



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Identificación de Proteínas de Mycobacterium bovis inductoras de apoptosis en macrófagos de bovino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ. Anaid Maciel Rivera

TUTOR O TUTORES PRINCIPALES

Dr. José Ángel Guadalupe Gutiérrez Pabello
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Departamento de Microbiología e Inmunología

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Departamento de Morfología

Dr. Javier Antonio Vallecillo Maza
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Departamento de Inmunología

MÉXICO, D. F. MARZO. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A la vida por dejarme llegar hasta este punto de mi formación académica y permitir superarme día a día a pesar de todos los obstáculos, dándome la fortaleza necesaria para llegar a cumplir esta meta.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de seguir adelante en mis estudios y haber obtenido grandes conocimientos dentro de sus instalaciones

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por haberme abierto las puertas y apoyarme en este nuevo proyecto de mi vida, ser parte de mi formación académica y por aportar gran cantidad de mis conocimientos que ahora poseo.

Dr. Javier Antonio Vallecillo Maza por ser parte de mi comité tutorial y haber sido tan paciente y comprensiva conmigo, no solo en lo profesional, si no en lo personal.

A la Dra. María Lourdes Juárez Mosqueda, por todo el tiempo de asesoría en la escritura de mi tesis y ser parte de mi comité tutorial.

Dr. Edgar Alfonseca Silva por ser mi maestro durante este proceso de aprendizaje que nunca termina y apoyarme como compañero y amigo durante esta etapa.

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón. Jefa de departamento de inmunología. Instituto de investigaciones biomédicas. UNAM. Departamento de Inmunología, por su apoyo en la realización del proyecto.

M en C. Cristina Parada Colín. Técnico académico.. Instituto de investigaciones biomédicas. UNAM. Departamento de Inmunología. Por su ayuda en la realización de las técnicas de extracción de proteínas.

M. en C. Erika Segura Salinas. Técnico académico. Instituto de investigaciones biomédicas. UNAM. Departamento de Inmunología. Encargada del manejo de la unidad de bioseguridad de agentes patógenos nivel 3. Gracias por la ayuda del manejo de cultivos de agentes patógenos.

Al uso de la Unidad de Bioseguridad de manejo de agentes patógenos Nivel 3 del Instituto de investigaciones biomédicas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y personal por brindarme, su apoyo en la realización de este estudio y por qué encontré muchos amigos.

A los proyectos de investigación PAPIIT IN-214009 y CONACYT CB2011-167488-Z por darme su apoyo económico y así poder realizar este proyecto.

A mi jurado: Dra. Clara Espitia Pinzón, Dr. Rogelio Alonso Morales y Dr. José Abel Ciprian Carrasco, por el tiempo que me dieron para revisar mi tesis y darme sus comentarios.

A mis compañeros de laboratorio y amigos por haberme alegrado los días de trabajo y por haber compartido un poco de sus vidas conmigo, en especial al Dr. Alejandro Benítez Guzmán, gracias por tu tiempo invertido en el trabajo.

Dedicatorias

Yo creo que todavía no es demasiado tarde para construir una utopía que nos permita compartir la tierra. Con estas palabras de García Márquez comienzo esta dedicatoria pues se necesita de mucho esfuerzo para poder dejar un granito en esta tierra que contribuya hacer un mundo mejor de como lo encontramos. Ese apoyo que me lo han proporcionado, Dios, mi familia y amigos.

Al cual quiero dedicarles esta tesis que sin su ayuda, no hubiera llegado hasta hoy el término de mi maestría, que con este logro espero que pueda retribuir a ustedes y a la sociedad todo lo que me ha brindado.

A mis papás Mariano y Gloria gracias por hacerme una mujer con valores, responsable, ser una motivación en mi vida para luchar y conseguir lo que me proponga. A mis hermanos, Mariano, Dennise, Samanta y primo Emmanuel que con sus alegrías me ayudan a olvidarme de lo malo y seguir con mi camino sin retroceder.

A mis compañeritas de casa Lluvia y Diana con la cual compartí muchas alegrías como también tristezas y supimos resolverlas juntas hoy forman parte de mi familia.

A mis amigos, Jackie, Alfonso y Lili que con ustedes crecí y nos formamos como profesionistas, los quiero mucho.

A mi comaye Cristina, con la cuál compartí muchas, horas de trabajo y travesuras en el laboratorio, también formas hoy parte de mis hermanillas.

A mis hermanillas Erika y Adriana a pesar de la distancia siempre están conmigo.

Al Dr. Fernando Romero que siempre ha sido una motivación en mi vida para desarrollarme en mi ámbito profesional.

A mis compañeros de laboratorio y del instituto biomédicas, con ustedes conocí el buen sentido de la amistad profesional.

Aunque llevo poco conociendo quiero agradecerles por estar en esta última etapa y contar con ustedes, Eduardo, Dante y Jonathan.

A todos ustedes que me ayudaron a crecer como persona, y no me dejaron rendirme, este logro es de ustedes y solo quiero decirles, GRACIAS y los QUIERO MUCHO. Son los mas importante en mi vida por ustedes sigo mi camino.



Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | I |
| Summary | II |
| 1. Introducción: | |
| 1.1 Muerte celular | 1 |
| 1.2 Apoptosis | 1 |
| 1.3 <i>Mycobacterium bovis</i> y sus características | 2 |
| 1.4 Micobacterias e inducción de apoptosis | 4 |
| 1.5 Inducción de apoptosis en modelo de bovino | 6 |
| 2. Justificación | 7 |
| 3. Hipótesis | 7 |
| 4. Objetivo general | 7 |
| 5. Objetivos específicos | 7 |
| 6. Material y métodos | 8 |
| 6.1 Cultivo de cepa AN5 de <i>M. bovis</i> | 8 |
| 6.2 Obtención de proteínas de <i>M. bovis</i> en medio de Sauton | 8 |
| 6.3 Fraccionamiento de proteínas por exclusión de peso molecular | 9 |
| 6.4 Cultivo celular de macrófagos de bovino | 9 |
| 6.5 Infección de macrófagos de bovino para inducción de apoptosis | 10 |
| 6.6 Técnica de TUNEL APO BrdU para identificación de apoptosis y análisis por medio de citometría de flujo. | 11 |
| 7. Resultados | 11 |
| 7.1 Proteínas totales de extracto soluble de biomasa AN5 y filtrado de cultivo de <i>M. bovis</i> , cepa AN5 | 11 |
| 7.2 Inducción de apoptosis por proteínas totales de extracto soluble de biomasa AN5 y filtrado de cultivo. | 12 |
| 7.3 Fraccionamiento de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular de proteínas de filtrado de cultivo. | 14 |
| 7.4 Fraccionamiento de los extractos totales proteicos por cromatografía de exclusión de peso molecular de biomasa | 16 |

| | | |
|-----|--|----|
| 7.5 | Inducción de apoptosis por fracciones proteicas por diferentes pesos moleculares | 18 |
| 8. | Discusión, conclusiones y perspectiva | 20 |
| 9. | Bibliografía. | 23 |
| | Anexos | 28 |

Resumen

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), el agente causante de la tuberculosis bovina, es capaz de inducir apoptosis en macrófagos de bovino; sin embargo, la identidad de las proteínas individuales asociados a este evento es desconocida. En este trabajo generamos fracciones proteicas del filtrado de cultivo y del extracto soluble de biomasa de *M. bovis* con el objetivo de identificar las fracciones con capacidad de inducir apoptosis en macrófagos de origen bovino. *M. bovis* cepa AN5 fue inoculada en un medio de Sauton e incubada a 37°C en condiciones estáticas durante 8 semanas. Las bacterias fueron separadas del medio de cultivo y se sonicaron para obtener el extracto soluble (ES). Las proteínas del filtrado de cultivo (CFE, por sus siglas en inglés) se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 70%. La concentración de proteína obtenida fue 4.5mg/ml (202.2mg de proteína total) y 0.2mg/ml (7.6mg de proteína total) correspondiente a ES y CFE, respectivamente, según lo estimado por el método de Lowry. Las fracciones del ES y CFE fueron sometidas a cromatografía de exclusión de peso molecular, obteniéndose 40 y 35 fracciones respectivamente en un rango de 5 a 100kDa en ambos casos. Estas fracciones se agruparon en 3 grupos: 1) 50 a 100kDa, 2) 20 a 50kDa, y 3) 10-20kDa y se utilizaron en la inducción de apoptosis de macrófagos de bovino, la cual fue medida por el método del TUNEL. Nuestros resultados mostraron que ambos extractos proteicos indujeron apoptosis independientemente de su fuente de extracción, siendo las proteínas en el rango de 20 a 50kDa las que indujeron el mayor porcentaje de apoptosis.

Palabras clave: Apoptosis, macrófagos, *Mycobacterium bovis*, CFE, extractos de proteínas.

Abstract

Mycobacterium bovis (*M.bovis*), the causative agent of bovine tuberculosis is able to induce bovine macrophage apoptosis. However, the identity of individual proteins associated to this event is not well known. In this work we proposed to generate *M. bovis* culture filtrate and cell extract protein fractions to identify their competence to induce cell apoptosis. *M.bovis* AN5 strain was inoculated in Sauton medium and incubated (37°C) in static conditions during 8 weeks. Bacterial growth was separated in biomass and culture medium. Biomass was sonicated and proteins were obtained from the soluble extract (SE). Culture medium was filtrated to obtain the culture filtrate extract (CFE) and proteins were precipitated with ammonium sulfate at 70% saturation. Protein concentration was 4.5mg/ml (202.2mg of total protein) and 0.2mg/ml (7.6mg of total protein) from biomass SE and CFE respectively, as estimated by the Lowry method. Protein fractionation from SE and CFE was accomplished by molecular weight exclusion chromatography. About forty fractions in a range from 5 to 100kDa were obtained in both cases. The protein fractions were grouped into 3 groups : 1) 50 to 100 kDa , 2) 20 to 50 kDa , and 3) 10-20kDa and used in the induction of apoptosis of bovine macrophages , which was measured by TUNEL method. Our results showed that both protein extracts induced apoptosis independently of its source extraction, and proteins in the range of 25-50kDa those who led the percentage of apoptosis.

Keywords: Apoptosis, macrophage, *Mycobacterium bovis*, CFE, protein extracts.

1. Introducción

1.1 Muerte Celular

La muerte celular es un proceso irreversible causado por un estímulo que ocasiona un daño fisiológico, bioquímico o estructural en la célula, con pérdida de las funciones vitales. Las primeras clasificaciones de muerte celular se basaron en los rasgos morfológicos, debido a que las pruebas bioquímicas que se utilizan hoy en día para su evaluación todavía no se habían desarrollado. Sin embargo, las clasificaciones morfológicas han dominado el panorama de la investigación de la muerte celular, aún después de la inclusión rutinaria de ensayos bioquímicos.

El Comité de Nomenclatura en muerte celular propuso algunos lineamientos para la clasificación de este fenómeno basados en: a) aspecto morfológico (que puede ser apoptótico, necrótico, autofágico o asociado con la mitosis), b) criterios enzimáticos (con y sin la participación de nucleasas o de distintas clases de proteasas, tales como caspasas, calpaínas, catepsinas y transglutaminasas) c) aspectos funcionales (programado o accidental, fisiológico o patológico) y d) características inmunológicas (inmunogénicos o no inmunogénicos)²⁰.

Tomando en consideración los criterios anteriores, hoy en día han surgido nuevos términos para la designación de los diferentes tipos de muerte celular dentro de los cuales tenemos: autofagia, anoikis, cornificación, etosis, catástrofe mitótica, necroptosis, parthanatos, piroptosis, apoptosis intrínseca dependiente de caspasas, apoptosis intrínseca independiente de caspasas, apoptosis extrínseca por receptores de muerte y apoptosis extrínseca dependiente de receptores¹⁴.

1.2 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, como se le definió antiguamente, es el proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra o intracelulares^{1,27}.

En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por lo tanto considerada como una muerte fisiológica, resultando en un mecanismo de eliminación de células

no deseadas, dañadas o desconocidas, como células tumorales, y que desempeña un papel en la respuesta inmune, en donde sirve como protector para la eliminación de microorganismos intracelulares. Adicionalmente, participa en la selección de linfocitos eliminando aquellos que reconocen antígenos propios. En etapas de desarrollo donde se producen células en exceso tiene un papel muy importante en la selección celular o en la formación de órganos.¹⁹

Este tipo de muerte se caracteriza por la condensación de los componentes del citoplasma, la condensación y ruptura de la cromatina, que son rodeados por la membrana celular para formar grandes vesículas, lo que lleva a la formación de cuerpos apoptóticos; el proceso es desencadenado por condiciones fisiológicas o patológicas, es dependiente de ATP y sin respuesta inflamatoria¹⁶. Para que se lleve a cabo este mecanismo de muerte, las caspasas juegan un papel central ya que son tanto iniciadoras como ejecutoras del proceso. Hay tres vías por las cuales las caspasas pueden ser activadas. Las dos vías de iniciación más comúnmente descritas son la vía intrínseca (o mitocondrial) y la vía extrínseca (o del receptor de muerte); ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis. Una tercera vía intrínseca de iniciación, menos conocida, es la vía del retículo endoplásmico.³⁴

1.3 *Mycobacterium bovis* y sus características

Mycobacterium bovis (*M. bovis*), es un bacilo de crecimiento lento, alcohol ácido resistente, aerobio y anaerobio facultativo, no esporulado ni capsulado, siendo en los animales el agente causal de la tuberculosis bovina, que guarda una estrecha relación con las bacterias causantes de las tuberculosis humana y aviar²⁶.

Aunque se considera que el verdadero hospedador del *M. bovis* es el ganado vacuno, también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales domésticos y no domésticos. *M. bovis* ha sido identificado en búfalos, bisontes, ovejas, cabras, caballos, camellos, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, tapires, alces, elefantes,

rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo y el lince³⁵.

El nombre de “tuberculosis” proviene de los nódulos, llamados “tubérculos”, que se forman en los linfonodos del animal afectado.¹¹. Esta una importante zoonosis y es una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo a la norma oficial mexicana ([NOM-031-ZOO-1995](#))²⁵

La principal ruta de entrada de *M. bovis* en el ganado bovino es aerógena, mediante inhalación (incluso con una carga bacteriana baja), y en menor medida por ingestión de organismos, pastos, agua o fómites contaminados. *M. bovis* al igual que otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis* tiene la habilidad de ser de vida intracelular facultativa⁵

El reconocimiento del bacilo se da a través de diferentes receptores que reconocen patrones moleculares (RRPM). Las micobacterias son reconocidas por sus diferentes componentes como el lipoarabinoamano (LAM) y la lipoproteína secretoria de 19 kDa este reconocimiento se llevaba a cabo por medio de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y 6 (TLR2 y TLR6) expresados en la membrana de macrófagos alveolares. De manera importante, Componentes del sobrenadante de cultivo de *Mycobacterium* son reconocidos por TLR4, mientras que el ADN micobacteriano por TLR9.²

Dentro de los mecanismos que se han reportado como una forma por la cual las micobacterias entra a la célula huésped, es la opsonización que dentro del pulmón utiliza a las proteínas surfactantes SP-A para inducir su fagocitosis por los macrófagos, a través de la inducción de la expresión de los receptores de manosa (CD26) que este a su vez regula de una forma negativa la producción de los intermediarios de reactivos de nitrógeno (IRNs),²⁸

Ya que las micobacterias consiguen ser fagocitadas modifican su medio ambiente para su supervivencia contrarrestando la acidificación y tener las condiciones de crecimiento óptimas dentro del fagosoma.

Parte del éxito evolutivo de *M. tuberculosis*, ha sido el desarrollo de las capacidades para crecer dentro de monocitos y macrófagos, las cuáles no han sido completamente explicadas, pero diferentes estudios⁸ han aclarado algunos aspectos como son: a) la capacidad para controlar la opsonización (C3b), requerida para la fagocitosis, b) estimulación de su propia fagocitosis a través de invasinas, c) modificación del fagosoma para prevenir su acidificación dentro de los macrófagos.^{8,28,2}

M.tuberculosis tiene la capacidad de inhibir la activación de los macrófagos a través del antígeno 85A, que se une a la fibronectina. Otro mecanismo de inactivación es el bloqueo de las células T mediante el liporabinomano.²⁹

No todas las micobacterias pueden sobrevivir dentro de los macrófagos, su supervivencia depende de varios factores huésped-patógeno como son: inmunodeficiencias del huésped, resistencias, carga bacteriana, virulencia o avirulencia de la cepa.⁶

La inducción de apoptosis también se ha propuesto como otro de los mecanismos de virulencia utilizados por las micobacterias.³⁹

1.4 Micobacterias e inducción de apoptosis

La apoptosis es un mecanismo del sistema inmune que sirve como defensa contra infecciones bacterianas, sin embargo también puede ser identificado como un mecanismo de virulencia de las micobacterias.³⁹

La apoptosis se puede producir cuando TNF α activa la vía extrínseca por el dominio de muerte de su receptor, que conduce a la activación de la caspasa 8; además, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, conduce a la

activación de la vía apoptótica intrínseca. Ambos caminos conducen a la activación de la caspasa 3, lo que resulta en muerte celular.⁴

En infecciones pulmonares con la cepa avirulenta de *M. bovis* BCG se ha observado apoptosis en macrófagos alveolares, mientras que las cepas virulentas pueden desarrollar estrategias que inhiben la apoptosis favoreciendo su replicación intracelular mediante la extensión de la supervivencia de la célula huésped.³⁰

A la fecha se han descubierto varias proteínas de la membrana y pared celular de micobacterias que inducen apoptosis, dentro de estas se encuentran la 19kDa²², 38kDa²¹, PE-PGRSS33⁷ y ESAT6.¹⁰ La proteína de 19kDa de *M. tuberculosis* es una glicolipoproteína, localizada en la pared celular, la cuál es secretada y considerara factor de virulencia; también se ha descubierto que es inductora de apoptosis en células THP1 y en los macrófagos derivados de monocitos; se ha encontrado que esta repuesta parece ser dependiente de caspasa 8 e independiente de caspa 9, siendo desencadenada esta señalización por medio de los TLR2.⁹

También se ha demostrado que la lipoproteína 38kDa de *M. smegmatis* tiene capacidad apoptogénica en macrófagos de humano, activando las dos vías de muerte: la extrínseca e intrínseca. La activación de apoptosis a través de la vía extrínseca, se lleva a cabo cuando la proteína activa los receptores de muerte FasL y TNF α los cuales a su vez activan a la caspasa 8 y esta estimula a la caspasa 3 ejecutora. Por otro lado, la vía intrínseca se lleva a cabo cuando la caspasa 8 rompe a bit para generar a T-bit y como consecuencia de esto se provoca un incremento de citocromo c citoplasmático que activa a la procaspasa 9 y esta última activa a la caspasa ejecutora 3³².

Otra proteína que es capaz de producir apoptosis es la PE-PGRS33 de *M. tuberculosis*, fenómeno que fue estudiado en macrófagos murinos, donde se

observó que la proteína activa a los TLR2 que lleva a la activación de TNF α , provocando un incremento de la expresión de TNFR1 y la activación de la caspasa 8, lo cual deriva en un incremento de citocromo c, que posteriormente induce la activación de la caspasa 9 y 3.³

Como se sabe ESAT6 es una proteína que provoca apoptosis, el mecanismo por el cual produce este efecto es por un incremento de Ca²⁺ intracelular y acumulación de radicales de oxígeno (ROS), lo que desencadena un estrés del retículo endoplásmico, activando a la calpaína la cual a su vez activa a la caspasa 12 que se rompe y estimula a la caspasa 4; esta última se incrementa conforme se incrementa ESAT6 y con esto se induce la apoptosis en macrófagos.¹⁸

1.5 Inducción de apoptosis en modelo de bovino

Después de infectar macrófagos de bovinos con una cepa de *M. bovis* se observó la inducción de apoptosis. En este experimento los macrófagos fueron infectados con una multiplicidad de infección (MOI) de 25:1, posteriormente se evidenció la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN a las 4h y 8h respectivamente¹⁷.

Otro estudio permitió la identificación de los elementos efectores de apoptosis inducida por *M. bovis* en macrófagos de bovino, los cuales fueron infectados con *M. bovis* (multiplicidad de infección 10:1) o tratados con un extracto proteico celular de *M. bovis* (CFE). Al realizar el ensayo del TUNEL, se demostró que los niveles de fragmentación del ADN en macrófagos de bovino inducida por *M. bovis* y CFE fueron 53.7% \pm 24% y 38.9% \pm 14%, respectivamente, mientras que las células control tuvieron una proporción basal de 8.9% a 4.1%.³⁷.

Aunque la información existente confirma que *M. bovis* induce apoptosis, la identidad de las proteínas asociadas a este proceso es aún desconocida.

2. Justificación

El mecanismo de apoptosis es considerado como parte de la respuesta inmune innata debido que puede eliminar microorganismos de vida intracelular, sin embargo, también puede ser considerado como un factor de virulencia bacteriana.

La identificación de las proteínas responsables de la inducción de apoptosis en macrófagos bovinos permitirá un mejor entendimiento de la patogénesis de la tuberculosis bovina. De igual forma, permitirá hacer uso de las proteínas inductoras de apoptosis de manera terapéutica en enfermedades como el cáncer.

3. Hipótesis

Las proteínas de *M. bovis* inductoras de apoptosis en macrófago de bovino, se encuentran en las fracciones proteicas de peso molecular por debajo de 70kDa.

4. Objetivo general

Identificar las fracciones proteicas de *M. bovis* que son capaces de inducir apoptosis en los macrófagos de bovino.

5. Objetivos específicos

- a) Realizar un fraccionamiento de las proteínas de la biomasa de *M. bovis* y del filtrado de cultivo a través de elución de proteínas por cromatografía.
- b) Evaluar en macrófagos de bovino la inducción de apoptosis con las diferentes fracciones proteicas obtenidas de *M. bovis*, por medio de la técnica de TUNEL.

6. Material y métodos

6.1 Cultivo de cepa AN5 de *M. bovis*

Para este trabajo la cepa AN5 fue gentilmente donada por el Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo primero un pre-cultivo de esta cepa en 100ml de medio Middlebrok 7H9 (DIFCO™, BD), -OADC (DIFCO™, BD) –TWEEN® 80(Sigma Ultra Aldrich) por inoculación de tres colonias e incubación a 37°C, en agitación por dos semanas.

Transcurrido este tiempo, el medio cultivo se centrifugó a 3500xg por un lapso de 15 min a una temperatura de 4°C, separando la biomasa del medio. Después se realizaron dos lavados con medio de Sauton decantando al final el sobrenadante. La biomasa se pesó y se re-suspendió en 10ml de medio de Sauton almacenándose alícuotas de 60 µg/ml de bacterias.

6.2 Obtención de proteínas de *M. bovis* en medio de Sauton

Las alícuotas del pre-cultivo de la cepa AN5 fueron inoculadas en 6l de medio de Sauton, después de 8 semanas de incubación a 37°C sin agitación se cosecharon las células. La biomasa fue separada del cultivo por filtración a través de una membrana con un poro de 0.45µm y posteriormente con una membrana con un poro de 0.22µm (Merk, Millipore, MA).

El extracto del filtrado de cultivo (CFE, por sus siglas en inglés) fue precipitado con 0.5g/ml de sulfato de amonio (High Purity), a una saturación al 70%, en agitación a 4°C por un periodo de 24 horas; enseguida se centrifugó a 10300xg por 30 minutos y se colectaron las proteínas precipitadas. Posteriormente las proteínas se dializaron empleando una membrana de MWCO 3,500 (Spectra/Por) durante 4 días¹².

La biomasa de AN5 fue resuspendida en buffer de PBS (10mM fosfato, pH 7.5, 150mM NaCl), se colocó en hielo para ser sonicada a 71.25W en un sonicador VirSonic (Virtis™), la sonicación se realizó cada 5 minutos por un periodo 2 horas, dejando 1 minuto de pausa entre pulsos. La muestra fue centrifugada a 10000xg por 15 minutos, obteniendo el sobrenadante que correspondió al extracto soluble (ES).

Ambas fracciones proteicas, ES y CFE, fueron cuantificadas en microplaca por la técnica de ácido bicinonílico (Micro BCA. Pierce™)..⁴⁰ Una muestra representativa de las fracciones proteicas totales fue sometida a electroforesis para separar por peso molecular a las proteínas en un gel de poliacrilamida al 12%.³⁶

6.3 Fraccionamiento de proteínas por exclusión de peso molecular

Las proteínas del filtrado de cultivo y de extracto soluble de la biomasa se fraccionaron por exclusión de peso molecular utilizando una columna Hiload 16/600 75 (GE Healthcare). Esta última contiene una matriz Superdex™ que por su grado de preparación está compuesta por dextrano altamente unido a agarosa. La cromatografía se llevo a cabo utilizando el equipo automatizado ÄKTA-PRIME (GE Healthcare). Para esta columna se utilizó un buffer (0.05M NaPO₄, 0.15M NaCl, con un pH 7.2) que sirvió para equilibrar y para todo el proceso de exclusión por peso molecular. La purificación se llevo a cabo de acuerdo al protocolo del fabricante.

6.4 Cultivo celular de macrófagos de bovino

Se obtuvo sangre periferica venosa de bovinos adultos saludables libres de tuberculosis (no vacunados, no expuestos), los cuales fueron facilitados por el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la

Universidad Nacional Autónoma de México. Se recolectaron 60ml de sangre de la vena yugular en jeringas que contenían 8ml de solución de ácido-citrato-dextrosa (ACD), la sangre se centrifugó a 509xg por 30 minutos. El paquete leucoplaquetario se diluyó en una porción 1:1 con PBS-citrato (NaCl 1.5mM, NaH_2PO_4 9.1mM, Na_2HPO_4 1.25mM, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$). Posteriormente, se depositó sobre un gradiente de Percoll (Pharmacia Biotech AB) con una densidad de 1.067 y se centrifugó a 1,284xg por 30 minutos. Los leucocitos de sangre periférica fueron removidos de la fase que quedó entre el plasma y la solución de Percoll; el paquete fue diluido en 30ml de plasma y se aforó a 45ml con PBS-citrato, se centrifugó a 1284xg durante un periodo de 15 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados con 45ml de PBS-citrato. El pellet obtenido fue resuspendido en RPMI Medium 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) suplementado con suero autólogo al 4%, L-glutamina 2mM, aminoácidos esenciales 0.1mM, $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ 1mM y NaHCO_3 20mM) (Gibco™ BRL, Life Technologies) (CRPMI) para facilitar la adherencia de los monocitos de sangre periférica a matraces de teflón de 5×10^6 y se cultivó a 37°C en 5% de CO_2 durante 24 horas. Pasado el período de incubación, se removieron las células no adheridas cambiando el medio de CRPMI al 12% y se incubó por 12 días con cambios del medio cada tercer día.

6.5 Infección de macrófagos de bovino para inducción de apoptosis

En los matraces de teflón se sembraron 4×10^5 macrófagos en 3ml de CRPMI al 12%, por toda una noche a 37°C en 5% CO_2 para promover la adherencia a la pared del matraz. Posteriormente, los macrófagos fueron incubados con 100µg totales de fracciones proteicas del ES, CFE y con 25µg de Camptotecina (SIGMA ADRICH)/ml como control positivo de muerte celular durante 16 horas. Después de 16 horas de incubación bajo las condiciones establecidas anteriormente, las células fueron fijadas en 1% de paraformaldehído (Electron microscopy sciences) por 15 minutos a 4°C, se lavaron 2 veces por centrifugación a 300xg por 5 minutos con 5ml de PBS, posteriormente se resuspendieron en etanol al 70% y se

guardaron a -20°C para realizar el análisis de fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL (del inglés Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling).

6.6 Técnica de TUNEL APO BrdU para identificación de apoptosis y análisis por medio de citometría de flujo

Las células fijadas de los diferentes tratamientos fueron utilizadas para medición de la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL con el kit de APO-BrdU™ (Invitrogen™, Molecular Probes) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó el marcaje de isotiocianato de fluoresceína (FICTC) para identificar las células positivas a la fragmentación del ADN, se seleccionaron 1×10^4 células por medio del citómetro de flujo (Facs Aria III, BD). Los datos se analizaron por medio de Infinicyt™ Flow Cytometry Software versión 1.7.

7 Resultados

7.1 Proteínas totales de extracto soluble de biomasa AN5 y filtrado de cultivo de *M. bovis* cepa AN5

La concentración proteica obtenida del extracto ES y CFE fue de 174mg y 7.6mg totales de proteínas, respectivamente. En la Figura 1 se muestran las bandas proteicas ES y CFE, en la primera columna se observaron veintiséis bandas del ES las cuales corresponden a los siguientes pesos moleculares: 98, 94, 84, 82, 81, 77, 75, 71, 69, 67, 65, 63, 58, 54, 50, 48, 44, 42, 36, 33, 31, 25, 21, 17, 10, 6 kDa. En la segunda columna se observan 10 bandas del CFE correspondientes a los siguientes pesos moleculares: 79, 63, 59, 43, 40, 35, 33, 21, 6 y 1 kDa.

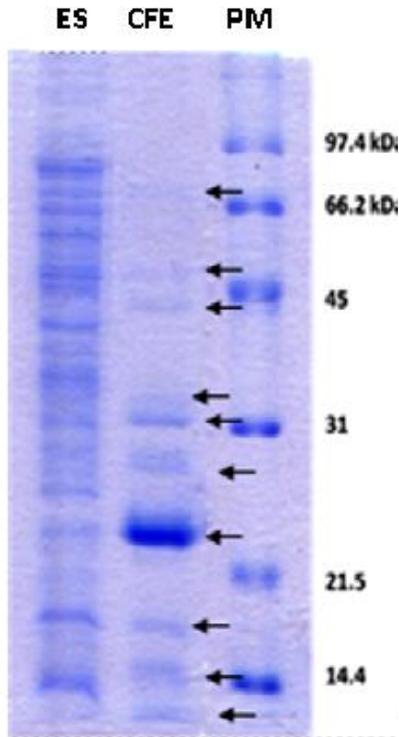


Figura 1. SDS-PAGE teñido con azul brillante de Coomassie. Las fracciones proteicas de CFE y ES de la cepa AN5 de *M.bovis*. Del extracto soluble (ES) se analizaron 20µg y 10µg de proteínas del extracto de filtrado de cultivo (CFE). Donde se muestra el número de fracciones contenidas en cada extracto.

7.2 Inducción de Apoptosis por Proteínas totales de extracto soluble de biomasa AN5 y Filtrado de Cultivo.

La Figura 2a es una muestra representativa del análisis por el citómetro de flujo de un estudio independiente de 3 replicas de inducción de apoptosis en macrófagos bovinos estimulada por la proteínas totales de CFE y ES, mostrando con color de naranja las células viables del lado izquierdo y del lado derecho representado de color verde las células que contienen el marcaje de isotiocianato de fluoresceína (FICTC) para la identificando de célula positivas a la fragmentación del DNA. La figura 2b muestra el resultado de las 3 replicas de ambas fracciones, donde se observa el porcentaje promedio de fragmentación del ADN que presentaron los macrófagos de bovino bajo las diferentes condiciones experimentales del CFE y ES demostrando que ambos extractos fueron capaces de inducir apoptosis en los macrófagos de bovino.

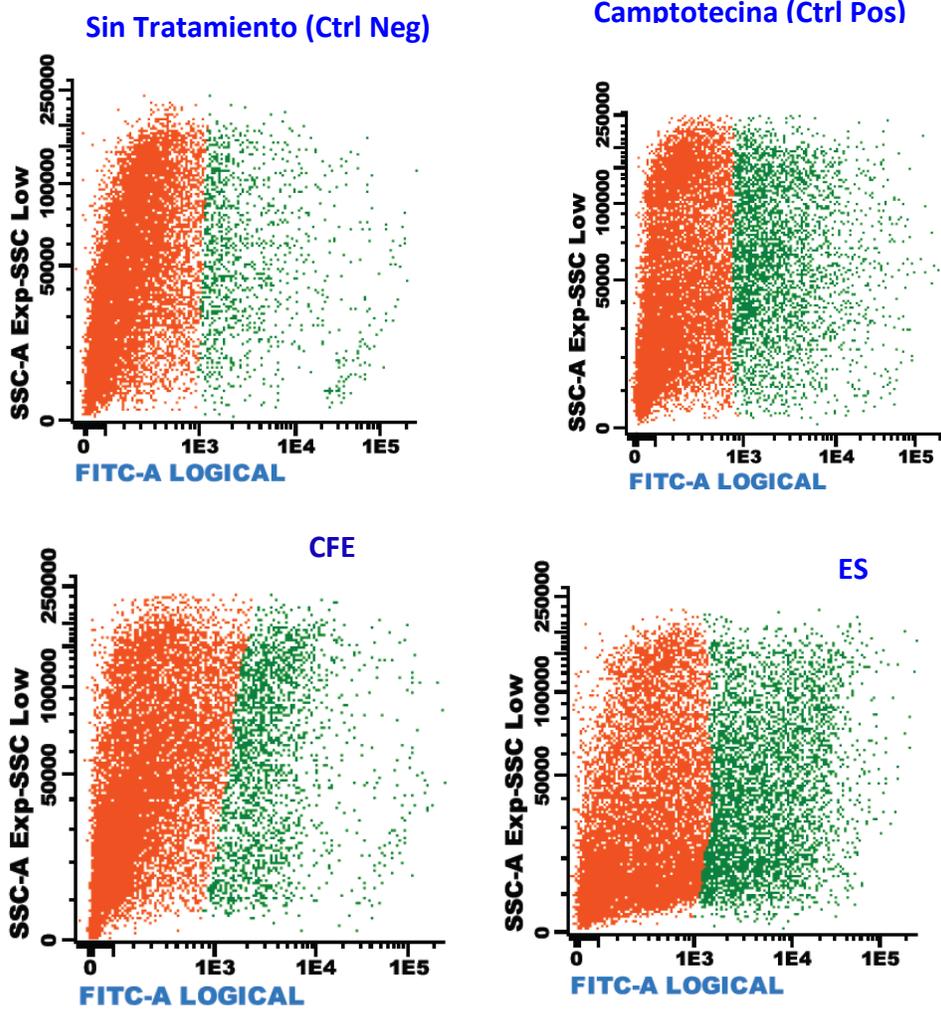
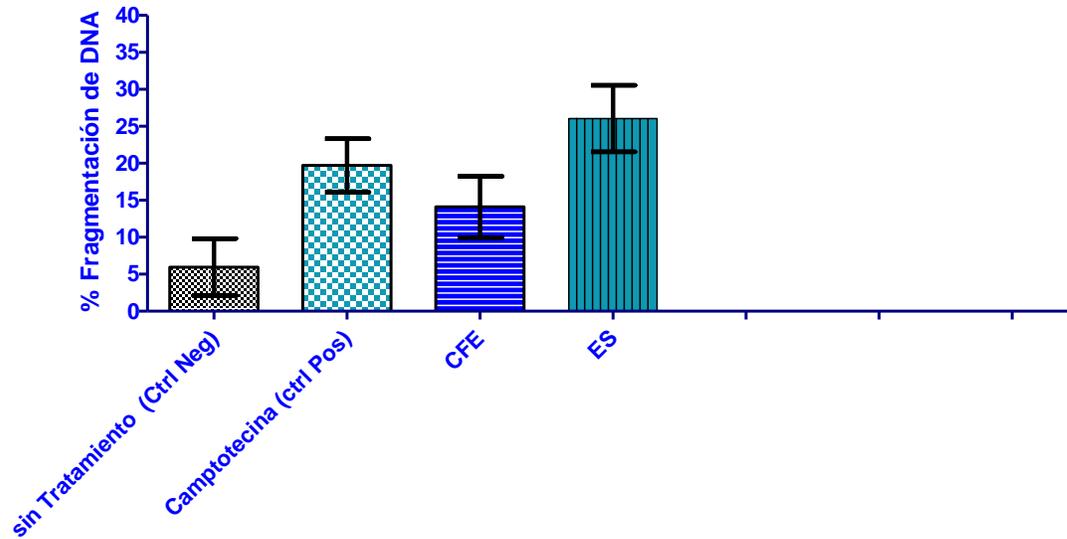


Figura 2a. Representación de gráficas del análisis por citometría de flujo de inducción de proteínas totales de CFE y ES de apoptosis en macrófagos de bovino.



Tratamientos

Figura 2b. Gráfica que representa el resultado de inducción de apoptosis por las proteínas totales de CFE y ES en macrófagos de bovino, realizado con el programa estadístico Graphpad prims 5.0 (GRAPHPAD SOFTWARE).

7.3 Fraccionamiento de proteínas por cromatografía de exclusión de peso molecular de filtrado de cultivo.

Las proteínas totales de filtrado de cultivo se separaron por exclusión de peso molecular. Las fracciones obtenidas se muestran en la Figura 3a, las líneas rojas en el cromatógrama nos indican las fracciones separadas por el cromatógrafo y en azul se representa los picos de reconocimiento y fraccionamiento proteico. En la figura 3b se muestran los geles que corresponden a las fracciones proteicas separadas por la cromatografía de exclusión de peso molecular de CFE. En los geles podemos observar que los pesos moleculares de las proteínas obtenidas se encuentran entre los 50 a 100kDa. En algunos casos fue necesario teñir los geles usando una tinción de plata debido a la baja concentración de las proteínas obtenidas.

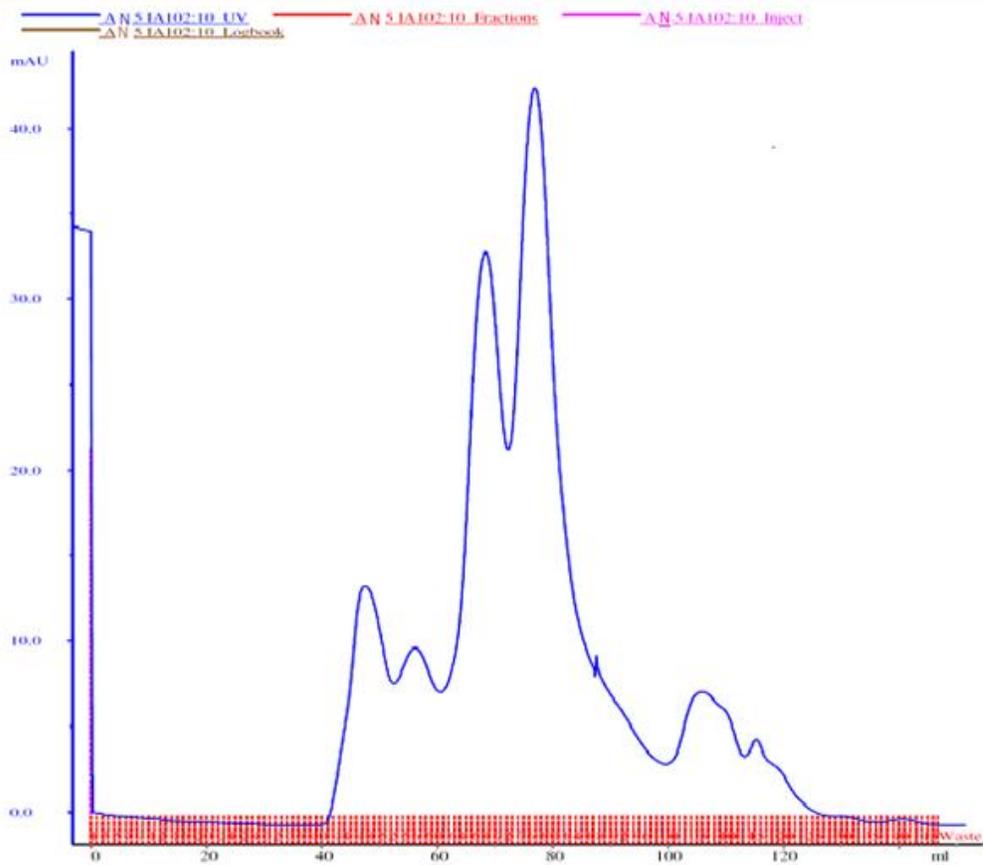


Figura 3a. Cromatógrama de fracciones de CFE por exclusión de peso molecular de *M.bovis* AN5.

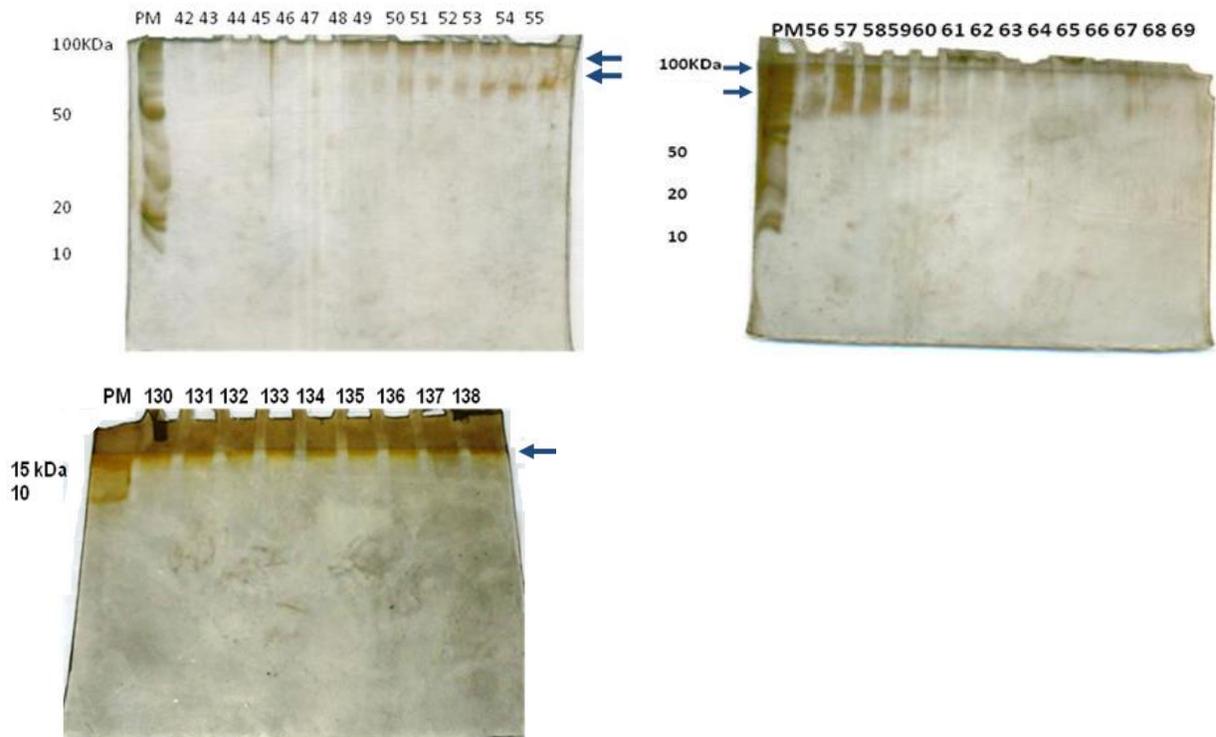


Figura 3b. Fracciones proteicas de CFE en SDS-page al 15%, que representan el cromatógrama por exclusión de peso.

7.4 Fraccionamiento de los extractos totales proteicos por cromatografía de exclusión de peso molecular de biomasa

El cromatógrama muestra las fracciones de proteínas del extracto soluble que se separaron por peso molecular (picos azules) obteniéndose un total de 80 fracciones (Figura 4a), las cuales se visualizaron mediante SDS-PAGE en geles al 12%. En la figura 4b se observan los geles del 1 al 4 que corresponden a las fracciones así enumeradas en el cromatógrama. El peso molecular de las primeras fracciones es alto, mientras que las últimas fracciones tienen el menor peso molecular. El Gel número uno, corresponde a las fracciones proteicas que se encuentran en un intervalo de 50 a 100kDa, el gel numero dos nos muestra las fracciones proteicas pertenecientes a los pesos moleculares entre 25 y 50kDa y

los geles posteriores como el número tres y cuatro tienen proteínas menores a los 25 kDa(Figura 4b).

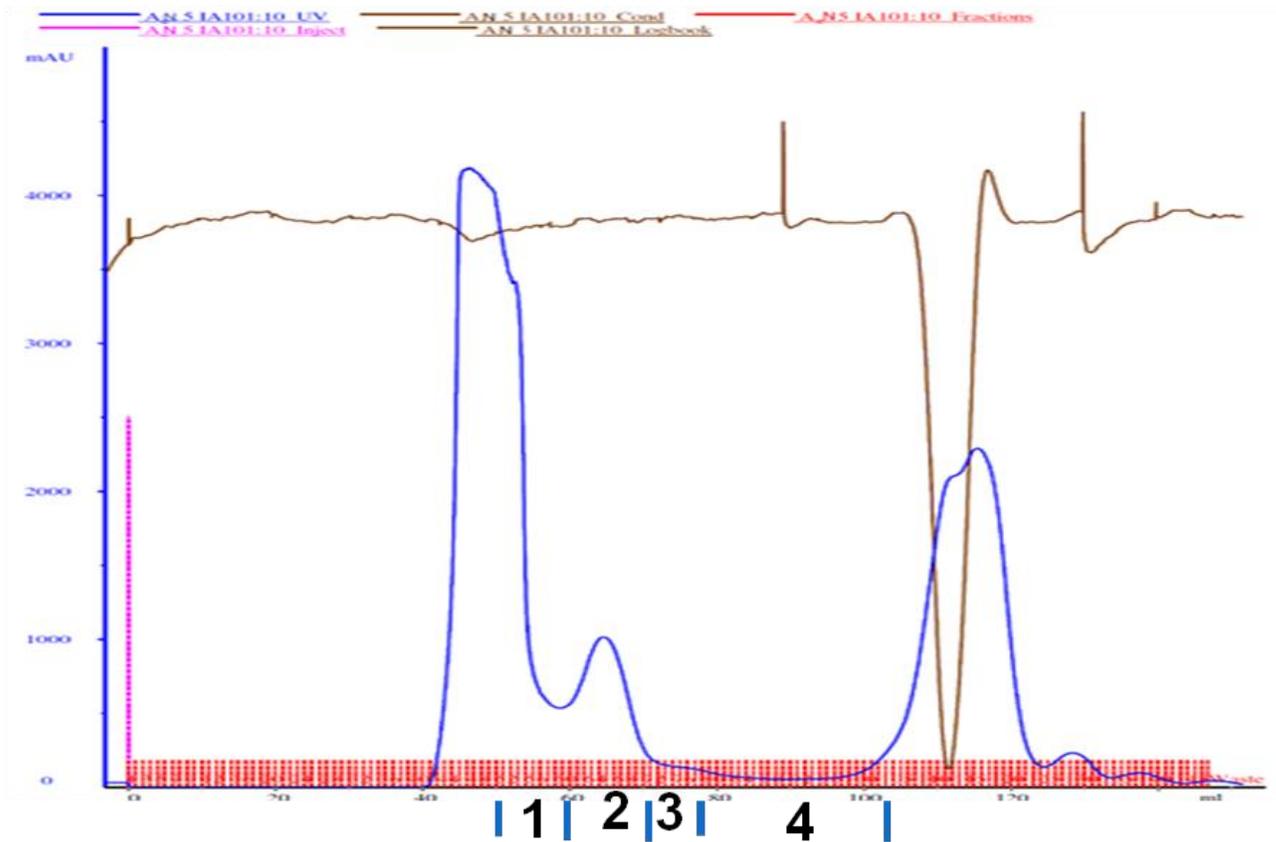


Figura 4a. Cromatógrama de fracciones proteicas de extracto soluble de *M. bovis* AN5 por exclusión de peso molecular.

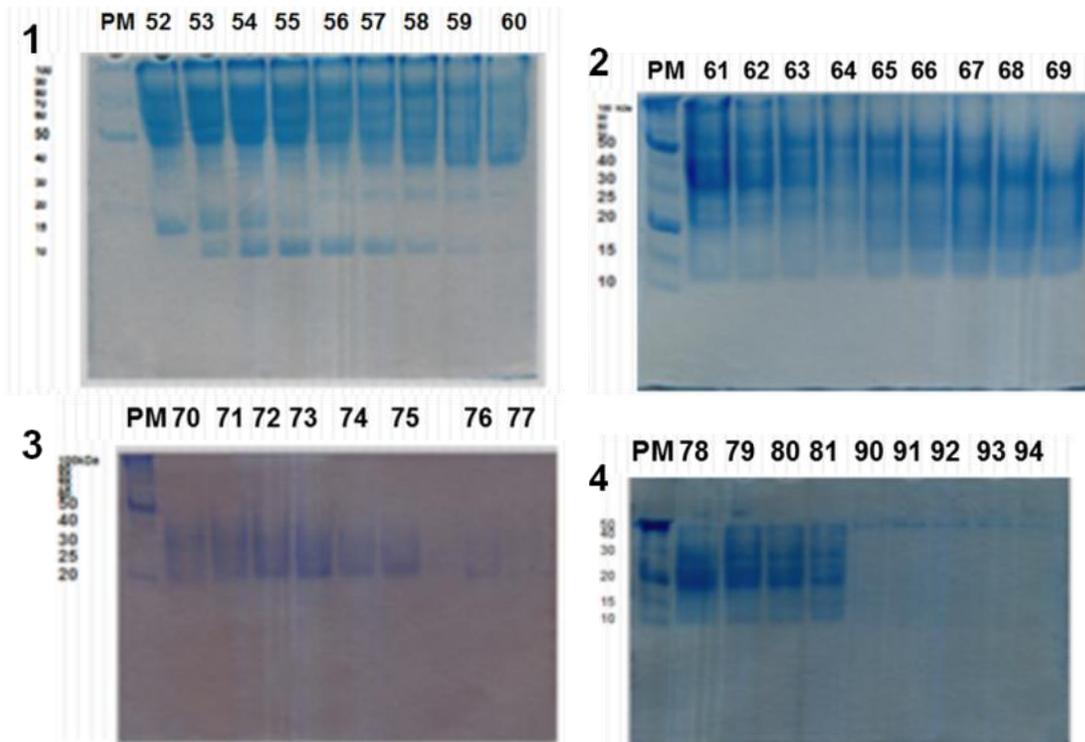


Figura 4b. SDS-PAGE. Fracciones proteicas correspondientes con su respectivo número al cromatógrama de exclusión por peso molecular del extracto soluble de *M. bovis* AN5.

7.5 Inducción de apoptosis por fracciones proteicas por diferentes pesos moleculares de ES.

Para efectos de un análisis rápido de inducción de apoptosis las fracciones proteicas fueron agrupadas de acuerdo con su peso molecular quedando de la siguiente manera: para empezar a identificar las fracciones proteicas de *M. bovis* inductoras de apoptosis, creamos 3 grupos de acuerdo a su peso molecular; 1) 50 a 100kDa, 2) 20 a 50kDa, y 3) 10-20kDa. Los grupos de fracciones también fueron incubados con los macrófagos bovinos y los resultados de TUNEL demostraron

fragmentación del ADN por parte de los grupos 1 y 2. Cada una de estos grupos contiene ± 7 bandas en cada una de las fracciones. Sin embargo, la identidad de las fracciones proteicas o de las proteínas individuales que las componen es aún desconocida (Figura 5).

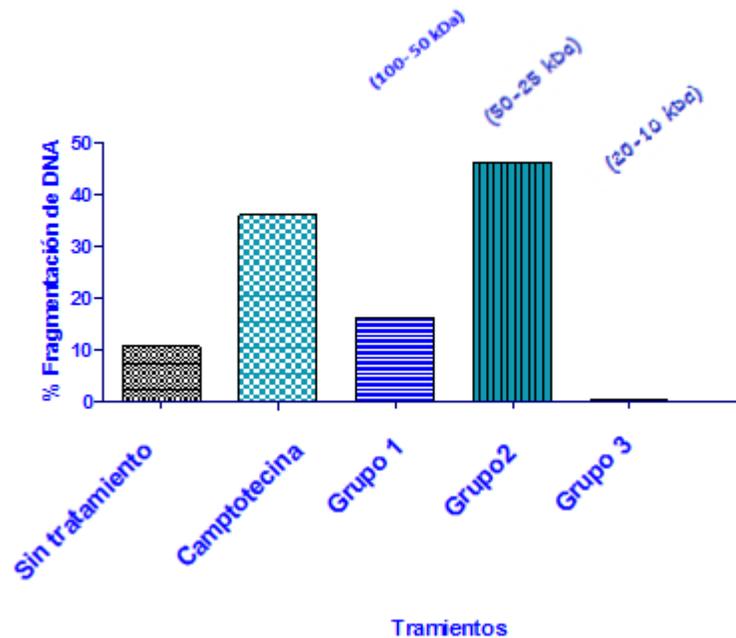


Figura 5. Representación gráfica de fragmentación de ADN inducida por grupos de proteínas separadas por exclusión de peso molecular de extracto soluble de *M. bovis* AN5. Técnica de TUNEL.

8 Discusión, conclusiones y perspectiva

El objetivo del presente estudio fue identificar fracciones proteicas de *M. bovis* inductoras de apoptosis. En nuestros experimentos usamos proteínas totales del CFE y el ES encontrando que ambas fracciones pueden inducir este mecanismo de muerte celular como se observa en la gráfica 2b. En la literatura sólo se ha descrito que ciertas proteínas de algunas micobacterias como *M. tuberculosis* o *M. smegmatis*, pueden inducir la apoptosis en macrófagos de murino o de humano. Gutiérrez- Pabello et al. demostraron que *M. bovis* provocó la muerte de macrófagos de bovino, cuyas características principales fueron la condensación de la cromatina y fragmentación de ADN, por lo cual concluyeron que se trataba de un proceso de apoptosis.¹⁷ Por su parte, Vega-Manríquez et al. demostraron que un extracto proteico de *M. bovis* (CFE) indujo apoptosis en macrófagos de bovino, la cual era caspasa independiente.³⁷ Cabe mencionar que estas son las primeras evidencias encontradas de apoptosis inducidas por *M. bovis* en macrófagos de bovinos.

Una vez que se demostró que los extractos crudos indujeron apoptosis, se decidió fraccionarlos por peso molecular para identificar las fracciones con la capacidad de inducir apoptosis. Se crearon 3 grupos de fracciones de diferentes pesos moleculares: 1) 50 a 100kDa, 2) 20 a 50kDa, y 3) 10-20kDa y encontramos que el grupo 2, que se encuentra entre los pesos de 20 a 50kDa, fue el que tuvo mayor capacidad de inducción de apoptosis, seguido del grupo 1 que contiene proteínas de 50 a 100KDa.

A la fecha ya se tienen identificadas algunas proteínas del complejo *Mycobacterium* que inducen apoptosis. Por ejemplo, la lipoproteína 19kDa dispara tanto la apoptosis como la liberación de IL -1 β durante la fase temprana de infección por micobacterias. Derrick y Morris (2007) demuestran que ESAT6 induce apoptosis en células THP-1, que son macrófagos de humanos, utilizando fluoresceína isotiocianato-anexina V y tinción caspasa intracelular. Demostrando

que la inducción de apoptosis por ESAT6 es dependiente de la dosis de la proteína y la expresión de caspasas.⁵

La baja concentración de proteínas obtenidas del CFE fue un factor limitante de este estudio, debido a que en las primeras extracciones las proteínas se obtuvieron de un cultivo de 4 semanas. A fin de obtener una mayor concentración de proteínas, el tiempo de cultivo se incremento a 8 semanas. Adicionalmente, se cambió el volumen de PBS utilizado para resuspender las proteínas y se modificó la temperatura de precipitado de 4°C a temperatura ambiente. Todas estas modificaciones resultaron en un incremento de 20 veces la concentración de proteínas (4mg/ml). Otro problema encontrado fue la discrepancia entre la presencia de uno de los picos del cromatograma y la ausencia de fracciones proteicas correspondientes a este pico, en el gel de poliacrilamida. Una de las razones que pueden explicar este resultado es la presencia de una sola proteína que contiene una gran cantidad de anillos aromáticos, los cuales pueden encontrarse con el detector de UV que marca una mayor absorbancia sin que necesariamente se correlacione con una mayor concentración de la proteína. En relación a la concentración obtenida de proteínas del ES no hay mucha información en la literatura, para utilizarla como un punto de comparación, sin embargo los 174mg totales obtenidos es una concentración adecuada para realizar los experimentos planteados. Los extractos proteicos crudos mostraron mediante análisis de electroforesis 26 y 10 bandas correspondientes al ES y CFE. En relación al filtrado de cultivo, Fifi et al. (1991) reportaron que dependiendo del número de semanas en incubación se podrían obtener entre 10 y 18 bandas, en este estudio nosotros obtuvimos resultados similares. Se puede decir que las 10 bandas obtenidas bajo las condiciones establecidas son comparables con las obtenidas por Fifi en 1991.¹³ En el experimento que se trabajó, se caracterizaron las proteínas de filtrado de cultivo de *M. bovis* a diferentes semanas, observándose un incremento en el número de bandas a medida que el cultivo se hacía más viejo, incrementándose también el número de proteínas de filtrado de cultivo. En el caso del número de bandas obtenido del ES, después de realizar

una búsqueda de información, no encontramos estudios similares con los que pudiéramos hacer una comparación. El número de fracciones obtenidas fue de 35 y 40 para CFE y ES respectivamente. En el análisis por electroforesis se observó ± 7 bandas a lo encontrado por exclusión de peso molecular.

En este proyecto se identificó que tanto las fracciones proteicas del CFE como las del ES fueron capaces de inducir apoptosis en macrófagos bovinos. Estos resultados sugieren que *M. bovis* potencialmente tiene un arsenal de moléculas capaces de inducir apoptosis en las células hospedadoras que tratan de contener su presencia. Parecería que la inducción de apoptosis es algo deseable para la bacteria que trata de esta forma, evadir la respuesta inmune de los macrófagos. La apoptosis podría servir como un mecanismo de diseminación de la infección en los tejidos. Walsh et al. (2004), comprobaron que la apoptosis es más frecuente en las lesiones paucibacilares, lo que sugiere que la activación de la apoptosis podría actuar como un mecanismo de contención para la multiplicación y propagación de bacilo.³⁹

El identificar las fracciones proteicas o proteínas individuales con esta capacidad nos permitirá tener un mejor entendimiento de la interacción entre la micobacteria y las células de la respuesta inmune.

En este trabajo se concluye que tanto las proteínas del extracto soluble como las de filtrado de cultivo son capaces de inducir apoptosis. Las proteínas de 25 a 50kDa del ES son las que tienen mayor efecto inductor. Se sugiere fraccionar mas estos grupos para conocer el comportamiento individual en inducción de apoptosis de cada una de estas proteínas, así como la descripción de la vía por la cual se está llevando a cabo este mecanismo.

La información obtenida de las proteínas se puede implementar como un proyecto a futuro para el tratamiento terapéutico contra enfermedades como cáncer u otros microorganismos intracelulares, aunado a esto se puede crear una nanoconstrucción que nos permita evaluar su efectividad terapéutica. Utilizando nanodrogas como liposomas, polímeros conjugados, micelas, dendrímeros, con

base de carbonos y nanopartículas de metales.²³ podríamos explorar la capacidad de las fracciones proteicas de *M. bovis* para inducir apoptosis en líneas de células cancerosas.

9 Bibliografía

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Bray D, Watson JD. 2002. Programmed Cell Death (Apoptosis). Molecular biology of the cell. Garland science. Vol.4:17
2. Arce –Mendoza, A., Rosas –Taraco, A.G. Morales-San Claudio, P.C. and Solís-Soto, J.M. 2008. TUBERCULOSIS: mecanismos de defensa, inmunopatogenesis y biomarcadores de resistencia y susceptibilidad. RESPYN Revista de Salud Pública Nutrición. Disponible en www.researchgate.net/...Tuberculosis_mecanismos_de_defensa...biomarcad...&gws_rd=cr,ssl&ei=x3jqVKrFIJexyATI34GwDA
3. Basu, S., Pathak, S.K., Banerjee, A., Pathak, S., Bhattacharyya, A., Yang, Z., Talarico, S., Kundu, M., and Basu, J. 2007. Mechanims of signal Transduction: Execution of macrophage apoptosis by PE-PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediates by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . J.Biol.Chem. doi:10.1074/jbc.M604379200.
4. Behar, S.M., Martin C.J., Botty, M.G., Nishimura,T., Zhao, X., Gan,H., Divangahi, M. and Remold, H.G. 2011. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. Mucosal Immunology. doi:10.1038/mi2011.3.
5. Bezos, G. J. 2009. Immune recognition and innate response in bovine tuberculosis: summary. VISAVET Outreach Journal. VISAVET Health Surveillance Centre (U.C.M.). Disponible en: <https://www.visavet.es/en/articles/immune-recognition-innate-response-bovine-tuberculosis.php>

6. Butler, R.E., Brodin, P., Jang, J., Jang, M-S., Robertson, B.D. and Glicquel, B. 2012. The balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0047573
7. Cadieux, N., Parra, M., Cohen, H., Maric, D., Morris, S.L. and Brennan, M.J. 2011. Induction of cell death after localization to the host cell mitochondria by the *Mycobacterium tuberculosis* PE-PGRS33 protein. Microbiology. Doi:10.1099/mic0.041996-0
8. McDonough, K.A., Kress, Y. and Bloom, B.R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infect. Immun. PMID: PMC280919
9. Ciaramella, A., Cavone, A., Santucci, M.B., Garg, S.K., Sanarico, N., Bocchino, M., Galati, D., Martino, A., Auricchio, G., D'Orazio, M., Stewart, G. R., Neyrolles, O., Young, D.B., Colizzi, V. and Fraziano, M. 2004. Induction of apoptosis and release of Interleukin-1 β by cell wall-associated 19-kDa lipoprotein during the course of *Mycobacteria* infection. J Infect Dis. Doi:10.1086/423850.
10. Derrick, S.C. and Morris, S.L. 2007. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. Cellular microbiology. Doi:10.1111/j.1462-5822.2007.0089.x.
11. Centro de recerca en sanidad animal (CRESA). 2011. Tuberculosis Bovina. Centro de Recerca en Sanidad Animal. Disponible en: <http://158.109.105.11/granja/tuberculosis.pdf>. Consultado en 2012.
12. Esquivel-Solis, H., Vallecillo, A.J., Benitez-Guzman, A., Adams, L.G., López-Vidal, Y. and Gutiérrez-Pabello, J.A. 2003. Nitric oxide not apoptosis mediates differential killing of *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. PLOS ONE. Doi:10.371/journal.pone.0063464.
13. Fifis, T., Costopoulos, C., Radford, A.J. and Bacic, A. 1991. Purification and characterization of major Antigens from a *Mycobacterium bovis* Culture Filtrate. Infect. Immun. Doi: PMID: PMC258330

14. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrahams, J.M., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., El-Dery, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X.; Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H-U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. and Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell death and differentiation* (2012). doi:10.1038/cdd.2011.96.
15. González- Zamorano, M., Mendoza-Hernández, G., Xolalpa, W., Parada, C., Vallecillo, A.J., Bigi, F. and Espitia, C. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteomics based on ConA-Lectin affinity capture of mannosylated Proteins. *J. Proteome Res.* Doi: 10.1021/pr800756a
16. Gustavo-Adolfo, E., 2002. *Rev. Arg. Anestesiología. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis.* Disponible en: http://www.anestesia.org.ar/search/articulos_completos/1/1/284/c.php. <http://es.calameo.com/books/0034286036aa700a31485>. Consultado en 2013
17. Gutiérrez-Pabello, J.A., McMurray, D.N. and Adams, L.G. 2002. Upregulation of thymosin β -10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infection and Immunity*. doi:10.1128/IAI.704.2121-2127.2002
18. Choi, H-H., Shin, D-M., Kang, G., Kim, K-H., Park, J.B., Hur, G.M., Lee, H-M., Lim, Y-L., Park, J-k., Jo, E-K., and Song, Ch-H. 2010. Endoplasmic reticulum stress response is involved in *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6-mediated apoptosis. *febsletters*. doi:10.1016/j.febslet.20120.04.050
19. Jordan, J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM Bioquímica*, Vol.22 No. 6, Centro regional de investigaciones biomédicas. Universidad de Castilla-La Mancha. p. 100-106.
20. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrahams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green,

- DR., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. and Melino, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death differ.*2009. doi:10.1038/cdd.2008.150.
- 21.Lim, Y-J., Lee, J-H., Choi, C.H., Kim, H-J. and Soon, Ch-H. 2015. Mycobacterium tuberculosis 38-kDa antigen induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via toll like receptor 2/4. *Apoptosis.* doi:10.1007/s10495-014-1080-2
- 22.López, M., Sky, L.M., Luu, Yvonne, D., Cooper, H. and Reiner, N.E.2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophages apoptosis through toll-like receptor 2. *J. immunol.* doi: 10.4049/jimmunol.170.5.2409
- 23.Markman, J.L., Rekechenetskiy, A., Holler, E. and Ljubimova, J.L. 2013. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews.* doi:10.1016/j.addr.2013.09.019.
- 24.Monge-Villegas, K. A , 2003 tesis Estandarización de métodos inmunoquímicos con el filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv obtenido del medio líquido Sauton. Universidad de Sonora. UNISON.pag. 49.
- 25.NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996
- 26.Pírez M., Mota M.; Morfología y estructura bacteriana. 2008. URL Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf> . Consultado en: 2013.
- 27.Porras, A. and Marzo, I. 2011. Apoptosis: una forma controlada de muerte celular. SEBBM divulgación. Disponible en: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/apoptosis-una-forma-controlada-de-muerte-celular_379

28. Rosas–Taraco A Arce-Mendoza A., 2007 TUBERCULOSIS: MECANISMOS DE DEFENSA, INMUNOPATOGENESIS Y BIOMARCADORES. RESPYN Revista de Salud Pública Nutrición. disponible en : <http://www.respyn.uanl.mx/viii/4/ensayos/tuberculosis.htm> consultado en el 2012
29. Rodriguez G.; 2008. *Micobacterias*, Temas de Bacteriología y Virología Médica; pag 384-399. Disponible en: www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf. Consultado en 2013.
30. Rodrigues, M. F., Barsante, M.M., Alves, C.C.S., Souza, M.A., Ferreira, A.P., Amarante-Mendes, G.P. and Teixeira, H.C. 2009. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. Immunology doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03062.x.
31. Rosenkrands, I., King, A., Welgingh, K., Moniatte, M., Moertz, E. and Andersen, P. 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis. doi: 10.1002/1522-2683(200011)21:17<3740::AID-ELPS3740>3.0.CO;2-3
32. Sanchez A., Espinosa, P., Esparza, M.A., Colon, M., Bernal, G. and Mancilla, R. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* 38- kDa Lipoprotein is Apoptogenic for Human- Monocyte- derived Macrophages. Scandinavian Journal of Immunology. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02193.x
33. Sonnenberg, M.G. and Belisle J.T. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, n-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. Infect. Immun. PMID:9353028 PubMed - indexed for MEDLINE] PMCID:PMC175649
34. Sosa, R.D., Brandan, N. and Jeréz, J. 2012 Apoptosis. Cátedra de bioquímica de apoptosis Facultad de Medicina UNNE. p. 1-6. Disponible en: med.unne.edu.ar/sitio/.../files/...Medicina/BIOQUIMICA/apoptosis.pdf

35. The center for food security & public health. 2009. Tuberculosis bovina. Disponible en: www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis_bovina.pdf
36. Vallecillo A.J. 2009 Tesis Expression of *Mycobacterium tuberculosis* pe_pgrs33 is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A. Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). p.200.
37. Vega-Manriquez, X., López-Vidal, Y., Moran, J., Adams, L.G. and Gutiérrez-Pabello, J.A. 2007. Apoptosis –inducing factor participation in bovine macrophages *Mycobacterium bovis*- induces caspases independent cell death. Infect.Immun.doi:10.1128/IAI.01047-06.
38. Jianhua, Z., Xianwen, R., Candong, W., Jian, Y., Yongfen, H., Ligu, L., Xingye, X. and Wang, J.; Qi, J. 2013. Analysis of secretome and Identification of Novel Constituents from Culture Filtrate of Bacillus Calmette- Guerin Using High- Resolution Mass Spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics.doi:10.1074/mcp.M113.027318
39. Walsh, D.S., Lane, J.E., Abalos, R.M. and Myint, K.S.A. 2004. Tunnel and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. FEMS Immunology & Medical Microbiology.Doi:10.1016/j.femsim.2004.04.002
40. Xolalpa, W. Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M. and Espitia, C. 2007, Identificación de novel bacteril plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. Proteomics. doi:10.1002/pmic.200600876.

1. Anexos.

1.1 Protocolos

1.1.1 Medio de cultivo Middlebrok 7H9-OADC-TWEEN 80.

En 90ml de agua destilada agregar 0.47g de medio de M.7H9, revolver y esterilizar en autoclave por 17 minutos a 121°C. Al enfriar el medio adicionar en un ambiente

estéril 10ml de OADC, 250µl de TWEEN 80 al 20% (meter en la incubadora por 24 horas como prueba de esterilidad).

Pasando el periodo de esterilidad, sembrar tomando tres colonias de la cepa AN5 que se encuentra en una caja petri con el medio Middlebrok 7H11 e inocular en el medio de Middlebrok 7H9- OADC –TWEEN 80 durante dos semanas.

Medio de Sauton.

En 500 ml de agua destilada disolver 2g de L-aspargina, 0.25g de sulfato de magnesio, 0.25g de fosfato dipotásico, 1g de ácido cítrico, 0.02g de citrato de amonio férrico, ajustar a un pH de 7.2 a 7.4, esterilizar en autoclave a 121°C con un curso de 17 minutos (poner en incubadora por 24 horas como prueba de esterilidad).

4.1 Procedimiento de preparación de los geles, electroforesis, transferencia y tinción de estos.

La mezcla para el gel separar (gel de 7x 9cm):

| Porcentaje del gel: | | | | | |
|-------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Reactivo: | 8% | 10% | 12% | 15% | 20% |
| Agua (ml) | 4.8 | 4.2 | 3.5 | 2.5 | 0.8 |
| Buffer gel separador 4X (ml) | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| Acrilamida/Bis-acrilamida*29:1 (ml) | 2.7 | 3.3 | 4.0 | 5.0 | 6.7 |
| Persulfato de amonio 10% (□l) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| TEMED** (□l) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Volumen total (ml) | 20.055 | 20.055 | 20.55 | 20.055 | 20.055 |

*Premezcla (BioRad)}

**N,N,N´N´-Tetramethylenediamine (BioRad)

Mezcla para el gel concentrador:

| Reactivo: | Porcentaje del gel: | |
|-------------------------------------|----------------------------|-------------|
| | 3% | 4.5% |
| Agua (ml) | 3.2 | 3.0 |
| Buffer gel concentrador 4X (ml) | 1.25 | 1.25 |
| Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 (ml) | 0.5 | 0.75 |
| Persulfato de amonio 10% (μ l) | 100 | 100 |
| TEMED (μ l) | 10 | 10 |
| Volumen total (ml) | 5.060 | 5.110 |

Las soluciones necesarias para el SDS-PAGE:

*Buffer gel separador 4X: el cual lleva 1,500mM de Tris-HCL, pH 8.8 y SDS al 4%.

*Buffer gel concentrador 4X: se prepara con 500mM de Tris-HCL, pH 6.8 y SDS al 4%.

Ambas soluciones almacenarlas a 4°C, protegidos de la luz, al igual que la solución de acrilamida/bis-acrilamida.

*Solución de Persulfato de amonio al 10% (1ml): esta se elabora con 0.1g de persulfato de amonio y agua destilada cbp. 1ml. Guardada a -20°C.

Soluciones necesarias para la electroforesis:

*Buffer de carga 2X: realizar con concentraciones de buffer gel concentrador 4X al 25%, SDS 0.2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.0025% y rojo de pironina 0.0025%. Mantener en congelación (-20°C).

*Buffer de corrida 10X: se produce con las concentraciones de Tris base 250mM, glicina 1.91M y SDS 10%. Así preparado el pH está en un rango de 8.2 a 8.4. No ajustarlo. Almacenar a 4°C.

4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry en microplaca.

Soluciones a preparar:

*Solución A: se requiere de una concentración de 2% de Na_2CO_3 , 0.4% de NaOH, 0.16% de Tartrato de Na y K y 1% de SDS.

*Solución B: compuesta por una concentración del 4% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Filtrar ambas soluciones por \varnothing de 0.22mm y almacenarlos a temperatura ambiente.

*Solución C: elaborada por una concentración de 99% de la solución A y 1% de la solución B. Mezclar perfectamente antes de adicionar a los pozos de la placa.

5.2 Tunel APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit

-Preparar una solución de ADN-labeling, un volumen total de 50 μl que se requiere para cada muestra. Mezclar 10 μl de buffer de reacción (tapa verde), 0.75 μl de enzima TdT (tapa amarilla), 80 μl de BrdUTP (tapa violeta) y 31.25 μl de dH_2O . Para las muestras de los volúmenes adicionales pueden ser ampliadas en consecuencia, pero sólo lo suficiente de la mezcla de la solución ADN labeling para completar el número de ensayos preparados por sesión. La solución de ADN-labeling es activa durante aproximadamente 24 horas.

- Preparar 100 μl de solución de tinción de anticuerpos para cada muestra

mediante la mezcla de 5.0µl de la Alexa Fluor® 488 de tinte anticuerpo anti-BrdU anticuerpo (tapa naranja) con 95 µl de buffer de lavado (tapa roja). Preparar suficiente solución sólo tinción de anticuerpos para completar el número de ensayos preparados por sesión.

9.2.1 Buffer para intercambio aniónico

Buffer de Unión: 200ml

- TrisHCl 20mM

- Agua mili Q 200ml

Adicionar el TrisHCl 20mM a 150ml de agua miliQ. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 200ml para después desgacificar.

Buffer de Elusión: 150ml

- TrisHCl 20mM

- NaCl 1M

- Agua mili Q 150ml

- Adicionar el TrisHCl 20mM, NaCl1M a 100ml de agua miliQ. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a 150ml para después desgacificar.

Buffer y manejo para fraccionamiento de exclusión molecular con la columna Superdex (HiLoad 16/600 75

Conexión de la columna.

Antes de conectar la columna al sistema de cromatografía, debe remover las burbujas de aire de las bombas del sistema en particular de los tubos y válvulas. Posteriormente parar las bombas para montar la columna verticalmente, retirar el tapón del alto y conectar el tubo de entrada al sistema "goteo". Retirar el dispositivo de transporte y conectar el tubo de salida de la columna a, por ejemplo al elemento del monitor. Guardar el dispositivo de transporte para su uso, cuando se almacene la columna.

Equilibrar la columna.

Se recomienda equilibrar la columna antes de su uso; asegurando que el límite de presión establecido sea el adecuado. Hay que equilibrar primero la columna o después de su largo tiempo de almacenamiento de la siguiente forma:

Usar un buffer de baja fuerza ionica de 30 cm/h (1ml/min para 16/600) en un volumen de la columna (CV).

Recomendaciones de las condiciones de corrida:

| | |
|------------------------|--|
| Velocidad de flujo | 30 cm/h (1ml/min para 16/600) |
| Volumen de la muestra | 0.5% a 4% del volumen de la columna (0.6 a 4.8 ml para 16/600) Nota: El volumen de la muestra es critica para la separación. |
| Preparación de muestra | Disolver la muestra en el buffer de corrida y filtrarlo con un poro de 0.22µm o centrifugar a 10,000 x g durante 10 min. |
| Buffer | 0.05M NaPO ₄ , 0.15M NaCl, pH 7.2 o seleccionar el buffer adecuado para su siguiente paso de purificación. Para evitar interacciones dependientes de pH no iónicos con la matriz, incluir al menos 0,15 M de sal en el buffer(o usar un buffer con un equivalente a la fuerza iónica). |
| Regeneración | Para regenerar la columna después de cada corrida hacerlo con un volumen de la columna del buffer de corrida a 30cm/h (1ml/min 16/600) |

Después usar dos volúmenes de la columna (CV) de buffer, por ejemplo 0.05M NaPO₄, 0.15M NaCl, pH 7.2 a 50 cm/h(1.6ml/min para 16/600).

Nota: Al momento de usarlo debe de ser en condición fría o utilizar un buffer con alta viscosidad, ajustar la velocidad del flujo de manera que no se exceda el límite de presión.

Entrega y almacenamiento de la columna

La columna empaquetada es entregada en 0.2 M de acetato de sodio, 20% de etanol (Superdex 30 y Superdex 75) o 20% de etanol (Superdex 200). La columna almacenada por más de dos días debe de lavarse con cuatro volúmenes de la columna de agua destilada y equilibrarse con cuatro volúmenes de la columna de 0.2; de acetato de sodio, 20% de etanol solo, dependiendo de la media. Usando el dispositivo de trasporté para prevenir que entre el aire a la columna y se destruya el empaquetado de la columna. Conectar el dispositivo de transporte al tubo capilar de la salida de la columna. Iniciar la bomba y llenar el dispositivo de arriba con aproximadamente el 50% total del volumen del dispositivo.

Nota: Degasificar y filtrar todas las soluciones con un poro de 0.22 μ m para incrementar el tiempo de vida de la columna. Buffer y solventes con alta viscosidad afectaran la presión y velocidad del flujo.