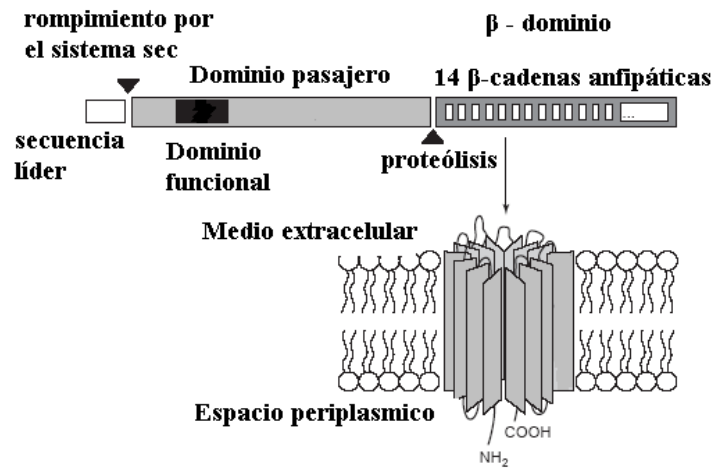
### **1.3 SPATE (Serine Protease Autotransporter of *Enterobacteriaceae*)**

Las especies de *E. coli* y *Shigella* son responsables de una variedad de enfermedades, extendiéndose de infecciones del tracto urinario a diarrea persistente. Un mecanismo de patogenicidad que comparten estos microorganismos es la secreción de proteínas de alto peso molecular con propiedades toxicas, las cuales le confieren a estas bacterias su carácter de virulencia. Estos factores están incluidos dentro de una subfamilia nombrada SPATE (serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*), las cuales a su vez pertenecen a las proteínas auttransportadoras de tipo V. Estas proteínas tienen como característica común un dominio funcional de serina proteasa y se han relacionado con las proteasas para inmunoglobulina A de bacterias de las especies *Neisseria* y *Haemophilus* (25). Las proteínas autotransportadoras poseen una estructura

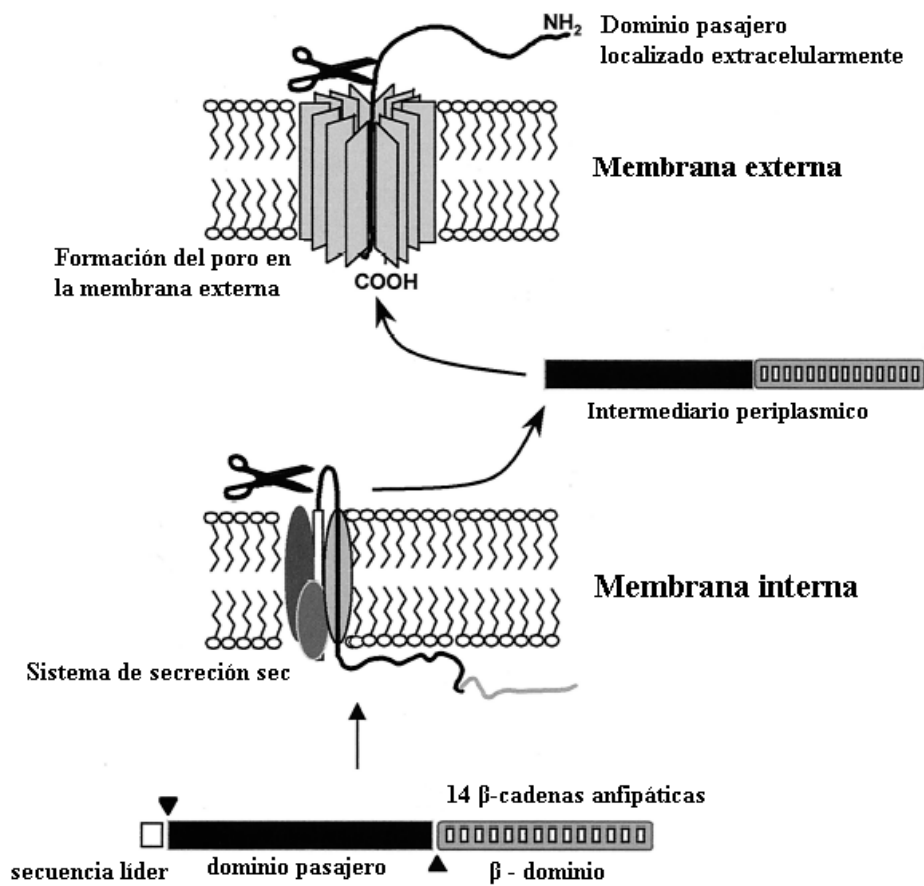
unificada compuesta por la secuencia líder amino-terminal, la proteína madura secretada (dominio pasajero), que posee los dominios funcionales, incluyendo el dominio de serina proteasa (G<sup>256</sup>DSGSGV) y un dominio carboxilo terminal (beta) que forma un poro barril-β para permitir la secreción de la proteína pasajera (Figuras 2 y 3). Estas proteínas incluyen a la proteína involucrada en la colonización intestinal Pic (protein involved in intestinal colonization) de EAEC y *Shigella flexneri* (26), EspC de EPEC, EspP de EHEC, Pet (Plasmid-encoded toxin) de EAEC, Sat de *E. coli* uropatógena (UPEC), Tsh de *E. coli* patógena de aves y SepA de *S. flexneri*.

Varias funciones han sido propuestas para las proteínas SPATE. Se ha demostrado que EspC actúa como una enterotoxina sobre el tejido jejunal de rata montado en cámara de Ussing. EspP degrada tanto pepsina como el factor V de coagulación humano, el efecto más reciente es que se cree que actúa potencialmente en la exacerbación de la colitis hemorrágica. Además, EspP puede actuar como una citotoxina, causando la interrupción de la red de actina cuando es cultivada en células Vero. Sat, aislado de una cepa de *E. coli* uropatógena CFT073, produce efectos citopáticos sobre células HEp-2 y células Vero de riñón de mono. Estos efectos no sólo incluyen el alargamiento de estas células sino también vacuolización en otras líneas de células y tejidos de animal. Benjelloun - Touimi y colaboradores (27) demostraron que SepA es una proteína abundante en el sobrenadante de *Shigella spp.*, y juega un papel importante causando inflamación intestinal e invasión de tejido. Provenza y Curtis describieron Tsh como una hemaglutinina sensible a la temperatura en *E. coli* patógenas de aves. Otros investigadores han confirmado el efecto de hemaglutinación de una proteína idéntica, Hbp, y desde entonces también han demostrado su capacidad para degradar la hemoglobina y el papel que juega en la formación de abscesos por *Bacteroides fragilis*. (25).

Se cree que Pet contribuye en la patogénesis de EAEC y ha sido estudiado exhaustivamente. Recibió la nominación Pet (Plasmid-encoded toxin), por ser una proteína codificada por plásmido (28). El blanco celular de Pet es la molécula de fodrina o espectrina (29), molécula cuya función es de servir de andamio o sostén a la membrana celular. La actividad de Pet es desestabilizar el citoesqueleto membranal y la disminución de las fibras de estrés de actina.



**Figura 2.** Estructura básica de las proteínas autotransportadoras. Estas proteínas poseen una estructura funcional formada por tres dominios; una secuencia líder amino-terminal, un dominio pasajero, y un dominio carboxilo terminal ( $\beta$ -dominio).



**Figura 3.** Mecanismo de secreción TipoV, de las SPATE.

### **1.3.1 Pic (Proteína Involucrada en la Colonización)**

Se ha reportado la presencia de Pic en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas EAEC aisladas de niños con diarrea. Al evaluar la actividad de esta proteína en el modelo de asa ligada de intestino de rata (30), se observó que se presentaba acortamiento de las vellosidades intestinales, hemorragia, necrosis y ulceración del epitelio superior. Las alteraciones histológicas son semejantes a las descritas previamente en otros estudios, en los que se utilizaron cepas EAEC vivas.

El gen que codifica para la proteína de Pic se localiza en el cromosoma, tanto de las cepas EAEC, como en las cepas de *Shigella flexneri*. Este gen se nombró *she* o *pic* (26). La proteína codificada por éste gen se ha relacionado con la colonización al intestino, por lo que se le denominó Pic por ser una proteína involucrada en colonización al intestino (protein involved in intestinal colonization).

Esta molécula pesa alrededor de 110 kDa y posee actividad como mucinasa, además posee actividad de hemaglutinina y participa en la ruptura de la molécula de hemoglobina para la liberación de hierro y posteriormente en la captación del mismo. También, aunque en menor grado rompe fodrina (26), como lo hace Pet. Esta proteína pertenece a la familia SPATEs, proteasas que se han relacionado con virulencia.

Pic muestra homología con la proteína EspP de EHEC (31); con EspC de EPEC (32), con SigA, ShMu (proteína que participa en la invasión a los tejidos), SepA y She (33) de *Shigella* (33,34), también, con Tsh, una hemaglutinina de cepas de *E. coli* patógenas de aves (35).

La detección de Pic por métodos moleculares para estudios de epidemiología molecular para ver la frecuencia de la presencia del gene *pic*, y por otro lado, la frecuencia de expresión de las proteínas Pic en el sobrenadante de los cultivos de las cepas EAEC es de gran utilidad para estudiar la distribución de estos factores de patogenicidad dentro del grupo enteroagregativo (36-37), ya que como anteriormente se ha mencionado, este factor es una causa directa de daño al intestino, como lo demuestra el hecho de que las cepas EAEC aisladas de pacientes expresan este factor y los individuos que las portan presenta cuadros de diarrea persistente, diarrea aguda o diarrea con sangre. Hasta el momento, aunque se han descritos diferentes metodologías para su detección como son el ELISA, dot-blot e Inmunoblot, en los cuales se han utilizado anticuerpos policlonales, no se ha podido eliminar el cruce inmunológico con otras proteínas autotransportadoras de otros grupos patógenos de *E. coli*, por lo que es indispensable el

desarrollo de una prueba inmunológica simple, rápida y altamente sensible y específica (38); una alternativa es la producción de anticuerpos monoclonales contra Pic de EAEC como herramienta para diseñar estas técnicas inmunológicas con mayor especificidad.

#### 1.4 Las Inmunoglobulinas

La respuesta humoral es efectuada por inmunoglobulinas (Ig), que son moléculas solubles con actividad de anticuerpo, es decir se combinan específicamente con un determinado epítipo del antígeno que indujo su producción. Estructuralmente todas las Ig están formadas por una unidad básica de cuatro cadenas unidas entre si por puentes disulfuro: dos pesadas (H, del inglés *heavy*), con secuencias exclusivas en cada isotipo, y dos ligeras (L) que son comunes para todas. Esta unidad está conformada por tres porciones globulares, dos Fab (del inglés *antigen binding fragment*, fragmento que se une al antígeno) que poseen dos sitios activos, y un Fc (del inglés *crystallizable fragment*, fragmento que se cristaliza); cada Fab consta de una de las cadenas ligeras y la mitad amino-terminal de una cadena H (donde se ubican las regiones variables que confieren especificidad de anticuerpo), y el Fc incluye las dos mitades carboxi-terminales de ambas cadenas H (Figura 4).(39)

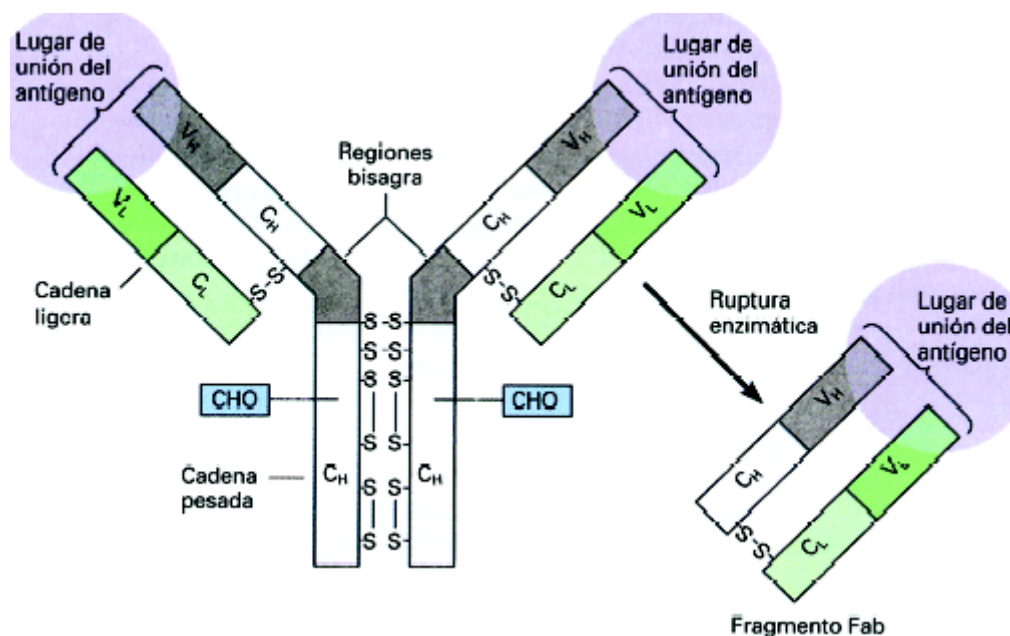


Figura 4. Representación gráfica de un anticuerpo como una IgG.

En el humano existen cinco clases de Ig: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE; la IgG tiene cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y la IgA dos (IgA1 e IgA2). En el ratón se encuentran cuatro diferentes subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Tabla 1). Todas las Ig tienen actividad de anticuerpo y, a excepción de la IgD, participan en fenómenos de protección y daño. La unión de los anticuerpos con su antígeno puede bastar para que éste quede neutralizado y ya no se adhiera a células blanco; la reacción antígeno-anticuerpo también favorece que la Ig se una a receptores para su porción Fc en la superficie de células o active otros sistemas moleculares. En prácticamente todas las infecciones se ha documentado alguna forma de protección mediada por anticuerpos, con o sin participación del complemento o de células. La patogenicidad de muchos agentes infecciosos es debida a que cuentan con mecanismos de evasión del efecto de los anticuerpos, por ejemplo que queden recubiertos de moléculas del hospedero de modo que el agente queda mimetizado, la presencia de cubiertas protectoras, la secreción de mitógenos inductores de respuestas policlonales heterólogas con formación de anticuerpos no específicos para el agente, la secreción de enzimas que rompen las Ig en fragmentos fisiológicamente inactivos, etc. (40)

**Tabla 1. Características de las Inmunoglobulinas de ratón.**

Características	IgM	IgD	IgG	IgE	IgA
<b>Peso Molecular</b>	900 000	180 000	160 000	190 000	170 000 - 500 000
<b>Cadenas ligeras</b>	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ	κ ó λ
<b>Cadenas pesadas</b>	μ (80 000)	δ (65 000)	γ (55 000)	ε (80 000)	α (70 000)
<b>Subclases</b>	1	1	4 (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3)	1	1
<b>Carbohidratos</b>	9 – 12%	12 – 15%	2 – 3%	12%	7 – 11%
<b>Concentración en suero</b>	0.1-1.0	0.001-0.01	3-20	0.0001-0.001	1-3
<b>Vida media en suero (días)</b>	1	< 1	4 ( IgG1, IgG2a, IgG3 ) 2 (IgG2b)	Corto < 1	1
<b>Citotoxicidad mediada por complemento</b>	+	-	+	-	-
<b>Pase a través de la placenta</b>	-	-	+	-	-
<b>Propiedades especiales</b>	Primer anticuerpo en la mayoría de respuestas.	Clase mayor en la superficie de los linfocitos. Clase menor en suero.	Clase mayor en suero. Linfocitos que lleven IgG son raros.	Clase menor en suero. Responsable de la respuesta alérgica, liberación de histamina y serotonina.	Clase mayor en secreciones (lágrimas, saliva, bilis y estómago).

## **1.5 Los Anticuerpos Monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales (AcMos), son inmunoglobulinas homogéneas secretadas por clones celulares derivados de una única célula, capaces de proliferar en cultivo y/o propagarse en animales genéticamente compatibles (41). Son producidos por células híbridas producto de la fusión de células B de un ratón inmunizado con células de mieloma. Estas células híbridas o hibridomas heredan dos características principales de las células que les dieron origen, de la célula B heredan la capacidad de producir anticuerpos y de la célula de mieloma su característica de crecer indefinidamente en cultivo.

Para comprender mejor todas las ventajas que ofrecen los AcMo's se mencionan a continuación las características de los anticuerpos policlonales. Al inmunizar un ratón con un antígeno, se produce la activación de varias células B con diferentes receptores específicos para los epitopos del antígeno. La proliferación de estas células lleva a la generación de células plasmáticas secretoras de los respectivos anticuerpos, por lo que la sangre del animal posee una mezcla de inmunoglobulinas de distinta subclase, afinidad y especificidad para el antígeno. El resultado es un antisuero con anticuerpos demasiado heterogéneos en términos del isotipo, afinidad y epitopo reconocido, además, difieren de un individuo a otro, e incluso en el mismo animal a distintos tiempos de inmunización.

Es de tomarse en cuenta que si el antígeno comparte epitopos con otros antígenos de diferente origen, las preparaciones policlonales resultantes pierden la capacidad de discriminar entre los dos antígenos. Esto es poco deseable en el caso de tipificación de células, microorganismos y moléculas complejas. (42).

En el caso de los anticuerpos monoclonales las preparaciones tienen las siguientes propiedades: reconocen un solo epitopo, las reacciones cruzadas sólo se dan cuando el antígeno comparte epitopos con otros antígenos; se pueden preparar en grandes cantidades, es un producto homogéneo, y se pueden congelar por largos periodos. Algunas desventajas de los AcMos son que solo se pueden hacer en laboratorios con cierto nivel tecnológico, el costo se eleva por el uso de técnicas de cultivo celular, el tiempo de producción es de mínimo seis meses, en algunos casos se llega a tener AcMos poco específicos.

La tecnología de producción de anticuerpos monoclonales se diseñó por primera vez en 1975 por Köhler y Milstein (43), y esta herramienta consiste en la generación de



anticuerpos con especificidad conocida (44), lo que permite la posibilidad de obtener anticuerpos monoespecíficos en contra del antígeno deseado.

La producción de los AcMo se logra mediante la fusión de dos tipos celulares que tienen características muy especiales mediante el empleo de un desestabilizante de membranas como el polietilenglicol, el cual es un agente químico que promueve la adhesión célula a célula debido a su naturaleza hidrofílica, y que interactúa con las membranas celulares, incrementando su fluidez y por tanto la probabilidad de fusión. (Figura 5). Una de estas células son los linfocitos B de ratón, productores de anticuerpos específicos, los cuales son fusionados con un mieloma celular el cual además de dividirse indefinidamente como toda célula cancerosa, presenta dos mutaciones genéticas que los hacen carentes de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK). Estas características inhabilitan a los mielomas para efectuar síntesis de DNA por la vía alterna (45); de tal forma, que al agregarle a la fusión celular un bloqueador de la síntesis normal de producción de DNA, como es la aminopterina (medio HAT) solamente podrán sobrevivir aquellos híbridos (Linfocito B-Mieloma) que contengan las enzimas HGPRT y TK aportadas por la célula B (figura 6), las cuales producirán su DNA de novo a partir de bases púricas y pirimídicas presentes en el medio de cultivo (46,47).

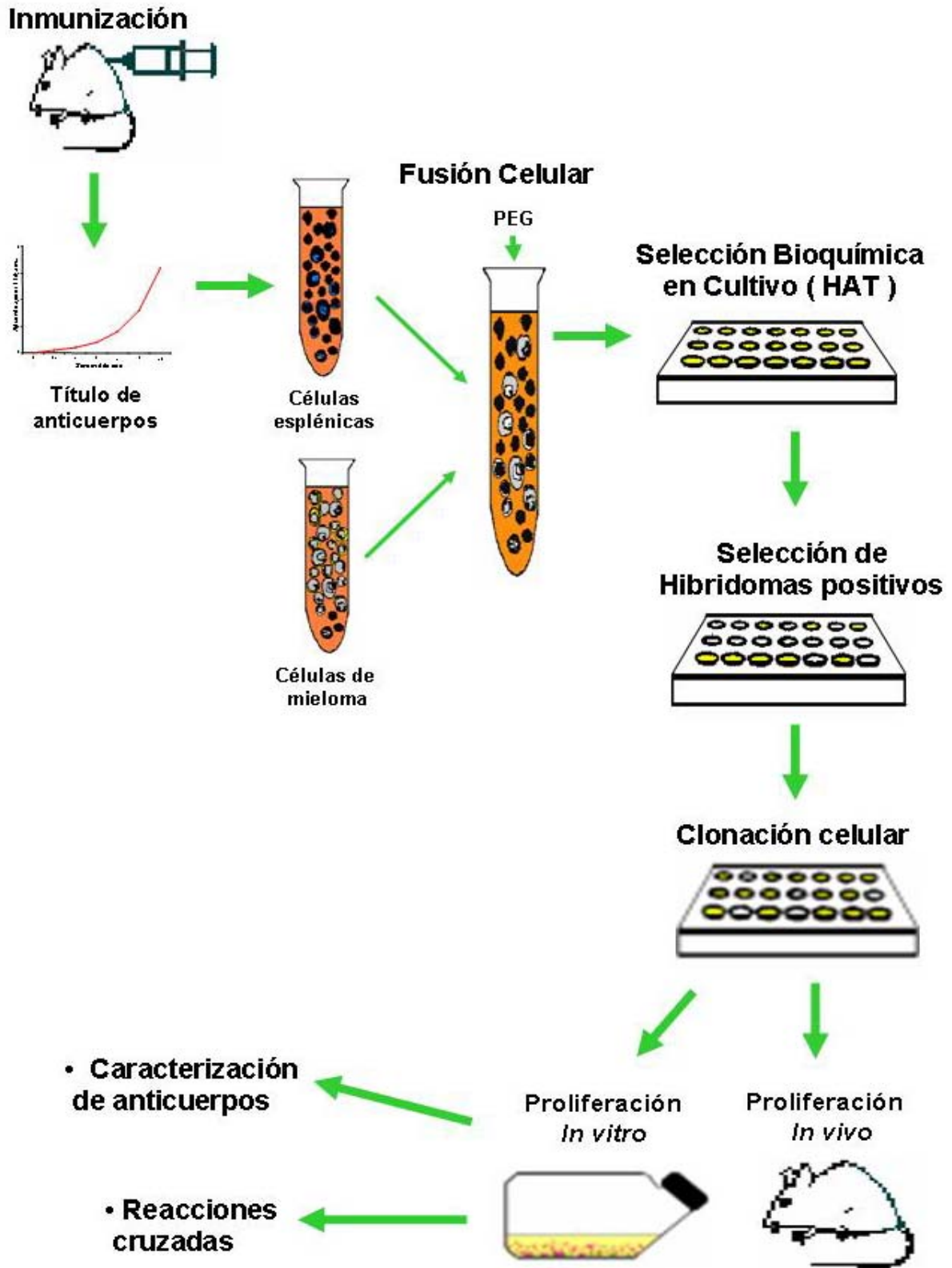
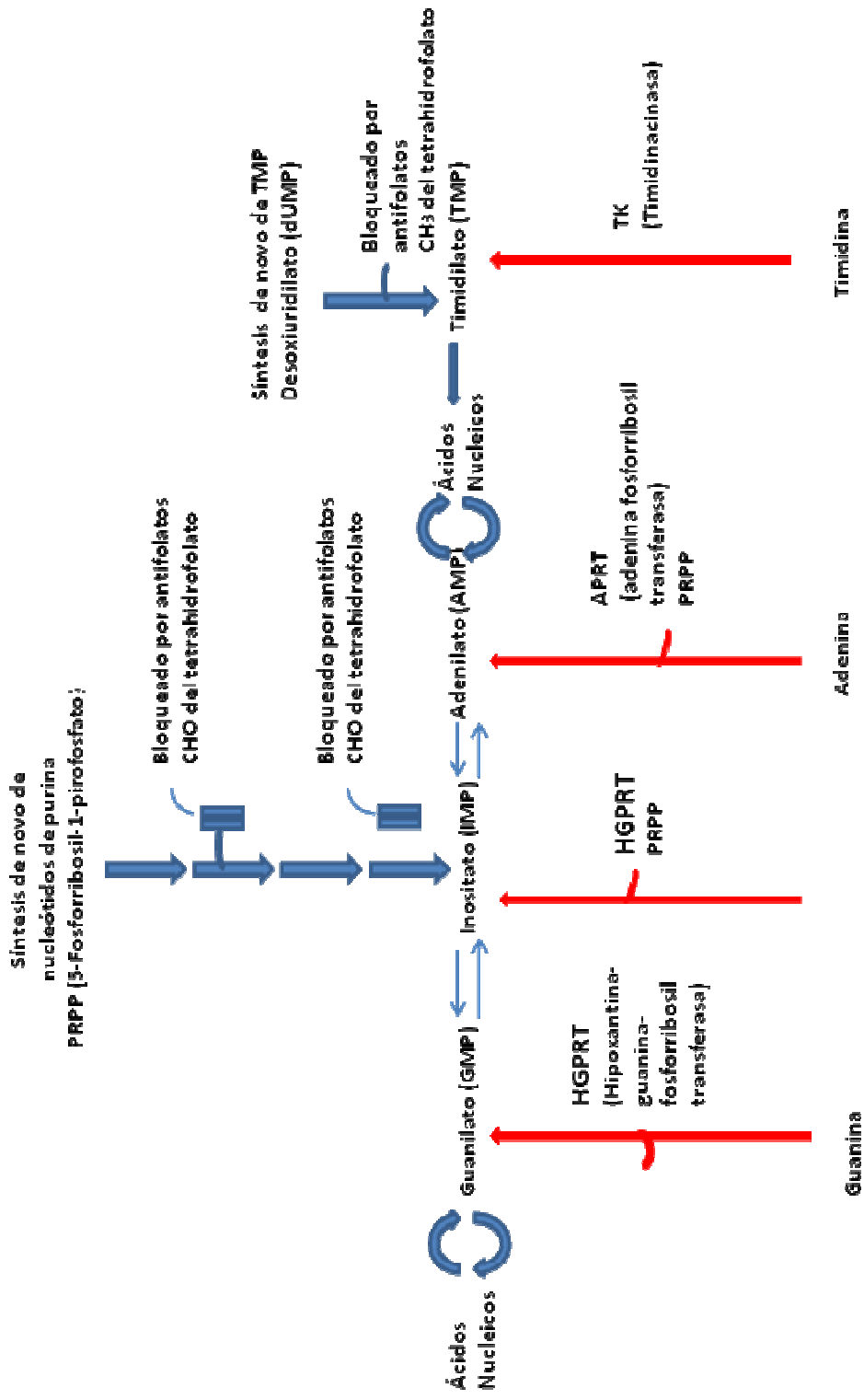


Figura 5. Esquema general de la producción de anticuerpos monoclonales.



**Figura 6.** Diagrama que muestra las vías de novo para la síntesis de nucleótidos. Las células animales pueden sintetizar los nucleótidos de purina (AMP, GMP, IMP) a partir de componentes mas simples por las vías de novo (azul). Estas requieren la transferencia de un grupo formilo o metilo ("CHO") desde una forma activada de tetrahidrofolato, como se muestra en la parte superior del diagrama. Los antifolatos, como la aminopterina y la ametopterina, bloquean la reactivación de tetrahidrofolato, impidiendo la síntesis de purina y timidilato. Muchas células animales pueden usar vías de rescate (rojo) para incorporar bases de purina o nucleosidos y timidina. Si estos precursores están presentes en el medio, las células normales crecerán aun en presencia de antifolatos. Las células cultivadas que carecen de una de las enzimas –HGPRT, APRT o TK- de las vías de rescate no sobrevivirán en un medio que contenga antifolatos

Una vez efectuada la fusión y la selección bioquímica, los sobrenadantes de todos los pozos con células en crecimiento son sometidos a pruebas para determinar si producen el anticuerpo deseado; si el resultado es positivo, los cultivos se clonan, es decir, se siembran en los pozos de una placa de modo que sólo haya una célula por pozo y de esta forma obtener anticuerpos monoclonales específicos, homogéneos y capaces de proliferar en cultivo o propagarse en animales genéticamente compatibles (48). Dado que cada anticuerpo monoclonal reconoce un determinante antigénico único, es posible seleccionar aquel que identifica exclusivamente la molécula de interés, evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos antisueros policlonales. De esta forma, las reacciones cruzadas inesperadas se deberán exclusivamente a la presencia de epitopos idénticos o muy similares (49).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La importancia clínica y epidemiológica de EAEC está ampliamente demostrada. La toxina Pic es uno de los mecanismos de virulencia asociados con la patogénesis de la diarrea y se ha identificado preferentemente en cepas aisladas de niños que presentan diarrea con sangre (37). El análisis de las secuencias de aminoácidos de esta proteína muestra homología con el grupo SPATE, que se ha identificado en bacterias causantes de enfermedad en humanos.

La producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína Pic permitirá diseñar herramientas inmunológicas de detección de este factor mediante el cual se podrá dar un diagnóstico específico de esta enfermedad. Implementar un sistema de diagnóstico que permita la detección de Pic en pacientes con diarrea, para un mejor manejo de los pacientes. El diseño a futuro de un ensayo rápido, en el menor tiempo posible; a bajo costo, con capacidad de analizar una gran cantidad de muestras a la vez, sería de gran utilidad.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Producir anticuerpos monoclonales contra la proteína Pic de *Escherichia coli* enteroagregativa y evaluar su reactividad contra proteínas autotransportadoras, para determinar su especificidad y su potencial diagnóstico.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Purificar la proteína Pic de EAEC a partir del sobrenadante del cultivo de la clona p56.
2. Producir y caracterizar anticuerpos monoclonales contra la proteína Pic, para determinar su reactividad contra dicha proteína.
3. Determinar por ELISA e IET la reactividad del AcMo anti-Pic contra las proteínas autotransportadoras Pet, Sat, EspC y la cepa EAEC 2403.

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS AUTOTRANSPORTADORAS**

#### **4.1.1 Cepas Bacterianas**

Las características de las cepas que se utilizaron en este trabajo son las siguientes: la cepa p56 (clona productora de Pic); clona productora de Pet pCEFNI; clona productora de Sat HB101 (pDG7); clona productora de EspC pJLM174 y la cepa EAEC 2403 obtenida de un niño. Las cepas bacterianas se conservaron en medio de Dorset, su pureza se comprobó cultivándolas en medio de gelosa sangre y Mac Conkey, p56 fue mantenida en agar y caldo Luria con 100 µg/ml de tetraciclina, mientras que las otras cepas se mantuvieron en los mismos medios pero con 100 µg/ml de ampicilina.

#### **4.1.2 Purificación de la Proteína Pic**

Para la producción de Pic, la cepa p56 se sembró previamente por separado en cajas con agar Luria y del cultivo obtenido se inocularon tubos con 5 ml de caldo Luria, se incubaron por 4 h a 37°C con agitación continua. De estos tubos se tomaron 1 ml y se inocularon 10 matraces de 1000 ml de mismo medio, conteniendo 100 µg/ml de tetraciclina, y se incubaron durante 18 h a 37°C en agitación continua (150 r.p.m.). Los cultivos se centrifugaron (12,000 X g) durante 30 min. a 4°C, el paquete bacteriano se descarto y el sobrenadante se precipito con sulfato de amonio, a una saturación de 75% (470 g de sal/l). El sulfato de amonio se adiciono al sobrenadante libre de bacterias, con agitación suave hasta su total disolución, para finalmente dejarlo en reposo durante toda la noche a 4°C. El precipitado se colecto por centrifugación a 12,000 X g (30 min. a 4°C). Posteriormente, se resuspendió con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2, se dializó contra el mismo amortiguador durante tres días, haciendo dos cambios por día. El producto dializado se estabilizo con glicerol a una concentración final del 20% (v/v) y se guardo en alícuotas a -20°C hasta su uso. El precipitado obtenido en el proceso antes descrito se fraccionó con una solución de fosfatos de potasio 3.5 M pH 6.8 (K1/K2). Primero, se fraccio a 1.15 M durante 18 h. El sobrenadante, que contenía la proteína Pic, se obtuvo por centrifugación (12,000 X g durante 30 min. a 4°C). El sobrenadante (1.15 M) se fraccio ahora a 1.75 M (K1/K2), durante 18 h. El precipitado (1.75 M), que contenía Pic se separo del sobrenadante (12,000 X g durante 30 min. a 4°C) y se dializo contra el amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 y después con 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M EDTA.2Na a pH 8.0. Este precipitado (1.75 M) se sometió a cromatografía, primero en una columna de intercambio aniónico de Q-Sepharose (Pharmacia Fine Chemical No 17-

0510-01) y posteriormente se le realizó cromatografía de intercambio catiónico en FPLC en una columna Mono S HR 5/5. La columna de Q-Sepharose fue de 1.4 cm de diámetro por 57.5 cm de largo, la velocidad de flujo se ajustó a 50 ml/h para obtener fracciones de 10 ml. Para la columna Mono S HR 5/5, la velocidad de flujo fue de 60ml/h y las fracciones de 1 ml. Las columnas se equilibraron con amortiguador 0.05 M Tris-HCl en 0.01M EDTA.2Na a pH 8.0. Algunas proteínas fueron eluidas en el mismo amortiguador y las fracciones proteicas retenidas por las columnas fueron eluidas aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5 M de NaCl. (50-52).

Los perfiles de elución se determinaron utilizando una muestra de cada fracción que fue mezclada con el reactivo de Bradford para obtener una reacción colorida que se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro (Dynatech MR 580). Como alternativa, las muestras se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro Genesis 2 (Spectronic Instruments). Las fracciones proteicas obtenidas se estabilizaron con glicerol al 20% (v/v) y se congelaron hasta su uso.

Las proteínas Pet, EspC, Sat y 2403 fueron purificadas por el mismo procedimiento que Pic, hasta la cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose.

#### **4.1.3 Cuantificación de Proteínas por Reactivo de Bradford.**

La concentración de proteínas de los productos obtenidos se determinará por el método de Bradford, por microensayo en placa, con seroalbúmina bovina como estándar. La reacción colorida se leyó a 595 nm en espectrofotómetro (Dynatech MR 580). (53).

#### **4.1.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).**

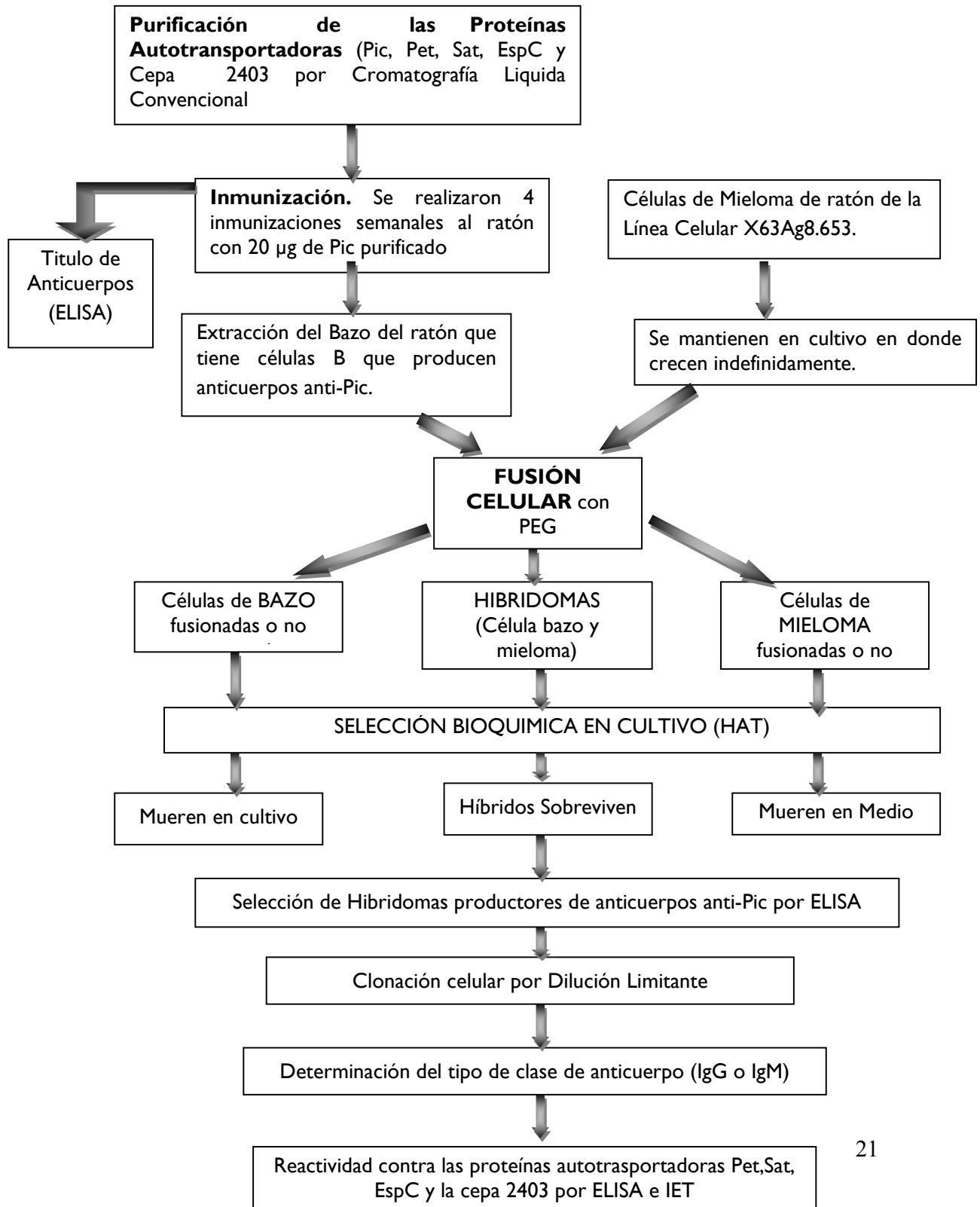
La toxina Pic purificada se analizó por electroforesis convencional en una dimensión, bajo condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 6% con 0.1% (p/v) de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Las dimensiones del gel resolutor (separador) fueron de 10 cm de altura por 1.5 mm de espesor (10 X 1.5). La corriente aplicada al gel concentrador y al gel resolutor fue de 100 V. El desplazamiento de las proteínas en SDS-PAGE fue comparada con marcadores preteñidos de peso molecular conocido. Para analizar los perfiles proteicos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma Chemical). (54).



## 4.2 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La producción de anticuerpos monoclonales abarca toda una serie de técnicas que comprende desde inmunizar a los ratones con el antígeno de interés, la obtención de hibridomas, clonación de los mismos hasta la caracterización de los anticuerpos deseados.

(Ver Diagrama de flujo)



#### 4.2.1 Inmunización y sangrado

Se inmunizaron ratones hembras Balb/c de seis semanas de edad, semanalmente por vía intraperitoneal con la proteína Pic purificada obtenida previamente.

Se aplicaron 4 dosis de 20 µg de Pic en 200 µl de PBS + 200 µl de adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera inmunización e incompleto (AIF) para las siguientes. Además, se les dio un reto de 5 µg de Pic en 50 µl de PBS por vía intravenosa tres días antes de la fusión. Los sangrados para evaluar la respuesta inmune de los ratones se hicieron por vía retroorbital (Tabla 2).

Tabla 2. Esquema de inmunización de los ratones

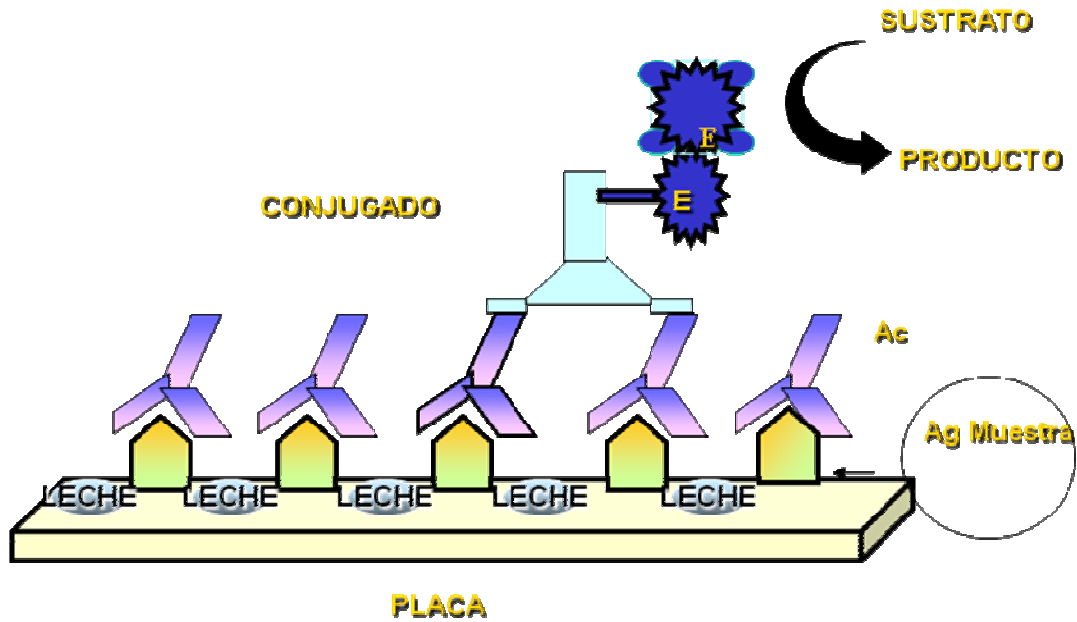
<b>DIA</b>	<b>DOSIS DEL ANTIGENO</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>1</b>	20 µg en 200 µL + ACF INTRAPERITONEAL	Sangrado preinmune 200µl
<b>7</b>	20 µg en 200 µL + AIF INTRAPERITONEAL	Primer sangrado 200 µl
<b>14</b>	20 µg en 200 µL + AIF INTRAPERITONEAL	Segundo sangrado 200 µl
<b>21</b>	20 µg en 200 µL + AIF INTRAPERITONEAL	
<b>28</b>	5 µg en 50 µL de PBS estéril INTRAVENOSA	RETO FINAL
<b>31</b>	FUSION	Ultimo sangrado

#### 4.2.2 Determinación del título de anticuerpos por ELISA

El título de anticuerpos de los ratones inmunizados se determino por ELISA.

1. En placas de 96 pozos de poliestireno, se colocaron 100  $\mu$ L por pozo de solución del antígeno a 5  $\mu$ g/mL en PBS y se incubaron durante 2 horas a 37°C o a 4° C durante toda la noche.
2. Se elimino la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seco el exceso sobre una gasa.
3. Las placas se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ L/pozo con PBS Tween 20 al 0.05%, durante 5 min cada lavado.
4. Posteriormente las placas fueron bloqueadas durante 30 minutos con 200  $\mu$ L/pozo de leche descremada al 5% en PBS
5. Se procedió como en los pasos 2 y 3 y después se agregaron 100  $\mu$ L de diluciones dobles seriadas del suero del ratón a titular a partir de 1:1000 y se incubaron 2 horas a 37°C o a 4° C durante toda la noche.
6. Los pasos 2 y 3 se repitieron y posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L del conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (previamente titulado), se incubaron durante 2 horas a 37°C.
7. Se repitieron los pasos 2 y 3; enseguida se agrego el sustrato, 100  $\mu$ L/pozo (4 $\mu$ g de ortofenilendiamina en 5 ml de acido cítrico 0.1 M y 5 ml de citrato de sodio 0.1 M mas 4  $\mu$ l de peroxido de hidrogeno)
8. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 100  $\mu$ L/pozo de ácido sulfúrico 2N.
9. Finalmente se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 492 nm (Marca Bio-Rad Modelo 3550).

Nota: Como testigo positivo en los ELISA se utilizo el suero del ratón inmunizado con mejor título (1:16 000). En todos los ELISA siempre se coloco un blanco, que fue PBS, en lugar de muestra. (Ver Figura 7)



*Figura 7.* Esquematación de la técnica de ELISA.

#### 4.2.3 Cultivo Celular

El manejo de los cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células del mieloma X63Ag8.653 se mantuvieron en medio RPMI-1640 y enriquecido con suero fetal bovino descomplementado al 10% v/v. Los cultivos se revisaron diariamente en el microscopio invertido, vigilando la morfología celular, así como las posibles fuentes de contaminación bacteriana y fúngica. Se realizaron cambios de medio de cultivo cuando éste viraba de anaranjado a amarillo, lo que indicaba un cambio en el pH por acidificación. Cuando los cultivos se encontraban confluentes (esto es, cuando la proliferación celular se encontraba en fase logarítmica) se sembraron las células en cajas nuevas o se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido.

#### **4.2.4 Fusión celular**

##### **4.2.4.1 Preparación de las células de bazo**

Los ratones inmunizados se sangraron por vía retroorbital para obtener el suero y determinar el título de anticuerpos por ELISA. El ratón de mejor título (mayor de 1:4000), se sacrificó por dislocación cervical y se le extrajo el bazo asépticamente. Se colocó el bazo en una caja de Petri estéril con aproximadamente 5 mL de medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino y un cuadro de tela de organza estéril, la cual sirvió para disgregar el bazo.

Los siguientes pasos se realizaron en campana de flujo laminar:

1. El bazo se envolvió totalmente con la tela de organza y con ayuda del émbolo de una jeringa estéril se presionó el bazo lo más suavemente posible para disgregar el tejido y por último se resuspendió con una pipeta Pasteur.
2. La suspensión celular resultante se colocó en un tubo de 50 mL y se lavó una vez con medio RPMI-1640 sin suero, mediante centrifugación a 1,200 rpm durante 10 min a 37°C.
3. Se desecharon el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 25 mL de medio RPMI-1640.

##### **4.2.4.2 Preparación de células de mieloma**

1. Las células de mieloma empleadas fueron de la línea celular X63Ag8.653 (Ag8), las cuales se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio de RPMI-1640 y con SFB; para esto, se sembraron 24 horas antes, colocando aproximadamente  $5 \times 10^6$  células de mieloma en botellas de 75cm<sup>2</sup> con 20 mL de medio RPMI-1640 y enriquecido con 10% de SBF y se incubaron a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.
2. El día de la fusión las células fueron resuspendidas mediante agitación suave; posteriormente, con ayuda de una pipeta de 5 mL, la suspensión se colocó en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 min.
3. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en medio RPMI-1640 sin suero fetal.

**NOTA:** Las células de mieloma se lavaron al mismo tiempo que las células de bazo. Se realizaron 5 fusiones, pero en todas se siguió el mismo procedimiento.

1. En un tubo de 50 mL se mezclaron las células de bazo y las de mieloma en una relación 5:1 (5 células de bazo por 1 célula de mieloma) y se completo con medio RPMI-1640 sin suero hasta tener 50 mL y se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 min.
2. Se elimino el sobrenadante y el botón celular se disgrego suavemente.
3. Para realizar la fusión se agrego gota a gota durante un minuto 1 mL de polietilenglicol (PEG al 42%), precalentado a 37° C, agitando suavemente.
4. Se adicionaron 5 mL de medio RPMI-1640 sin suero fetal, por goteo y agitando suavemente en un lapso de 3 min; de la misma forma se adicionaron 15 mL más en un lapso de 1 min y se centrifugo a 1,200 rpm durante 10 min.
5. Se elimino el sobrenadante y el botón se resuspendió en medio RPMI-1640 con SFB al 20% adicionado con HAT.
6. Se colocaron 200µL/pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se cultiva a 37° C en atmósfera húmeda con 95% aire y 5% CO<sub>2</sub>. (42)

#### **4.2.5 Selección y mantenimiento de híbridos en cultivo**

Las células se revisaron diariamente para identificar si existía algún tipo de contaminación y localizar los pozos con híbridos viables (se presentan como cúmulos de células) o si se requería cambiar el medio de cultivo. Diez días después de la fusión se realizaron los cambios a medio con HT por 5 días, al finalizar estos solo se cultivaron las células con medio RPMI-1640 con 15% de suero fetal. La presencia de híbridos productores de anticuerpos se detecto tomando el sobrenadante de los cultivos y realizando un ELISA indirecto de anticuerpos, usando los sobrenadantes de cultivo directamente y revelando con un conjugado anti-gammaglobulinas de ratón-peroxidasa, diluido 1:6000. Los cambios de medio a las células de la fusión se realizan conforme al calendario siguiente (Tabla 3):

**Tabla 3. Calendario para realizar cambio de medio de cultivo a las células.**

Día	Tipo de medio	Actividad
1	RPMI-1640-SFB 20%	Fusión HAT 100X
3	RPMI-1640-SFB 20% + HAT	Cambio de medio
5	RPMI-1640-SFB 20% + HAT	Cambio de medio
8	RPMI-1640-SFB 20% + HAT	Cambio de medio
10	RPMI-1640-SFB 20% + HT	Cambio de medio
12	RPMI-1640-SFB 20% + HT	Cambio de medio
14	RPMI-1640-SFB 20% + HT	Cambio de medio
16	RPMI-1640-SFB 15%	Cambio de medio

#### **4.2.6 Clonación de Hibridomas.**

Para realizar la clonación de los hibridomas se empleó la técnica conocida como dilución limitante. En una placa de cultivo de 96 pozos se colocaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI-1640 con SFB al 15% en toda la fila A. Se tomaron 100  $\mu$ L de suspensión celular de aquellos híbridos que fueron positivos al antígeno de interés por ELISA y se colocaron en la posición A1 y a partir de esta se hicieron diluciones dobles seriadas hasta el final de la fila. Se dejaron reposar las células durante 10 min. Posteriormente se contaron las células de cada pozo en el microscopio invertido y aquel pozo que contenía entre 30-40 células se diluyó en 18 mL de medio RPMI-1640 con SFB al 20%. De esta suspensión celular se sembraron 200  $\mu$ L por pozo en las 7 filas restantes de la placa. La placa se mantuvo a 37°C con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante una semana. Posteriormente se revisó la formación de clonas celulares y aquellos pozos donde sólo se encontraba un cúmulo de células fueron seleccionados para probarlos en ELISA y determinar si estas clonas secretaban anticuerpos específicos, los pozos que fueron positivos se clonaron nuevamente y se expandieron las células en cultivo o en peritoneo de ratón.

## **4.2.7 Caracterización de los anticuerpos monoclonales**

### **4.2.7.1 Determinación de clases de anticuerpos.**

A este ensayo entraron exclusivamente las clonas productoras de anticuerpos anti-Pic es decir que reunían el criterio de monoclonalidad. La determinación se realizó por medio de un ensayo de ELISA, como el que se describió arriba pero utilizando conjugados anti-IgG y anti IgM de ratón marcadas con peroxidasa.

### **4.2.8 Determinación de reacciones cruzadas**

La determinación de reacciones cruzadas de los anticuerpos monoclonales, se realizo con otros antígenos relacionados a la proteína Pic de EAEC, principalmente de la subfamilia de las SPATES, tales como Pet, Sat y EspC. El procedimiento empleado para esta determinación fue la Inmunoelectrotransferencia y para realizarla, se utilizo 1 µg de cada una de las proteínas.

Nota: Para poder determinar las reacciones cruzadas, se utilizo la misma técnica de purificación que se detallo arriba para la obtención de cada uno de las diferentes proteínas autotransportadoras de las diferentes cepas empleadas.

#### **4.2.8.1 Inmunotransferencia (Inmunoblot).**

Después de realizar la separación de las proteínas de las muestras por SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Immunobilon-N C, Millipore HAHY 304 FO) de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin y col. La solución de transferencia se preparó con 0.25% (p/v) de Trizma-base, 1.2% (p/v) de glicina y 16.6% (v/v) de metanol. Se aplicaron 100 volts durante 1 hora. Al terminar la transferencia se coloco la membrana de NC en un recipiente con rojo de Ponceau, para verificar que las proteínas fueron transferidas a la NC; esto se observa con la aparición de bandas de color rojo, momento en el cual se elimino el exceso de colorante y se lavo con agua destilada, aproximadamente de 4 a 5 veces. Una vez visualizadas las proteínas, las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05% (v/v) y se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en TBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron 3 veces (5 min. cada uno) con PBS-Tween. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios

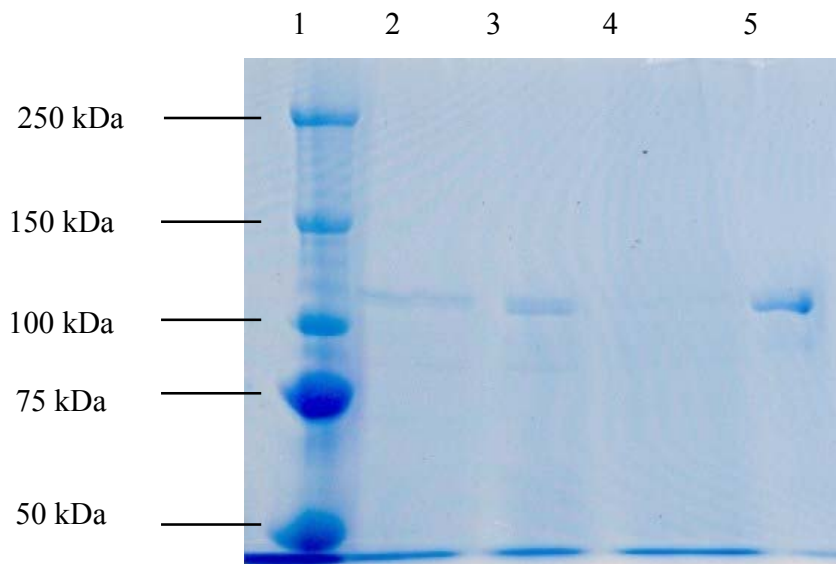


(controles anticuerpos anti-Pic, suero de ratones inmunizados o los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas) a una dilución de 1:2000 en PBS. Las membranas en presencia del anticuerpo se incubaron durante toda la noche a 4 °C y después se lavaron con PBS-Tween. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo se realizó con anticuerpos anti-IgG de ratón, marcados con peroxidasa diluidos en PBS-Tween; se incubaron una hora con el segundo anticuerpo y se lavó con PBS-Tween. Por último, la reacción se visualizó al agregar el sustrato para peroxidasa ( $H_2O_2$  en presencia de 3, 3'-Diaminobenzidina), mostrándose bandas de un precipitado insoluble color café; la reacción se detuvo lavando con agua destilada. (55)

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Purificación de Pic y de las otras proteínas autotransportadoras

Los diferentes procedimientos de precipitación (sulfato de amonio y amortiguador de fosfato de potasio K1/K2 1.75M) favorecieron de manera importante el enriquecimiento de Pic, ya que muchas proteínas de bajo peso molecular se eliminaron. La cromatografía de Q-Sepharose mostró un perfil de elusión, y por análisis electroforético (SDS-PAGE) de estos reveló que Pic eluía en las primeras fracciones. El tratamiento de las proteínas eluidas de las columnas de Q-Sepharosa, permitió obtener una sola fracción proteica (Figura 8). Utilizando un ensayo de inmunoelectrotransferencia y anticuerpos anti-Pic se comprobó que la fracción obtenida correspondía a Pic.



**Figura 8.** Proceso de purificación de Pic. SDS-PAGE al 6%. Precipitación son sales.

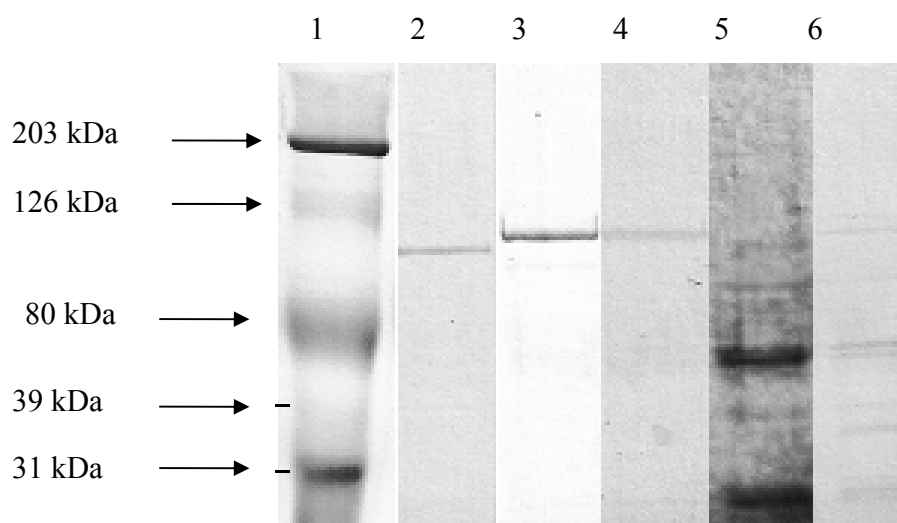
1) Marcador de pesos moleculares, 2) Precipitación con sulfato de amonio al 75%, 3) Sobrenadante con fosfato de potasio 1.15M, 4) Precipitado 1.15M, 5) Pic eluido por Q-sepharosa.

El rendimiento final en el proceso de purificación se calculó al determinar la concentración de proteínas totales obtenidas en cada uno de los pasos de purificación. Los resultados mostraron que en la etapa de purificación de Pic se recuperaron 2 mg de proteína pura, que corresponde a un rendimiento del 11.23%. (Tabla 4)

**Tabla 4. Resumen de la purificación de Pic**

<i>PIC</i>				
<i>Fracción Proteica</i>	VOLUMEN (mL)	CONCENTRACION (mg/mL)	mg. TOTALES	RENDIMIENTO (%)
<i>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	17	1.1	17.8	100
<i>SN 1.15 M</i>	12	1.2	14.4	80.8
<i>Q-sepharosa</i>	33	0.28	9.24	51.91
<i>Mono- S</i>	2	1	<b>2</b>	<b>11.23</b>

Para poder realizar la determinación de reacciones cruzadas, se purificaron las proteínas Pet, Sat EspC y una proteína de alto peso molecular de la cepa 2403 de la misma manera que Pic, observándose los siguientes resultados. Al igual que para Pic, se muestra un gel SDS-PAGE en donde se observan los resultados del procedimiento de purificación por precipitación de sales para los 5 antígenos. (Figura 9).



**Figura 9.** Proceso de purificación de las proteínas autotransportadoras en SDS-PAGE al 6%. 1) Marcador de PM, 2) Pet, 3) Pic, 4) Sat, 5) EspC, 6) 2403.

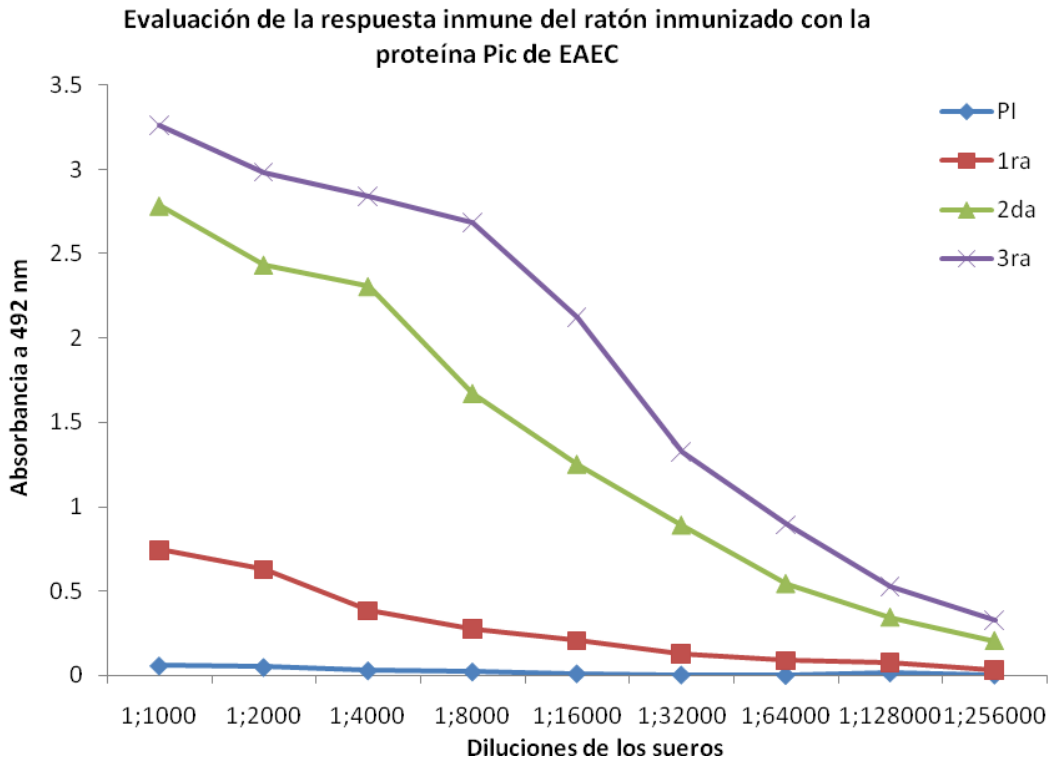
Los mismos cálculos se realizaron para determinar el rendimiento final de la purificación de las proteínas empleadas en la determinación de reacciones cruzadas, obteniendo para la proteína Pet un rendimiento del 3.25%, para Sat de 0.6%, para EspC de 0.1% y para la cepa 2403, 0.479%. (Tabla 5)

**Tabla 5. Resumen de la purificación de las otras proteínas empleadas en la determinación de reacciones cruzadas.**

<i>Fracción Proteica</i>	<i>VOLUMEN (mL)</i>	<i>CONCENTRACION (mg/mL)</i>	<i>mg. TOTALES</i>	<i>RENDIMIENTO (%)</i>
<b>PET</b>				
<i>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	475	0.57088	271.168	100
<i>SN 1.15 M</i>	350	0.52	182	67
<i>pp. 1.15 M</i>	10	0.73454	7.3454	2.7
<i>Q-sepharosa</i>	11	0.8	8.8	<b>3.25</b>
<b>SAT</b>				
<i>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	180	0.2863	51.534	100
<i>SN 1.15 M</i>	30	0.31333	9.3999	18.2
<i>pp. 1.15 M</i>	4	1.671	6.684	12.97
<i>Q-sepharosa</i>	6	0.05166	0.30996	<b>0.6</b>
<b>EspC</b>				
<i>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	65	0.25348	16.4762	100
<i>SN 1.15 M</i>	20	0.32006	6.4012	38.85
<i>pp. 1.15 M</i>	2.5	1.172	2.93	17.7
<i>Q-sepharosa</i>	0.5	0.03313	0.01656	<b>0.1</b>
<b>2403</b>				
<i>pp. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	20	0.4186	8.372	100
<i>SN 1.15 M</i>	10	0.36279	3.6279	43.3
<i>pp. 1.15 M</i>	4.5	1.06744	4.8034	57.37
<i>Q-sepharosa</i>	0.5	0.08023	0.04011	<b>0.479</b>

## 5.2 Inmunización

Se evaluó la respuesta inmune desarrollada por los ratones Balb/c inmunizados con la proteína Pic por ELISA y para la fusión fue utilizado un ratón que mostró un título de 1:16 000 (Figura 10).



**Figura 10.** Respuesta inmune humoral del ratón inmunizado después de 4 inmunizaciones, y que fue utilizado para la obtención de AcMos contra Pic. (Suero Preinmune PI; 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup> son los sueros del ratón obtenidos una semana después de las inmunizaciones).

### 5.3 Fusión Celular

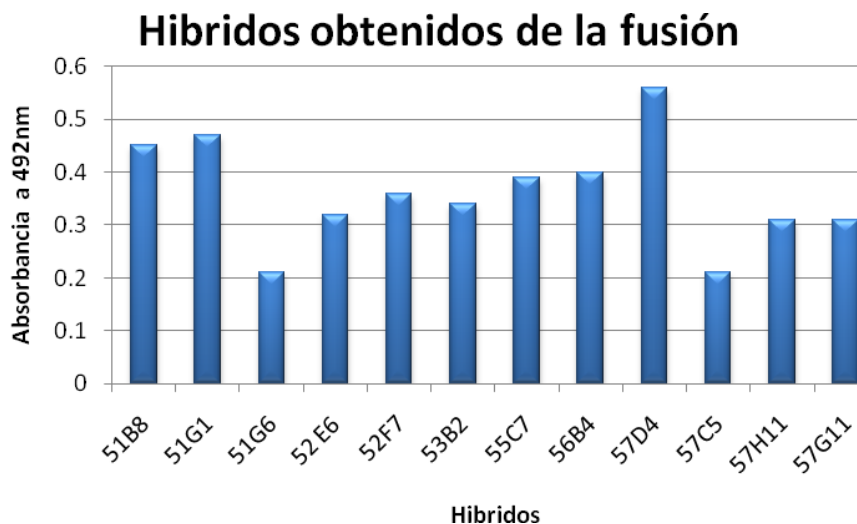
Después de la fusión se sembraron 7 placas de cultivo de 96 pozos. Se obtuvieron 12 Híbridos productores de anticuerpos anti- Pic. (Tabla 6).

**Tabla 6. Resumen de resultados de la fusión**

RESULTADOS	
Título de Ac's anti-Pic al fusionar	1: 32 000
Relación Bazo: Mieloma	5 : 1
Numero de placas sembradas	7
Número de Híbridos Positivos a Pic	12
Numero de Clonas obtenidas	8

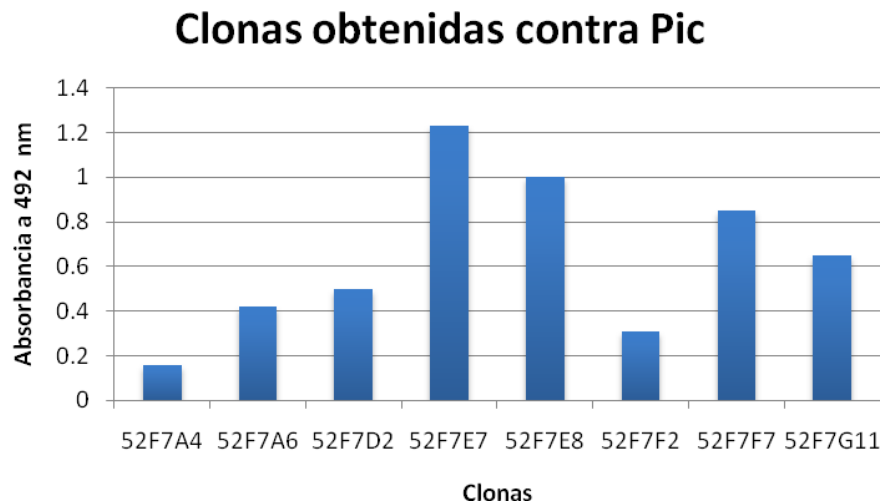
### 5.4 Clonación

Al realizar el ensayo por ELISA para determinar si existían hibridomas positivos para la proteína Pic, se obtuvieron 12 hibridomas de la quinta fusión (Figura 11), pero al realizar la clonación de estos híbridos sólo uno de ellos (52F7) permaneció positivo por ELISA a la proteína Pic, dando origen a 8 clonas, de las cuales se seleccionaron 3 para su posterior subclonación.



**Figura 11.** Híbridos obtenidos contra la Proteína Pic

El híbrido 52F7 fue el único que se mantuvo positivo a la proteína Pic, por lo que se realizó la clonación de éste, resultando 8 clonas positivas, que se muestran en la figura 12.



**Figura 12.** Clonas obtenidas contra Pic

De las clonas obtenidas se seleccionaron 3, siendo las que presentaron mayor valor de absorbancia en el ensayo de ELISA y se subclonaron (Tabla 7).

**Tabla 7.** Clonas obtenidas del híbrido 52F7

Subclonación			
52F7E7	52F7E7B2	52F7F7	52F7F7B4
	52F7E7D10		52F7F7C5
	52F7E7D11		52F7F7E6
	52F7F7F3		
52F7E8	52F7E8B3		52F7F7G7
	52F7E8B8		52F7F7F10
	52F7E8C10		

## 5.5 Determinación de Clase de AcMo's

A todas las clonas se les determino la clase a la que pertenecían, mediante ELISA (Figura 13). Todos los anticuerpos corresponden a la clase IgG.

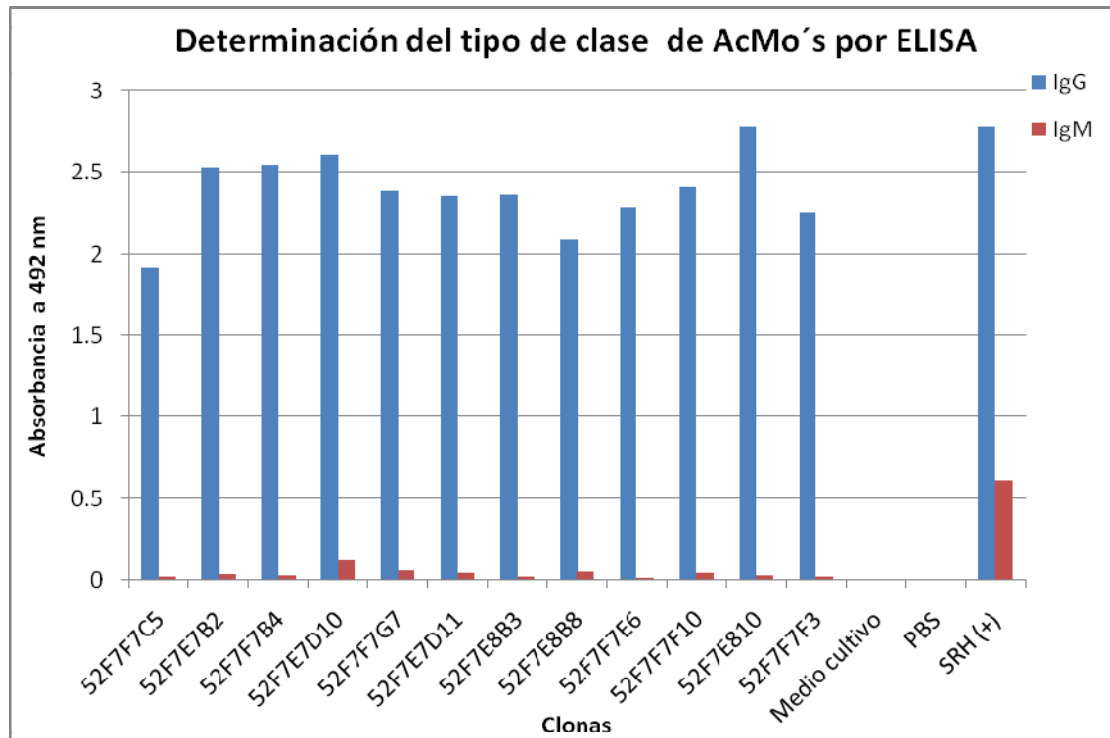
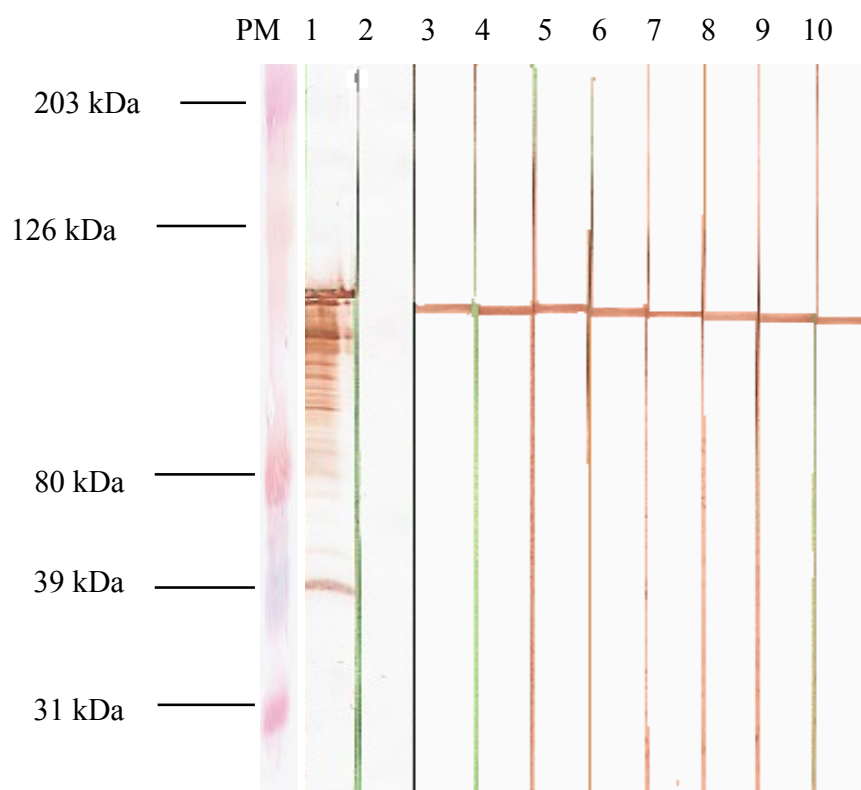


Figura 13. Determinación del tipo de clase de los AcMo's por ELISA.



## 5.6 Reactividad de los Anticuerpos Monoclonales a Pic

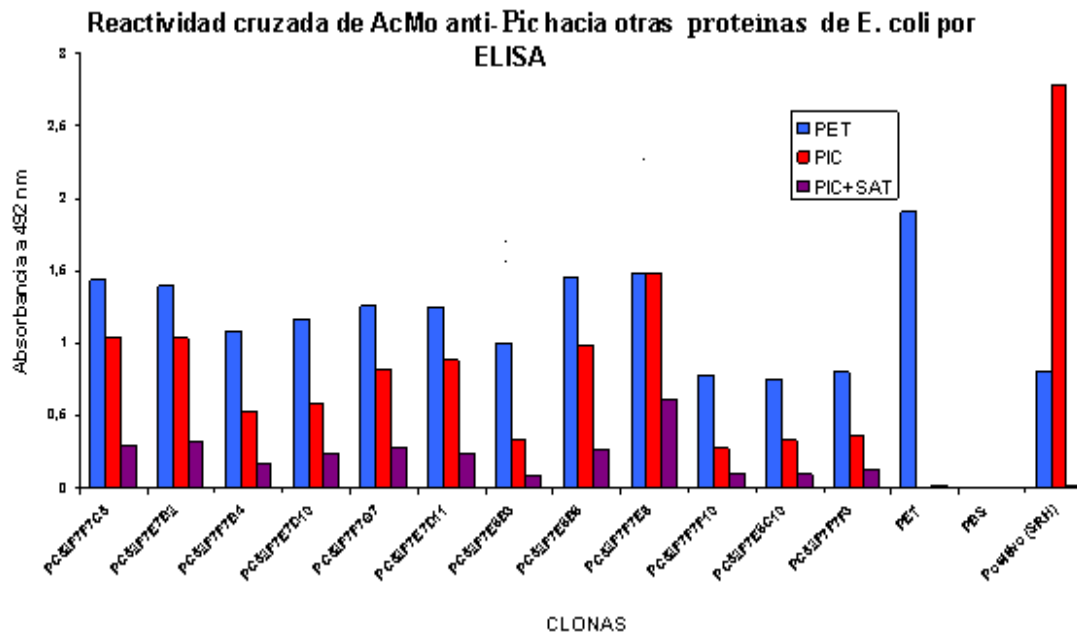
Se confirmó la reactividad a Pic purificado por los AcMo's de cada una de las clonas mediante un ensayo de Inmunotransferencia y se demostró que todas reconocían una banda 110 kDa que corresponde a la proteína Pic (Figura 14).



**Figura 14.** Reconocimiento de los AcMo's contra la proteína Pic por inmunotransferencia. 1) Anticuerpo policlonal de ratón anti Pic. 2) Control Medio de cultivo. 3-10) Anticuerpos Monoclonales producidos.

## 5.7 Determinación de Reactividad Cruzada.

Se determinaron las reacciones cruzadas de los anticuerpos monoclonales por ELISA (Figura 15) y por IET, utilizando otras proteínas relacionadas a la proteína Pic de EAEC, como son Pet, Sat y EspC principalmente de la subfamilia de las SPATES, además de la cepa 2403.

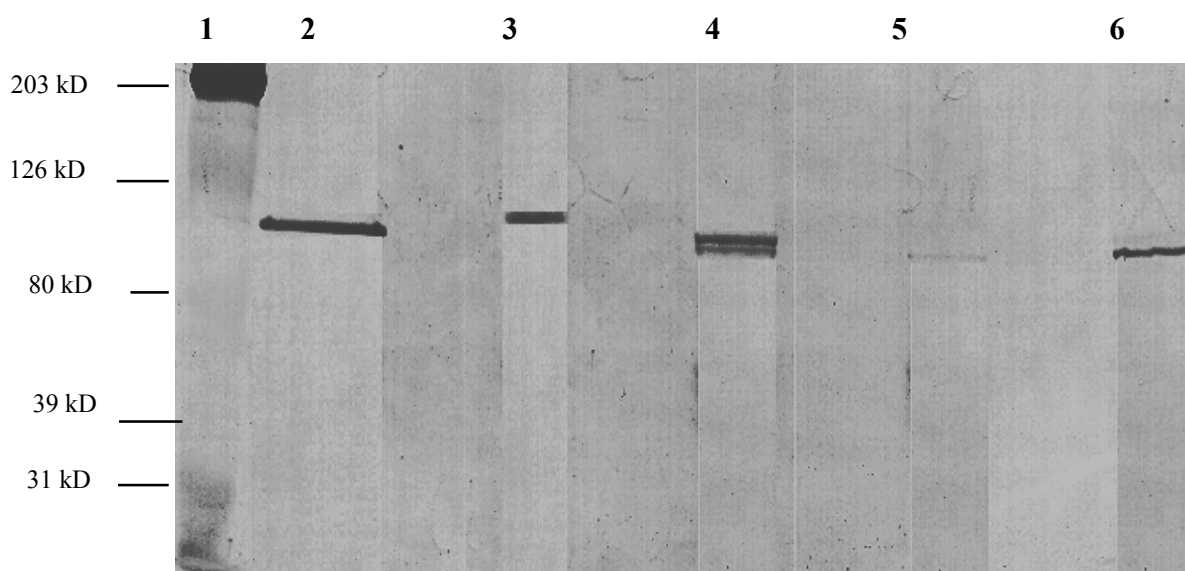


**Figura 15.** Resultados del ensayo de ELISA, en donde se muestra la reacción cruzada del AcMo anti-Pic contra las proteínas Pet y Sat que también pertenecen al grupo de proteínas autotransportadoras. Se muestran 2 controles, uno negativo que es PBS y uno positivo que es el suero hiperinmune del ratón empleado en la fusión.

Como puede observarse en la grafica, Pic presenta reacciones cruzadas por ELISA contra las proteínas Pet y Sat, inclusive se puede observar claramente como es que estos AcMos anti Pic, muestran mayor respuesta con la proteína Pet que con Pic.

Las determinaciones de reacciones cruzadas del AcMo anti-Pic, se realizaron por medio de una IET con otros antígenos relacionados a la proteína Pic de EAEC, principalmente de la subfamilia de las SPATES, tales como Pet, Sat, EspC y la cepa EAEC 2403. Para esto se empleo el AcMo 52F7F7C5, en donde se observa que al igual que por ELISA, existe reacción cruzada con estos antígenos, observándose el reconocimiento de bandas específicas, las cuales pertenecen a las proteínas autotransportadoras purificadas. (Figura 16).

Como se puede observar, en la siguiente imagen (figura 16), en el segundo carril se muestra el reconocimiento por el AcMo a una banda de 104 kDa, la cual pertenece a la Proteína Pet, en el siguiente carril se observa el reconocimiento de otra banda la cual pertenece a la proteína Pic con aproximadamente 110 kDa; para el cuarto carril, se muestra una banda de aprox. 107 kDa, correspondiente a la proteína Sat; en el quinto carril se observa una muy ligera banda, la cual pertenece a EspC con 110 kDa; y en el carril 6 se observa reacción hacia una proteína de aproximadamente 104 kDa, la cual podría ser la proteína Pet.



**Figura 16.** Inmunoelectrotransferencia que muestra las reacciones cruzadas que presenta el AcMo 52F7F7C5 con las proteínas autotransportadoras. 1) PM, 2) Proteína Pet purificada, 3) Proteína Pic, 4) Proteína Sat, 5) EspC y 6) cepa 2403.

## 6. DISCUSIÓN

EAEC es un patógeno intestinal, causa diarrea principalmente en niños de países en desarrollo. Estas cepas producen la proteína involucrada en la colonización intestinal Pic, la cual posee actividad de mucinasa, participa en la ruptura de hemoglobina y en menor grado rompe fodrina. Esta proteína pertenece a la familia de SPATE que se han relacionado con las características de virulencia de estas bacterias. En este trabajo se produjeron AcMo contra la proteína Pic y se evaluó su reactividad contra otras proteínas autotrasportadoras para determinar su especificidad y su potencial diagnóstico.

Para producir los anticuerpos monoclonales de Pic era necesario trabajar con la proteína pura. El empleo de precipitaciones con sales y la cromatografía líquida convencional permitió obtener un compuesto con las características requeridas para un producto único. Aunque la metodología utilizada para la purificación de Pic fue satisfactoria, para las otras proteínas el rendimiento fue bajo. Lo anterior probablemente se relaciona con un proceso de autodegradación de la proteína ya que el producto es una proteasa y aunque se trabajó con condiciones para disminuir los efectos de degradación, el tiempo requerido para la purificación fue prolongado. Además durante el proceso de purificación hay pérdida de proteína y por tanto una disminución en el rendimiento, sin embargo se logró obtener un producto más homogéneo.

La proteína Pic resultó ser un excelente inmunógeno, como lo demuestran los títulos de anticuerpos anti-Pic altos en los ratones inmunizados (Figura 10).

Durante el proceso de clonación de hibridomas se obtuvieron 12 AcMo's, pero debido a que todos estos provienen del mismo híbrido, 52F7, no se pueden considerar como diferentes AcMo's, ya que todos provienen de la misma célula madre y por tanto presentan similitud en su comportamiento, aunque dicha similitud no es de todo, ya que pudiera tratarse de anticuerpos que reconocen lo mismo pero con diferente afinidad y para demostrar esto se tendría que realizar otro método.

Lo anterior se confirma, dado que las clonas originadas del híbrido reconocen las mismas bandas en IET, por lo que se sugiere que realmente sólo se cuenta con 1 anticuerpo monoclonal.

Los valores de absorbancia de los híbridos obtenidos en el primer ensayo como positivos y que tiempo después mostraron ser negativo, posiblemente se deba a que antes de que estos híbridos fueran clonados se mantuvieron demasiado tiempo en cultivo, induciendo a que la proporción de células productoras de anticuerpos anti-Pic con respecto a las no productoras disminuyera considerablemente, dando como resultado una baja en la concentración de los anticuerpos específicos y por consecuencia una disminución en el valor de absorbancia. El reducido número de pozos positivos a la producción de anticuerpos, posteriores a las clonaciones, era de esperarse con base en los valores tan bajos promovidos por las líneas. Lo contrario sucedió al realizar la subclonación de los pozos positivos obtenidos de la primera clonación. En este caso los pozos previamente enriquecidos por el proceso de clonación contaban con una elevada proporción de células productoras de anticuerpo, siendo lógico esperar un gran número de pozos positivos detectados por ELISA. Es importante mencionar que con el paso de las clonaciones, lo que se pretende es darle más estabilidad al anticuerpo, por esta razón, en algunos casos, las clonas dejan de producir y otras mejoran logrando estabilizarse.

Al enfrentar a los anticuerpos monoclonales y a los sobrenadantes de las líneas celulares con los antígenos en inmunotransferencia (Figura 14), se pudo evidenciar que se trataba del mismo anticuerpo. Al realizarse dicho ensayo, se observó que las clonas reconocían la misma banda de 110 kDa, que pertenece a Pic. Demostrando así que desde las clonas se trataba del mismo anticuerpo. Por esto, se decidió tratarlo como a uno solo.

Las reacciones cruzadas que presenta el AcMo con las proteínas Pet, Sat, y EspC puede atribuirse al hecho de que estas proteínas pertenecen al grupo SPATE, tienen como característica común un motivo de serina proteasa.

En ambos ensayos, tanto en ELISA como en IET, se observa que el AcMo anti-Pic, presenta mayor afinidad por la proteína Pet que por Pic, esto puede atribuirse a que

posiblemente ambas proteínas presentan algún epitopo compartido o similar, lo que puede ser el origen de esta reacción cruzada, favoreciendo la respuesta a la proteína Pet. Además de que se encuentra reportado que ambas proteínas (Pic y Pet) muestran alta homología con las proteínas autotransportadoras de tipo V, todas ellas incluidas dentro de la subfamilia SPATE, (56). Es importante resaltar que aunque Pic y Pet, presentan alta homología, la actividad biológica de ambas es diferente.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede referir lo que reportan Pinaki y cols. (25) en cuanto a las relaciones filogenéticas de este grupo de proteínas. Las proteínas SPATE pueden ser divididas en dos grupos ejemplificados por Pic y Pet. Curiosamente el análisis filogenético de las SPATE no revela una correlación en el dominio pasajero, que posee los dominios funcionales, incluyendo el motivo de serina proteasa (G<sup>256</sup>DSGSGV), pero sí muestra evidencia significativa de la recombinación homóloga entre miembros de esta familia. Efectivamente, proteínas muy similares como Pet y Sat (que son 53% idénticas en general) no comparten oligopéptidos específicos a pesar de las habilidades compartidas de romper espectrina y causar efectos citopáticos en células Hep-2. En contraste, las proteínas que son menos similares como Pic y Sat (30% idénticas), comparten algunos oligopéptidos específicos a pesar de ser clasificados en diferentes grupos y romper diferentes sustratos biológicos.

Aun cuando éstos anticuerpos monoclonales producidos presentaron reactividad cruzada con algunas proteínas autotransportadoras, pueden ser de utilidad en la detección de dichas proteínas presentes en diferentes grupos patógenos de *E. coli*.

## 7. CONCLUSIONES

Se logro purificar la proteína Pic de EAEC a partir del sobrenadante del cultivo de la clona p56.

Se obtuvo un AcMo anti-Pic de EAEC de la clase IgG que reconoce a dicha proteína por ELISA e IET, reconociendo una banda de 110 kDa.

Se determino que el AcMo anti-Pic presenta reacciones cruzadas por ELISA e IET con las proteínas autotransportadoras Pet, Sat, EspC y la cepa EAEC 2403.

Los AcMo anti-Pic reconocieron por ELISA e IET un epítoto que es compartido o similar dentro de las proteínas autotransportadoras estudiadas. Por lo tanto estos AcMo no son específicos para identificar a la proteína Pic en cepas del grupo enteroagregativas, pero sí pueden ser de utilidad en la detección de SPATE en diferentes grupos patógenos de E. coli.

Finalmente una opción para poder producir un anticuerpo monoclonal específico contra Pic eliminando reacciones cruzadas con proteínas autotransportadoras contra las cuales presenta una alta homología sería el sintetizar una región de aminoácidos específicos de Pic que no sean compartidos dentro de este grupo de proteínas.

## 8. REFERENCIAS

1. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**: 142-201.
2. Sussman, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease. In: Sussman M. (ed.). The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press, Inc., New York, p. 7-45.
3. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**:377-389.
4. Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. A. Vial, and M. M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J. Ped. Infect. Dis. **6**:829-831.
5. Hyams, K. C., A. L. Bourgeois, and B. R. Merrell. 1991. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. N. Engl. J. Med. **325**:1423-1428.
6. Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect. Immun. **55**:69-77.
7. Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. **3**:95-99.
8. Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. **45**:534-536.
9. Vial, P. A., R. M. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. **158**:70-79.
10. Levine, M. M., and R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol. Rev. **6**:31-51.
11. Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. **337**:262-264.
12. Baldwin, T. J., S. F. Brooks, S. Knutton, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P. H. Williams. 1990. Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **58**:761-765.
13. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**:377-389.
14. Formal, S., and R. B. Hornick. 1978. Invasive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. **137**:641-647.
15. Sereny, B. 1975. Experimental kerato conjunctivitis Shigellosa. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. **4**:367-376.
16. Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect. Immun. **45**:534-536.
17. Nataro, J. P., I. C. A. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine, and L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **48**:378-383.
18. Levine, M. M., V. Prado, R. Robins-Browne, H. Lior, J. B. Kaper, S. L. Moseley, K. Gicquelais, J. P. Nataro, P. Vial, and B. Tall. 1988. Use of DNA



- probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **158**:224-228.
19. Bhan, M. K., P. Raj, M. M. Levine, J. B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* **159**:1061-1064.
  20. Baqui, A. H., R. Bradley Sack, R. E. Black, K. Haider, A. Hossain, A. R. M. Abdul Alim, M. Yunus, H. R. Chowdhury, and A. K. Siddique. 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh in children < 5 years of age. *J. Infect. Dis.* **166**:792-796.
  21. Gomes, T. A. T., V. Rassi, K. L. MacDonald, S. R. T. S. Ramos, L. R. Trabulsi, M. A. M. Vieira, B. E. C. Guth, J. A. N. Candeias, C. Ivey, M. R. F. Toledo, and P. A. Blake. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo. *J. Infect. Dis.* **164**:331-337.
  22. Mathewson, J. J., R. A. Oberhelman, H. L. DuPont, F. J. de la Cabada, and E. V. Garybay. 1987. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1917-1919.
  23. Nataro, J. P., T. Steiner, and R. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **4**:251-261.
  24. Nataro, J. P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, C. O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* **171**:465-468.
  25. Pinaki R. Dutta, Renato Cappello, Fernando Navarro-García, and James P. Nataro. 2002. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infection and Immunity.* **70**: 7105-7113.
  26. Henderson I.A., Czczulin. J.,Eslava C.A., Noriega.F.,Nataro J.P. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **67**: 5587-96.
  27. Benjelloun-Touimi, Z., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1995. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**:123-135.
  28. Eslava, C., F. Navarro-Garcia, J. R. Czczulin, I. R. Henderson, A. Cravioto, and A. Cravioto. 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:3149-3154.
  29. Villaseca J.M., F. Navarro-Garcia, G. Mendoza-Hernandez, J.P. Nataro, A. Cravioto & C. Eslava. 2000. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect. Immun.* **68**:5920-5927.
  30. Villaseca Flores Jorge Mateo. 1997. Factores bacterianos involucrados en la patogenicidad de *Escherichia coli* enteroagregativa. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias, UNAM.
  31. Brunder W., H. Schmidt, and H. Karch. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* **24**:767-778.
  32. Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein, and B. B. Finlay. 1996. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J. Bacteriol.* **178**:6546-6554.

33. Benjellountouimi, Z., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1995. SepA. the major extracellular protein of *Shigella flexneri*-autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**:123-135.
34. Al-Hasani, K., K. Rajakumar, D. Bulach, R. Robins-Browne, B. Adler, and H. Sakellaris. 2001. Genetic organization of the she pathogenicity island in *Shigella flexneri 2a*. *Microb. Pathog.* **30**:1-8.
35. Provence, D. L., and R. Curtiss. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**:1369-1380.
36. Hernández Chiñas Ulises. 1996. Capacidad patogénica de diferentes proteínas identificadas en cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa. Tesis de licenciatura (QFB). Unidad Académica de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
37. Hernández, U., J. Villaseca, A. Navarro, A. Cravioto, and C. Eslava. 2001. Expression of Pet and Pic the serine proteases from enteroaggregative *Escherichia coli* in strains isolated from mexican children with and without diarrhea, abstr. B-226, p. 92. In Abstracts of the 101 General Meeting of the American Society for Microbiology 2001. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
38. Villaseca J. M., U. Hernández, T. R. Sainz-Espuñes, C. Rosario, C. Eslava. 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**:140-159.
39. Roitt IM, Delves PJ, Martin S, Burton D. 2003. Roitt's essential immunology, 11<sup>th</sup> edition. Oxford, UK: Blackwell Science, 2006. Traducción al español de la 10<sup>a</sup> edición en inglés: *Inmunología. Fundamentos*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
40. Rojas Espinosa O. 2002. *Inmunología de memoria*. México, DF: Editorial Médica Panamericana,
41. Gavilondo CJ. 1987. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de Anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología*, **4**:1-16.
42. Gavilondo CJ. 1995. Anticuerpos monoclonales. Colección Teoría y Práctica. Elfos Sciencitae. Cuba 180 pp.
43. Kohler G., and C. Milstein. 1976. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**:495.
44. Kennet R. Monoclonal antibodies hybridomas: A new dimension in biological analysis. New York, R. Kennet, T. Mckearn and K. Bechtol, eds. 1980. 376.
45. Potter M. 1972. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev*, **52**:631-719.
46. Goding JW. 1987. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. 2<sup>nd</sup>. ed. Academic Press, London,
47. Harvey Lodish, Arnol Berk, et al. 2004. *Biología Celular y Molecular*. 5a. ed. Editorial Médica Panamericana. México,
48. Horibata K, Harris AW. 1970. Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp Cell Res* **60**:61-77.
49. Milstein C, Cuello AC. 1984. Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. *Immunol Today*, **5**:10.

50. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Analysis of Proteins. In: Ausubel, F. M., et al. (ed.). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, Chap. 10, p. 10.0.1-10.12.9.
51. Fahey J. L., and E. W. Terry. 1978. Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Weir D. M. (ed). Handbook of experimental immunology, vol. 1: Immunochemistry, 3nd. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, chap. 8, p. 8.1-8.16.
52. Ion Exchange Chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-715 04 Uppsala 1, Sweden.
53. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.
54. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **22**:680-683.
55. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**:4530-4534.
56. Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect. Immun. **69**:1231-1243.