



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias -Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias
con mención en Higiene y Tecnología de los Alimentos



Obtención de anticuerpos específicos contra *Helicobacter pylori* producidos en yemas de huevos de gallina araucana

CARMEN LORENA VILLAGUALA PACHECO
CHILLAN-CHILE
2013

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *Helicobacter pylori* PRODUCIDOS EN YEMAS DE HUEVOS DE GALLINA ARAUCANA

Apolinaria García Cancino
Profesor Asociado
Bioquímico,
M. Sc., Dr. Cs. Biológicas

Profesora Guía

René Ortega Vásquez
Profesor Asociado
Médico Veterinario,
Dr. Cs. Silvoagropecuarias y Veterinarias

Asesor Externo

Fidel Ovidio Castro
Profesor Asociado
Ingeniero Zootecnista,
M. Sc., Ph.D.

Asesor Interno

Juana López Martín
Profesor Asociado
Médico Veterinario,
M.Sc.

Directora de Programa



ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo		Página
I	RESUMEN	1
II	SUMMARY	2
III	INTRODUCCIÓN	3
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	12
V	RESULTADOS	34
VI	DISCUSIÓN	57
VII	CONCLUSIONES	64
VIII	REFERENCIAS	65
IX	ANEXOS	74



ÍNDICE DE TABLAS

En el texto		
Tabla		Página
1	Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los lisados completos de <i>Helicobacter pylori</i> cepas J99 y 43504.	34
2	Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los anticuerpos IgY anti- <i>Helicobacter pylori</i> cepas J99 y 43504 no purificados (en bruto).	35
3	Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los anticuerpos IgY anti- <i>Helicobacter pylori</i> cepas J99 y 43504 purificados (fracciones eluato-peak II y eluato-peak III) mediante cromatografía de adsorción tiofílica (TAC).	37

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Diferencias estructurales entre IgG e IgY.	08
2	Etapas de inmunización de gallinas tipo araucanas (A) y de recolección de huevos (B).	13
3	Proceso de extracción de IgY desde la yema de huevo de gallina tipo araucana.	15
4	Orden de ubicación de los papeles filtros, membrana de transferencia y gel con muestras.	21
5	Disposición de las muestras en la membrana de transferencia y de las inmunoglobulinas IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa J99 aplicadas como anticuerpo primario.	23
6	Disposición de las muestras en la membrana de transferencia y de las inmunoglobulinas IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa 43504 aplicadas como anticuerpo primario.	24
7	Ensayo Profiláctico <i>in vitro</i> de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de <i>H. pylori</i> con los anticuerpos en bruto y eluato-peak II.	27

Figura N°		Página
8	Ensayo Profiláctico <i>in vitro</i> de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de la cepa 43504 de <i>H. pylori</i> con el anticuerpo en su forma eluato-peak III.	27
9	Ensayo Terapéutico <i>in vitro</i> de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de <i>H. pylori</i> con el anticuerpo en su forma bruta y eluato-peak II.	30
10	Ensayo Terapéutico <i>in vitro</i> de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de <i>H. pylori</i> con el anticuerpo en su forma eluato-peak III.	31
11	Purificación de IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa J99 con resina mediante cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC).	36
12	Purificación de IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa 43504 con resina mediante cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC).	36
13	Concentración de proteínas de anticuerpos IgY anti- <i>H. pylori</i> cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificada (eluato-peak II y eluato-peak III).	38

Figura N°		Página
14	Gel de SDS-PAGE con muestras de lisado y anticuerpos post electroforesis y tinción con azul de coomassie.	39
15	Gel teñido con azul de coomassie, post transferencia a membrana.	40
16	Membrana de transferencia teñida con rojo ponceau.	41
17	Membrana de transferencia utilizando como anticuerpo primario a IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa J99 sobre proteínas purificadas y no purificadas, teñida con D.A.B.	43
18	Membrana de transferencia utilizando como anticuerpo primario a IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa 43504 sobre proteínas purificadas y no purificadas, teñida con D.A.B.	44
19	Titulación del antígeno <i>H. pylori</i> cepa J99.	45
20	Titulación del antígeno <i>H. pylori</i> cepa 43504.	46
21	Titulación del anticuerpo IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa J99.	47
22	Titulación del anticuerpo IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa 43504.	48

Figura N°		Página
23	Evaluación de reacción cruzada IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa J99 frente a antígenos de diversas bacterias.	49
24	Evaluación de reacción cruzada IgY anti- <i>H. pylori</i> cepa 43504 frente a antígenos de diversas bacterias	50
25	Ensayo profiláctico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti- <i>H. pylori</i> cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de <i>H. pylori</i> en células AGS.	52
26	Ensayo profiláctico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti- <i>H. pylori</i> cepas J99 y 43504 en su forma purificada (eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de <i>H. pylori</i> en células AGS.	53
27	Ensayo terapéutico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti- <i>H. pylori</i> cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de <i>H. pylori</i> en células AGS.	55

Figura N°**Página**

- 28 Ensayo terapéutico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada (eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de *H. pylori* en células AGS. 56



I. RESUMEN

OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA *Helicobacter pylori* PRODUCIDOS EN YEMAS DE HUEVOS DE GALLINA ARAUCANA

OBTAINING SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST *Helicobacter pylori* PRODUCED IN EGG YOLKS FROM ARAUCANA HENS

Helicobacter pylori es el agente causal de diversas patologías gastroduodenales, con una seroprevalencia a nivel mundial de 50% y en Chile de un 73-76%. La dificultad en el tratamiento actual (resistencia a los antibióticos, efectos secundarios y alto costo) hace necesaria la búsqueda de métodos de tratamiento más eficientes e idealmente de prevención, como el planteado en este estudio. El diseño experimental contempló la inoculación intramuscular de gallinas araucanas con lisados completos de dos cepas de *H. pylori* con diferente genotipo de virulencia: la cepa ATCC 43504 (*cagA+*, *vacAs1m1*, *dupA-*), asociada al desarrollo de cáncer gástrico y la cepa J99 (ATCC 70824) (*cagA+*, *vacAs1m1*, *dupA+*), asociada al desarrollo de úlcera duodenal. Se realizó el aislamiento de IgY desde la yema de los huevos recolectados, basado principalmente en ultrafiltración y precipitación con sulfato de amonio, obteniendo así anticuerpos aviares sin purificar (en bruto). Mediante cromatografía de adsorción tiofílica (TAC) se purificaron las IgY anti-*H. pylori* de las cepas J99 y 43504, obteniendo así las fracciones eluato II (peak II) y eluato III (peak III). El rango de concentración proteica de estas inmunoglobulinas fue de 0,3 a 5,4 mg/mL. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en ambiente reductor (SDS-PAGE) y western blot (WB) se observó una banda de 67 KDa (cadena pesada de IgY) de las inmunoglobulinas de ambas cepas. El título de anticuerpos, mediante ELISA indirecto (ELISA-I), para IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 fue mayor a 1/6400. En el test de reacción cruzada entre los anticuerpos aviares con diversas bacterias no hubo reacción cruzada. En los ensayos profilácticos y terapéuticos *in vitro* utilizando una línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS), el eluato III de IgY anti-*H. pylori* al ser desafiada con *H. pylori* demostró una alta eficiencia protectora contra ambas cepas de *H. pylori*.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, Inmunoglobulina Y, Yema, Huevo, Gallina.

II. SUMMARY

OBTAINING SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST *Helicobacter pylori* PRODUCED IN EGG YOLKS FROM ARAUCANA HENS

Helicobacter pylori is responsible for causing various gastroduodenal diseases, with a worldwide seroprevalence of 50% and a prevalence in Chile of 73-76%. The difficulty in the current treatment (antibiotic resistance, side effects and high cost) make imperative the search for more efficient treatment methods and ideally prevention, as proposed in this study. The experimental design included an essay with araucanas hens, which were inoculated intramuscularly with *H. pylori* whole lysates of different genotype pylori virulence: strain ATCC 43504 (cagA +, vacAs1m1, dupA-), associated with the development of gastric cancer and strain J99 (ATCC 70824) (cagA +, vacAs1m1, dupA +), associated with the development of duodenal ulcer. IgY antibodies were isolated from collected egg yolks, through mainly ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation, obtaining non purified avian antibodies (in raw). Antibodies IgY against *H. pylori*, strains J99 and 43504, were purified by Thiophilic Adsorption Chromatography (TAC), thus obtaining eluted II (peak II) and eluted III (peak III). The protein concentration range for these immunoglobulins were between 0,3 and 5,4 mg/mL. By polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot (WB), it was observed a band of 67 kDa (IgY heavy chain) of immunoglobulins in both strains. By indirect ELISA (I-ELISA), the antibody titers for IgY *H. pylori* strains J99 and 43504 were greater than 1/6400. In cross-reactivity test between avian antibodies with several bacteria, there were not cross reaction. In the prophylactic and therapeutic assays *in vitro* using a gastric adenocarcinoma cell line (AGS), eluted III of IgY against-*H. pylori* challenged with *H. pylori* demonstrated a high protective efficiency against both strains of *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Immunoglobulin Ig Y, Yolk, Egg, Chicken.

III. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, microaerófilo, de forma espiralada, colonizador persistente de la mucosa gástrica en humanos (Blaser y Atherton, 2004; Marshall y Warren, 1984, citado por Ledesma *et al.*, 2010), induciendo, inicialmente, una gastritis crónica no atrófica que eventualmente progresa hacia gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y carcinoma gástrico o hacia linfoma tipo MALT (Rivas-Traverso y Hernández, 2000; Suerbaum y Michetti, 2002). La asociación entre la infección con *H. pylori* y cáncer gástrico es tan estrecha que esta bacteria ha sido clasificada como carcinógeno de clase I, por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer y la OMS en 1994 (World Health Organization and International Agency for Research on Cancer, 1994).

Seroprevalencia de *Helicobacter pylori*

La infección con ese patógeno abarca la población mundial y su seroprevalencia varía de acuerdo al nivel socio-económico de ésta (Suerbaum y Michetti, 2002). La infección en los países en vías de desarrollo supera el 90% de prevalencia, donde la adquisición de la infección ocurre mayoritariamente a una temprana edad (Rivas-Traverso y Hernández, 2000; Logan y Walker, 2001), mientras que en los países industrializados varía entre un 11% y un 40%, y la adquisición de la infección ocurre a una edad adulta (Martínez *et al.*, 2008).

En Chile, la prevalencia, por análisis serológicos, en población adulta asintomática fluctúa entre un 73% y 76% (Figueroa *et al.*, 1997; Ferreccio *et al.*, 2007), y la prevalencia por el test de la ureasa, en pacientes adultos con síntomas digestivos, alcanza el 78% (Ortega *et al.*, 2010). En los niños chilenos, entre los 3 y 14 años, la infección por *H. pylori* ha alcanzado una seroprevalencia de un 26% (González *et al.*, 2007), los cuales generalmente son asintomáticos y por ende no son tratados. Esta infección puede transformarse en una infección persistente, la cual podría generar, en aproximadamente un 20% de la población, patologías como la enfermedad úlcero péptica, enfermedades linfoproliferativas o adenocarcinoma gástrico (González *et al.*, 2007).

Por otra parte, se detectó la presencia de *H. pylori* en el 11,4% de los lactantes de la Región del Bío Bío, mediante antígeno en deposición y anticuerpos anti-*H.pylori* (Súarez, 2007). Estas cifras son muy preocupantes, ya que el cáncer gástrico en Chile, representa la primera causa de muerte por cáncer y la Región del Bío Bío posee la mayor tasa de cáncer gástrico del país (Ministerio de Salud, 2006).

Factores de Patogenicidad de *Helicobacter pylori*

El éxito que ha tenido *H. pylori* en infectar y colonizar por décadas a sus huéspedes se debe a que este microorganismo cuenta con varios genes de virulencia, entre los cuales se encuentra: *vacA* (Atherton *et al.*, 1995), el cual codifica para la toxina vacuolizante A (VacA), proteína que estaría fuertemente asociada con el daño celular y la inflamación (Houghton y Wang, 2005; Kusters *et al.*, 2006; Peek y Crabtree, 2006); *babA*, el cual codifica la adhesina BabA, adhesina que facilita la unión del microorganismo a los antígenos de Lewis b (Mizushima *et al.*, 2001; Björnham *et al.*, 2009); *oipA*, el cual codifica para la proteína de membrana externa conducentes a un aumento de la inflamación (Kudo *et al.*, 2004); *dupA*, el cual es un gen promotor de la úlcera duodenal, pero que a su vez reduce el riesgo de atrofia gástrica y cáncer (Arachchi *et al.*, 2007); *sabA* codifica para una proteína que interviene en la adherencia bacteriana a glicoconjugados que contienen ácido siálico, lo que permitiría inducir y provocar inflamación gástrica (Ramírez y Sánchez, 2009); *cagA*, el cual codifica un antígeno inmunodominante, que no está presente en todas las cepas de *H. pylori* (Covacci *et al.*, 1993), pero forma parte de la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), que contiene 31 genes (Censini *et al.*, 1996; Wiedemann *et al.*, 2009). La isla de patogenicidad *cag* codifica un sistema de secreción de la bacteria tipo IV que inyecta productos bacterianos dentro de las células epiteliales resultando en eventos de señalización que promueven la inflamación y riesgos neoplásicos (Naumann y Crabtree, 2004; Kusters *et al.*, 2006; Peek y Crabtree, 2006). Por lo tanto, la detección molecular de *cagA* indica la presencia de la isla de patogenicidad *cag* en el cromosoma del microorganismo. Las cepas *cag+* (cepas tipo I) se asocian a mayor virulencia, al inducir daño gástrico visible, mientras que

las cepas *cag-* (cepas tipo II) se asocian a menor virulencia y se comportan como bacterias comensales más que patógenas (Censini *et al.*, 1996).

Las cepas que conforman la especie *H. pylori* han demostrado una alta diversidad genética, tanto en los genes conservados (genes housekeeping) (Solca *et al.*, 2001) como a los asociados a virulencia (Chiarini *et al.*, 2009), como resultado de eventos de frecuente recombinación, una alta tasa de mutación, y la capacidad de integrar inusualmente pequeños fragmentos de ADN exógeno en su cromosoma (Tomb *et al.*, 1997; Salama *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2001; Morelli *et al.*, 2010).

Esto explica la difícil erradicación de la infección por *H. pylori* en los seres humanos, a lo que se suma la ineficiencia del tratamiento actual (2 antibióticos y 1 inhibidor de la bomba de protones) causado principalmente por el aumento de la resistencia a los antibióticos y por la discontinuidad en los tratamientos debido a los efectos secundarios (diarrea, vómitos, dolor abdominal, etc.) (Koletzko *et al.*, 2006; Castro-Fernández *et al.*, 2009), además se suma el alto costo del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades asociadas a la infección por este microorganismo (Alvarez *et al.*, 2002; Sachs y Scott, 2012; Salas-Aguilar *et al.*, 2003).

Gallina como fuente de obtención de anticuerpos

La razón de la elección de la gallina para la producción de anticuerpos (IgY) tiene importantes ventajas como es que los anticuerpos pueden cosecharse de la yema del huevo en vez del suero, haciendo obsoleta la toma de muestra sanguínea, evitando así las molestias y/o sufrimiento a los animales involucrados en las etapas de la propia vacunación, la toma de muestra sanguínea y el sangrado de los animales, etapas que son un pre-requisito para la preparación de anticuerpos (Mojca, 2003). Además, la productividad de anticuerpos de una gallina ponedora es mucho mayor que la de un mamífero de tamaño similar (Leenaars *et al.*, 1999; Hau y Hendriksen, 2005) por lo que, comparada con la IgG mamífera, la IgY de los pollos presenta varias ventajas: es muy económica, se puede producir en grandes cantidades, se evita el sangrado del animal, no presenta reacciones cruzadas con los factores reumatoídeos (Larsson *et al.*, 1991), no activa el sistema de

complemento mamífero (Carlander y Larsson, 2001), no interfieren con las heteroaglutininas humanas en la prueba de Coombs, presentan menor fluorescencia inespecífica en preparaciones inmunofluorescentes y, por otra parte, la IgY contra los antígenos de mamíferos suele reconocer varias regiones de antígeno de superficie resultando en una señal final más fuerte en ensayos inmunológicos (Tini *et al.*, 2002).

La gallina produce una importante cantidad de IgY, la cual corresponde, desde el punto de vista de su función en el cuerpo y uso inmunoquímico, a la IgG de los mamíferos. Ya en 1962, la proteína IgY fue identificada por Williams (1962), como gamma-globulinas en una fracción gamma livetin de yema de huevo. La gallina traspasa su IgY a la yema del huevo, donde su concentración oscila entre 10-25 mg/mL, cantidad notoriamente mayor en relación a su concentración sanguínea, la cual es de 5-6 mg/mL (Leslie y Martin, 1973). Por otra parte, si se considera que el volumen de una yema de huevo es de 15 mL, la producción de IgY por huevo fluctuaría en un rango desde los 50-100 mg (Kovacs-Nolan y Mine, 2004) a 375 mg de IgY/huevo (Berghman *et al.*, 2005). Otros estudios estiman que la concentración de IgY en una yema de huevo sería de unos 15 mg/mL, con variaciones entre los 8 y 25 mg/mL (Sunwoo *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 1974, citados por Gatica *et al.*, 2004). La producción total de huevos anual de una gallina es de 300 huevos aproximadamente, lo que implicaría una producción de 100 g de IgY/gallina/año (Berghman *et al.*, 2005). Esta variación dependerá de la línea genética o raza del ave, así como del tamaño del huevo y las variaciones fisiológicas individuales de ella. La extracción de la IgY desde la yema del huevo se realiza mediante un método de precipitación y de cromatografía (Verdoliva *et al.*, 2000).

Gallina tipo araucana

Considerando las ventajas que la gallina tiene como modelo animal para la obtención de anticuerpos, es que se utilizará para este estudio la gallina tipo araucana, la cual proviene de la unión de dos razas, una de ellas llamada "collonca", cuya característica es la de no tener cola (falta del pigostilo) y poner

huevos de color azul o azul verdoso (Storey *et al.*, 2007). La otra raza denominada “quetra”, quetro o quetero, cuyas características son comunes, salvo que posee aretes (Noorai *et al.*, 2012). En Chile, la mayor parte de las gallinas de campo que ponen huevos verde-azulados no son araucanas puras, sino mezclas con otras razas. Por eso, actualmente se habla de gallina tipo araucana (Moya, 2004), debido a que el único rasgo común a todas las variedades es la coloración verde-azulada de los huevos (Bitgood *et al.*, 1980). Esta característica es heredada como un gen dominante autosomal (Sheppy, 2009).

La gallina tipo Araucana se describe como rústica, con un bajo nivel de postura y con una cloquera acentuada (Orellana, 1993), alta tolerancia climática, habilidad de digerir alimento de baja calidad y de sobrevivir con suplementos alimentarios reducidos (Moya, 2004). Adicionalmente, presenta una menor susceptibilidad al virus de la leucosis aviar (Toledo, 2006). Otra característica racial es su mayor concentración de hemoglobina en la sangre y mayor número de eritrocitos que las variedades tradicionales (Toledo, 2006).

Características de IgY

La estructura general de la molécula de IgY es comparable a la de las inmunoglobulinas de los mamíferos, componiéndose de dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas. A diferencia de los tres dominios constantes de la cadena pesada de la IgG, la cadena pesada de la IgY se representa con la griega “Y” o “u” y contiene un dominio variable y cuatro dominios constantes. El peso molecular de la IgY es de alrededor de 180 KDa a diferencia de la IgG cuyo peso molecular es de alrededor de 159 KDa (Kovacs-Nolan y Mine, 2004). Existe una cierta homología entre los dominios Cy3 y Cy4 de la IgY y los dominios Cy2 y Cy3 de la IgG mamífera, mientras que se cree que el dominio Cy2 que representa la región bisagra de la IgG, se encuentra mucho menos desarrollada en la IgY. El poco desarrollo de la región bisagra de la IgY tiene como consecuencia una reducción en la flexibilidad de la movilidad de las regiones Fab y esta puede ser una de las razones de las diferencias estructurales entre IgG e IgY. La porción Fc de la IgY es el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en

forma similar a lo que ocurre con la IgG. El fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una (Figura N°1). El punto isoeléctrico varía entre 5,7 y 7,6 (Michael *et al.*, 2010).

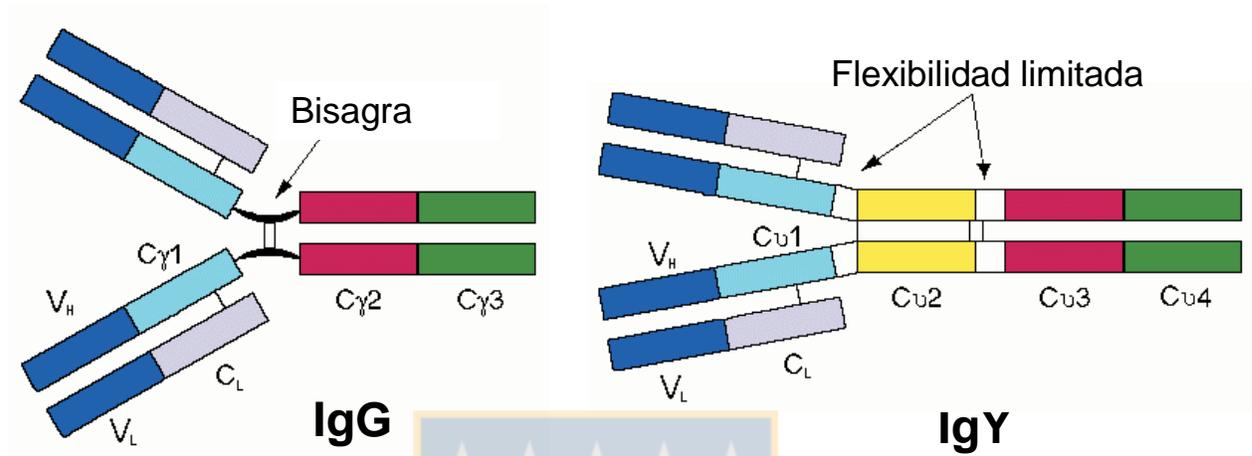


Figura N°1. Diferencias estructurales entre IgG e IgY.

La IgY es estable a pH 4-8 y hasta 60° C en condiciones acuosas (Shimizu, *et al.*, 1992; Shin *et al.*, 2002; Chacana *et al.*, 2004), incluso la actividad inmunológica de IgY no se vería afectada a 60° C por 3,5 minutos (Hatta *et al.*, 1993). Las condiciones de alta salinidad o una adición de compuestos que otorguen estabilidad (por ejemplo, azúcar) aumentan la resistencia al calor, pH de acidez extremo y alta presión (Shimizu *et al.*, 1994; Zhang, 2003).

Por otra parte, se podría pensar en la posibilidad de administrar oralmente IgY como inmunoterapia para tratar la infección por *H. pylori*, ya que se ha sugerido que una fracción de inmunoglobulinas mantiene su actividad de neutralización, al menos a nivel local en varios segmentos del tracto intestinal, debido a que *H. pylori* sería reconocido por el anticuerpo inhibiendo así, de una forma más eficiente, la adherencia de este microorganismo a las células epiteliales humanas, junto con inhibir la actividad de ureasa de este microorganismo (Shin *et al.*, 2002). Esta vía de administración reemplazaría a las actuales formas de inmunización que se utilizan, a saber la administración sistémica o intravenosa de anticuerpos

específicos, las cuales fueron seleccionadas sobre la teoría de que las moléculas de inmunoglobulina administradas oralmente se degradarían y se inactivarían por proteasas en el estómago y el intestino, situación que Shin *et al.* (2002) no lo comparte en su totalidad.

Las formas de dosificación oral de anticuerpos tendrían las ventajas de reducción de costos y simplicidad de la administración, así como el potencial para tratar las enfermedades localizadas en el tracto gastrointestinal. Dado que normalmente, los huevos se incluyen en la dieta, no hay prácticamente ningún riesgo de efectos secundarios tales como la toxicidad. Sin embargo, es importante considerar la alergia a los huevos (de tipo digestiva y respiratoria), causada específicamente por la α -livetina (fracción hidrosoluble de proteínas de la yema), antes de comenzar la inmunoterapia con anticuerpos de yema de huevo porque podrían ocurrir reacciones alérgicas (Alvarez *et al.*, 2004; Sansosti *et al.*, 2009).

Ensayo *in vitro* en línea celular AGS

Los cultivos celulares son utilizados frecuentemente en la investigación biotecnológica y biomédica, existiendo una amplia variedad de líneas celulares cuyo uso dependerá de los objetivos que se desean alcanzar.

En el caso particular de este estudio, era recomendable utilizar una línea celular epitelial gástrica de origen humano que pudiese replicar *in vitro* las condiciones *in vivo*, para realizar ensayos de tipo profiláctico y terapéutico para determinar el efecto protector de los anticuerpos aviares anti *H. pylori* de ambas cepas. Es así, que se decidió trabajar con la línea celular AGS, correspondiente a adenocarcinoma gástrico humano obtenido de una biopsia de un adenocarcinoma del estómago de un humano no tratado. La razón de esto es que las líneas celulares AGS mantienen sus características del epitelio gástrico y otras características únicas de la línea celular y además sus clones se han utilizado en la investigación en los campos de oncología, virología, bacteriología e inmunología.

La ventaja principal del uso de la línea celular AGS es que esta línea celular es susceptible a las toxinas VacA (Chan *et al.*, 1996) y CagA (Smoot *et al.*, 1999) de

H. pylori lo que permitiría cuantificar la producción de ureasa al momento de realizar el desafío de los anticuerpos con las dos cepas de esta bacteria.

Considerando lo anteriormente expuesto es que surge la necesidad de contar con un método de diagnóstico de *H. pylori* que sea sencillo, rápido, de uso masivo y a un menor precio, especialmente para estudios de tipo epidemiológico, donde la seroprevalencia es de elección y que reemplace a los actuales métodos comerciales utilizados con este fin, los cuales son de un alto costo y de mayor complejidad en su elaboración.

Para ello se pensó como estrategia experimental utilizar un método de inmunodiagnóstico utilizando la IgY obtenida de yema de huevo de gallina tipo araucana inmunizada, por separado, con dos cepas de *H. pylori* asociadas a virulencia, cuyos genotipos se asocian al desarrollo de úlcera duodenal (*cagA+*, *vacAs1m1*, *dupA-*), y de cáncer gástrico (*cagA+*, *vacAs1m1*, *dupA-*).



Hipótesis

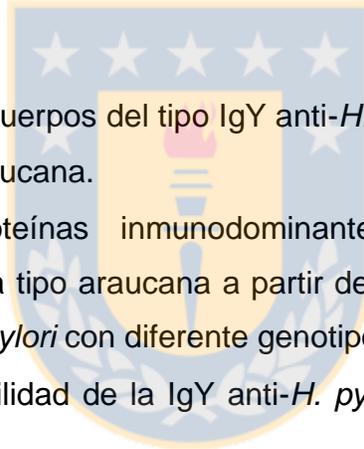
Las IgY anti-*Helicobacter pylori* de las cepas J99 y ATCC 43504, producidas en la yema de huevo de gallina tipo araucana, ejercen un efecto protector *in vitro* contra las cepas J99 y ATCC 43504 de *H. pylori*, en la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS).

Objetivo General

- Producir IgY anti-*H. pylori* y determinar su efecto protector *in vitro* en una línea celular.

Objetivos Específicos

- Aislar y purificar anticuerpos del tipo IgY anti-*H. pylori* a partir de la yema de huevos de gallina araucana.
- Determinar las proteínas inmunodominantes como respuesta a la inoculación de gallina tipo araucana a partir del lisado completo de un pool de dos cepas de *H. pylori* con diferente genotipo asociado a virulencia.
- Determinar la sensibilidad de la IgY anti-*H. pylori* sintetizada por la gallina inmunizada.
- Determinar la especificidad de la IgY anti-*H. pylori* sintetizada por la gallina inmunizada.



IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de cepas de *H. pylori* y cuantificación proteica de ellas

H. pylori (ATCC 43504 y J99) fueron cultivadas separadamente en placas con agar Columbia (Oxoid) suplementado con 5% (vol/vol) sangre de caballo y DENT, a 37°C, durante 4 días, bajo condiciones de microaerofilia. Se cosecharon ambas cepas de *H. pylori* desde sus placas para ponerlas dentro de tubos con PBS 1x (pH 7,2). El material celular fue removido por centrifugación a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C y luego fue sonicado. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas, desde el lisado completo, por el método del ácido bicinonínico, para lo cual a partir de la alícuota sonicada se realizó centrifugación y diluciones seriadas en duplicado de ambas cepas, para obtener la absorbancia de estas muestras y así cotejarlas con la absorbancia de una muestra de albúmina de concentración conocida de proteínas (BCA) a una absorbancia de 562 nm.

Inmunización de gallinas

Se inocularon a 3 grupos de gallinas araucanas (32 semanas de edad; n= 21) de la siguiente forma: el primer grupo constituido por 2 gallinas a las cuales se les inyectó PBS 1x (pH 7,2) (control negativo); el segundo grupo constituido por 10 gallinas inmunizadas con lisado completo de *H. pylori*, cepa J99; y el tercer grupo formado por 9 gallinas inmunizadas con lisado completo de *H. pylori* cepa ATCC 43504.

Las gallinas fueron inyectadas a ambos lados de la pechuga (300 µL por sitio) con lisado completo de *H. pylori* (50 µg/mL, proteínas), usando igual volumen de adyuvante completo de Freund (SIGMA). Dos semanas después, las gallinas recibieron tres inyecciones boosters, con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA), con un intervalo de 2 semanas entre inyecciones. A contar del mes post primera inoculación (día posterior al segundo booster), se hizo la recolección de los huevos en forma diaria durante 4 semanas, los cuales se almacenaron a 4°C (Figura N°2).

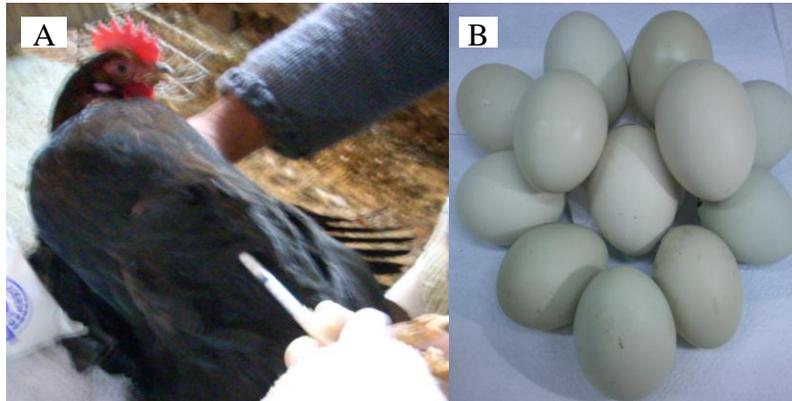


Figura N°2. Etapa de Inmunización de gallinas tipo araucanas (A) y de recolección de huevos (B).

Aislamiento de IgY – *H. pylori* desde las yemas de los huevos de gallina

Se realizó la separación de las yemas de las claras de pools de huevos de los 3 grupos de gallinas en forma diaria. Cada pool de yemas (4°C) se diluyó con 9 volúmenes de agua destilada fría (4°C) y se homogeneizó por 1 minuto usando una juguera (Waring) a alta velocidad. Se ajustó el pH de la solución de yemas de huevo a pH 5 con HCl 3N y se centrifugó a 2.800 x g por 40 minutos a 4°C.

Después de la centrifugación, al sobrenadante recolectado se le agregó 0,05% de carbón activado, se ajustó a pH 4 con HCl 1N y nuevamente se centrifugó a 2.800 x g por 30 minutos a 4°C para remover las lipoproteínas residuales en el sobrenadante. El sobrenadante fue filtrado al vacío usando un papel filtro Whatman N°1 y luego se realizó una ultrafiltración utilizando tubos de 15 mL con filtros de membrana de poros de tamaños de corte de 100 kD (Amicon Ultracel).

La solución de la muestra concentrada por ultrafiltración se purificó usando el método de precipitación con sulfato de amonio. Para tal efecto, se precipitó con sulfato de amonio saturado al 40% (pH 9) y luego se centrifugó a 4.500 rpm por 20 minutos a 4°C. Posteriormente el pellet fue resuspendido en Tris-HCl 0,01M (pH 8) a un volumen igual a la mitad del sobrenadante. La muestra nuevamente fue

precipitada con sulfato de amonio saturado al 40% y centrifugada a 4.500 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en PBS 1x (pH 7,2) y fue dializado 4 veces con PBS 0,5x (pH 7,2), durante 48 hrs para remover el NaCl (Figura N°3). La actividad y pureza de las IgY de ambas cepas de *H. pylori* se determinaron utilizando ELISA, SDS-PAGE y Western Blot.



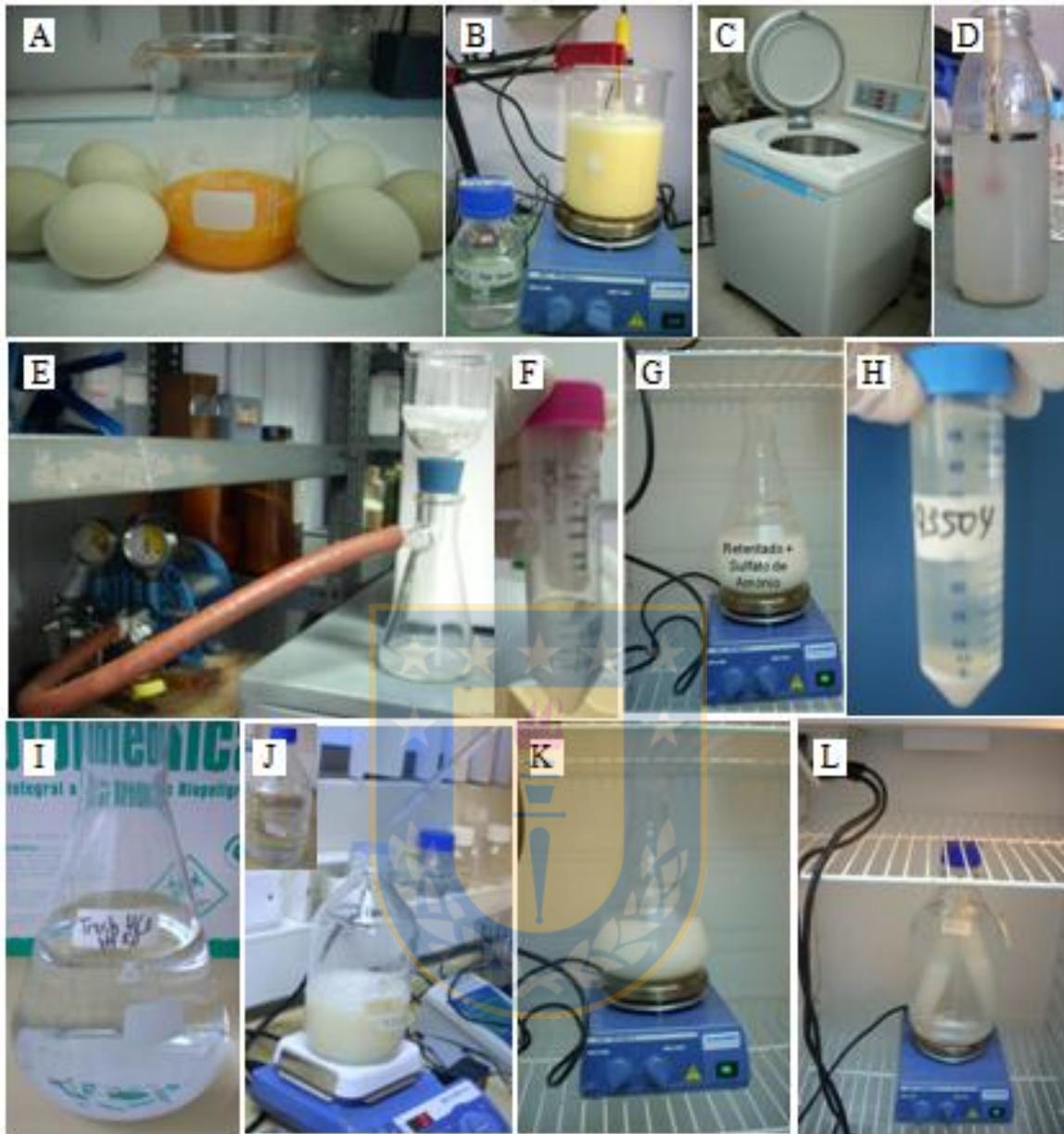


Figura N°3. Proceso de extracción de IgY desde la yema del huevo de gallina tipo araucana. A: Separación de las yemas de las claras de los huevos; B: Ajuste de pH a la solución de huevos licuada; C: Centrifugación; D: Ajuste de pH a sobrenadante con carbón activado; E: Filtración al vacío; F: Ultrafiltración; G: Adición de Sulfato de amonio con agitador magnético a 4°C; H: Centrifugación de la solución con sulfato de amonio; I: Adición de Tris-HCl; J: Adición de Sulfato de amonio; K: Agitación de solución de sulfato de amonio a 4°C; L: Diálisis de las muestras centrifugadas y resuspendidas en PBS 1x (pH 7,2).

Purificación con resina de afinidad por TAC a IgY *H. pylori* cepas J99 y 43504 desde las yemas de huevos de gallinas procesadas

Las muestras procesadas al final de la etapa anterior (Aislamiento de IgY – *H. pylori* desde las yemas de los huevos de gallina) fueron purificadas por Cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC) a través de una resina de afinidad por las inmunoglobulinas y α_2 -macroglobulinas.

Antes de comenzar la purificación de proteínas, las muestras se prepararon añadiéndoles 335 mg de anhídrido de sulfato de sodio (Na_2SO_4) a 5 mL de muestra. Se disolvieron los cristales al invertir suavemente el tubo que contenía la muestra. Luego la muestra fue filtrada con un filtro con poros de 0,45 μm de diámetro a fin de extender la vida útil de la resina.

Se ensambló y se empaquetó la columna de cromatografía con la resina para esto se aplicó presión para extraer el aire del primero y se resuspendió la resina en un tubo de filtración con agua MiliQ hasta obtener un volumen de 10 mL. Luego la resina resuspendida se transfirió a la columna de cromatografía de baja presión, donde se esperó por 20 minutos hasta que se estabilizara completamente la resina dentro de la columna.

Se hizo correr el equipo a un volumen de flujo de 0,5 mL/minuto para evitar el ingreso de aire a la bomba de la columna y a las sondas durante el ensamblaje.

Se equilibró la columna con buffer de Equilibrio a un volumen 10 veces mayor al volumen de la columna (columna de 10 mL = 100 mL de buffer de Equilibrio). Se usó una velocidad de flujo de ≤ 2 cm/min. Por lo tanto, para esta columna se utilizó un volumen de flujo de 4 mL/min.

Cuando ya la resina fue empaquetada y equilibrada, se procedió a pasar las muestras previamente tratadas con anhídrido de sulfato de sodio a un volumen de flujo de 2 mL/min. En esta etapa se recolectaron las Proteínas No Unidas (al momento en que empieza a elevarse la curva que formará el Peak I, observable en la pantalla del equipo computacional conectado al equipo TAC).

Una vez que la curva declinó (llegó a la línea base), se cambió al Buffer de Elución, para lo cual comenzó la recolección de las Proteínas Eluidas del

anticuerpo al reducirse la concentración de Na_2SO_4 y esta recolección comenzó al momento de elevarse la línea base para formar el Peak II.

Una vez que la curva declinó (llegó a la línea base), se pasaron 50 mL de Buffer de Regeneración, para lo cual comenzó la recolección de las Proteínas Eluidas del anticuerpo en ausencia de Na_2SO_4 al momento de elevarse la línea de base para formar el Peak III.

Una vez que la curva declinó (llegó a la línea base) se pasaron 30 mL de etanol al 25% para desinfectar la resina y reutilizarla en otro momento o con otra muestra tratada.

ELISA Indirecto

La presencia de inmunoglobulinas IgY en el extracto de yemas con especificidad para *H. pylori* cepa J99 y 43504 se determinó por el método inmunoenzimático de ELISA indirecto. Las proteínas totales de *H. pylori* cepa J99 y 43504 fueron diluidas en buffer carbonato-bicarbonato (50mM, pH 9.6) en una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (previamente determinada por titulación del antígeno). Las diluciones fueron usadas para la inmovilización del antígeno en placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Immunoplate Maxisorp, Denmark), por incubación a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con buffer PBS/Tween (TPBS: PBS y 0,05% de Tween 20) y se les adicionó buffer de bloqueo (TPBS y gelatina al 0,8% [w/v]) y se incubó por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Luego, se lavaron 3 veces durante 1 minuto con TPBS y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C, en cámara húmeda, con diferentes diluciones de los extractos de yema enriquecidos en IgY anti-*H. pylori* cepa J99, 43504 y un control negativo (proveniente de gallinas inoculadas con solución salina) disueltas en buffer para anticuerpos (TPBS y 0,2% de gelatina), al finalizar el periodo de incubación se lavaron 3 veces las placas con TPBS. Posteriormente se incubaron las placas con un anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 anti-IgY de gallina (Sigma Aldrich), el anticuerpo se utilizó en una dilución de 1/2000 en buffer de anticuerpo y se incubó por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Luego se lavaron 3 veces durante 1 minuto con TPBS y se

incubaron con un anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (ImmunoResearch) en una dilución de 1/5000 en buffer para anticuerpos, y se incubó nuevamente por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Finalizada la incubación, las placas fueron lavadas 3 veces y reveladas adicionando una solución de ortofenildiamina (OPD/Fast) 0,4 mg/mL (Sigma-Aldrich, Inc.) incubando por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se realizó la lectura de la reacción colorimétrica empleando un lector de microplacas a una longitud de onda de 450nm (Victor3, PerkinElmer).

Determinación de reacciones cruzadas con otras bacterias.

La reactividad cruzada de las inmunoglobulinas IgY en el extracto de yemas con especificidad para *H. pylori* cepa J99 y 43504 se determinó por el método inmunoenzimático de ELISA indirecto. Las proteínas totales de *H. pylori* cepa 43504, *H. pylori* cepa J99, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus* ATCC 6538P, *Enterobacter cloacae*, *Yersenia* spp., *Shigella flexneri*, *Campylobacter yeyuni*, *Listeria monocytogenes* y *Arcobacter butzceri* fueron diluidas en buffer carbonato-bicarbonato (50mM, pH 9.6) en una concentración final 10 µg/mL. Las diluciones fueron usadas para la inmovilización del antígeno en placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc Immunoplate Maxisorp, Denmark), por incubación a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con buffer PBS/Tween (TPBS: PBS y 0,05% de Tween 20) y se les adicionó buffer de bloqueo (TPBS y gelatina al 0,8% [w/v]) y se incubó por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Luego, se lavaron 3 veces durante 1 minuto con TPBS y se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C, en cámara húmeda, con una dilución de 1/1500 de los extractos de yema enriquecidos en IgY anti-*H. pylori* cepa J99, 43504 y un control negativo (proveniente de gallinas inoculadas con solución salina) disueltas en buffer para anticuerpos (TPBS y 0,2% de gelatina), al finalizar el período de incubación se lavaron 3 veces las placas con TPBS. Posteriormente se incubaron

las placas con un anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 anti-IgY de gallina (Sigma Aldrich), el anticuerpo se utilizó en una dilución de 1/2000 en buffer de anticuerpo y se incubó por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Luego, se lavaron 3 veces durante 1 minuto con TPBS y se incubaron con un anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (Immuno Research) en una dilución de 1/5000 en buffer para anticuerpos, y se incubó nuevamente por 1 hora a 37°C, en cámara húmeda. Finalizada la incubación, las placas fueron lavadas 3 veces y reveladas adicionando una solución de ortofenildiamina (OPD/Fast) 0.4 mg/ml (Sigma-Aldrich, Inc.) incubando por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se realizó la lectura de la reacción colorimétrica empleando un lector de microplacas a una longitud de onda de 450nm (Victor3, PerkinElmer).

SDS-PAGE

El gel completo (en duplicado) se preparó por la disposición de tres geles en diferentes porcentajes de sus componentes: Gel Concentrador al 5% (AB-6: 0,6 mL; Gel Buffer (3x): 1,5 mL; H₂O destilada: 3 mL; APS: 30 uL; Temed: 10 uL); Gel Intermedio al 10% (AB-6: 1 mL; Gel Buffer (3x): 1,65 mL; H₂O destilada: 2,32 mL; Urea: 1,8 g; APS: 25 uL; Temed: 8 uL); y Gel Separador al 16% (AB-6: 3,2 mL; Gel Buffer (3x): 3,2 mL; H₂O destilada: 2,5 mL; Glicerol: 1 g; Urea: 3,6 g; APS: 50 uL; Temed: 16 uL).

Se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el método del ácido bicinconínico, de acuerdo a instrucciones de The Thermo Scientific Pierce (BCA Protein Assay Kit), cuya cuantificación fue la siguiente: Considerando la alta concentración proteica de los lisados completos de *H. pylori* cepa J99 (1931,4 µg/mL); y lisado completo de *H. pylori* cepa 43504 (1473,6 µg/mL) es que se decidió diluirlas a una quinta (cepa J99) y cuarta parte (cepa 43504) de su concentración original, utilizando para esto buffer Tris/HCl 25 mM pH/ con EDTA 1mM para llegar a una concentración proteica final de 386 µg/mL y 368 µg/mL para los lisados completos de *H. pylori* cepa J99 y 43504 respectivamente. Por otra parte, considerando la baja concentración proteica del lisado completo de *E.*

coli (30,3 µg/mL) es que esta muestra fue manejada en su estado original (sin diluir).

Desde las muestras diluidas (lisado completo de *H. pylori* cepa J99 y 43504 diluido) y de la sin diluir (lisado completo de *E. coli*) se extrajeron 10 µL de muestra para mezclarlos con 4 µL de buffer de carga, relación indicada para cargar 1 carril (esta proporción de 10 µL muestra: 4 µL buffer carga fue la necesaria para llenar un carril, por lo que se esta relación se multiplicó tantas veces como carriles a llenar con la muestra se necesitaron).

Luego la muestra con buffer de carga fue llevada a un termobloque a 95°C por 5 minutos para posteriormente realizarle un spinning por 3 minutos.

Los geles fueron preparados y dispuestos en la cámara de electroforesis en el siguiente orden: Gel Separador, Gel Intermedio y Gel Concentrador. Se realizaron dos geles, los cuales se sumergieron en buffer cátodo 1x y cada carril se cargó con 10 µL de cada una las siguientes muestras tratadas (explicadas en el párrafo anterior): marcador de peso molecular; lisado completo de *H. pylori* cepa J99, lisado completo de *H. pylori* cepa 43504; y lisado completo de *E. coli*.

El gel se corrió en dos etapas; primero, se corrió a 50 Volts, por 40 minutos y a continuación se corrió a 100 Volts por 80 minutos.

Western blot

Los geles obtenidos de la electroforesis (SDS-PAGE) se utilizaron para realizar Western blot. Para esto, se dejaron los geles sumergidos en buffer de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 0,037 % SDS) por 10 minutos. Por otra parte, la membrana de transferencia se dejó sumergida en metanol por 15 segundos. Luego se lavó la membrana de transferencia con agua destilada dos veces para luego dejarla sumergida en buffer de transferencia por 5 minutos.

Se preparó la transferencia, de acuerdo a lo esquematizado en Figura N°4.

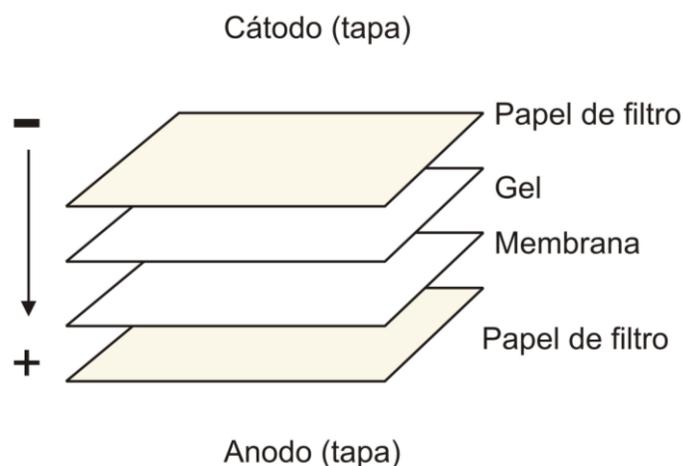


Figura N°4. Orden de ubicación de los papeles filtros, membrana de transferencia y gel con muestras.

La transferencia se realizó a 10 Volts durante 3 horas. Para comprobar si se realizó exitosamente la transferencia, se tiñó la membrana de transferencia con rojo ponceau, lo que permitió observar las bandas de las muestras transferidas y cortar cada membrana de transferencia en 3 partes: primera parte: marcador de peso molecular y 3 lisados (lisado completo de *H. pylori* cepa J99; lisado completo de *H. pylori* cepa 43504 y lisado de *E. coli*); segunda y tercera parte solo incluyó los 3 lisados completos de las bacterias ya señaladas. El gel también se tiñó, pero se hizo con azul de coomassie, donde se observaron muy tenuemente algunas bandas de las muestras, lo que demostró que se hizo la transferencia exitosamente. Antes de continuar con el procedimiento de Western blot, se retiró todo vestigio de los colorantes empleados, para lo cual se lavó con agua destilada y PBS 1x (pH 7,2) la membrana de transferencia y el gel teñidos anteriormente.

Posteriormente se llevó la membrana de transferencia a un recipiente con leche descremada (2,5 g de leche descremada en polvo con 50 mL de PBS 1x (pH 7,2)) y se dejó overnight a 4°C.

Luego cada parte de la membrana de transferencia (6 fracciones) se puso en un bolsillo de bolsa plástica con una solución de leche descremada (preparación ya

descrita) con el anticuerpo primario (IgY de *H. pylori* de las gallinas de este ensayo de tesis), en la relación 1:100 (1980 µL de leche descremada con 20µL de anticuerpo primario).

Cada fracción de la membrana de transferencia fue enfrentada a diferentes anticuerpos IgY *H. pylori* (Figuras N°5 y N°6). Estos anticuerpos IgY *H. pylori* fueron los siguientes: IgY *H. pylori* cepa J99 sin purificar con la resina de afinidad (394 µg/mL); IgY *H. pylori* cepa 43504 sin purificar con la resina de afinidad (385 µg/mL); IgY *H. pylori* cepa J99 purificado con resina de afinidad (Eluato II: Peak II) (391 µg/mL); IgY *H. pylori* cepa 43504 purificado con resina de afinidad (Eluato II: Peak II) (281 µg/mL); IgY *H. pylori* cepa J99 purificado con resina de afinidad (Eluato III: Peak III) (443 µg/mL); e IgY *H. pylori* cepa 43504 purificado con resina de afinidad (Eluato III: Peak III) (338 µg/mL).



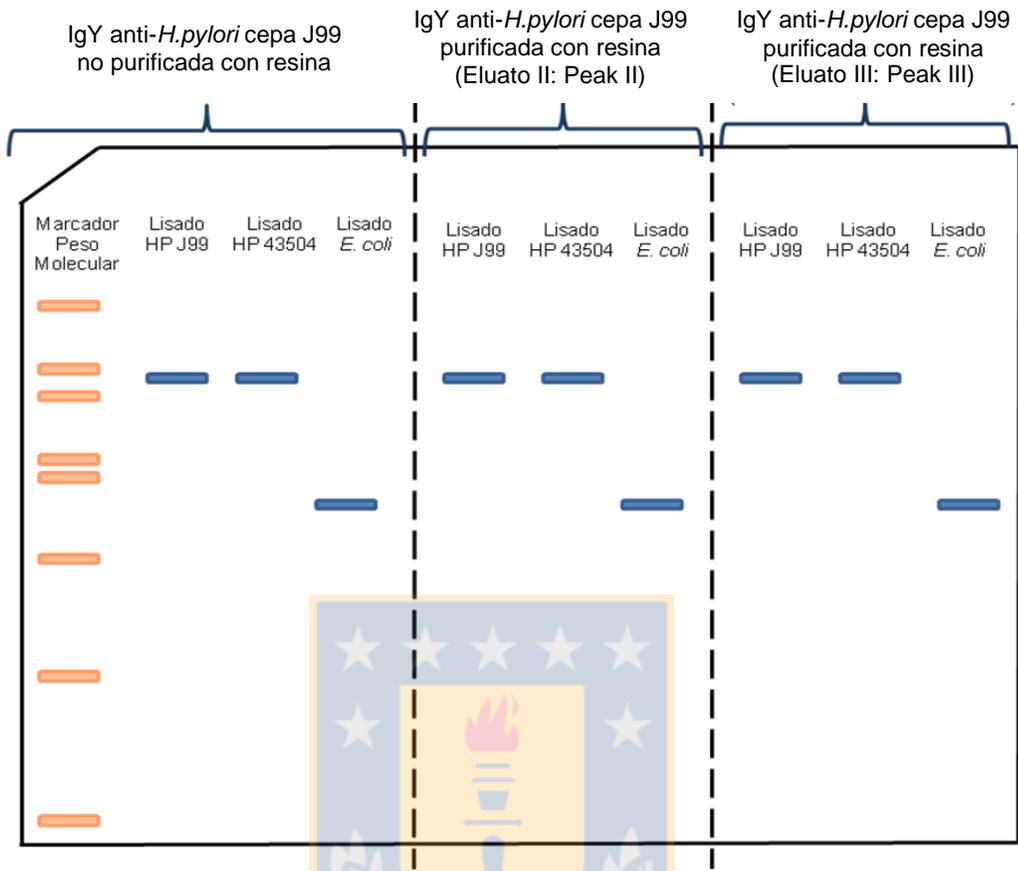


Figura N°5. Disposición de las muestras en la membrana de transferencia y de las inmunoglobulinas IgY anti-*H. pylori* cepa J99 aplicadas como anticuerpo primario.

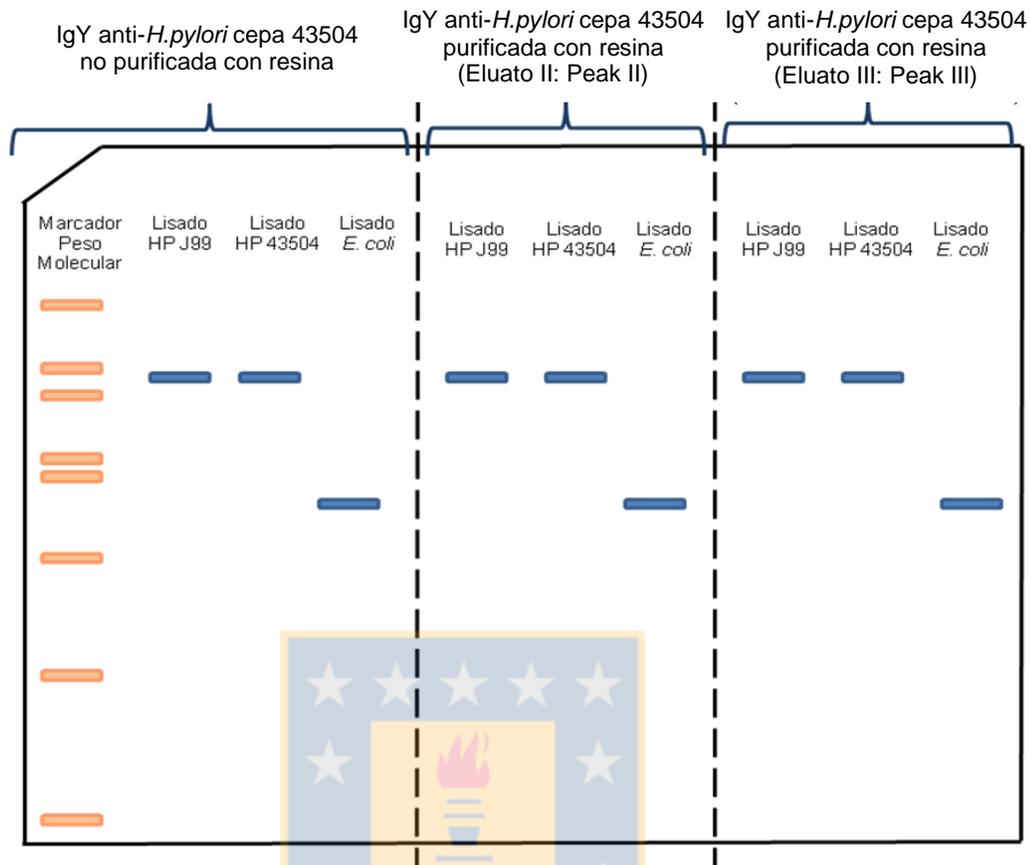


Figura N°6. Disposición de las muestras en la membrana de transferencia y de las inmunoglobulinas IgY anti-*H. pylori* cepa 43504 aplicadas como anticuerpo primario.

Se selló con una prensadora de calor cada lado de los bolsillos de bolsa plástica conteniendo cada fracción de la membrana embebida con la solución leche/anticuerpo. Estos bolsillos fueron dispuestos en un equipo de rotación giratoria continua por 4 horas.

Luego se retiraron las membranas de transferencias de sus bolsillos de plásticos respectivos y se lavaron 3 veces, con agitación por 10 minutos en cada sesión, con solución PBS-Tween al 0,1%.

A continuación, se puso cada fracción de membrana de transferencia dentro de otro bolsillo de bolsa de plástico con leche descremada con anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 anti-IgY de gallina (Sigma Aldrich) en la relación 1:50 (1960

μL de leche descremada con $40\mu\text{L}$ de anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 anti-IgY de gallina, Sigma Aldrich).

Luego se retiraron las membranas de transferencias de sus bolsillos de plásticos respectivos y se lavaron 3 veces, con agitación por 10 minutos en cada sesión, con solución PBS-Tween al 0,1%.

A continuación, se puso cada fracción de membrana de transferencia dentro de otro bolsillo de bolsa de plástico con leche descremada con anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (ImmunoResearch) en la relación 1:1000 ($1998\mu\text{L}$ de leche descremada con $2\mu\text{L}$ de anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa, ImmunoResearch).

Luego se retiraron las membranas de transferencias de sus bolsillos de plásticos respectivos y se lavaron 3 veces, con agitación por 10 minutos en cada sesión, con solución PBS-Tween al 0,1%.

Finalmente, se agregó diaminobencidina, D.A.B. ($0,7\text{ mg/mL}$ de D.A.B.; $10\text{ mL H}_2\text{O}$; $15\mu\text{L}$ de peróxido de hidrógeno) a cada fracción de membrana de transferencia y se mantuvo en agitación por 5 minutos. Al finalizar dicho tiempo, se observaron bandas teñidas de color café.

Desafío *in vitro* de IgY con *H. pylori* en células AGS

a) Cultivo de Línea Celular

Se trabajó con la línea celular AGS (línea de células epiteliales gástricas de adenocarcinoma gástrico humano), la cual se cultivó durante dos semanas en medio RPMI-1640 completo (Anexo A) y se realizó cambio de medio de cultivo (Anexo B) y traspaso de células (Anexo C) según fuese necesario, cada 3-4 días, hasta que las células alcanzaron una confluencia celular aproximada de un 80 a 90% de la placa. Una parte del cultivo celular obtenido fue congelado a -80°C (Anexo D) con el fin de contar con células AGS para otros ensayos que requieran de su uso. Cabe destacar que la manipulación de las células AGS se hizo dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II.

Cultivo bacteriano

Las cepas J99 y ATCC 43504 de *H. pylori* se cultivaron en Agar Columbia (Oxoid) suplementado con 5% (vol/vol) sangre de caballo y DENT, a 37°C, durante 3 días para el caso de la cepa J99 y de 4 días para la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, bajo condiciones de microaerofilia. Luego de esto, el pellet fue resuspendido en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, libre de antibiótico, hasta alcanzar una concentración de 0,5 en escala de Mac Farland (1×10^7 ufc/ml).

b) Ensayo profiláctico y terapéutico en células AGS

• Ensayo Profiláctico

Para este ensayo se utilizaron 6 placas de cultivo celular de 24 pocillos con células AGS cada una a una confluencia celular de un 80 a 90% de la placa.

Las placas fueron destinadas a ensayos con el anticuerpo aviar a diferentes concentraciones (al 100%, 50% y 25%) en sus 3 formatos (bruto, eluato-peak II, y eluato-peak III) para las cepas J99 y 43504 de *H. pylori*.

Cada placa con células AGS contempló el ensayo para pocillos con control negativo (sólo células AGS); control positivo (*H. pylori*); pocillos con el anticuerpo aviar (concentrado al 100%), pocillos con el desafío profiláctico con anticuerpo a una concentración del 100% (anticuerpo al 100% + *H. pylori*); pocillos con el desafío profiláctico con anticuerpo a una concentración del 50% (anticuerpo al 50% + *H. pylori*); pocillos con el desafío profiláctico con anticuerpo a una concentración del 25% (anticuerpo al 25% + *H. pylori*).

Este ensayo se hizo en cuadruplicado (Figura N°7) para los desafíos de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* con los anticuerpos en bruto y eluato-peak II y eluato-peak III, exceptuando el desafío de la cepa 43504 de *H. pylori* con el anticuerpo aviar en su forma eluato-peak III, el cual se hizo en triplicado (Figura N°8).

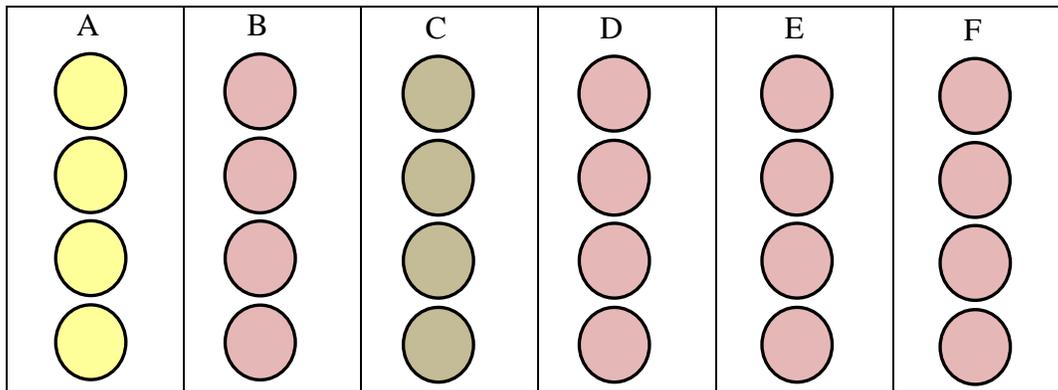


Figura N°7. Ensayo Profiláctico *in vitro* de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* con los anticuerpos en bruto y eluato-peak II. A. células AGS; B. IgY al 100%; C. *H. pylori*; D. IgY al 100% + *H. pylori*; E. IgY al 50% + *H. pylori*; F. IgY al 25% + *H. pylori*.

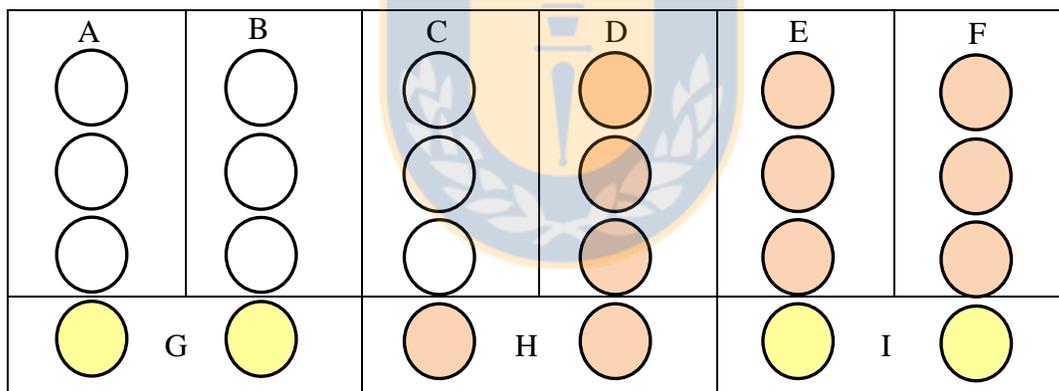


Figura N°8. Ensayo Profiláctico *in vitro* de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de la cepa 43504 de *H. pylori* con el anticuerpo en su forma eluato-peak III. A, B y C: en blanco; D. IgY 43504 al 100%; + *H. pylori* cepa 43504; E. IgY 43504 al 50%; + *H. pylori* cepa 43504; F. IgY 43504 al 25%; + *H. pylori* cepa 43504; G. células AGS; H. IgY 43504 al 100%; I. células AGS.

Adición de IgY a los pocillos

Se trabajó dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II. Antes de agregar el IgY respectivo a cada pocillo de la placa, se lavó con 1 mL cada pocillo con PBS 1x (pH 7,2) estéril, tres veces.

Luego se agregó 350 μ L del anticuerpo respectivo a los pocillos asignados para tal efecto en las placas de cultivo celular. A continuación del anticuerpo, se le agregó a cada pocillo 650 μ L de RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico a los pocillos en los cuales fue agregado el anticuerpo para completar un volumen final de 1mL. Luego se llevó a estufa de incubación por 4 horas, a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Adición de suspensión de *H. pylori* a los pocillos

Se retiraron las placas de la estufa de incubación y se llevaron al gabinete de bioseguridad tipo II, donde se lavó con 1 mL cada pocillo con PBS 1x (pH 7,2) estéril tres veces.

Luego, se agregó 100 μ L de la resuspensión de *H. pylori* en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico (concentración de 0,5 en escala de Mac Farland equivalente a 1×10^7 ufc/ml) a los pocillos asignados para tal efecto en las placas de cultivo celular. A continuación de haber agregado *H. pylori*, se agregó 900 μ L de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico a los pocillos en los cuales fue agregada la suspensión bacteriana a fin de completar un volumen final de 1mL. Luego se llevó a estufa de incubación por 2 horas, a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Adición de Reactivo Urea-Rojo Fenol

Se eliminó el medio de cultivo de todos los pocillos de las placas y se lavó cada pocillo 3 veces con 1mL de PBS 1x (pH 7,2) estéril. El frasco con el reactivo urea-rojo fenol se sacó del refrigerador por lo menos 1 hora antes de su uso, a fin de que lograra llegar a la temperatura ambiente del laboratorio. Luego se agregó 1mL de reactivo urea-rojo fenol (Anexo E) a cada pocillo de la placa de

cultivo celular. Las placas se incubaron por 6 horas, a 37° C, tiempo que permitiría visualizar algún cambio de color en la solución del reactivo urea-rojo fenol del pocillo que presentase alguna reacción. Luego se extrajeron 250 µL de la solución urea-rojo fenol desde cada pocillo de la placa de cultivo celular de 24 pocillos para traspasarlo a pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos.

Finalmente se midió la absorbancia de este sobrenadante del reactivo urea-rojo fenol desde la placa de cultivo celular de 96 pocillos en un lector de placas a 570 nm (Biotek).

- **Ensayo Terapéutico**

Para este ensayo se utilizaron 3 placas de cultivo celular de 24 pocillos con células AGS cada una a una confluencia celular de un 80 a 90% de la placa. Cabe destacar que la manipulación de las células AGS se hizo dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II.

Las placas fueron destinadas a ensayos con el anticuerpo aviar a diferentes concentraciones (al 100%, 50% y 25%) en sus 3 formatos (bruto, eluato-peak II, y eluato-peak III) para las cepas J99 y 43504 de *H. pylori*.

Cada placa con células AGS contempló el ensayo para pocillos con control negativo (sólo células AGS); control positivo (*H. pylori*); pocillos con el anticuerpo aviar (concentrado al 100%), pocillos con el desafío terapéutico con anticuerpo a una concentración del 100% (*H. pylori* + anticuerpo al 100%); pocillos con el desafío terapéutico con anticuerpo a una concentración del 50% (*H. pylori* + anticuerpo al 50%); pocillos con el desafío terapéutico con anticuerpo a una concentración del 25% (*H. pylori* + anticuerpo al 25%).

Este ensayo se hizo en triplicado para los desafíos de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* con los anticuerpos en bruto y eluato-peak II (Figura N°9) y eluato-peak III (Figura N°10).

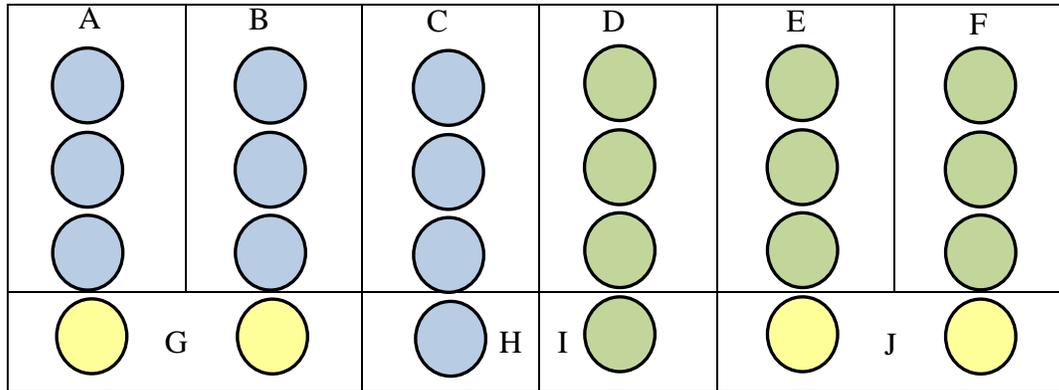


Figura N°9. Ensayo Terapéutico *in vitro* de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* con el anticuerpo en su forma bruta y eluato-peak II. A. *H. pylori* + IgY en bruto al 100%; B. *H. pylori* + IgY en bruto al 50%; C. *H. pylori* + IgY en bruto al 25%; D. *H. pylori* + IgY eluato-peak II al 100%; E. *H. pylori* + IgY eluato-peak II al 50%; F. *H. pylori* + IgY eluato-peak II al 25%; G. células AGS; H. IgY en bruto al 100%; I. IgY eluato-peak II al 100%; J. células AGS.

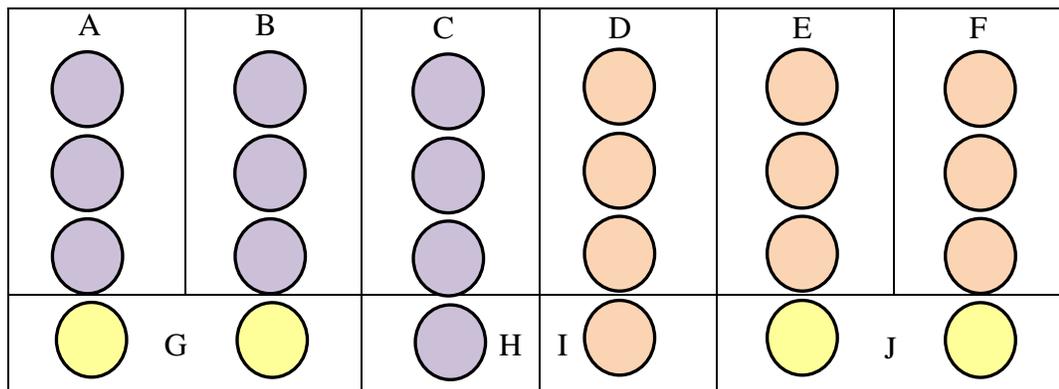


Figura N°10. Ensayo Terapéutico *in vitro* de anticuerpo IgY en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), para el desafío de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* con el anticuerpo en su forma eluato-peak III. A. *H. pylori* + IgY J99 al 100%; B. *H. pylori* + IgY J99 al 50%; C. *H. pylori* + IgY J99 al 25%; D. *H. pylori* + IgY 43504 al 100%; E. *H. pylori* + IgY 43504 al 50%; F. *H. pylori* + IgY 43504 al 25%; G. células AGS; H. IgY J99 al 100%; I. IgY 43504 al 100%; J. células AGS.

Adición de suspensión de *H. pylori* a los pocillos

En el gabinete de bioseguridad tipo II, cada pocillo de la placa de cultivo se lavó 3 veces con 1 mL de PBS 1x (pH 7,2) estéril. Luego, se agregó 100 µL de la resuspensión de *H. pylori* en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico (concentración de 0,5 en escala de Mac Farland equivalente a 1×10^7 ufc/ml) a los pocillos asignados para tal efecto en las placas de cultivo celular. A continuación de haber agregado *H. pylori*, se agregó 900 µL de medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico a los pocillos en los cuales fue agregada la suspensión bacteriana a fin de completar un volumen final de 1mL. Luego se llevó a estufa de incubación por 2 horas, a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Adición de IgY a los pocillos

Se trabajó dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II. Antes de agregar el IgY respectivo a los pocillos asignados para tal efecto, se lavó con 1 mL cada pocillo con PBS 1x (pH 7,2) estéril, tres veces.

Luego se agregó 350 μ L del anticuerpo respectivo a los pocillos asignados para tal efecto en las placas de cultivo celular. A continuación del anticuerpo, se le agregó a cada pocillo 650 μ L de RPMI-1640 con suero fetal bovino al 10%, pero libre de antibiótico a los pocillos en los cuales fue agregado el anticuerpo para completar un volumen final de 1mL. Luego se llevó a estufa de incubación por 4 horas, a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Adición de Reactivo Urea-Rojo Fenol

Se eliminó el medio de cultivo de todos los pocillos de las placas y se lavó cada pocillo 3 veces con 1mL de PBS 1x (pH 7,2) estéril. El frasco con el reactivo urea-rojo fenol se sacó del refrigerador por lo menos 1 hora antes de su uso, a fin de que lograra llegar a la temperatura ambiente del laboratorio. Luego se agregó 1mL de reactivo urea-rojo fenol (Anexo E) a cada pocillo de la placa de cultivo celular. Las placas se incubaron por 6 horas, a 37° C, tiempo que permitiría visualizar algún cambio de color en la solución del reactivo urea-rojo fenol del pocillo que presentase alguna reacción. Luego se extrajeron 250 μ L de la solución urea-rojo fenol desde cada pocillo de la placa de cultivo celular de 24 pocillos para traspasarlo a pocillos de una placa de cultivo celular de 96 pocillos.

Finalmente se midió la absorbancia de este sobrenadante del reactivo urea-rojo fenol desde la placa de cultivo celular de 96 pocillos en un lector de placas a 570 nm (Biotek).

Análisis Estadístico

Se utilizó el software Infostat, versión 2012, con el cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de comparar promedios y cuando resultó significativo el test, se utilizó el test de Tukey. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05, esto es cada vez que el valor p fue < de 0,05 se consideró significativo.



V. RESULTADOS

Preparación de las cepas de *H. pylori* y cuantificación proteica de ellas

Luego del cultivo y sonicación de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* se cuantificó la concentración de proteínas totales de ambas cepas mediante el método del ácido bicinconínico. Los resultados se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los lisados completos de *Helicobacter pylori* cepas J99 y 43504

	Lisado completo <i>Helicobacter pylori</i> cepa J99	Lisado completo <i>Helicobacter pylori</i> cepa 43504
Concentración de proteínas totales (mg/mL)	1,9	1,5

Inmunización de gallinas

El promedio de postura (a contar del día 28 post inoculación) del grupo de 10 gallinas inmunizadas con *H. pylori* cepa J99 fue de 4,8 huevos diarios; del grupo de 9 gallinas inmunizadas con *H. pylori* cepa 43504 fue de 4,9 huevos diarios; y del grupo control de 2 gallinas inoculadas con PBS fue de 1,8 huevos diarios.

Aislamiento de IgY – *H. pylori* desde las yemas de los huevos de gallina

Al final del proceso de aislamiento de IgY *H. pylori* de la yema de los huevos obtenidos de las gallinas inmunizadas con esta bacteria es que se obtuvo un pellet resuspendido en PBS 1x (pH 7,2) (detalle de cada etapa de este proceso fue explicado en sección “Materiales y Métodos”).

Se realizó una cuantificación proteica a los anticuerpos de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* en sus formas no purificadas y purificadas, a saber eluato-peak II y eluato-peak III (Tabla 2).

Se obtuvo una concentración de 3,2 mg/mL de proteínas totales de IgY *H. pylori* cepa J99 en un volumen total de 180 mL obtenidas de un grupo de 10 gallinas por 14 días, y se obtuvo una concentración proteica de 5,4 mg/mL en un volumen de 190 mL de IgY *H. pylori* cepa 43504 obtenidas de un grupo de 9 gallinas por 14 días.

Tabla 2. Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los anticuerpos IgY anti-*Helicobacter pylori* cepas J99 y 43504 no purificados (en bruto).

	IgY anti <i>Helicobacter pylori</i> cepa J99 no purificado (en bruto)	IgY anti <i>Helicobacter pylori</i> cepa 43504 no purificado (en bruto)
Concentración de proteínas totales (mg/mL)	3,2	5,4

Purificación con resina de afinidad por TAC a IgY *H. pylori* cepas J99 y 43504 desde las yemas de huevos de gallinas procesadas

La purificación de los anticuerpos IgY *H. pylori* cepas J99 y 43504 se hizo a través de una resina (Clontech) mediante la técnica de Cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC) por afinidad a inmunoglobulinas y α_2 -macroglobulinas, en la cual se recolectaron 3 fracciones para cada cepa de IgY *H. pylori* aislado de la yema de los huevos de gallina araucana. Estas 3 fracciones fueron las siguientes: proteínas no unidas; proteínas eluidas al reducirse la concentración a 0,1 M de Na₂SO₄; proteínas eluidas en ausencia de Na₂SO₄ (Figuras N°11 y N°12).

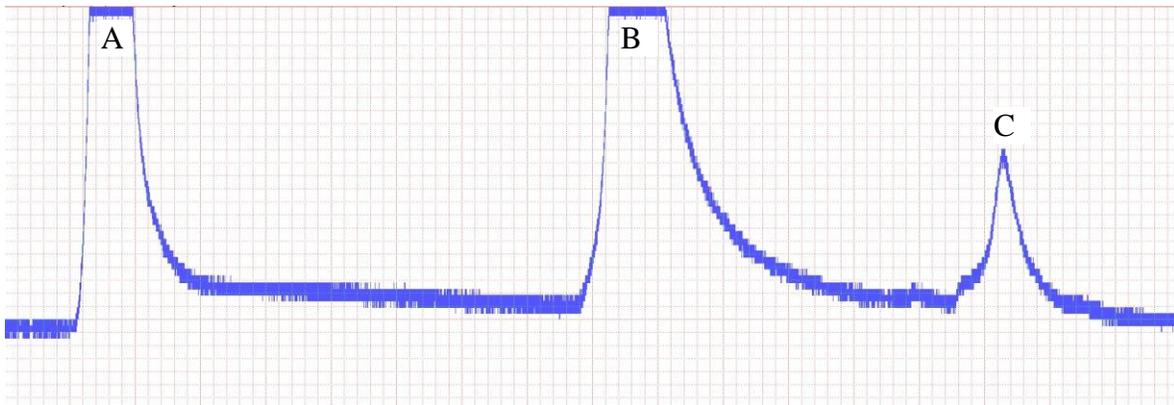


Figura N°11. Purificación de IgY anti-*H. pylori* cepa J99 con resina mediante cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC). A: Peak de Proteínas No Unidas a la columna (Peak I); B: Peak de Proteínas Eluidas del anticuerpo al reducirse la concentración a 0,1 M de Na_2SO_4 (Peak II); C: Peak de sólo una pequeña cantidad de proteínas eluidas en ausencia de Na_2SO_4 (Peak III).

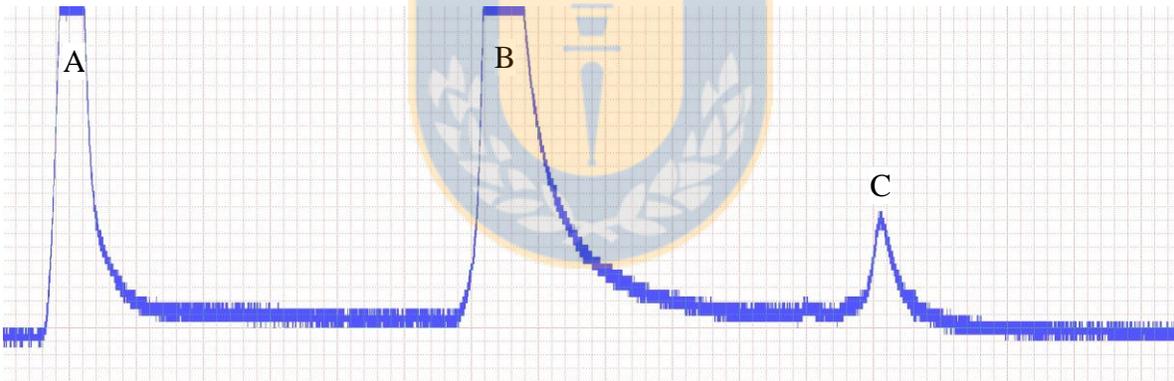


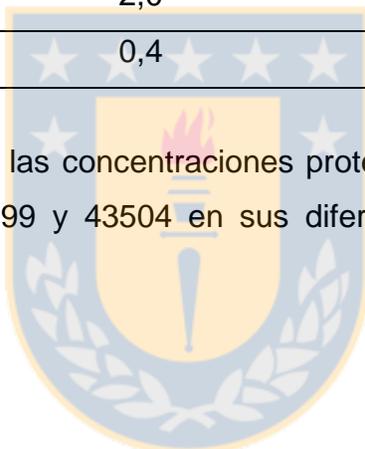
Figura N°12. Purificación de IgY anti-*H. pylori* cepa 43504 con resina mediante cromatografía de Adsorción Tiofílica (TAC). A: Peak de Proteínas No Unidas a la columna (Peak I); B: Peak de Proteínas Eluidas del anticuerpo al reducirse la concentración a 0,1 M de Na_2SO_4 (Peak II); C: Peak de sólo una pequeña cantidad de proteínas eluidas en ausencia de Na_2SO_4 (Peak III).

Una vez que se recolectaron las fracciones eluato-peak II y eluato-peak III (peak chico) se realizó una cuantificación proteica a los anticuerpos de las cepas J99 y 43504 de *H. pylori* de estas dos fracciones, cuyas concentraciones proteicas se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de proteínas totales (mg/mL) de los anticuerpos IgY anti-*Helicobacter pylori* cepas J99 y 43504 purificados (fracciones eluato-peak II y eluato-peak III) mediante cromatografía de adsorción tiofílica (TAC).

Fracción Purificada (mg/mL)	IgY anti- <i>Helicobacter pylori</i> cepa J99	IgY anti- <i>Helicobacter pylori</i> cepa 43504
Eluato-peak II	2,0	1,7
Eluato-peak III	0,4	0,3

El siguiente gráfico compila las concentraciones proteicas totales (mg/mL) de los anticuerpos IgY *H. pylori* J99 y 43504 en sus diferente niveles de purificación (Figura N°13).



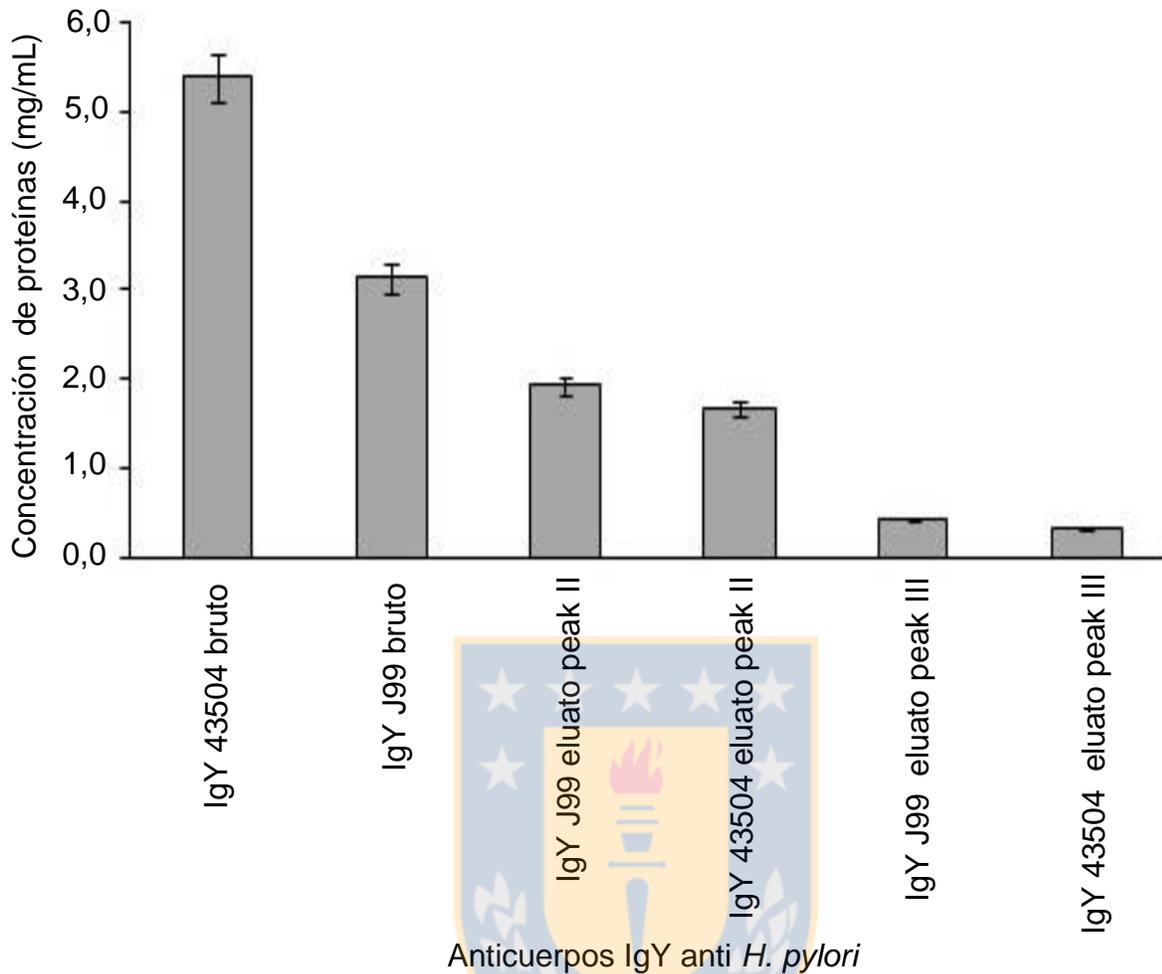


Figura N°13. Concentración de proteínas de anticuerpos IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificada (eluato-peak II y eluato-peak III).

SDS-PAGE de proteínas de lisados completos de *H. pylori* e IgY *H. pylori* de ambas cepas purificadas y no purificadas

Se realizó una electroforesis con muestras de IgY *H. pylori* cepas J99 Y 43504 sin purificar y purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III) a similares concentraciones de proteínas.

Se pudo observar claramente en el gel (Figura N°14) que las bandas más inmunodominantes fueron la de los anticuerpos IgY anti *H. pylori* cepas J99 y 43504 en sus formas no purificadas y purificadas (carriles de las letras E a la J)

con un peso cercano a los 70 KDa. En el caso de los anticuerpos IgY anti *H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (carriles de las letras E y F) se muestra una gran cantidad de proteínas no específicas el rango de los 30 a 50 KDa. Por otro lado en el caso de IgY anti *H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada, eluato-peak II (carriles letra G y H) se observa una banda cercana a los 40 KDa. Para las IgY anti *H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada, eluato-peak III (peak chico) se pudo observar una banda cercana a los 22 KDa.

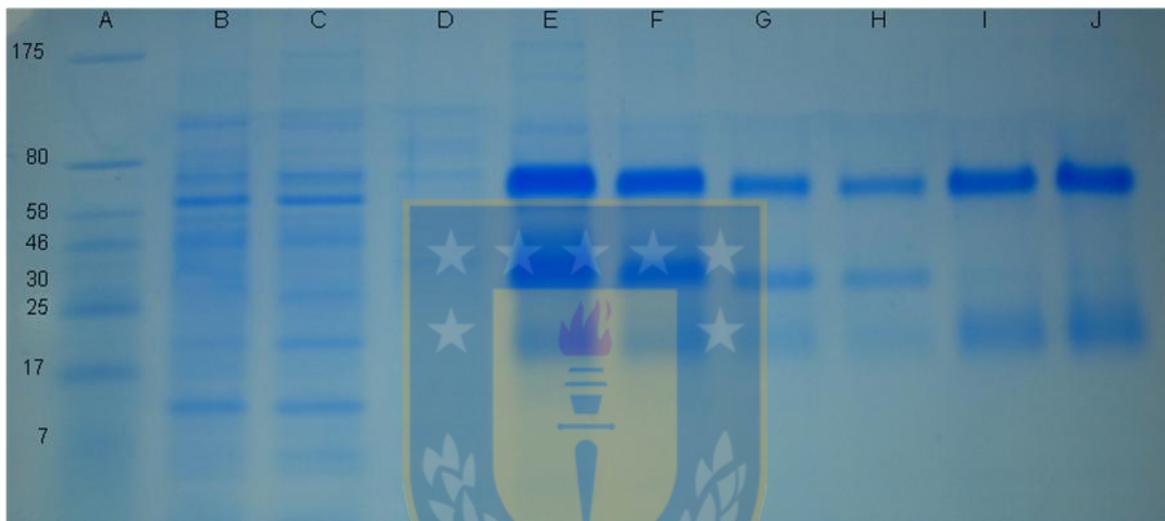


Figura N°14. Gel de SDS-PAGE con muestras de lisado y anticuerpos post electroforesis y tinción con azul de coomassie. A: .Marcador de Peso Molecular (7-175 KDa); B: Lisado completo de *H. pylori* cepa J99; C: Lisado completo de *H. pylori* cepa 43504; D: Lisado completo de *E. coli*; E: IgY *H. pylori* cepa J99 sin purificar por TAC (IgY J99 en bruto); F: IgY *H. pylori* cepa 43504 sin purificar por TAC (IgY 43504 en bruto); G: IgY *H. pylori* cepa J99 purificada por TAC (IgY J99 eluato-peak II, del anticuerpo al reducirse la concentración a 0,1 M de Na₂SO₄); H: IgY *H. pylori* cepa 43504 purificada por TAC (IgY 43504 eluato-peak II, del anticuerpo al reducirse la concentración a 0,1 M de Na₂SO₄); I: IgY *H. pylori* cepa J99 purificada por TAC (IgY J99 eluato-peak III, en ausencia de Na₂SO₄); J: IgY *H. pylori* cepa 43504 purificada por TAC (IgY 43504 eluato -peak III, en ausencia de Na₂SO₄).

SDS-PAGE y Western blot

Se prepararon dos geles, los cuales fueron cargados en forma idéntica con un Marcador de Peso Molecular y luego 3 tripletas de lisados de *H. pylori* cepa J99, lisado de *H. pylori* cepa 43504 y lisado de *E. coli*. Luego se realizó la transferencia a membranas de transferencia, para luego cortar cada gel en tres fracciones con los mismos lisados bacterianos, con el fin de enfrentar una fracción de membrana de transferencia con el anticuerpo primario (obtenido desde la yema de las gallinas inmunizadas) no purificado; otra fracción de la membrana de transferencia con el anticuerpo primario purificado por TAC (IgY eluato-peak II); y otra fracción de la membrana de transferencia con el anticuerpo primario purificado por TAC (IgY eluato-peak III). Esto se realizó para el anticuerpo primario IgY *H. pylori* cepa J99 y para el anticuerpo primario IgY *H. pylori* 43504.

Una vez que se hizo la transferencia de proteínas desde el gel a la membrana de transferencia, se tiñó el gel transferido con azul de coomassie (Figura N°15), a fin de verificar si hubo o no transferencia. En nuestro caso se pudo apreciar de que sí hubo transferencia de proteínas desde el gel a la membrana de transferencia, ya que el gel mostró unas muy tenues bandas teñidas, demostrando que fue exitosa la transferencia a la membrana.



Figura N°15. Gel teñido con azul de coomassie, post transferencia a membrana.

Por otra parte, también se tiñó la membrana de transferencia con rojo ponceau (Figura N°16), para determinar si hubo o no transferencia. En nuestro caso, la membrana de transferencia evidenció bandas rojas (proteínas transferidas desde el gel a la membrana de transferencia) y bandas azules (marcador de peso molecular transferido del gel a la membrana de transferencia) lo que demostró que la transferencia desde el gel a la membrana de transferencia fue exitosa.



Figura N°16. Membrana de transferencia teñida con rojo ponceau. MPM: Marcador de Peso Molecular; A: Lisado completo de *H. pylori* cepa J99; B: Lisado completo de *H. pylori* cepa 43504; C: Lisado completo de *E. coli*.

Posteriormente, las membranas de transferencia fueron enfrentadas a los 3 anticuerpos de acuerdo al protocolo señalado en la Sección Materiales y Métodos: anticuerpo primario obtenido de las yemas de las gallinas inmunizadas con las cepas de *H. pylori*; anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 anti-IgY de gallina (Sigma Aldrich); y anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con peroxidasa (ImmunoResearch) y finalmente se obtuvo una membrana de transferencia teñida con diaminobencidina, D.A.B., en la cual se pudo observar diferencias del nivel de purificación de los anticuerpos (Figuras N°17 y N°18).

La membrana con los anticuerpos no purificados de ambas cepas de IgY anti *H. pylori* mostraron una gran cantidad de bandas, las cuales incluso no permitían una diferenciación entre ellas. Por otra parte, las membranas con los anticuerpos purificados IgY anti *H. pylori* de ambas cepas presentaron bandas en forma marcada y definida cercana a los 70 KDa y otras bandas en cercanas a los 50 KDa.



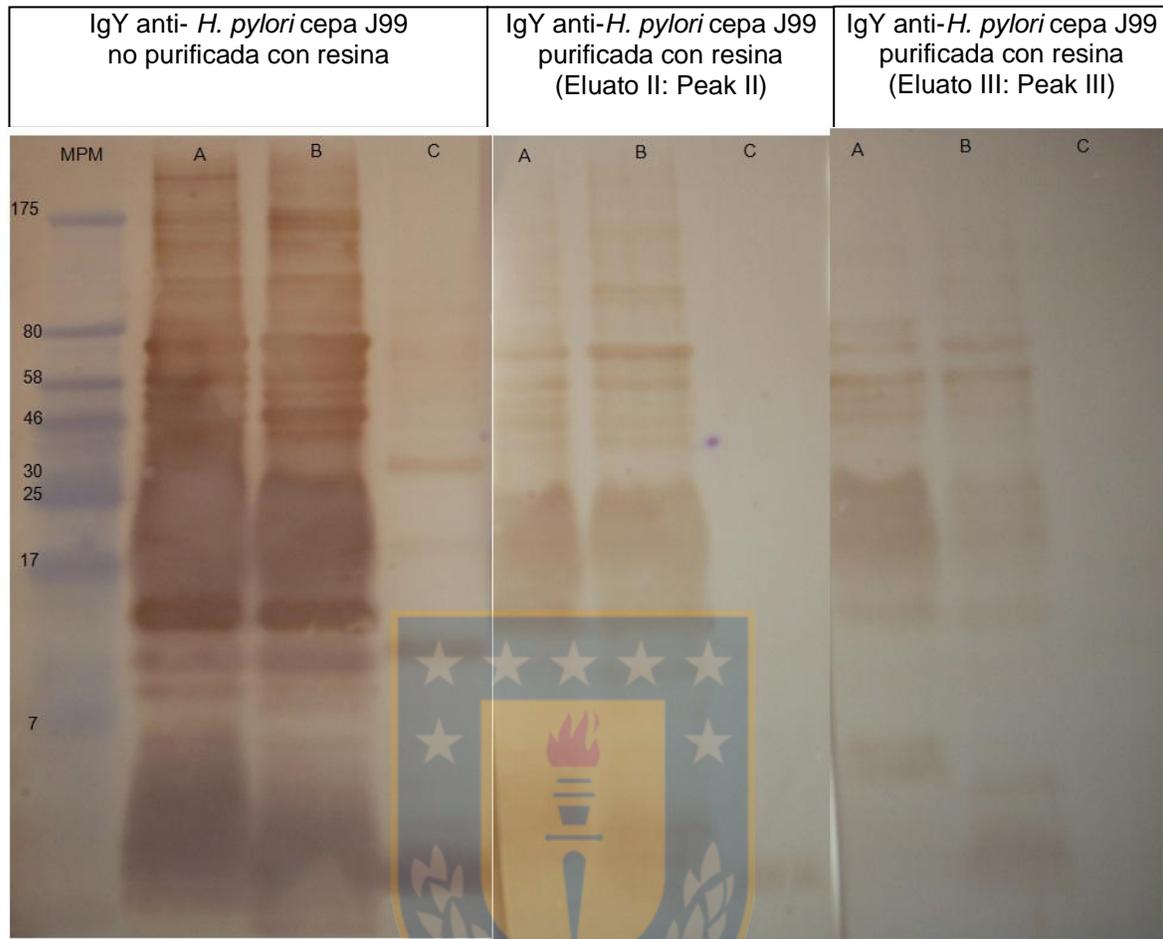


Figura N°17. Membrana de transferencia utilizando como anticuerpo primario a IgY anti-*H. pylori* cepa J99 sobre proteínas purificadas y no purificadas, teñida con D.A.B.. MPM: Marcador de Peso Molecular; A: Lisado completo de *H. pylori* cepa J99; B: Lisado completo de *H. pylori* cepa 43504; C: Lisado completo de *E. coli*.

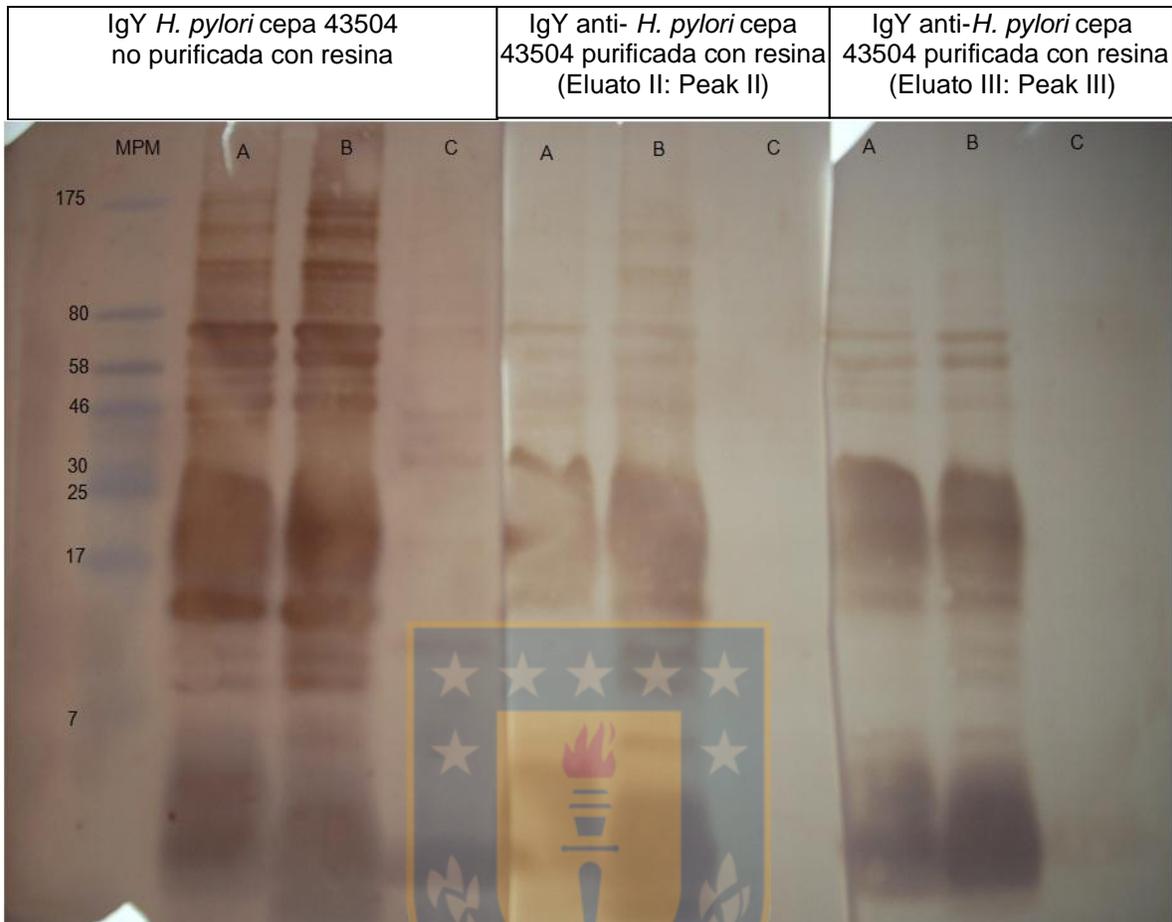


Figura N°18. Membrana de transferencia utilizando como anticuerpo primario a IgY anti-*H. pylori* cepa 43504 sobre proteínas purificadas y no purificadas, teñida con D.A.B. MPM. Marcador de Peso Molecular; A. Lisado completo de *H. pylori* cepa J99; B. Lisado completo de *H. pylori* cepa 43504; C. Lisado completo de *E. coli*.

Titulación del Antígeno *H. pylori* cepa J99

La titulación del antígeno de *H. pylori* cepa J99 se hizo mediante la medición a una absorbancia de λ de 450 nm de una serie de diluciones del antígeno (Figura N°19) medida por el método del ácido bicinconínico.

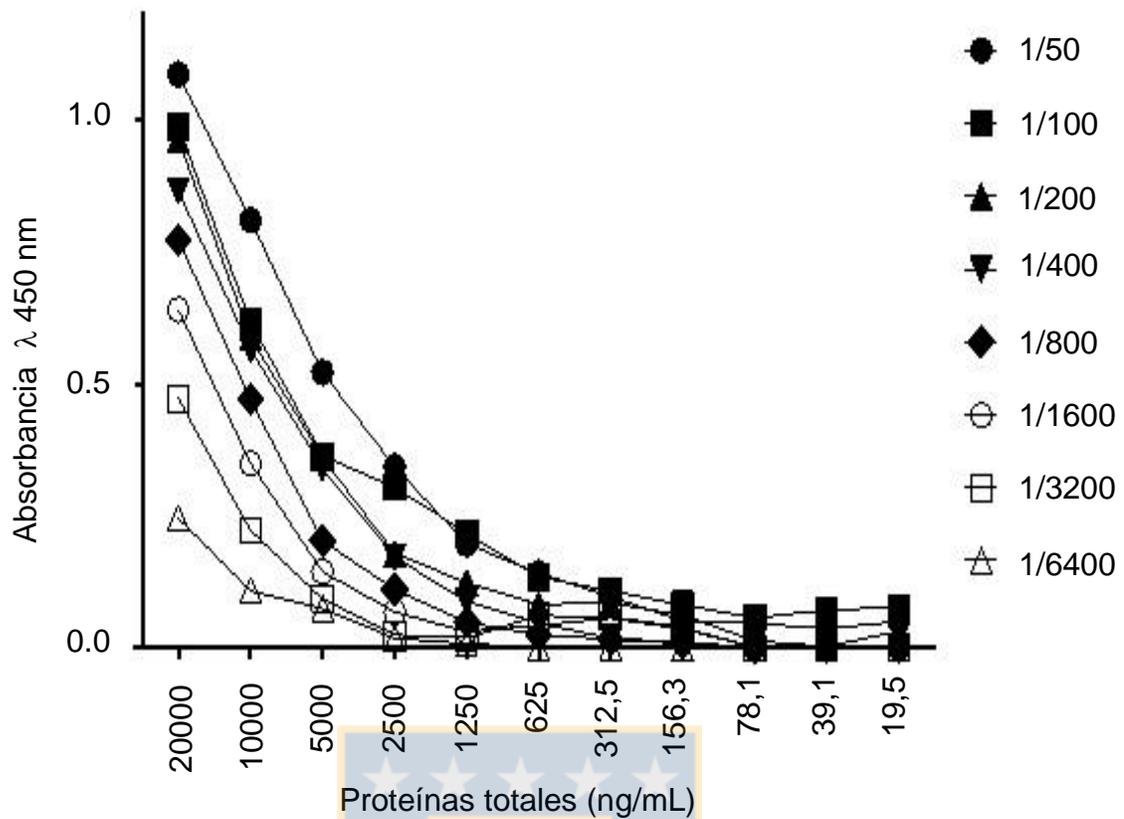


Figura N°19. Titulación del antígeno *H. pylori* cepa J99.

Se pudo determinar que a diferentes diluciones del antígeno *H. pylori* cepa J99, las mayores concentraciones de proteínas de éste eran las de 20 ug/mL y 10 ug/mL, eligiéndose esta última concentración proteica para los futuros ensayos de ELISA indirecto.

Titulación del Antígeno *H. pylori* cepa 43504

La titulación del antígeno de *H. pylori* cepa J99 se hizo mediante la medición a una absorbancia de 450 nm de una serie de diluciones del antígeno (Figura N°20) medida por el método del ácido bicinconínico.

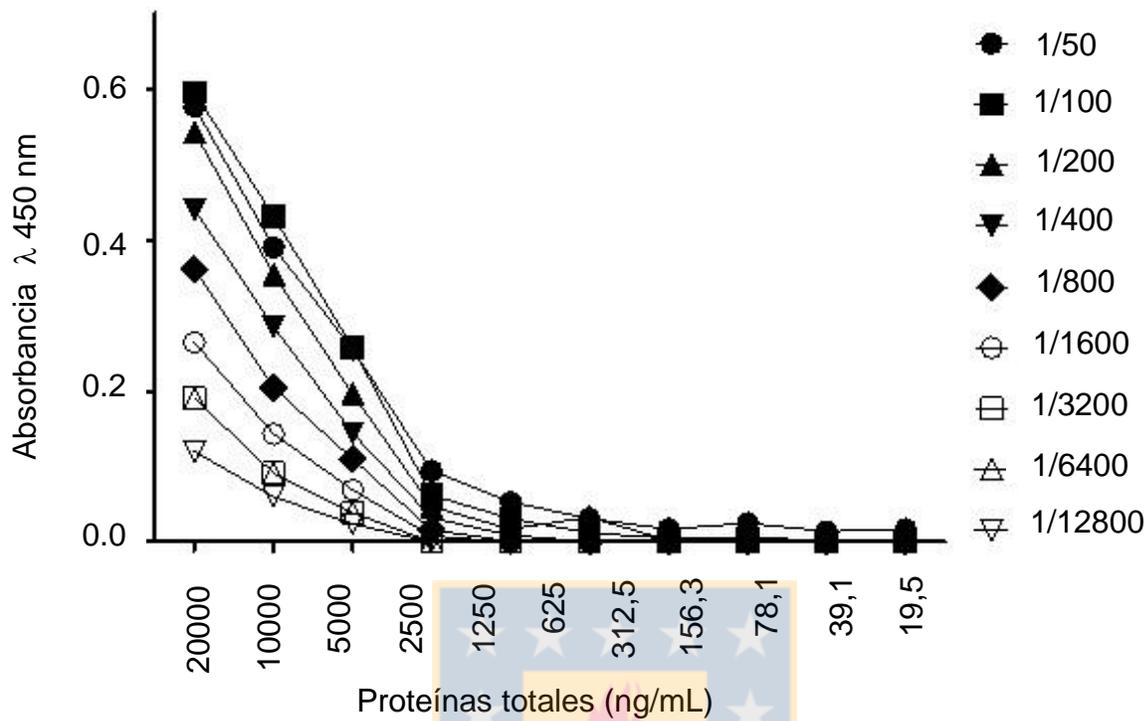


Figura N°20. Titulación del antígeno *H. pylori* cepa 43504.

Se pudo determinar que a diferentes diluciones del antígeno *H. pylori* cepa 43504, las mayores concentraciones de proteínas de éste eran las de 20 ug/mL y 10 ug/mL, eligiéndose esta última concentración proteica para los futuros ensayos de ELISA indirecto.

Titulación del Anticuerpo IgY *H. pylori* cepa J99

La titulación del anticuerpo IgY *H. pylori* cepa J99 se realizó mediante la sensibilización de la placa con 10 µg/mL de proteínas totales del antígeno a diferentes diluciones del anticuerpo (Figura N°21).

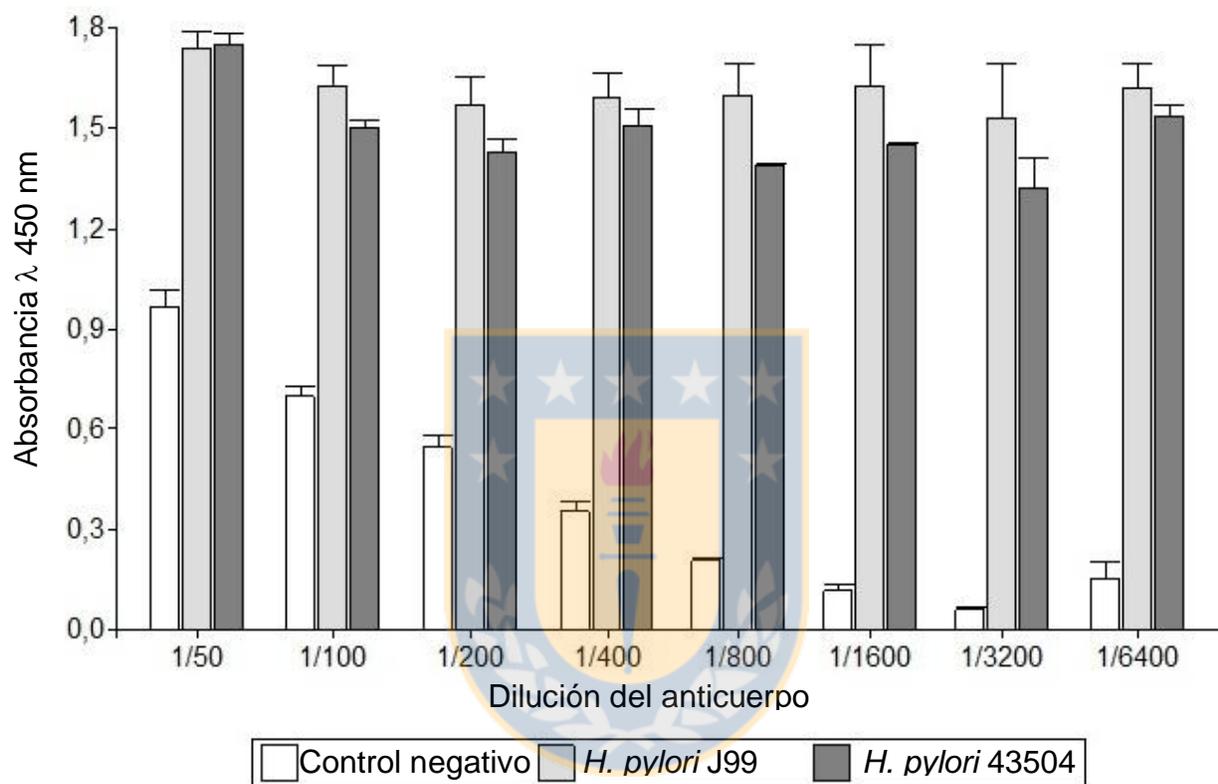


Figura N°21. Titulación del anticuerpo IgY anti- *H. pylori* cepa J99.

En la titulación del anticuerpo IgY *H. pylori* cepa J99 se buscó determinar que frente a una misma concentración de un antígeno (10 µg/mL) hasta qué dilución (título de anticuerpos) de anticuerpos se podía trabajar.

En el caso de IgY *H. pylori* cepa J99 se pudo determinar que este anticuerpo permite su uso en una altísima dilución (alto título de anticuerpos), lo que implicaría que a una tan alta dilución mayor a 1/6400, este anticuerpo reconocería

perfectamente a su antígeno del lisado de *H. pylori* cepa J99, demostrando así su alta sensibilidad.

Titulación del Anticuerpo IgY *H. pylori* cepa 43504

La titulación del anticuerpo IgY *H. pylori* cepa 43504 se realizó mediante la sensibilización de la placa con 10 µg/mL de proteínas totales del antígeno a diferentes diluciones del anticuerpo (Figura N°22).

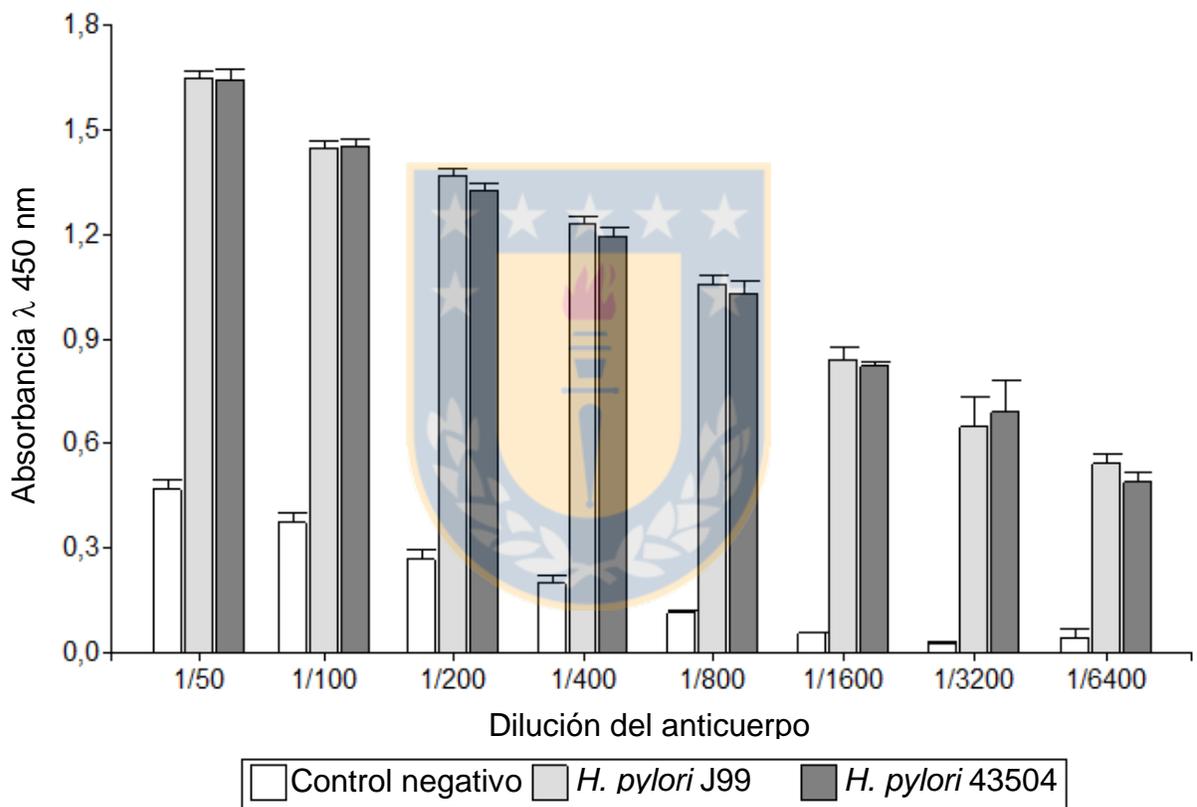


Figura N°22. Titulación del anticuerpo IgY anti-*H. pylori* cepa 43504.

En la titulación del anticuerpo IgY *H. pylori* cepa 43504 se buscó determinar que frente a una misma concentración de un antígeno (10 µg/mL) hasta qué dilución (título de anticuerpos) de anticuerpos se podía trabajar.

En el caso de IgY *H. pylori* cepa 43504 se pudo determinar que este anticuerpo permite su uso en alta dilución (alto título de anticuerpos), lo que implicaría poderlo

usar en una dilución a 1/6400, permitiendo al anticuerpo reconocer a su antígeno del lisado de *H. pylori* cepa 43504, demostrando así ser sensible en su detección.

Evaluación de reacción cruzada IgY *H. pylori* cepa J99 frente a antígenos de bacterias de interés gastrointestinal

Mediante un ELISA indirecto se pudo enfrentar el anticuerpo IgY *H. pylori* cepa J99 a antígenos de diferentes bacterias (Figura N°23).

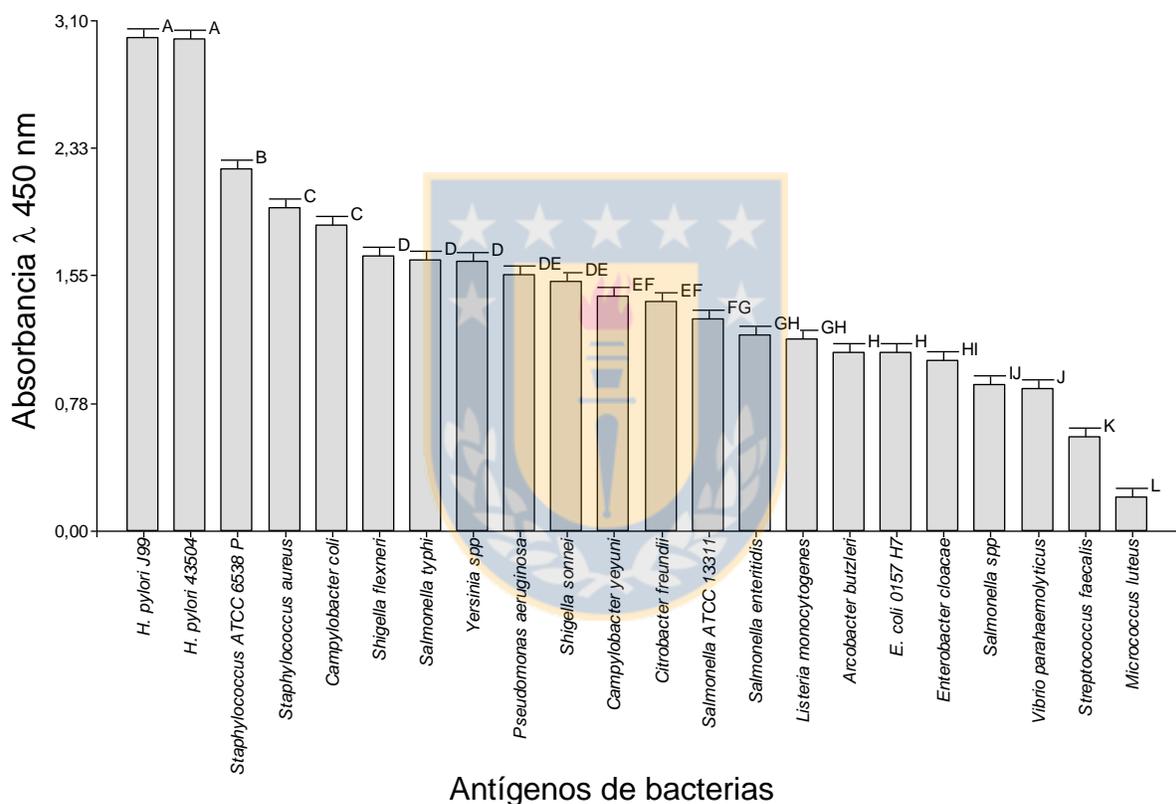


Figura N°23. Evaluación de reacción cruzada IgY anti-*H. pylori* cepa J99 frente a antígenos de diversas bacterias. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Al realizar el Test de reacción cruzada para IgY *H. pylori* cepa J99, se pudo observar de que este anticuerpo reconoció determinantes antigénicos en el lisado de *H. pylori* cepa J99 y también en el lisado de *H. pylori* cepa 43504.

Por otra parte, IgY *H. pylori* cepa J99 no presentó reactividad cruzada frente a los antígenos de las otras bacterias.

Evaluación de reacción cruzada IgY *H. pylori* cepa 43504 frente a antígenos de bacterias de interés gastrointestinal

Mediante un ELISA indirecto se pudo enfrentar el anticuerpo IgY *H. pylori* cepa 43504 a antígenos de diferentes bacterias (Figura N°24).

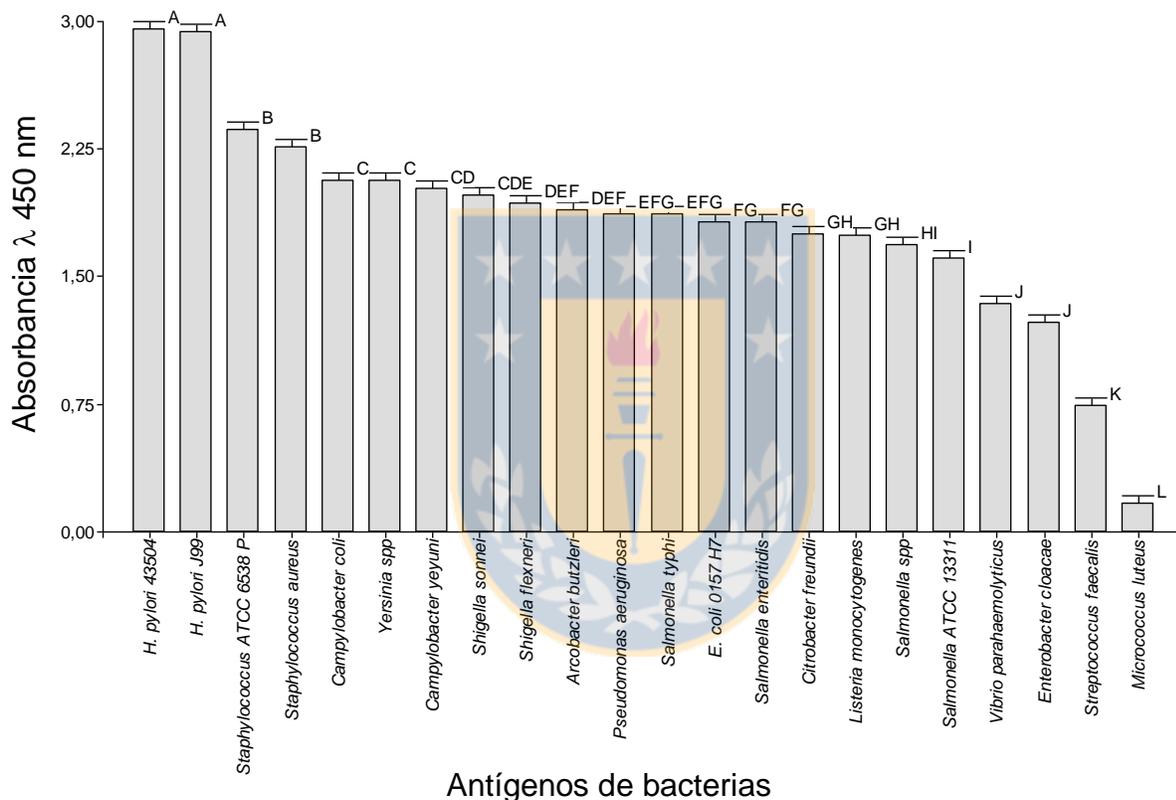


Figura N°24. Evaluación de reacción cruzada IgY anti-*H. pylori* cepa 43504 frente a antígenos de diversas bacterias. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Al realizar el Test de reacción cruzada para IgY *H. pylori* cepa 43504, se pudo observar de que este anticuerpo reconoció determinantes antigénicos en el lisado de *H. pylori* cepa 43504 y también en el lisado de *H. pylori* cepa J99.

Por otra parte, IgY *H. pylori* cepa 43504 no presentó reactividad cruzada frente a los antígenos de las otras bacterias.

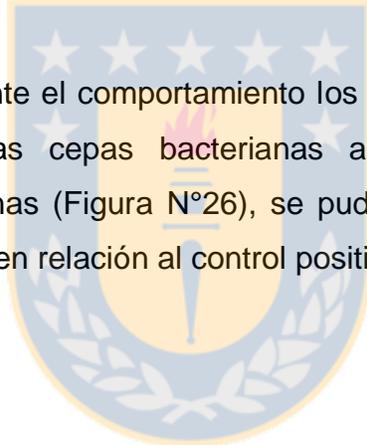
Desafío *in vitro* de IgY con *H. pylori* en células AGS

a) Ensayo Profiláctico

En el desafío profiláctico *in vitro*, utilizando la línea celular AGS (Figura N°25) se observó una mayor absorbancia de la asociación AGS-*H. pylori* cepa J99 en relación a la asociación AGS-*H. pylori* cepa 43504.

Por otra parte, se observaron bajas absorbancias en los desafíos profilácticos con IgY anti *H. pylori* eluato-peak III de ambas cepas bacterianas, no así con los anticuerpos aviares IgY anti *H. pylori* no purificadas (bruto) e IgY anti *H. pylori* purificada (eluato-peak II), los cuales mostraron una errática absorbancia a lo largo de sus diluciones.

Al revisar más detenidamente el comportamiento los IgY anti *H. pylori* purificados (eluato-peak III) de ambas cepas bacterianas al ser desafiados con sus respectivas cepas bacterianas (Figura N°26), se pudo observar que presentaron una muy baja absorbancia, en relación al control positivo (AGS+cepa bacteriana).



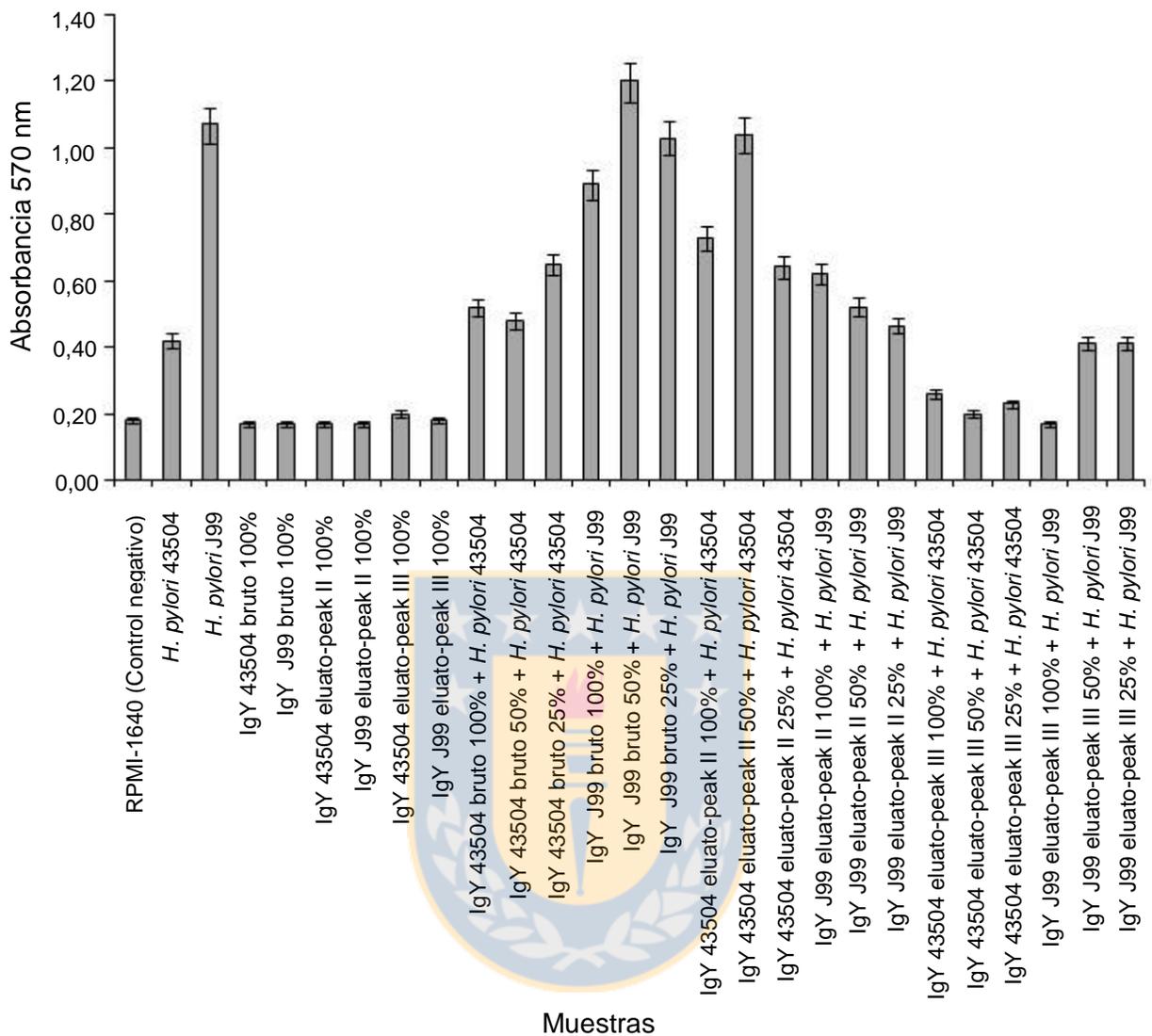


Figura N°25. Ensayo profiláctico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de *H. pylori* en células AGS.

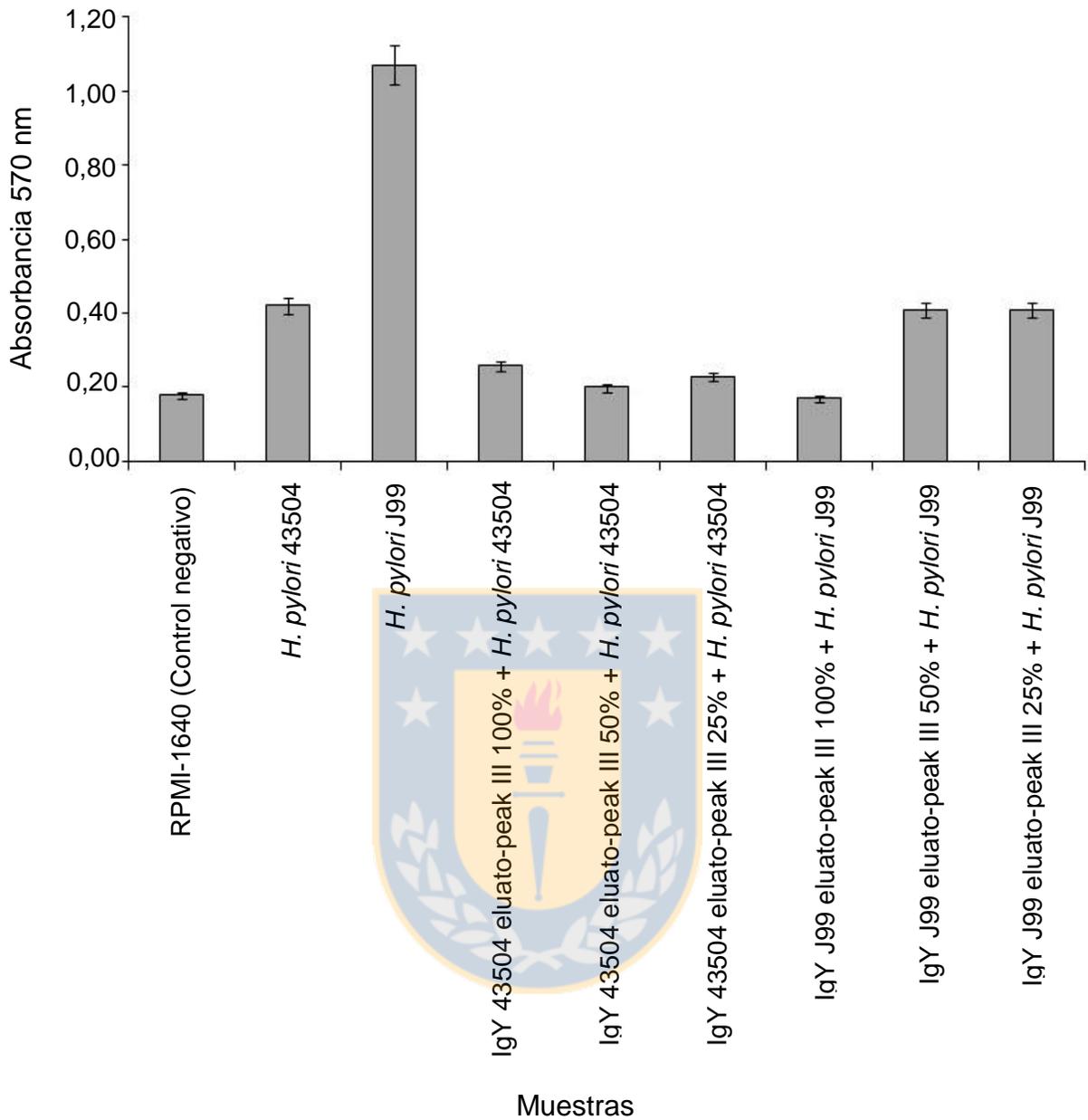


Figura N°26. Ensayo profiláctico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada (eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de *H. pylori* en células AGS.

b) Ensayo Terapéutico.

En el desafío terapéutico *in vitro*, utilizando la línea celular AGS (Figura N°27) se observó una mayor absorbancia de la asociación AGS-*H. pylori* cepa J99 en relación a la asociación AGS-*H. pylori* cepa 43504.

Por otra parte, se observaron bajas absorbancias en los desafíos terapéuticos con IgY anti-*H. pylori* eluato-peak III de ambas cepas bacterianas, no así con los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* no purificadas (bruto) e IgY anti-*H. pylori* purificada (eluato-peak II), los cuales mostraron una errática absorbancia a lo largo de sus diluciones.

Al revisar más detenidamente el comportamiento los IgY anti-*H. pylori* purificados (eluato-peak III) de ambas cepas bacterianas al ser desafiados con sus respectivas cepas bacterianas (Figura N°28), se pudo observar que presentaron una muy baja absorbancia, en relación al control positivo (AGS+cepa bacteriana).



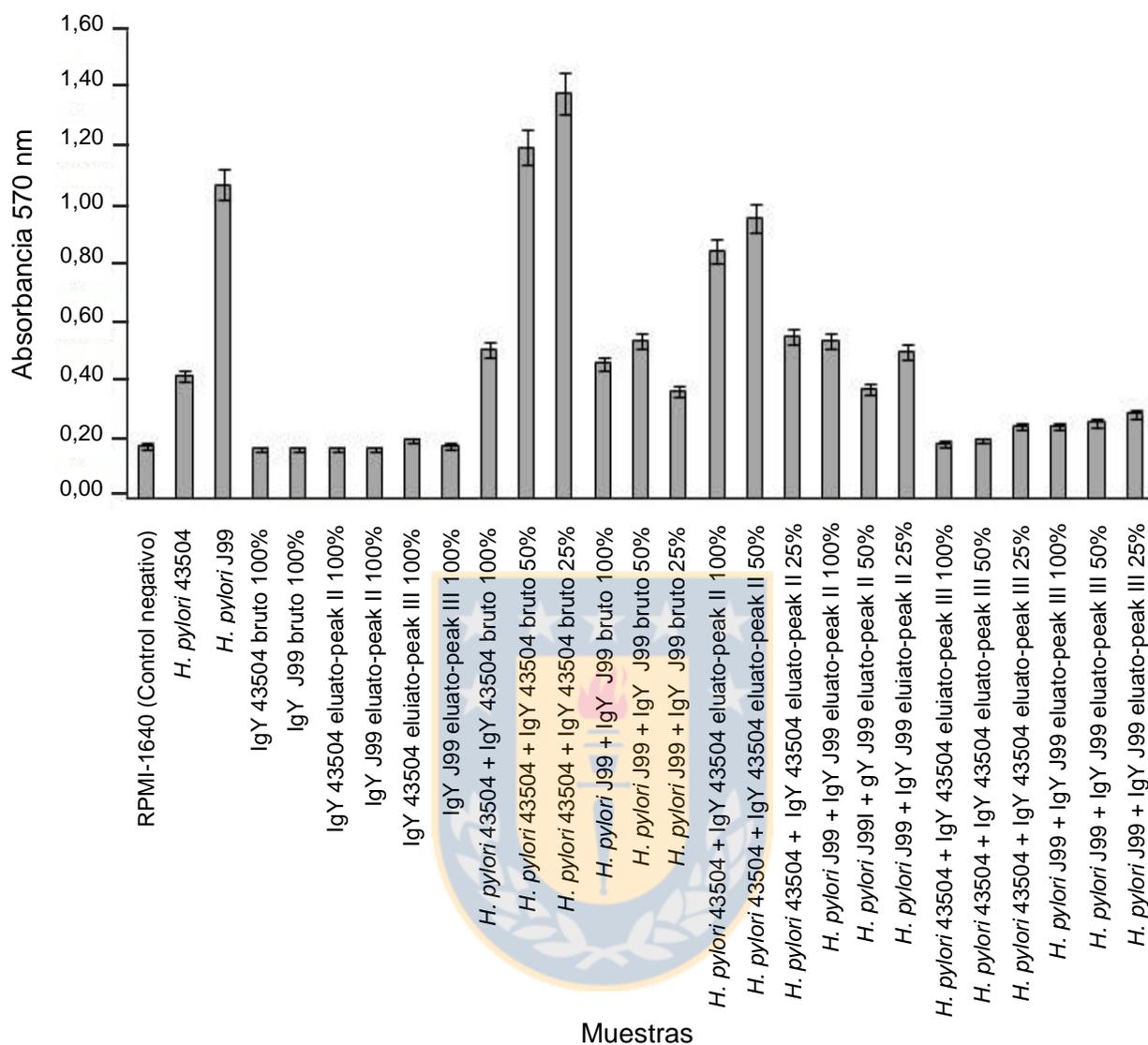


Figura N°27. Ensayo terapéutico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (en bruto) y purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de *H. pylori* en células AGS.

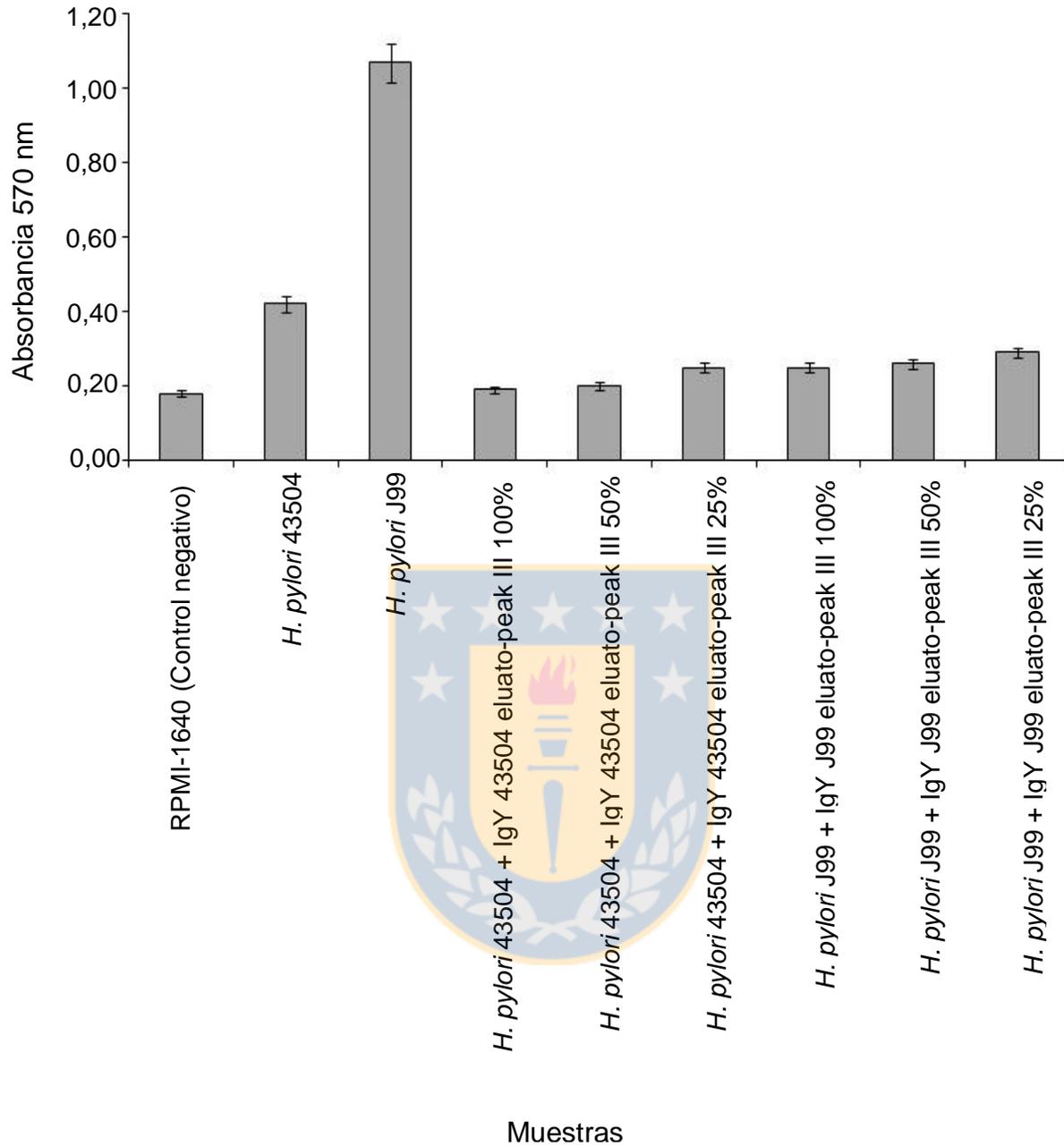


Figura N°28. Ensayo terapéutico para el desafío de los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada (eluato-peak III) a diferentes diluciones contra ambas cepas bacterianas de *H. pylori* en células AGS.

VI. DISCUSION

Frecuencia de la oviposición en gallinas

La obtención de anticuerpos (IgY) obtenidos desde la yema de huevos de gallinas es una técnica que permitirá reducir el uso de animales como fuente de anticuerpos, evitando así el sufrimiento e incluso la muerte de éstos. Por otra parte, según Leenaars *et al.* (1999) quien compara la producción de anticuerpos producidos por un conejo versus el producido por una gallina, expresa una superioridad productiva de los anticuerpos producidos por las aves. Sin embargo, hay que considerar de que la gallina tipo araucana tiene una postura de un 60%, es decir, realiza una ovipostura día por medio aproximadamente. A esto hay que sumarle el hecho de que en condiciones normales, las gallinas tipo araucanas no ponen huevos en invierno (en invierno se obtendrían 2 a 3 huevos de un grupo de 80 gallinas). Por otra parte, el máximo nivel reproductivo de esta raza se alcanza el primer año de vida, por lo tanto, posterior a este peak su nivel de postura empieza a bajar.

En cuanto a las otras razas de gallinas, se puede encontrar en literatura de que en promedio el tiempo entre oviposiciones se encuentra entre 24 y 26 horas. Sin embargo, hoy en día las aves con una gran producción presentan tiempos entre oviposiciones mayores a las 24 horas. No obstante, existen aves con tiempos entre oviposiciones ligeramente por debajo de las 24 horas, en torno a un 20% de las aves de un lote, pero éstas no presentarían los mejores rendimientos productivos (Icken *et al.*, 2008).

Otro parámetro a considerar es la yema de los huevos de gallina tipo araucana en relación a las yemas de los huevos de otras razas de gallinas. En un estudio realizado por Millet *et al.* (2006) se comparó los pesos de la yema de las gallinas tipo araucana en relación a la de otras dos razas de gallinas (ISA Brown y Lohmann Leghorn seleccionada) y se determinó que el peso de la yema de los huevos de gallina tipo araucana se situaba entre los dos pesos de las yemas de esas otras dos razas de gallina. Por otra parte, este mismo estudio analizó la relación yema:albúmina y determinó que esta relación era significativamente mayor en los huevos de gallina tipo araucana que en las otras razas.

Concentración de IgY obtenido desde la yema de huevos de gallina

La concentración y volumen obtenido de IgY anti-*H. pylori* de sus cepas J99 y 43504 en su forma sin purificar (en bruto) fue mayor, pero no óptima, ya que contenía una cantidad indeterminada de IgY dentro de un pool de proteínas totales, situación que fue evidenciada por los análisis de SDS-PAGE, Western blot y posterior cuantificación proteica de las fracciones purificadas por la resina específica por su alta afinidad a inmunoglobulinas IgY mediante TAC.

Por otra parte, la concentración obtenida de IgY anti-*H. pylori* de sus cepas J99 y 43504 en sus formas purificadas (eluato-peak II y eluato-peak III), mediante TAC, fue menor comparada a su forma no purificada, pero fue específica para IgY anti-*H. pylori*, especialmente el eluato-peak III, situación que se evidenció por los análisis de SDS-PAGE, Western blot y posterior cuantificación proteica de las fracciones purificadas por la resina específica por su alta afinidad a inmunoglobulinas IgY mediante TAC.

A pesar de que se obtuvo un mayor volumen en IgY *H. pylori* en su forma no purificada (en bruto), la concentración de este anticuerpo no fue específica en esa modalidad, a diferencia de los anticuerpos específicos (eluato-peak II y eluato-peak III) obtenidos a través de la resina mediante TAC, los cuales fueron específicos, pero a un bajo volumen productivo.

De acuerdo a lo publicado por Sunwoo *et al.* (2002) y Rose *et al.* (1974) citado por Gatica *et al.* (2004) la concentración de IgY en la yema de huevo oscilaría entre 8-25 mg/ml. Comparado las concentraciones proteicas de IgY obtenidas por esos estudios en relación a lo obtenido por nuestro estudio, en el que las concentraciones proteicas obtenidas de IgY en su forma no purificada (en bruto) fue de 3,2 mg/mL y de 5,4 mg/mL para IgY anti-*H. pylori* cepa J99 y 43504 respectivamente y que, la concentración proteica purificada de IgY en su fracción eluato-peak III fue de un 0,4 mg/mL y 0,3 mg/mL para IgY anti-*H. pylori* cepa J99 y 43504 respectivamente es que se puede concluir de que las concentraciones proteicas de IgY de este estudio estuvieron por debajo a lo señalado por Sunwoo *et al.* (2002) y Rose *et al.* (1974), citado por Gatica *et al.* 2004.

La baja concentración proteica obtenida de IgY anti-*H. pylori* de las cepas J99 y 43504 pudo deberse a fallas en el proceso de aislamiento de IgY y posterior purificación y/o al diferente método de aislamiento de IgY utilizado, a saber el de dilución de agua utilizado por Sunwoo *et al.* (2002) el cual fue más eficiente que el de nuestro estudio (precipitación con sulfato de amonio y posterior cromatografía con afinidad tiofílica, TAC).

Por otra parte, el objetivo final de este estudio era realizar un ensayo *in vivo* con gerbos como modelo animal para determinar el efecto protector de este anticuerpo IgY anti-*H. pylori* en sus dos cepas al ser desafiado con *H. pylori*, pero no fue posible realizar dicho ensayo *in vivo* con el volumen y concentración obtenida en nuestro estudio, ya que, de acuerdo a Shin *et al.* (2002), el volumen y la concentración de IgY a administrar a gerbos de Mongolia, oralmente, sería de 1 mL, a una concentración de 10 mg/mL para un grupo de 10 gerbos por un período de 30 días, por lo que sería necesario producir un volumen mínimo de 300 mL del anticuerpo a esa concentración, situación que no se pudo concretar ya que el volumen final obtenido del anticuerpo IgY no purificado (en bruto) de IgY anti *H. pylori* cepa J99 fue de 180 mL (concentración de 3,2 mg/mL de proteínas totales) y de 190 mL (concentración de 5,4 mg/mL de proteínas totales) de IgY anti-*H. pylori* cepa 43504.

Por otra parte, al hacer la purificación mediante TAC, las concentraciones proteicas el eluato-peak III de IgY anti-*H. pylori* de ambas cepas fueron aún menores, llegando a 0,4 mg/mL y 0,3 mg/mL para IgY anti-*H. pylori* cepa J99 y 43504 respectivamente (Tabla 3).

Por lo tanto, para hacer más eficiente el aislamiento y posterior purificación de IgY se deberá mejorar el manejo de la técnica de aislamiento de IgY utilizada en nuestro estudio o bien, cambiarla o innovarla por un método más eficiente.

SDS-PAGE

Se observó en el gel de SDS-PAGE (Figura 14) las bandas de los anticuerpos IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma no purificada (carriles de las letras E y F) cercanas a los 70 KDa, la cual posiblemente correspondería a una de las dos cadenas pesadas de IgY, cuya masa molecular es de 67 KDa (Murcia, 2009).

Además en estos anticuerpos también se observó una gran banda ubicada entre los 30 a 50 KDa, la cual podría deberse a la presencia de una gran cantidad de proteínas no específicas, junto con la formación de dímeros de dos cadenas livianas, donde la masa molecular de una de ellas es cercana a los 22 KDa (Murcia, 2009) y cuya unión se generó en primera instancia, por la separación que ejerció el β -mercaptoetanol y de la temperatura (95°C por 5 minutos) sobre las uniones disulfuro que tienen las cadenas de esta inmunoglobulina, lo que permitió en un comienzo la separación de las cadenas, para luego en forma natural volver a unirse nuevamente, pero en este caso se unieron a otras cadenas livianas, formando así dímeros.

En el caso de los anticuerpos IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada, eluato-peak II (carriles letra G y H de Figura 14) también se observaron bandas cercanas a los 70 KDa, posiblemente correspondientes a la cadena pesada de IgY. Además, se observaron bandas cercanas a los 40 KDa, las cuales podrían corresponder a dímeros de dos cadenas livianas.

En el caso de los anticuerpos IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 en su forma purificada, eluato-peak III (carriles letra I y J de Figura 14) también se observaron bandas cercanas a los 70 KDa, posiblemente correspondientes a la cadena pesada de IgY. Además, se observaron bandas cercanas a los 22 KDa., posiblemente correspondientes a las cadenas livianas de IgY.

Western blot

Se pudo observar que los anticuerpos aviares IgY anti-*H. pylori* cepas J99 y 43504 reconocieron los determinantes antigénicos de los lisados de su propia cepa como el de su homólogo, pero de cepa diferente, es decir, IgY anti-*H. pylori* J99 reconoció antígenos en el lisado de *H. pylori* J99, pero a su vez, también reconoció antígenos del lisado de *H. pylori* 43504. Lo mismo se aplica al análisis de IgY *H. pylori* 43504. Cabe hacer notar de que existieron algunas proteínas (que son muy pocas) que no fueron reconocidas por el anticuerpo contrario, es decir, el IgY *H. pylori* reconoció su propia proteína en presencia de su mismo lisado bacteriano, pero no lo hizo con algunas proteínas del lisado de su homólogo de

cepa diferente. Situación que explicaría en esencia la naturaleza de la existencia de cepas diferentes en una misma especie bacteriana (Olivares y Gisbert, 2006).

Por otra parte, al analizar esta membrana de transferencia también se observaron y definieron cuáles eran las bandas (proteínas) más inmunodominantes, destacando por su alta definición y nitidez, la ubicada a un peso molecular cercano de los 70 KDa. Esto se explica porque el segundo anticuerpo aplicado en este ensayo es específico para la cadena pesada de IgY.

Otro análisis que se puede desprender de lo observado en esta membrana de transferencia es que las bandas correspondientes al IgY anti-*H. pylori* para las cepas (J99 y 43504) en el eluato-peak III, correspondieron a nuestro anticuerpo específico de IgY, el cual fue identificable por formación de las dos bandas nítidas y definidas, ubicadas en el peso molecular de los 67 KDa y 20 KDa, correspondientes a las bandas pesada y liviana de este anticuerpo aviar respectivamente.

Título de anticuerpos IgY anti *H. pylori* cepas J99 y 43504

De acuerdo a Coll *et al.* (1986) la dilución óptima (título de anticuerpos óptimo) a elegir de una serie de diluciones de un suero problema será la dilución más elevada que presenta una densidad óptica dos veces superior a la absorbancia promedio del blanco.

En atención a lo anterior, para el ensayo de titulación de anticuerpos de IgY anti-*H. pylori* cepa J99, el promedio de las absorbancias del control negativo fue de 0,388 y el doble de esta absorbancia sería 0,777, por lo que la mayor dilución cercana a esa absorbancia sería una dilución mucho mayor a 1:6400.

En el caso del anticuerpo IgY anti *H. pylori* cepa 43504, el promedio de absorbancias del control negativo fue de 0,194 y el doble de esta absorbancia sería de 0,388, por lo que la mayor dilución cercana a esa absorbancia sería una dilución mayor, pero cercana a 1:6400.

De acuerdo a los estudios realizados por Sunwoo *et al.* (2002) y a Gatica *et al.* (2004) los títulos óptimos de anticuerpos IgY fueron los correspondientes a una dilución de 1:1000 y 1:10000 respectivamente. Ahora bien, en relación a los títulos

de anticuerpos aviares específicos contra *H. pylori*, Shin *et al.* (2002) lograron un título de anticuerpos (obtenido de gallinas) IgY anti-*H. pylori* correspondiente a una dilución de hasta 1:10240. Además, Kazimierczuk *et al.* (2005) logró obtener anticuerpos aviares, IgY anti-*H. pylori*, desde la yema de huevos de pata con un título de anticuerpos de 1:8000, dilución del anticuerpo que todavía permitía reconocer antígenos de *H. pylori*. Por lo tanto, los títulos de anticuerpos de IgY anti-*H. pylori* de las cepas J99 y 43504 obtenidos desde la yema de gallina araucana en esta tesis se encuentran dentro de los rangos señalados por la bibliografía citada, puesto que el título de anticuerpos óptimo superaba la máxima dilución utilizada (1:6400) en los inmunoensayos realizados.

Evaluación de reacción cruzada IgY *H. pylori* cepas J99 y 43504 frente a antígenos de bacterias

En este estudio se pudo observar que hubo reacción cruzada entre el anticuerpo aviar IgY anti-*H. pylori* cepa J99 y los antígenos de *H. pylori* J99 al reconocer a sus mismos antígenos. Situación que fue similar con el anticuerpo aviar IgY anti-*H. pylori* cepa 43504 el cual también presentó reacción cruzada con antígenos de su misma cepa.

También hubo reacción cruzada entre el anticuerpo aviar de IgY anti *H. pylori* cepa J99 con los antígenos de *H. pylori* cepa 43504 y también del anticuerpo aviar IgY anti *H. pylori* cepa 43504 con los antígenos de *H. pylori* cepa J99. La razón de esta reacción cruzada fue la similitud antigénica de estas cepas bacterianas con los anticuerpos originados de estas cepas.

Se presentaron altas absorbancias con *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter coli*. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la alta absorbancia se debió a la presencia de ciertos antígenos en común entre ambas especies bacterianas. Esto se podría explicar por lo establecido por Cover *et al.* (2003) el cual piensa que podrían existir ciertas similitudes entre los mecanismos por los que VacA de *H. pylori* y la toxina α de *S. aureus* inducirían la apoptosis, las cascadas de señalización intracelulares específicas que se activarían por VacA en células epiteliales gástricas, situación aún por definirse.

La razón de la alta absorbancia de *Campylobacter coli* se debió también a la presencia de ciertos antígenos en común entre ambas especies bacterianas. De hecho antiguamente se creía que pertenecían al mismo grupo filogenético, pero ahora se conoce que las especies de *Helicobacter* se ubican en una posición filogenéticamente diferente a las especies de *Campylobacter*, lo que le permitió la creación del género *Helicobacter* en 1989 (Goodwin *et al.*, 1989).

Desafío *in vitro* de IgY con *H. pylori* en células AGS

Tanto en los ensayos profilácticos y terapéuticos, los controles positivos *H. pylori* cepa J99 presentaron una mayor absorbancia a una mayor velocidad de reacción. No así los controles positivos *H. pylori* cepa 43504 los cuales presentaron una menor absorbancia a una menor velocidad de reacción. Este comportamiento es propio de cada cepa bacteriana, ya que a la cepa J99 le toma tan solo 3 días para su crecimiento en placas con agar Columbia, a diferencia de la cepa 43504 que le toma 4 días para su crecimiento.

El excelente nivel protector, tanto a nivel profiláctico como terapéutico, que presentó el anticuerpo aviar IgY anti-*H. pylori* purificado (eluato-peak III) de ambas cepas bacterianas, en sus diferentes diluciones se explica porque éste era el anticuerpo IgY anti-*H. pylori* específico y puro, obtenido por la cromatografía de afinidad tiofílica, TAC, lo que le permitió lograr formar eficientemente el complejo antígeno-anticuerpo, ejerciendo así una mejor defensa contra *H. pylori*. No así, los otros anticuerpos aviares IgY anti *H. pylori*, de ambas cepas, en su forma no purificada y purificada (eluato-peak II), los cuales contenían impurezas y/o proteínas anexas, como fue el caso del anticuerpo no purificado (en bruto), o bien presentaba pequeñas variaciones de afinidad por el antígeno (Berson y Yalow, 1959) como fue el caso de la fracción eluato-peak II.

VII. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo fue posible aislar y purificar IgY anti-*H. pylori* de las cepas J99 y 43504 mediante la técnica de precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de adsorción tiofílica (TAC).
- La principal proteína inmunodominante presente en las inmunoglobulinas aviares anti *H. pylori* de las cepas J99 y 43504 fue aquella de un peso molecular de 67 KDa, presente como una marcada banda en la membrana de transferencia de Western blot y que correspondería a la cadena pesada de IgY.
- La sensibilidad de las IgY *H. pylori* para las cepas J99 y 43504 fue alta, porque lograron un alto título de anticuerpos mayor de 1/6400 en ambos casos y ejercieron un efecto protector en las células AGS.
- La especificidad de las IgY *H. pylori* para las cepas J99 y 43504 fue alta, no encontrándose reacción cruzada entre los anticuerpos aviares con los antígenos de diversas bacterias especialmente de interés gastrointestinal.



VIII. REFERENCIAS

1. Álvarez A., D. Arrieche, E. Cala, L. Aristimuño y R. Rodríguez. 2002. Diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* en niños y adolescentes mediante determinación de IgG. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 22(2):122-127.
2. Álvarez M., X. Hevia, M. Gómez, R. Almarales y J. Rodríguez. Algunas consideraciones sobre las reacciones adversas por alimentos. Rev Cubana Med Gen Integr [online]. 2004, vol.20, n.5-6 [cited 2010-11-10], pp. 0-0 . Available from: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252004000500008&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0864-2125.
3. Arachchi HSJ., V. Kalra, B. Lal, V. Bhatia, CS Baba, S. Chakravarthy, S. Rohatgi, PM. Sarma, V. Mishra, B. Das and V. Ahuja. 2007. Prevalence of Duodenal Ulcer-Promoting Gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in Patients with Duodenal Ulcer in North Indian Population. Helicobacter. 12(6):591–597.
4. Atherton, J.C., P. Cao, R.M. Peek, M.K.R. Tummuru, M.J. Blaser, and T.L. Cover. 1995. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. J. Biol. Chem. 270(30): 17771-17777.
5. Berghman LR., D. Abi-Ghanem, SD. Waghela, and SC Ricke. 2005. Antibodies: An Alternative for Antibiotics? Poultry Science. 84:660–666.
6. Berson S. and R. Yalow. 1959. Cuantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest. 38(11):1996–2016.
7. Bitgood, J.J., RN Shoffner and JS Otis. 1980. Mapping of the genes for pea comb, blue egg, barring, silver, and blood groups A, E, H, and P in the domestic fowl. Poult. Sci. 59:1686-1693.
8. Björnham O., J. Bugaytsova, T. Borén and S. Schedin. 2009. Dynamic force spectroscopy of the *Helicobacter pylori* BabA–Lewis b Binding. Biophysical Chemistry. 143:102–105.
9. Blaser M J, J C Atherton. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J. Clin. Invest. 113:321-33.

10. Carlander D. and A. Larsson. 2001. Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA- Uppsala J. Med. Sci. 106:189-195.
11. Castro-Fernández M., E. Lamas, A. Pérez-Pastor, M. Pabón, R. Aparcero, J. Vargas-Romero, J. L. Larraona and M. Romero-Gómez. 2009. Efficacy of triple therapy with a proton pump inhibitor, levofloxacin, and amoxicillin as first-line treatment to eradicate *Helicobacter pylori*. Rev. Esp. Enferm. Dig. (Madrid) 101(6):395-402.
12. Censini S., C. Lange, Z. Xiang, JE. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli and A. Covacci. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:14648–14653.
13. Chacana P. A., HR Terzolo, E. Gutiérrez y R. Schade. 2004. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 85 (5):179-189.
14. Chan EC., KT Chen and YL. Lin. 1996. Vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* activates cellular signaling and pepsinogen secretion in human gastric adenocarcinoma cells. FEBS Lett 399:127-130.
15. Chiarini A., C. Calà, C. Bonura, A. Gullo, G. Giuliana, S. Peralta, F. D'Arpa y A. Giammanco. 2009. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28:437–446.
16. Coll P., R. Rosell, A. Gaya y G. Prats. 1986. Enzimoinmunoanálisis para la detección de anticuerpos séricos específicos de *Y. enterocolítica* 0:3. Comparación de varios métodos para la expresión de resultados. Rev. Doyma de Inmunología. 5(3):1-4.
17. Covacci A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, AND R. Rappuoli. 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter*

- pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:5791-5795.
18. Cover T., U. Krishna, D. Israel and R. Peek. 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. Cancer Res. 63:951-957.
 19. Falush D., C. Kraf, NS Taylor, P. Correa, JG Fox, M. Achtman and S. Suerbaum. 2001. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age PNAS 98(26):15056-15061; published ahead of print December 11, 2001, doi:10.1073/pnas.251396098.
 20. Ferreccio C. A. Rollán, PR. Harris, C. Serrano, A. Gederlini, P. Margozzini, C. Gonzalez, X. Aguilera, A. Venegas, and A. Jara. 2007. Gastric Cancer is Related to Early *Helicobacter pylori* Infection in a High-Prevalence Country. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16(4):662-667.
 21. Figueroa G., R. Acufia, M. Troncoso, DP. Portell, MS. Toledo, and J. Valenzuela. 1997. *Helicobacter pylori* Infection in Chile. Clinical Infectious Diseases. 25(5):983-989.
 22. Gatica R., JC Slebe, J. Ulloa y AJ Yáñez. 2004. Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra fructosa 1,6-bisfosfatasa en huevos de gallina. Arch. Med. Vet., 36(1):49-58.
 23. Goodwin CS, JA Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, D. Collins, L. Sly, W. McConnell and W. Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:397-405.
 24. González C., C. Serrano y P. Harris. 2007. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en niños mediante la detección de antígenos en deposiciones. Rev. Méd. Chile.135:182-188.
 25. Hatta H., K. Tsuda, S. Akachi, M. Kim and T. Yamamoto. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci. Biotech. Biochem. 57(3):450-454.

26. Hau J. and C. Hendriksen. 2005. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. *ILAR*. 46:294–299.
27. Houghton JM. and TC Wang. 2005. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: A New Paradigm For Inflammation-Associated Epithelial Cancers. *Gastroenterology*. 128(6):1567–1578.
28. Icken W., D. Cavero, M. Schmutz, S. Thurner, G. Wendl and R. Preisinger. 2008. Analysis of the free range behavior of laying hens and the genetic and phenotypic relationships with laying performance. *British Poultry Science*. 49(5):533-541.
29. Kazimierczuk K., L. Cova, B. Ndeboko, U. Szczurk, A. Targosz, T. Brzozowski and A. Sirko. 2005. Genetic immunization of ducks for production of antibodies specific to *Helicobacter pylori* UreB in egg yolks. *Acta Biochim. Pol.* 52(1):261-266.
30. Koletzko S., F Richy, P Bontems, J Crone, N Kalach, M L Monteiro, F Gottrand, D Celinska-Cedro, E Roma-Giannikou, G Orderda, S Kolacek, P Urruzuno, M J Martínez-Gómez, T Casswall, M Ashorn, H Bodanszky and F Mégraud. 2006. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe *Gut*. 55(12):1711–1716.
31. Kovacs-Nolan J. and Y. Mine. 2004. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology Reviews* 15(1):25-46.
32. Kudo T., Z. Z. Nurgalieva, M. E. Conner, S. Crawford, S. Odenbreit, R. Haas, D. Y. Graham, and Y. Yamaoka. 2004. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA Protein Expression and oipA Gene Switch Status. *J. Clin. Microbiol.* 42:2279–2281.
33. Kusters J., A. Van Vliet, and E. Kuipers. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. 19(3):449–490.
34. Larsson A., A. Karlsson-Parra and J. Sjöquist. 1991. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin. Chem.* 37: 211-215.

35. Ledesma Z., B. Gutiérrez, G. Cirión, M. Lemus, J. Sanabría, T. Romero, G. Sierra y M. Mirabal. 2010. Diagnóstico histológico de la infección por *Helicobacter pylori* en Pinar del Río, Cuba. *Vaccimonitor*. 19(2):1-4.
36. Leenaars PPA, C. Hendriksen, W. de Leeuw, F. Carat, P. Delahaut, R. Fischer, M. Halder, WC. Hanly, J. Hartinger, J. Hau, EB Lindblad, W. Nicklas, IM. Outschoorn and DES. Stewart-Tull. 1999. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *Alta*. 27:79-109.
37. Leslie GA and LN Martin.1973. Studies on the secretory immunologic system of fowl. 3. Serum and secretory IgA of the chicken; *J. Immunol*. 110(1):1-9.
38. Logan R and M. Walker. 2001. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Br. Med. J*. 323:920-2.
39. Martínez M., M.; González, R. Ferreira y J.A. Mas Páez. 2008. Genotipo cag A+ en cepas de *Helicobacter pylori* asociadas a úlcera péptica, gastritis crónica y cáncer gástrico. *Rev cubana med [online]*. 47(2):1-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232008000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0034-7523.
40. Michael A., S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran and S. Ramalingam. 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J. Sci. Technol*. 3(4):468-474.
41. Millet S., K. de Ceulaer, M. Van paemel, K, Raes, S. de Smet and G.P.J. Janssens. 2006. Lipid profile in eggs of Araucana hens compared with Lohmann Selected Leghorn an ISA Brown hens given diets with different fat sources. *British Poultry Science*. 47(3):294-300.
42. MINISTERIO DE SALUD. 2006. Guía Clínica Cáncer Gástrico. SERIE GUÍAS CLÍNICAS MINSAL N°35..
43. Mizushima, T. Sugiyama, Y. Komatsu, K. Ishizuka, M. Kato and M. Asaka. 2001. Clinical relevance of the babA2 genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J. Clin. Microbiol*. 39:2463–2465.
44. Mojca N. 2003. Production of antibodies in chickens. *Food Technol. Biotechnol*. 41(3):259–267.

45. Morelli G, X. Didelot, B. Kusecek, S. Schwarz, C. Bahlawane, D. Falush, S. Suerbaum y M. Achtman. 2010. Microevolution of *Helicobacter pylori* during Prolonged Infection of Single Hosts and within Families. PLoS Genet 6(7): e1001036.
46. Moya, R. 2004. Gallina de huevos azules: contribuciones a la elaboración de un protocolo. CET SUR. 4:1-21.
47. Murcia H. 2009. Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos. Revista Teoría y Praxis Investigativa. 4(2):19-26.
48. Naumann M. and JE Crabtree. 2004. *Helicobacter pylori*-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. Trends Microbiol. 12:29–36.
49. Noorai R., NH Freese, LM Wright, SC Chapman and LA Clark. 2012. Genome-wide association mapping and identification of candidate genes for the rumpless and ear-tufted traits of the araucana chicken. PLoS. ONE. 7(7): e40974.
50. Olivares D. and JP Gisbert. 2006. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Rev. Esp. Enferm. Dig. 98(5):374-386.
51. Orellana S., E. 1993. Análisis de características reproductivas de las Gallinas Araucanas, asociadas a la calidad del huevo. Memoria de título. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile
52. Ortega JP., A. Espino, A. Calvo, P. Verdugo, M. Pruyas, E. Nilsen, L. Villarroel, O. Padilla, A. Riquelme and A. Rollán. 2010. *Helicobacter pylori* infection in symptomatic patients with benign gastroduodenal diseases. Analysis of 5.664 cases. Rev. Med. Chile. 138:529-535.
53. Peek R. and J Crabtree. 2006. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. J Pathol. 208:233–248.
54. Ramírez A. y R. Sánchez. 2009. *Helicobacter pylori* 25 años después (1983 - 2008): Epidemiología, Microbiología, Patogenia, Diagnóstico y Tratamiento. Rev. Gastroenterol. Perú; 29(2):158-170.
55. Rivas-Traverso F, F. Hernández. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed. 11:187-205.

56. Sachs G. and D. Scott. 2012. *Helicobacter pylori*: eradication or preservation. F1000 Medicine Reports. 4(7):1-5.
57. Salama N, K. Guillemin, TK McDaniel, G Sherlock, L. Tompkins, S Falkow. 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci USA; 97 (26):14668–14673.
58. Salas-Aguilar R., R. Páez-Sáenz, G. Avendaño-Alvarado, A. Avalos-Giugliarelli, R. Barahona-García, L. Lang, V. Ramírez, R. Sierra y F. García. 2003. Erradicación de *Helicobacter pylori* mediante triple terapia (amoxicilina, claritromicina y omeprazole) en pacientes del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia. Acta Méd. Costarric. 45(2):57-61.
59. Sansosti A., JM Negro, JA Pagan, JM Quesada e I. Póstigo. 2009. Síndrome ave-huevo. Archivos de Alergia e Inmunología Clínica. 40(3):95-96.
60. Sheppy A. 2011. The colour of domestication and the designer chicken. Optics & Laser Technology. 43 (2):295–301.
61. Shimizu M., H. Nagashima, K. Sano, K. Hashimoto, M. Ozeki, K. Tsuda and H. Hatta. 1992. Molecular Stability of Chicken and Rabbit Immunoglobulin G. Biosci. Biotech. 56(2):270-274.
62. Shimizu M., H. Nagashima, K. Hashimoto and T. Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sucker concentrations. J. Food Sci. 59:763-772.
63. Shin J-H., M. Yang, S. Nam, J. Kim, Na Myung, W-G. Bang and I. Roe. 2002. Use of Egg Yolk-Derived Immunoglobulin as an Alternative to Antibiotic Treatment for Control of *Helicobacter pylori* Infection. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9(5):1061-1066.
64. Smoot DT., Z. Wynn, TB Elliot, CR Allen, G Mekasha, T. Naab and H. Ashktorab. 1999. Effects of *Helicobacter pylori* on proliferation of gastric epithelial cells *in vitro*. Am. J. Gastroenterol. 94:1508-1511.
65. Solcà N. M., M. V. Bernasconi, C. Valsangiacomo, L.J. Van Doorn, and J.C. Piffaretti. 2001. Population genetics of *Helicobacter pylori* in the southern part of Switzerland analysed by sequencing of four housekeeping genes

- (atpD, glnA, scoB and recA), and by vacA, cagA, iceA and IS605 genotyping. *Microbiology*. 147:1693-1707.
66. Storey A., J. M. Ramírez, D. Quiroz, D.V. Burley, D.J. Addison, R. Walter, A.J. Anderson, T.L. Hunt, J.S. Athens. L. Huynen and E.A. Matisoo-Smith. 2007. Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of Polynesian chickens to Chile. *PNAS*. 104(25):10335-10339.
 67. Suárez M. 2008. Detección de *Helicobacter pylori* en recién nacidos y lactantes. Tesis para optar al grado de Magíster en Salud Reproductiva. Dirección de Postgrado, Universidad de Concepción.
 68. Suerbaum S, P. Michetti. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*. 347:1175-86.
 69. Sunwoo H., E. Lee, K. Menninen, M. Suresh y J. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*. 67(4):1486-1494.
 70. Tini M, UR. Jewell, G. Camenisch, D. Chilov and M. Gassmann. 2002. Generation and application of chicken egg yolk antibodies; *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 31:569-574.
 71. Toledo T., 2006. Incubabilidad de huevos de gallinas tipo araucanas (*Gallus inauris*) durante la temporada invernal, en relación al tiempo de almacenaje previo a la incubación. Memoria de título. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chile
 72. Tomb JF, O. White, AR. Kerlavage, RA. Clayton, GC. Sutton, RD. Fleischmann, 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539–547.
 73. Verdoliva A., G. Basile and G. Fassina. 2000. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J. Chromatogr. B*. 749:233-242.
 74. Wiedemann T., E. Loell, S. Mueller, M. Stoeckelhuber, M. Stolte, R. Haas y G. Rieder. 2009. *Helicobacter pylori* cag-pathogenecity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS ONE*. 4(3):e4754.

75. Williams J. 1962. Serum proteins and the livetins of hen's egg yolk; *Biochem. J.* 83:346-355.
76. World Health Organization and International Agency for Research on Cancer. 1994. IARC Monographs on the Evaluation of Carginogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flakes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks. Hum. 61:1-241.
77. Zhang, W-W. 2003. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Disc. Today* 8(8):364-371.



Anexos

Anexo A.

Cultivo Celular

Reactivos/soluciones:

- Criovial con 1 mL de células AGS (SIGMA) congeladas a -80°C con DMSO estéril
- Sobre de medio de cultivo celular RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Corporation)
- 10 % de Suero Bovino Fetal (Biological Industries Kibbutz Beit Haemek Israel)
- 1% de Solución antibiótica de Penicilina-Streptomicina (SIGMA)

Materiales:

- 2 Frascos de cultivo celular T-75 (SPLF)
- Pipetas Falcon estériles de 10 mL
- Micropipeta estéril de 1000 µL
- Puntas Azules con algodón estériles
- Filtros con poros de 0,20 µL de diámetros
- Jeringas desechables estériles de 10 mL
- Temperatura de 37° C
- Ambiente con 5% de CO₂

Procedimiento Preparación del Medio de Cultivo

1. Preparar el medio RPMI-1640 de acuerdo a las instrucciones del fabricante y luego se filtrar este medio de cultivo en el gabinete de bioseguridad tipo II con flujo constante, utilizando filtros de poros de un diámetro de 0,22 µm y jeringas desechables estériles de 10 mL
2. Adicionar suero bovino fetal al 10% y solución antibiótica al 1% del volumen de RPMI-1640 (RPMI-1640 completo).
3. Conservar en frascos estériles sellados a 4°C.

Preparación siembra de células AGS:

1. Descongelar a temperatura ambiente el criovial con células AGS congeladas con dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°
2. Centrifugar el criovial con células AGS a 1200 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente.
3. Dentro del gabinete de bioseguridad tipo II con flujo laminar constante, eliminar el sobrenadante del criovial y resuspender con 1 mL de medio de cultivo celular RPMI-1640 completo (medio de cultivo adicionado con suero fetal bovino al 10% y solución antibiótica al 1%)
4. Centrifugar nuevamente a 1200 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente.
5. Dentro del gabinete de bioseguridad tipo II con flujo laminar constante, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular con 1 mL de medio de cultivo celular RPMI-1640 completo.
6. Agregar 14 mL de RPMI-1640 completo a 2 frascos de cultivo celular T-75.
7. Adicionar 0,5 mL de la resuspensión celular y llevarlo a incubar a 37°C en un ambiente de 5% de CO_2 .
8. Dentro del gabinete de bioseguridad tipo II con flujo laminar constante, cambiar el medio de cultivo RPMI-1640 completo por otro fresco después de 12 a 24 hrs post siembra
9. Incubar por aproximadamente 2 semanas cambiando el medio de cultivo celular (Anexo B) cada cierto tiempo de acuerdo a las necesidades presentes.

Anexo B.

Cambio de medio de cultivo celular

Reactivos/soluciones:

- Medio de cultivo celular completo: RPMI-1640 filtrado, suero bovino fetal al 10% y solución antibiótica al 1% (Ver Anexo A)
- PBS 1x (pH 7,2) estéril

Todos estos medios se temperan a 37°C

Materiales:

- Pipetas Falcon estériles de 10 mL

Procedimiento:

1. Realizar el cambio de medio de cultivo celular RPMI-1640 desde los frascos T-75 con células AGS sembradas en su interior de acuerdo a lo requerido en el momento (Primer cambio de medio se hace a las 12-24 horas post siembra celular y cada 3-4 días aproximadamente o cuando se detecte aumento de la formación de detritus celulares en el medio al observarlos bajo el microscopio invertido, o cuando se sospeche de alguna contaminación en el medio, al ver turbidez y cambio de color del medio de cultivo).
2. Dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II con flujo laminar constante, extraer todo el medio de cultivo celular antiguo por otro fresco utilizando pipeta Falcon desde los frascos de cultivo celular T-75.
3. Agregar 6 mL de PBS 1x estéril y dejar reposar en forma horizontal el frasco T-75 por unos 30 segundos.
4. Extraer totalmente esta solución salina utilizando otra pipeta Falcon.
5. Agregar 13 mL de medio fresco RPMI-1640 completo e incubar a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Anexo C.

Traspaso de células

El traspaso de células consiste en realizar un pasaje de un cultivo de células que se encuentran en los frascos de cultivo celular T-75 con una confluencia celular de un 80 a 90% hacia placas de cultivo celular de 24 pocillos para lograr una expansión celular.

Reactivos/soluciones:

- Medio de cultivo completo: RPMI-1640, SBF 10% y solución antibiótica al 1%

- Buffer PBS 1x (pH 7,2) estéril
 - Tripsina 0,25% - Solución EDTA (SIGMA)
- Todos previamente temperados a 37°C

Materiales:

- Placas de cultivo celular de 24 pocillos
- Micropipetas estériles: de 1000 uL y 100 ul
- Puntas con algodón estériles: azules y amarillas
- Pipetas Falcon estériles de 10 mL

Procedimiento:

1. Una vez que las células alcanzan una confluencia celular de un 80-90% en los frascos T-75, se hace el traspaso a placas de cultivo celular de 24 pocillos, para lo cual se trabaja dentro de un gabinete de bioseguridad tipo II con flujo laminar constante, en donde se extrae, con una pipeta Falcón, el medio de cultivo celular antiguo.
2. Agregar 6 mL de PBS 1x estéril y dejar reposar el frasco T-75, en posición horizontal, con este buffer por unos 30 segundos, para posteriormente extraer completamente el buffer.
3. Agregar cuidadosamente 3 mL de tripsina 0,25% - solución EDTA al fondo del frasco T-75 procurando que esta solución no toque las paredes del frasco.
4. Dejar el frasco T-75 dentro de la estufa de incubación, en posición horizontal, por 5 minutos.
5. Sacar el frasco T-75 de la estufa de incubación y agregarle rápidamente 9 mL de medio RPMI-1640 completo. Usando una pipeta Falcon, bañar con la solución de tripsina/RPMI-1640 completo la superficie de la pared del frasco T-75 en donde estaban adheridas las células, con el fin de desprender las células de la superficie de la pared del frasco, hasta que no se vea opacidad en la pared del frasco.
6. Vaciar la resuspensión celular con tripsina/RPMI-1640 completo a un tubo Falcon de 15 mL para centrifugarlo a 1200 rpm por 10 minutos.

7. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet celular de cada tubo Falcon de 15 mL con 2 mL de medio RPMI-1640 completo.
8. Utilizando puntas azules, agregar 1 gota de la solución celular resuspendida en RPMI-1640 completa a cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Cabe destacar que antes de agregar la gota con la suspensión celular al pocillo, se deberá agregar 1 mL de RPMI-1640 completo a cada pocillo.
9. Incubar la placa de 24 pocillos a 37°C en un ambiente de un 5% de CO₂ hasta que alcance una confluencia celular de un 80 a un 90% del pocillo de la placa.

Anexo D.

Protocolo de congelamiento de células.

Procedimiento:

El congelamiento de células se realiza para poder almacenar la línea celular a -80°C para su posterior uso. Para frascos de cultivo celular T-75:

- 1) Trabajar en gabinete de bioseguridad tipo II, con flujo laminar constante.
- 2) Utilizar un frasco con células que hayan alcanzado una confluencia de un 80-90%.
- 3) Con pipeta retirar el medio de cultivo antiguo del frasco T-75.
- 4) Lavar las células con 6 mL de PBS 1x agregándolo suavemente en el fondo del frasco T-75.
- 5) Mover la placa suavemente durante 30 segundos en posición horizontal para que las células queden cubiertas con PBS. Retirar el PBS con pipeta.
- 6) Despegar las células con 3 mL de tripsina-EDTA agregándolo en el fondo de frasco T-75 sin que toque la pared donde se encuentran las células. Llevar a estufa por 5 minutos cuidando que la tripsina cubra las células.
- 7) Retirar de la estufa y agregar rápidamente 9 mL de medio completo. Con ayuda de pipeta disgregar las células hasta obtener un líquido homogéneo.

- 8) Traspasar las células suspendidas a un falcon estéril y centrifugar a 1200 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente.
- 9) Descartar el sobrenadante.
- 10) Preparar medio para congelamiento: En un falcon preparar medio RPMI completo más SBF al 50%, para obtener dos criotubos utilizar 0,95 mL de medio completo y 0,95 mL de SBF. Al medio enriquecido agregar 100 uL de DMSO estéril para obtener un medio con DMSO al 5%.
- 11) Resuspender las células en el medio para congelamiento obteniendo un líquido homogéneo.
- 12) Agregar a cada criovial 1 mL del medio de congelamiento con células. Rotular.
- 13) Mantener las células durante 1 hora a -20°C antes de almacenarlas a -80°C .

Anexo E

Reactivo Urea-Rojo Fenol

Reactivos/soluciones

a) 0,002% de Rojo Fenol:

- 0,02 g de Rojo Fenol (para 1 litro de Tampón Fosfato)

b) 150 mM de Urea (P.M. 60,06 g/mol):

- 9,009 g de Urea

c) 100 mM de Tampón Fosfato ajustado a pH 6,8. Para esto:

- 14,2 gr de Na_2HPO_4 (Peso Molecular 141,95)
- 13,8 gr de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Peso Molecular 137,99)
- 1 litro de agua destilada

Preparación Tampón Fosfato:

- A 900 mL de agua destilada se le agrega 14,2 g de Na_2HPO_4 y 13,8 g de NaH_2PO_4 .
- Se ajusta a pH 6,8 y luego se completa con agua destilada hasta llegar a los 1000 mL de esta solución.
- Se autoclava esta solución.

Procedimiento:

1. Se une el Rojo Fenol, la Urea y el Tampón Fosfato autoclavado.
2. Se conserva el reactivo urea-rojo fenol a 4°C en un frasco color ambar o bien recubierto totalmente con papel de aluminio para protegerlo de la luz.

