



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Posgrado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN BCG MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
LUIS CONTRERAS CASTRO**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Luis Servín González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**Dra. Bertha María J. González Pedrajo
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

Ciudad de México, Abril, 2016



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.

Reconocimientos

Este trabajo se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana (PIMM) de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal. El proyecto se realizó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD2010-C01-140998 y Presupuesto Operativo 2014 y 2015. El aspirante a maestro en Ciencias Bioquímicas Luis Contreras Castro fue becario de CONACyT con número de registro 443289.

Agradecimientos

A mi familia, por estar ahí conmigo siempre, aun cuando no me diera cuenta.

A Natalia Galeano Báez, por el apoyo incondicional y por darme la oportunidad de tener los mejores años de mi vida.

A la Dra. Yolanda López Vidal, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A mis colegas del PIMM, por brindarme su apoyo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Bertha María J. González Pedrajo, Dr. Luis Servín González, por sus aportes a nivel tanto académico como técnico.

Al Dr. Raúl Azael Agis Juárez por su apoyo en el aprendizaje de las técnicas utilizadas.

A la M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar, del Laboratorio de Biología Molecular, del Instituto de Biología, UNAM, por su ayuda en la secuenciación de los amplificadores utilizados en este trabajo.

A la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, así como a la M. en C. Cristina Parada Colín, técnico académico titular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por su apoyo en la purificación de los extractos de proteína utilizados en este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, Dra. Norma Adriana Valdez Cruz, Dr. Ricardo Oropeza Navarro, Dra. Gohar Gevorgyan Markosian y Dr. Julio César Carrero Sánchez, por sus aclaraciones y correcciones del presente trabajo.

Al Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) por el estímulo brindado para asistir al Tercer Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias en Cuatro Ciénegas Coahuila, del 3 al 7 de octubre de 2013.

Por último, a la UNAM, por permitirme la oportunidad de ser formado como uno de sus profesionales de excelencia.

Índice

Reconocimientos	2
Agradecimientos	3
Índice	4
Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Tuberculosis.....	9
Vacuna BCG	12
Vacuna BCG México	14
Células dendríticas.....	16
Proteínas de estrés	19
Proteína alquil-hidroperoxirreductasa subunidad C (AhpC)	21
Justificación	26
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Objetivo General	27
Objetivos Particulares	27
Metodología	28
Clonación del gen <i>ahpC</i> de BCG México 1931 en el vector pTrcHisA en <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	29
Obtención de la secuencia del gen <i>AhpC</i> y diseño de oligonucleótidos.	29
Amplificación del gen por PCR	29
Clonación del gen	29
Sobreexpresión del vector por inducción con IPTG	31

Mejora de las condiciones de inducción	31
Expresión de la proteína.	31
Purificación de las proteínas con cola de histidina.....	32
Purificación de las proteínas con cola de histidina.	32
Detección de la proteína por anticuerpo antihistidina.	33
Estimulación de células dendríticas murinas con la proteína.....	33
Obtención de CD a partir de precursores de médula ósea de ratón	33
Co-cultivo de las CD con la proteína recombinante y Citometría de Flujo	34
Determinación de la secreción de citocinas.....	35
Resultados.....	37
Clonación del gen <i>AhpC</i> de BCG México 1931 en el vector pTrcHisA en <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	37
Obtención de la secuencia del gen <i>AhpC</i> y diseño de oligonucleótidos.	37
Amplificación del gen por PCR	38
Clonación del gen	40
Sobreexpresión por inducción con IPTG	42
Purificación de las proteínas con cola de histidinas.....	47
Purificación.....	47
Detección de la proteína	49
Estimulación de células dendríticas murinas con la proteína	51
Análisis por citometría de flujo de la expresión de receptores	51
Determinación de la secreción de citocinas.....	57
Discusión	61
Conclusiones	67
Perspectivas	67
Bibliografía.....	68
Anexo I	75
Anexo II	76

Abreviaturas

AhpC: Alquil hidropoxi-reductasa	MHC II: Complejo principal de histocompatibilidad tipo II)
Ab: Anticuerpo	MNT: Micobacterias no tuberculosas
Ag: Antígeno	MOI: Multiplicidad o índice de infección
APC: Células presentadoras de Antígeno	OMS: Organización Mundial de la Salud
BCG: Bacilo de Calmette-Guérin	PBS: Solución salina amortiguada con fosfatos
BrEt: Bromuro de Etidio	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
BSA: Albúmina Sérica Bovina	PD: Muerte Programada
CBA: Cytometric Bead Array	PD-L: Ligando de PD
CD80,CD40,etc.: Cluster de diferenciación	PE: Ficoeritrina
CDs: Células Dendríticas	Prxs: Peroxirredoxinas
Células NK: Asesinas naturales	pH: potencial de Hidrógeno
CSP: Proteína de choque de frío	PPD: Derivado proteico purificado
DC-SIGN: Molécula de adhesión intercelular específica de CDs	PVDF: Polifluoruro de vinilideno
DNA: Ácido Desoxirribonucleico	RD: Regiones deletadas
dNTP: Desoxinucleótidos	RNA: Ácido Ribonucleico
DO: Densidad óptica	rRNA: Ácido Ribonucleico ribosomal
DU: Duplicaciones	ROS: Especies reactivas de oxígeno
FBS: Suero fetal bovino	RPMI: Medio Roswell-Park-Memorial-Institute
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos	SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
HPC: Hematopoyético	SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
HSP: Proteína de choque de calor	SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
HTP: Proteína de Alta temperatura	TA: Temperatura ambiente
IFN- γ , INF- α : Interferon gamma, alfa	TB: Tuberculosis
IgG2: Inmunoglobulina de tipo G isotipo 2	TLR: Receptor tipo Toll
IL-12, IL-6, IL-10.: Interleucina 12, 6, 10.	TNF: Factor de necrosis tumoral
IMF: Intensidad Media de Fluorescencia	VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida	
LB: medio Luria	
LPS: Lipopolisacárido	
mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero	

Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa que representa un grave problema de salud pública debido a su elevada incidencia mundial. La única forma de prevenir la enfermedad, consiste en la vacunación durante el primer año de edad con la vacuna viva atenuada Calmette-Guérin (BCG), la cual tiene un índice de protección variable del 0 al 80%. A inicios del siglo XX, se preparó en el Instituto Pasteur a partir del cultivo de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*. Diferentes países recibieron una alícuota de ésta cepa y como consecuencia de los métodos de preservación y preparación de la vacuna, se diversificó en subcepas BCG (como BCG México) con características fenotípicas, genotípicas e inducción de la respuesta inmune particulares.

Un estudio en el que el proteoma de *M. bovis* BCG México fue enfrentado contra sueros de pacientes infectados con *M. tuberculosis*, infectados con micobacterias no tuberculosas, sujetos derivado proteico purificado (PPD) positivos y sujetos PPD negativos, demostró la antigenicidad de varias proteínas de la vacuna. Algunas de estas proteínas están relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo, resultando ser particularmente interesante la proteína alquil hidropoxi-reductasa (AhpC), debido a que se sabe que se encuentra en la pared celular de BCG México y está asociada con el primer evento de contacto con las células dendríticas, las cuales juegan un papel muy importante al enlazar la respuesta inmune innata y adaptativa.

Por esta razón, el presente trabajo consistió en localizar el gen que codifica para la proteína de estrés oxidativo en el genoma de *M. bovis* BCG México para clonarlo en un vector, y así sobreexpresarlo y purificarlo en *E. coli*. Con la proteína recombinante purificada, se estimuló a células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea de ratón, a las que se les determinó la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras inducidas, así como la expresión de citocinas liberadas en el medio, con el fin de comprender el papel de la proteína en la respuesta inmune innata de la vacuna *M. bovis* BCG-México. Se encontró un aumento en la expresión de la molécula coinhibidora PDL2, así como un aumento en la expresión de citocinas IL-6 e IL-10 en el medio. Se deben realizar más estudios para poder verificar si la proteína podría estar activando parcialmente a la célula dendrítica, de modo que pudiera estar modulando la respuesta inmune.

Abstract

Tuberculosis is a highly contagious bacterial infection and a serious public health problem due to its high global incidence. The only way to prevent it is by vaccinating during the first year of life with the live attenuated strain *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), which has a protection percentage of 0-80%. Starting the 20th century, this vaccine was prepared at the Pasteur Institute from an attenuated *M. bovis* strain. Different countries received samples of this strain, and due to the different preservation and preparation methods available at that time, the vaccine was diversified in several sub-strains (like BCG-Mexico) with particular phenotypic and genotypic characteristics, as well as differences in its immune response.

A study in which the proteome of *M. bovis* BCG-Mexico was challenged against sera of patients infected with *M. tuberculosis*, Non-tuberculous Mycobacteria, PPD positive and negative subjects, showed the antigenicity of several proteins of the vaccine. Some of these proteins are related to the oxidative stress response, being of particular interest the protein alkyl hydroperoxide reductasa (AhpC), due to its location in the cellular wall and its relation with dendritic cells (being one of the first proteins making contact with the immune response), which play a very important role integrating adaptive and innate immune responses.

The present work consisted in finding the gene for the AhpC protein in the genome of BCG Mexico in order to clone it, overexpress it in *E. coli*, and purify the recombinant protein. Bone marrow derived dendritic cells were then stimulated with the protein, to determine its expression of co-stimulatory and co-inhibitory molecules, as well as the expression of cytokines released, in order to understand the role of the protein in the innate immune response of *M. bovis* BCG Mexico. An increase in the expression of the co-inhibitory molecule PDL2 was found, as well as an increase in the expression of IL-6 and IL-10. More studies are needed in order to verify if the protein could partially activate dendritic cells, modulating the immune response in the process.

Introducción

Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto contagiosa causada por microorganismos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual consiste de micobacterias que presentan un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16S, pero difieren en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. Este complejo está constituido por las especies *M. tuberculosis*, *M. cannetti* y *M. africanum* que tienen como hospedero al humano; *M. pinnipedii* y *M. microti* a roedores; *M. caprae* a rumiantes y *M. bovis* a bovinos (3).

El género *Mycobacterium* es el único miembro que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae*, la cual pertenece al orden de los Actinomycetales y a la clase *Actinomycetes*. La definición del género está basada en tres criterios: ácido alcohol resistencia, estructura de los ácidos micólicos y alta proporción de guanina y citosina (GC) en el ADN. *M. tuberculosis* fue la primera especie descrita en 1882 y es la especie tipo de este género. Dentro del género *Mycobacterium* se describieron más de 150 especies, algunas de ellas patógenos estrictos del hombre y otros animales como *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. paratuberculosis* y *M. microti*. Otras especies, las más numerosas, frecuentemente denominadas como Micobacterias No Tuberculosas (MNT), son saprófitas o patógenas oportunistas del hombre y otros animales (3).

La tuberculosis principalmente afecta los pulmones (TB pulmonar) aunque también ocasiona daño en otros sitios (TB extra pulmonar como la TB meníngea y la TB miliar). Esta enfermedad es diseminada por vía aérea; cuando la persona enferma con TB pulmonar, tose y libera bacterias por medio de pequeñas gotas de saliva de entre 1 y 5 µm que contienen al bacilo (4). En general, el 10% de la población infectada con *M. tuberculosis* desarrolla la enfermedad en los extremos de la vida; sin embargo, la probabilidad de desarrollarla es mayor en personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH/I). La TB es mucho más común en hombres que en mujeres, y afecta mayoritariamente a la población económicamente productiva; se estima que alrededor de dos tercios de los casos ocurren entre los 15 y 59 años (5).

La TB representa un problema serio de salud a nivel mundial. En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la declaró emergencia de salud pública global, en una época en la que ocurría un estimado de 7 a 8 millones de casos y alrededor de 1.3 a 1.6 millones de muertes anuales. En 2010, se estimaron alrededor de 8.5 a 9.2 millones de casos y de 1.2 a 1.5 millones de muertes incluyendo personas con VIH. La TB es la segunda causa de muerte líder en el mundo por enfermedades infecciosas (la primera es el VIH, que se estimó causó 1.2 millones de muertes en 2014) (5, 34). La TB se presenta en todo el mundo; sin embargo, la mayor incidencia se concentra en los países en vías de desarrollo (Figura 1); es frecuentemente asociada a las clases socioeconómicas bajas, siendo características en estas regiones la desnutrición, el hacinamiento humano y las condiciones de higiene inadecuadas. Como se mencionó con anterioridad, el grupo con mayor riesgo de padecer TB lo constituyen las personas con VIH, en los que el riesgo anual de desarrollar la enfermedad incrementa en un 7-10%, ya sea por reactivación endógena o por re-infección (3).

Tasa estimada de incidencia de TB, 2014.

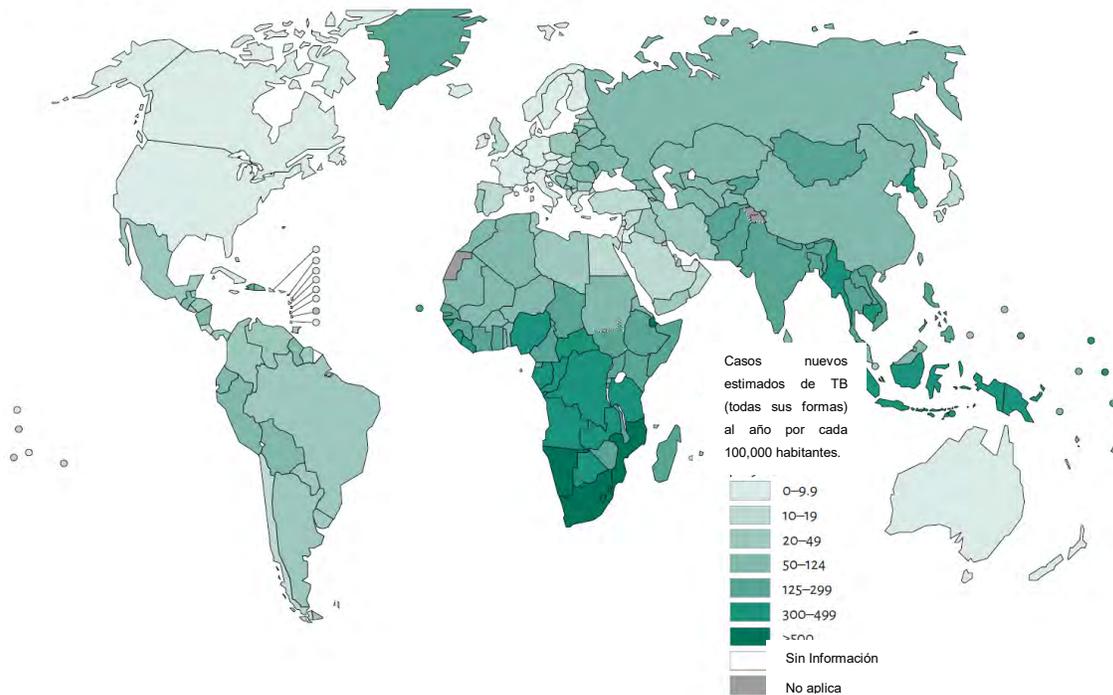


Figura 1. Distribución mundial de la tuberculosis. En la figura se muestran los casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes estimados para el año 2014. Modificado de (34)

La respuesta inmune generada por la micobacteria en el cuerpo humano es compleja. La micobacteria ingresa al organismo a través de las vías respiratorias, resultando en la

localización de las micobacterias en las vías bajas del sistema respiratorio y en el tejido alveolar, tras lo cual entran en contacto con células dendríticas profesionales presentadoras de antígeno (CDs) y con macrófagos residentes, las cuales son importantes células inmunitarias que se encuentran detectando las mucosas (19, 20).

Estas células reconocen a las micobacterias a través de diversos receptores como los tipo Toll (TLR), las Moléculas de adhesión intercelular específicas de células dendríticas (DC-SIGN), entre otros, los cuales pueden favorecer tanto la fagocitosis del microorganismo como el ensamblaje de sus antígenos con las moléculas principales de histocompatibilidad de clase I y II (MHC-I y MHC-II), necesario para la subsecuente presentación de los antígenos a otras células del sistema inmune como los linfocitos T (LT). Las CDs son especialistas en la presentación antigénica: después de interactuar con el microorganismo en el sitio de la infección, inician su migración hacia los nódulos linfáticos durante la cual desarrollan un proceso de maduración en términos de la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, la sobre-expresión de MHC-II y la secreción de citocinas pro-inflamatorias como las interleucinas 12, 6 y 1 β (IL-12, IL-6 e IL-1 β), así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que la capacitan para realizar una presentación antigénica efectiva a los LT vírgenes favoreciendo su activación, proliferación y conversión hacia LT efectores cooperadores o citotóxicos (19, 20).

Una vez activados por las CDs, los LT efectores migran al pulmón en respuesta a la inflamación y median la protección al activar a los fagocitos infectados para eliminar a la micobacteria. La respuesta celular generada por las micobacterias es generalmente de tipo Th1 (respuesta de LT cooperadores activados principalmente por IL-12), la cual es una respuesta protectora caracterizada por la secreción de interferón gamma (IFN- γ), que favorece la inmunidad mediada por fagocitos que son activados para destruir a los microorganismos e induce el cambio de isotipo en los linfocitos B (LB) principalmente hacia las inmunoglobulinas (IgG2) opsonizadoras y fijadoras del complemento. Cabe mencionar que esta respuesta dependerá en gran parte de varios factores como la carga microbiana, y la inmunocompetencia del hospedero, entre otros (19, 20). (Figura 2)

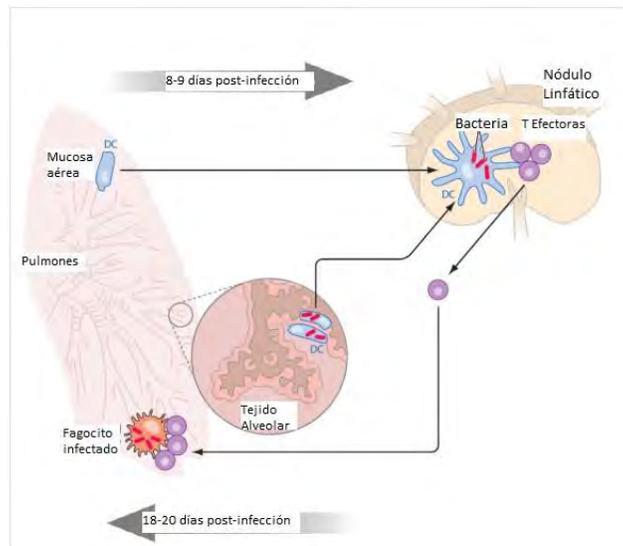


Figura 2. Respuesta inmune a *M. tuberculosis*. Modificado de (20). Las CDs residentes del sitio de la infección captan los antígenos y viajan a los nódulos desarrollando procesos de maduración para presentar los antígenos a los LT. La presentación antigénica eficiente permite la activación de LT efectoras que migran al pulmón para participar en el desarrollo de la respuesta inmune protectora.

Vacuna BCG

La vacuna viva atenuada de Calmette-Guérin (BCG), una cepa atenuada del bacilo *M. bovis*, es actualmente la única recomendada por la OMS para la prevención de la TB. Esta vacuna fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur de Lille, Francia entre 1908 y 1921, a partir de una cepa virulenta de *M. bovis* aislada de leche producida por una vaca con mastitis tuberculosa (4). La cepa fue atenuada después de realizar 230 cultivos, cada 2 semanas, en medio de papa glicerizada con bilis de buey. A partir de la obtención de la cepa atenuada, en 1921, la cepa BCG se mantuvo mediante cultivos continuos hasta 1960, año en el cual se implementó la liofilización como medio de preservación de la vacuna (8).

Alrededor de 1924 se comenzó a distribuir la BCG a nivel mundial. Debido a la fase inicial de atenuación (230 cultivos), se esperaba que las cepas BCG distribuidas compartieran mutaciones comunes, mientras que la segunda fase (distribución a nivel global) llevaría a mutaciones adicionales específicas para cada cepa de BCG individual, para generar distintos “linajes” dependientes de la zona en la que fue procesada y conservada, hasta la

liofilización (6). A continuación se describen las distintas mutaciones encontradas en las distintas cepas existentes (Figura 3).

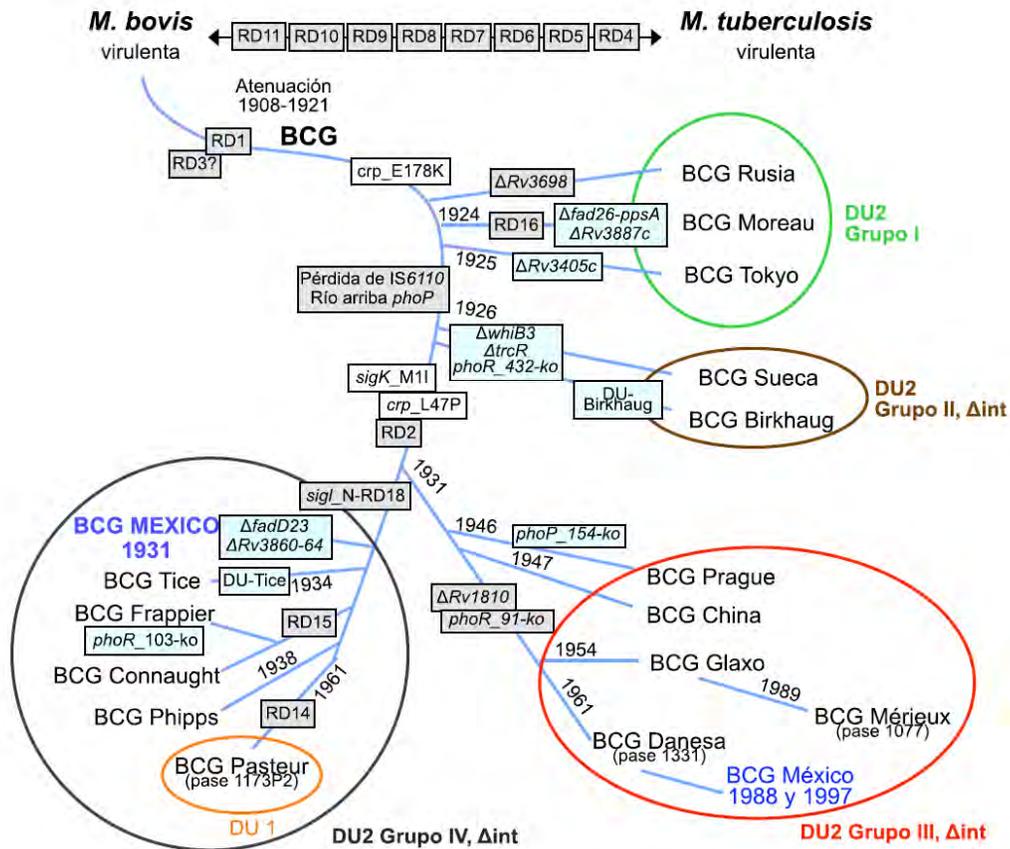


Figura 3. Genealogía de las BCGs, construida con base en regiones deletadas (RD) y duplicaciones (DU). La figura representa el orden cronológico en el que las BCGs derivaron del Instituto Pasteur y sus mutaciones (8).

El grave impacto de estas diferencias genéticas, dadas como variaciones antigénicas en la eficacia protectora, generó una preocupación considerable a nivel internacional. Algunas de las discrepancias en la eficacia protectora observadas en la vacuna BCG para distintas pruebas son, al menos parcialmente, explicadas por las diferencias genéticas entre las cepas vacunales (7).

Estudios recientes sugieren que las diferencias genéticas entre las cepas vacunales de BCG son muy importantes. Por medio del análisis del transcriptoma *in vitro* entre diferentes cepas, se encontraron diferencias en la expresión genética bastante significativas (9). Otro estudio de expresión genética, identificó 2 grupos de patrones distintos de respuesta inmune inducida por diferentes cepas de BCG (10).

Como consecuencia de influenciar la expresión genética, la diversidad de las cepas vacunales demostró tener un efecto en la inmunogenicidad, virulencia, y viabilidad, entre otras propiedades que intervienen en la protección contra la tuberculosis. Incluso, la corta sobrevivencia de algunas cepas vacunales de BCG en el huésped, se encuentra asociada a estímulos al sistema inmune que podrían ser insuficientes pues resultan en la desaparición temprana de la inmunidad protectora comparando con cepas modificadas de *M. tuberculosis* (7).

No obstante la problemática descrita, desde 1974, la vacunación con BCG fue incluida en el Programa Expandido de Inmunización de la OMS; con un estimado a la fecha de más de 3 mil millones de individuos inmunizados con BCG y alrededor de 100 millones de dosis administradas anualmente, siendo la vacuna más empleada en humanos (6). La inmunización con la vacuna BCG demostró su eficacia en niños, a quienes confiere una protección hasta el 80% en contra de TB grave y diseminada, como TB meníngea y miliar (7). En contraste, la eficacia protectora de la vacuna BCG en adultos y adolescentes varía del 0 al 80%, como consecuencia de las diferencias previamente expuestas (6).

Vacuna BCG México

En México, el Instituto Nacional de Higiene reporta que la vacuna BCG comenzó a aplicarse en 1925. Durante este tiempo la producción de la vacuna BCG se realizó a una escala muy pequeña y bajo solicitud del médico; hasta que en 1949 fue inaugurado el Instituto de BCG, mismo que en la actualidad se encarga de la preparación, distribución, aplicación y control de la vacuna BCG en todo el país. Durante este período la vacuna BCG se produjo a partir de la BCG enviada directamente del Instituto Pasteur de París con la designación No. 870 Serie I (denominada BCG México). La vacuna que se producía en este instituto además fue aprobada en 1963 por la división de control de productos biológicos de la OMS, a partir de un estudio comparativo con la vacuna patrón elaborada en el Staten Serum Institut, Dinamarca; y mostró ser tan aceptable como ésta. Por ello esta vacuna fue distribuida a todo el territorio nacional y a diversos países de Sudamérica (4, 8).

La producción de la vacuna BCG México continuó hasta 1970, año en que se cambia el método de producción al de "lote semilla" (vacuna BCG liofilizada), empleándose la BCG Danesa 1331 para la producción, a fin de evitar que la BCG sufriera una posible variación

genómica, y en caso de que esto ocurriese, fuera sustituida por otra cepa BCG con diferentes propiedades, además de conservar una calidad homogénea de la vacuna BCG. En 1998 la vacuna BCG Danesa dejó de producirse definitivamente en México y a partir de ese año se usa indistintamente la vacuna BCG disponible comercialmente. Lo anterior originó que en México se use una gran diversidad de vacunas BCG, por lo cual la eficacia protectora de la vacuna es incierta. Existen también reportes, poco frecuentes, de una falta de abastecimiento de la vacuna BCG en los sistemas de salud, lo que origina la ausencia de vacunación por periodos de hasta 6 meses. Además, la importación de la vacuna BCG también lleva a un incremento en el costo de la vacunación, aún cuando el personal entrenado en la preparación de esta vacuna se encuentra activo laboralmente (8).

Todo lo anterior llevó a la caracterización de la vacuna BCG México con el objetivo de producirla en un futuro para ser utilizada como vector para el diseño de nuevas vacunas de segunda generación en contra de la TB. Por esto mismo, se comenzó con la secuenciación de su genoma con el trabajo de Orduña y colaboradores en el 2011. Esta caracterización genómica llevó al descubrimiento de varias diferencias con otras cepas, como nuevas regiones deletadas designadas RDMex02 y RDMex03 y varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (11).

En este trabajo también se caracterizaron proteínas con respuesta inmunológica al enfrentar el proteoma de la vacuna BCG México con sueros de pacientes con TB, micobacteriosis, PPD positivos y negativos con anticuerpos de isotipo IgG2 (11). De este modo se encontraron 37 proteínas capaces de generar una respuesta inmunogénica protectora de tipo Th1. Las proteínas previamente reportadas pertenecen a distintas familias y desempeñan funciones diversas, resaltando para este trabajo tres proteínas relacionadas con la respuesta a estrés, la proteína alquil hidroperoxireductasa subunidad C (AhpC), la chaperonina GroEL2 y la proteína de estrés oxidativo hspX. Estas proteínas son generadas por los microorganismos en respuesta a situaciones de estrés, como la presencia de especies reactivas de oxígeno y la ausencia de nutrientes, entre otros factores; y favorecen su sobrevivencia. Esta capacidad de modificar el entorno a su favor, las posiciona como uno de los tipos más importantes de moléculas que las micobacterias producen ya que les permite evadir algunos mecanismos que el sistema inmune lleva a cabo para su eliminación (12). Muchas de las proteínas de respuesta a estrés en microorganismos son altamente inmunogénicas, además de que se encuentran muy

conservadas entre géneros y especies. Aún más, algunas de estas proteínas se han encontrado en pared celular, lo que da una idea de la importancia que tienen en la inmunidad (13). En este trabajo se decidió dirigir el enfoque en la proteína AhpC porque además de lo mencionado anteriormente, está involucrada en la resistencia hacia uno de los antibióticos de primera línea en contra de la tuberculosis, la isoniazida, además de que se sabe que ayuda a la micobacteria a sobrevivir dentro de macrófagos y células dendríticas (45, 22, 27).

Se cuenta con amplia información respecto a la función de algunas de estas proteínas en el contexto de la respuesta inmune adaptativa contra *M. tuberculosis*, tanto así que algunas de estas proteínas son empleadas en el desarrollo de nuevas vacunas debido a su inmunogenicidad; sin embargo, se tiene muy poca información relacionada con la respuesta inmune innata. Se cuenta con menos información relacionada con BCG México, aunque es posible comparar las propiedades de las proteínas de *M. tuberculosis* y BCG México, debido a la identidad del 100% entre las mismas. En cuanto a la respuesta inmune adaptativa (respuesta inmune específica dirigida), el trabajo de Orduña y colaboradores (11) demostró que estas proteínas generan una respuesta inmunogénica de tipo Th1 (mediada por anticuerpos IgG2), no obstante, se desconocen los mecanismos que se llevan a cabo en el contexto de la inmunidad innata (que es la respuesta inmune de primera línea, poco específica) determinantes en el advenimiento de la respuesta inmune adaptativa protectora.

Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) son células profesionales presentadoras de antígeno de origen hematopoyético ampliamente distribuidas en el organismo. Se originan en la médula ósea a partir de células progenitoras hematopoyéticas (HPC), bajo el control de factores de crecimiento y el contacto con las células estromales de la médula ósea. Las CDs pueden generarse a partir de progenitores tanto linfoides como mieloides, que derivan de éste progenitor pluripotente. Las CDs, granulocitos y macrófagos pueden obtenerse de precursores de médula ósea en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lo que confirma que estas células tienen un precursor en común (3).

Las CD son reconocidas por su capacidad de iniciar una respuesta inmune y estimular respuestas de memoria al activar LT vírgenes y LT activados y/o efectores, respectivamente. Se localizan en mucosas y en tejidos linfoides, lo que les permite capturar antígenos. Poseen un sistema endocítico y de procesamiento especializados indispensables para la presentación de antígenos. Se activan en respuesta a un gran espectro de microorganismos y estímulos ambientales. Su activación puede determinar la especialización funcional de las células. Se dividen en subpoblaciones, cada una con propiedades particulares que pueden inducir respuestas inmunes diferentes. El inmunofenotipo que las CD adquieren posterior al estímulo producido por daño tisular, inflamación o infección puede ser maduro o inmaduro. Las CD inmaduras se encuentran distribuidas ampliamente en tejidos linfoides y no linfoides, con una tasa de recambio relativamente rápida. Esta alta tasa de recambio está asociada a una de las características particulares de esta población celular, que es su capacidad de “transitar” y “migrar” de un tejido a otro (3, 19).

En la periferia, las CD funcionan como “centinelas” monitoreando la exposición en las superficies del cuerpo a los antígenos. En esos sitios, las CD se consideran inmaduras, poseen altos niveles de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) que codifica para el MHC II (molécula en la que cargarán los antígenos que logren procesar para presentarlos a los linfocitos, junto con moléculas de co-estimulación, como CD-80, CD-86 y CD-40, así como un microambiente de citocinas favorable para poder activar a los linfocitos) en el citoplasma, pero baja expresión en la membrana. Además, las CD inmaduras se caracterizan por la baja expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie y son incapaces de producir interleucina 12 (IL-12), citocina proinflamatoria necesaria para la proliferación de LT. Las CD inmaduras presentan una gran capacidad para fagocitar microorganismos y antígenos, pero son pobres estimuladoras de la respuesta por LT (51). Las CD son estimuladas a migrar por daño al tejido, inflamación o infección. El proceso de migración hacia la periferia, vía vasos linfáticos aferentes a los ganglios linfáticos está asociado con la maduración fenotípica y funcional de éstas células. Bajo el arribo al ganglio linfático, la CD adquiere la capacidad para estimular eficientemente a los LT vírgenes o “naive”. Esta activación está relacionada con la regulación positiva de la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de las CD, involucradas en la interacción y estimulación de LT (52). Es así como altos niveles de expresión de MHC II, y de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, contribuyen a la eficiencia de las CD como células presentadoras de antígeno (sin olvidar, como se mencionó

anteriormente, un ambiente favorable de citocinas). Por otro lado, puede haber un inmunofenotipo parcialmente maduro. Las CD_s parcialmente maduras expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias, pero altos niveles de la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10). Además de las moléculas coestimuladoras, las CD_s pueden expresar ligandos del receptor de muerte programada PD-1 y 2 (PD-L1 y PD-L2), expresado en LT activados, los cuales son considerados moléculas coinhibidoras. En particular, se han descrito las propiedades coinhibidoras de PD-L2 en la respuesta de LT (Figura 4) (3, 21, 19).

Algunas de las citocinas involucradas en este proceso se describe a continuación:

El papel principal de IL-6 en la inmunidad innata es estimular la síntesis de proteínas de la fase aguda por los hepatocitos y de esta forma contribuir a la respuesta de la fase aguda, estimula la producción de neutrófilos a partir de progenitores de médula ósea, habitualmente actuando de manera concertada con factores estimuladores de colonias. Por otra parte, el TNF-alfa (TNF) y la IL-1beta son los principales mediadores de la respuesta inflamatoria aguda, estimulando la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activando a estas células para que erradiquen a los microorganismos. La interleucina 12 (IL-12), como se explicó, es una citocina proinflamatoria necesaria para la proliferación de linfocitos T.

IL-10 es conocida como una citocina anti-inflamatoria o inmuno-supresora que funciona como amortiguador de la respuesta inmune al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, la expresión de moléculas coestimuladoras y la presentación de antígenos.

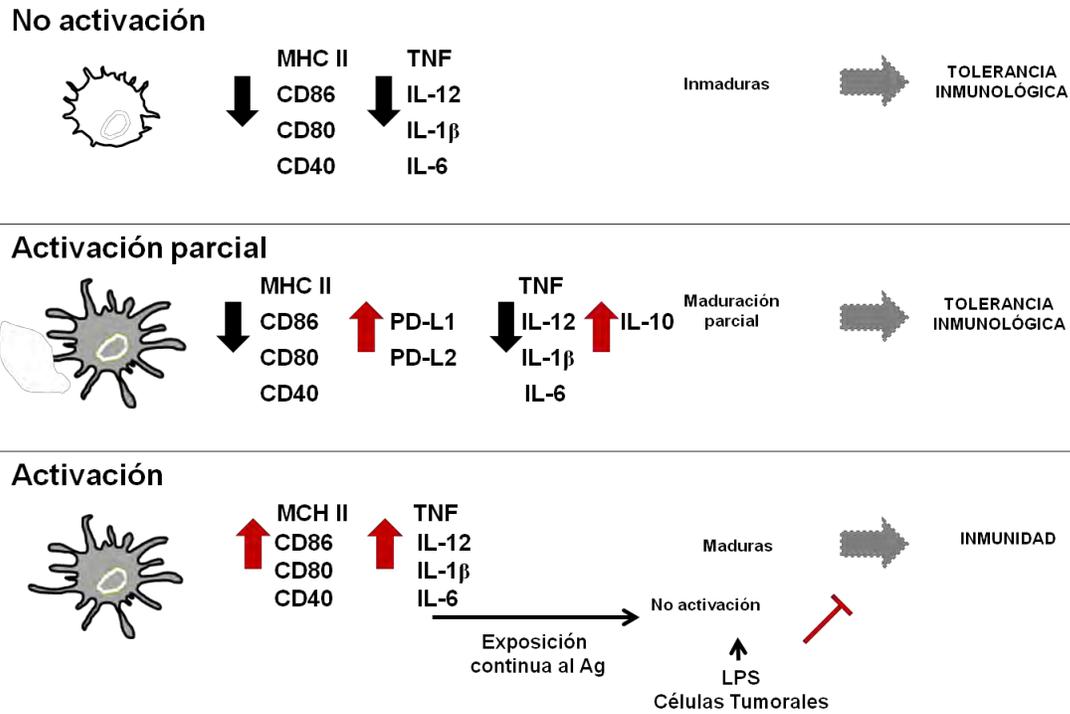


Figura 4. Fenotipos de células dendríticas inmaduras, parcialmente maduras y maduras. Moléculas coestimuladoras y coinhibidoras presentadas en cada fenotipo de activación de las CD, así como su respectiva elevación o disminución de producción de citocinas, lo cual lleva a distintos estados de protección: Inmunidad o tolerancia inmunológica. En el caso de la activación, se debe remarcar que una exposición continua al antígeno (Ag) puede llevar a la no activación del fenotipo (Modificada de Mendoza).

Proteínas de estrés

Las bacterias poseen habilidades limitadas para modificar y adaptarse a su ambiente. Utilizan sistemas de procesamiento de información para monitorear sus alrededores constantemente. Dentro de las respuestas más apropiadas hacia los cambios del ambiente se encuentran cambios en su fisiología, su desarrollo, su virulencia y su localización. En la mayoría de las bacterias, existen redes reguladoras globales que modulan la expresión de genes. Estos cambios se encuentran mediados en gran parte por la iniciación de transcritos de mRNA por proteínas que se unen al ácido desoxirribonucleico (DNA), factores σ y sistemas de transducción de señales. Esta respuesta adaptativa les permite responder rápidamente y de manera efectiva a los cambios del ambiente que impiden su crecimiento o incluso amenazan su vida. La

homeostasis celular es alcanzada por una multitud de reguladores transcripcionales y detectores, los cuales registran y responden ante cambios de temperatura (choque térmico de calor o de frío), de pH externo (choque ácido y alcalino), especies reactivas de oxígeno (peróxido de hidrógeno y superóxidos), osmolaridad (choque h́per e hipo osmótico), y disponibilidad de nutrientes, por mencionar algunos de los más importantes (14). Estos cambios usualmente son llamados factores de estrés, y pueden presentarse de manera repentina o crónica. Cada factor de estrés activa o reprime a un grupo de genes, los que codifican para proteínas de estrés (15). A su vez, mientras algunos genes son sólo inducidos por un factor, otros responden a varios. Por último, se debe mencionar que de las moléculas detectoras de estrés, fueron descritas principalmente tres: el DNA, el mRNA y las proteínas, siendo las principales estas últimas. (14, 15).

De manera general se describirá cada una de las principales situaciones de estrés de la bacteria, para proceder después a describir las proteínas de interés:

- Choque térmico y altas temperaturas – La primera (choque térmico) responde a un incremento de temperatura temporal, y resulta en la expresión pasajera de genes que codifican para chaperoninas del tipo proteína de choque calórico (Heat Shock Proteins ó HSPs). Éstas ayudan a proteger proteínas de la posible desnaturalización. La segunda responde a un cambio absoluto en la temperatura, es constitutiva y resulta en la expresión de genes que codifican para proteínas de alta temperatura. Éstas ayudan a cambios conformacionales generales para adaptarse a la temperatura (High Temperature Proteins o HTPs) (14).
- Choque frío – Este factor de estrés influencia varios parámetros vitales como la difusión de solutos, la cinética enzimática, la fluidez de la membrana y afecta la conformación, flexibilidad y la topología de macromoléculas tales como DNA, ácido ribonucleico (RNA) y proteínas. Dos principales problemas a resolver por la bacteria son la fluidez de la membrana que se ve reducida por temperaturas frías, impidiendo el movimiento de proteínas integrales y la inducción de estructuras secundarias en las moléculas de mRNA bloqueando la traducción. La bacteria responde con proteínas de choque frío (Cold Shock Proteins o CSP) y con una “reprogramación” extensiva en su expresión genética, disminuyendo el metabolismo (14).

- Estrés osmótico – Un aumento (cambio hiperosmótico) o una disminución (cambio hipoosmótico) en la osmolalidad externa provoca que el agua fluya a través de la membrana resultando en la concentración o dilución del citoplasma. Estas alteraciones resultan en cambios en el volumen, en viscosidad, y la tensión de la membrana, así como en su potencial y en su gradiente iónico, además del cambio de la actividad termodinámica entre el agua y las demás moléculas. Para responder a estos cambios, las células acumulan o sueltan sales de bajo peso molecular gracias a proteínas integrales como canales y transportadores osmorreguladores por medio de distintos mecanismos (14).
- Especies reactivas de oxígeno (ROS) – Especies como los radicales superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son generados de manera continua como productos de la respiración. La reacción de H_2O_2 con hierro libre genera radicales hidroxilo (OH). Estos radicales son altamente reactivos y reaccionan con casi todas las biomoléculas (16). ROS también son generadas por el sistema inmune del huésped (macrófagos, neutrófilos) como primera línea de defensa en contra de las bacterias invasoras. Las bacterias han desarrollado una serie de mecanismos para combatir estas especies, en su mayoría en forma de enzimas especializadas en transformarlas en moléculas menos reactivas (14).
- Cambio de pH externo – Cambios drásticos en el pH celular suelen resultar en la pérdida de la función de varias proteínas en incluso en su desnaturalización. Existen ciertos promotores de genes que responden a cambios de pH, aunque estos mecanismos no están muy bien descritos. Se sabe que algunas bacterias emplean sistemas de transducción de señales de dos componentes para monitorear cambios de pH y que utilizan HSPs para proteger su maquinaria, aunque no esté sucediendo un cambio de temperatura (14).

La proteína analizada en este trabajo pertenece al grupo que se encarga de las especies reactivas de oxígeno (AhpC).

Proteína alquil-hidroperoxirreductasa subunidad C (AhpC)

El óxido nítrico (NO) se encuentra presente tanto en suelos como en el aire y es producido por bacterias, animales y plantas. Los iones superóxido (O_2^-) surgen en todos los microorganismos que habitan ambientes aeróbicos. De este modo, es probable que muchos microorganismos encuentren peroxinitritos ($OONO^-$), un producto de NO y O_2^-

que se forma de manera limitada por su difusión, y se descompone rápidamente por la protonación generada por su isomerización a nitrato (NO_3) mientras genera radicales hidroxilo (OH) y radicales de dióxido de nitrógeno (NO_2), siendo estos dos más reactivos que sus precursores de peroxinitrito. El peroxinitrito tiene potencial oxidativo, inflamatorio, mutagénico y citotóxico, de aquí que la habilidad de las células para contender con los peroxinitritos es central en el desafío con NO (25).

En el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, estar dentro de macrófagos la expone a un ambiente tóxico dentro del fagosoma con bajas cantidades de oxígeno y nutrientes. Bajo estas condiciones, las enzimas y agentes reductores que protegen a *M. tuberculosis* en contra de peróxidos, óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno se vuelven muy importantes para su sobrevivencia (22). El sistema de defensa de antioxidantes de *M. tuberculosis* es inusual en varios aspectos. Esta bacteria (así como sucede con todos los actinomicetos) carece del sistema de respuesta de glutatión peroxidasa, que es el sistema antioxidante utilizado por su huésped mamífero (26). Su metabolismo de H_2O_2 depende de una catalasa/peroxidasa conteniendo un grupo hemo llamada KatG. Además depende de una variedad de enzimas relacionadas con las tiorredoxinas y con micotioles (22, 26).

Se ha demostrado que las mutantes de KatG proveen resistencia al antibiótico de primera línea en contra de la tuberculosis, isoniazida, la cual requiere su activación por KatG. La sobrevivencia y virulencia de estas cepas se atribuye a que la bacteria deja de depender de KatG para responder ante ROS, utilizando mejor un sistema antioxidante basado en una peroxidasa de tipo peroxirredoxin de 2-Cys, llamada AhpC (26, 24).

Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia ubicua de enzimas antioxidantes, las cuales están divididas en tres clases, que dependen del número de residuos conservados de cisteína en su región N-terminal: Prxs de 2-Cys típicas, atípicas y las Prxs 1-Cys. La típica de 2-Cys es la más grande y se identifica por la conservación de dos cisteínas redox-activas: la cisteína peroxidática y la que resuelve el bloqueo del sitio catalítico después de llevar a cabo la reacción. Las atípicas usan el mismo mecanismo que las típicas pero son funcionalmente monoméricas. Por último, las Prxs 1-Cys, solo tienen la cisteína peroxidática ya que no necesitan resolver ningún bloqueo (28). Aunque la AhpC de *Mycobacterium tuberculosis* pertenece a la clase Prxs 2-Cys, tiene tres residuos de cisteína directamente involucrados con su acción (se desconoce el papel de la tercera cisteína). Es una proteína homóloga con las AhpCs de otros microorganismos, teniendo mayor similitud con las secuencias encontradas en bacterias Gram positivas

(*Corynebacterium diphtheriae* 68%, *Streptomyces viridosporus* 62%) que en las negativas (*Escherichia coli* 36%, *Bacillus subtilis* 41%, *Staphylococcus aureus* 39%). En micobacterias, las Prxs pueden destoxificar varias ROS, como H_2O_2 , alquil hidroperóxidos, así como peroxinitritos. La amplia actividad de la AhpC de *M. tuberculosis* puede explicar su habilidad para sustituir la pérdida de la actividad de la KatG (22, 27).

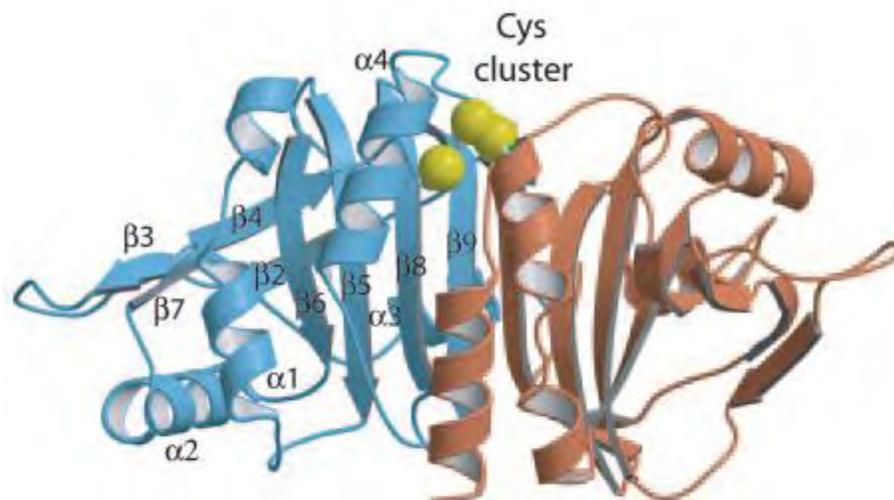


Figura 5. Dímero de la AhpC con cisteínas (Cys) en amarillo (29).

La AhpC tiene que ser constantemente reducida, y el reductor más común de la AhpC en bacterias, la disulfuro reductasa AhpF, no se encuentra en *M. tuberculosis*, y su sistema reductor básico aparentemente parece no responder al estrés oxidativo como responde en enterobacterias, ya que el gen *oxyR* también está ausente. La AhpC de *Mycobacterium*, en vez de esto puede ser reducida por la AhpD (el proceso se describe brevemente en la figura 6), una enzima que contiene un motivo CXXC y puede ser reciclada por ácidos lipoicos unidos a proteínas del complejo α -ceto-ácido deshidrogenasa, o por las tioredoxinas micobacterianas TrxC y TrxR. Las micobacterias contienen dos peroxirredoxinas más, la AhpE, que es 1-Cys y cuya función sigue sin describirse, y la tiol peroxidasa Tpx, la cual es una tioredoxín peroxidasa, que está caracterizada como la peroxidasa más efectiva de la micobacteria (26).

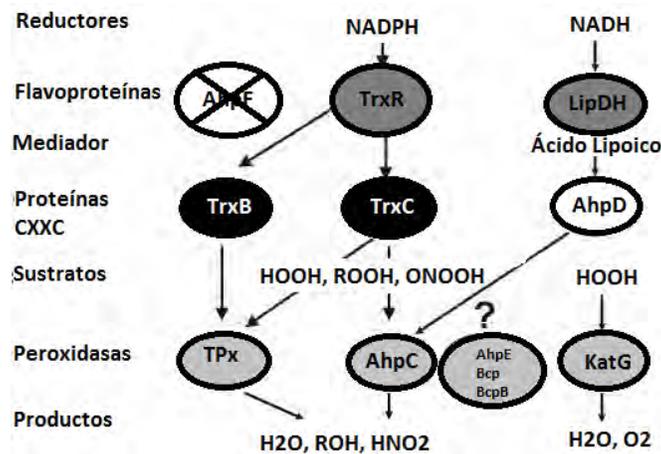


Figura 6. Esquema de proteínas involucradas en la reducción de ONOO- y ROS en micobacterias. Aunque la proteína KatG es la utilizada comúnmente, hay otra serie de proteínas involucradas en la eliminación de ROS. La proteína AhpC puede eliminar peroxinitritos, y es reducida por AhpD o por TrxC. Dichas proteínas requieren de otras, las cuales dependen de moléculas con poder reductor como NADH y NADPH. La peroxidasa más efectiva del sistema es TpX. Por último, no se conoce el uso de la proteína AhpF (22).

Aunado a todo esto, AhpC ha demostrado ser vital para la sobrevivencia de la bacteria dentro de macrófagos (48), lo que vuelve a esta enzima junto con su sistema, blancos atractivos para la síntesis de nuevos antibióticos. De hecho, se sabe que uno de los principales factores de virulencia del complejo de *M. tuberculosis* es AhpC, por todas las características mencionadas anteriormente (45), además de ayudarle incluso a sobrevivir en el estado de latencia (47, 44).

Además de encontrar esta proteína en *M. tuberculosis*, recientemente se ha encontrado en otros estudios, además del de Orduña (11), que AhpC es una proteína integral en la expresión genómica de una amplia variedad de cepas de BCG (46). En cuanto a respuesta inmunológica no se tiene información, más allá de que la proteína ayuda a la micobacteria a sobrevivir en macrófagos; aunque recientemente también se describió que podría ayudar a su sobrevivencia en células dendríticas (27, 49). Debido a que los estudios sobre esta proteína son algo recientes, no se ha realizado la producción de manera comercial de AhpC purificada.

Los anteriores hallazgos, aunado con la función de las CDs como enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa, ponen de manifiesto la relevancia de estudiar el inmunofenotipo adquirido por las CDs inducido por el estímulo con la proteína AhpC, para

correlacionar la antigenicidad y producción de anticuerpos con la maduración de éstas células, lo cual indicaría que uno de los mecanismos involucrados en el establecimiento de la respuesta protectora es la activación de LT efectoras realizada por la presentación antigénica que las CD4 maduras estimuladas con AhpC estarían realizando.

En el grupo de trabajo se encuentran definidos los protocolos de estudio para las CD4 derivadas de médula ósea de ratón (BMDC), por lo cual el propósito de este trabajo radica en la caracterización de las BMDC estimuladas con la proteína de estrés inmunogénica AhpC de la vacuna BCG México, después de su sobreexpresión y purificación.

Justificación

Se han detectado anticuerpos de isotipo IgG2 en sueros de pacientes infectados con *M. tuberculosis*, micobacterias no tuberculosas, y sujetos PPD positivos, contra la proteína altamente conservada de estrés oxidante AhpC en la vacuna *M. bovis* BCG México, indicando que dicha proteína participa en la respuesta inmune adaptativa. Se desconoce el efecto de esta proteína sobre el asentamiento de la respuesta inmune innata, por lo que su estudio ayudaría a definir el mecanismo mediante el cual la vacuna confiere protección.

La proteína AhpC recombinante producida en *E. coli* permitirá el estudio de la interacción de dicha proteína con las células dendríticas, mismas que constituyen el enlace principal entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, lo cual generará una mejor comprensión sobre la respuesta inmune establecida por el estímulo con BCG México.

Hipótesis

La proteína de estrés AhpC recombinante de *M. bovis* BCG inducirá la maduración de células dendríticas murinas.

Objetivos

Objetivo General

- Emplear la proteína AhpC recombinante de BCG México para estimular células dendríticas murinas y determinar la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras inducidas en su superficie celular.

Objetivos Particulares

- Clonar el gen *ahpC* en el vector de expresión pTrcHisC.
- Sobreexpresar la proteína recombinante con cola de histidinas en *E. coli*.
- Purificar la proteína por cromatografía de afinidad.
- Estimular células dendríticas murinas con diferentes concentraciones de la proteína recombinante.
- Determinar la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras inducidas en la superficie de las células dendríticas estimuladas con la proteína recombinante.
- Determinar las citocinas secretadas por las células dendríticas murinas estimuladas con la proteína recombinante.

Metodología

La metodología se dividió en tres fases.

1. En la primera fase, se llevó a cabo la clonación del gen *ahpC* de BCG México 1931 en el vector pTrcHisA en *Escherichia coli* TOP10 (30, 32).
 - a. Se diseñaron oligos para amplificar el gen *ahpC* en *M. bovis* BCG México (39) por medio de PCR (35), para después cortarlo con enzimas de restricción (36) y ligarlo a un vector de expresión. Ya introducido el gen en el vector, se transformó en *E. coli* TOP10 (31, 37).
2. La segunda fase se dividió en dos etapas:
 - a. Sobreexpresión del gen *ahpC* clonado en el vector pTrcHisA por inducción con Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) previa estandarización (30, 31). Se indujo con distintas concentraciones de IPTG, temperatura y tiempo, para elegir las mejores condiciones de sobreexpresión. Cada cultivo fue centrifugado y sonicado para separar la fracción soluble del total de proteínas (32, 33). La fracción soluble fue analizada con geles de electroforesis SDS-PAGE (38).
 - b. Purificación de la proteína sobreexpresada con el protocolo de proteínas con cola de histidina (41). Se preparó un cultivo con las condiciones de la primera etapa, se separó la fracción soluble (42) y se purificó por medio de cromatografía de afinidad en una columna de níquel (40), revisando después la purificación con geles de electroforesis SDS-PAGE y con Western Blot utilizando anticuerpos anti-histidinas (43).
3. En la tercera fase se llevó a cabo la estimulación de células dendríticas murinas con la proteína. Se partió de células precursoras de médula ósea murinas, las cuales fueron diferenciadas en células dendríticas. Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de la proteína recombinante, para después realizar la medición de las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras expresadas, así como las citocinas secretadas en el medio (3, 23, 38).

Clonación del gen *ahpC* de BCG México 1931 en el vector pTrcHisA en *Escherichia coli* TOP10

Obtención de la secuencia del gen *AhpC* y diseño de oligonucleótidos.

Se consultó el genoma secuenciado de BCG México 1931 NC_016804.1 en el sitio GenBank de la NCBI para la obtención de la secuencia.

Una vez obtenida la secuencia en GenBank, se realizó el diseño de los oligonucleótidos de manera manual río arriba y río abajo del marco de lectura del gen *ahpC*. Posteriormente con el programa “pDRAW32” se determinaron los sitios de restricción que no se encuentran en la secuencia del gen, pero que están presentes en el sitio múltiple de clonación del vector pTrcHisA (fueron los sitios BamHI e HindIII); otro requisito a considerar fue que permitieran la clonación unidireccional y en fase. Usando el programa, se realizó el diseño de los oligos para incluir las bases necesarias para crear el sitio de corte en cada oligonucleótido. Una vez diseñados los oligonucleótidos, se analizaron con los programas OligoAnalyzer 3.1 y OligoCalc para establecer las condiciones teóricas óptimas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen y se solicitaron a Sigma.

Amplificación del gen por PCR

De acuerdo a las condiciones teóricas óptimas establecidas anteriormente, se realizó PCR para amplificar el gen *ahpC* empleando como molde el DNA de BCG México 1931 extraído y purificado en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana. Posteriormente el producto amplificado fue analizado en un gel de agarosa al 1% previamente teñido con bromuro de etidio, además se adicionó un marcador de 500 pares de bases. El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del kit de purificación de DNA Qiagen (35) y se eluyó en agua para conservarse a -20°C hasta su uso.

Clonación del gen

De acuerdo con los sitios de restricción diseñados incluidos en los oligonucleótidos, se realizaron las reacciones con las enzimas seleccionadas para el producto de PCR y el vector de expresión pTrcHisA (Figura 7).

El fragmento de DNA se ligó con el vector empleando la enzima con la Ligasa T4.

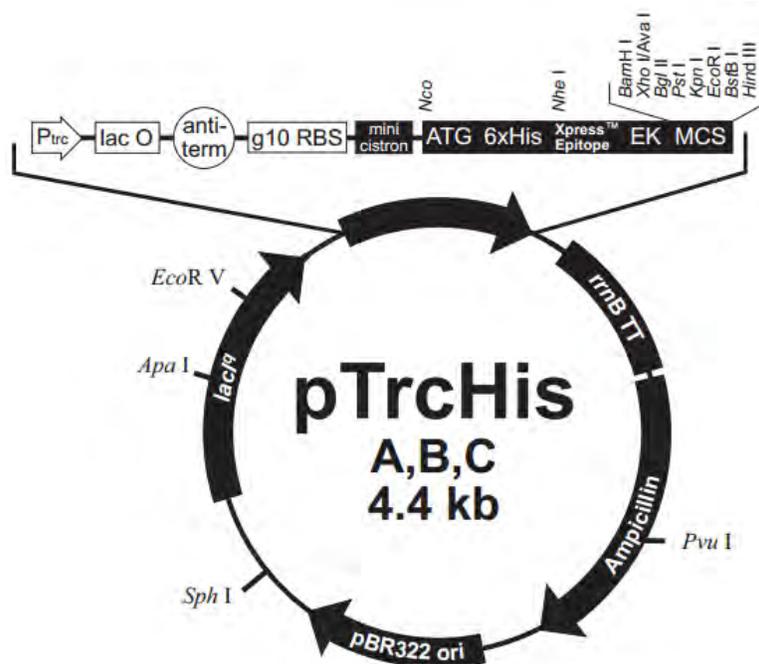


Figura 7. Mapa del vector pTrcHis. El vector logra altos niveles de expresión gracias a un promotor *trc* (*trp-lac*) y a la región de anti-terminación *rrnB*. El promotor *trc* contiene la región -35 del promotor *trp* junto con la región -10 del promotor *lac*. Además contiene una copia del gen *lacIq*, el cual codifica para la proteína represora de *lac*, para un control eficiente de la transcripción del inserto clonado. La traducción es mejorada por la presencia de un minicistrión que provee un reinicio traduccional altamente eficiente en el marco abierto de lectura (ORF) del sitio múltiple de clonación (MCS). Los insertos son posicionados río abajo y en marco con una secuencia que codifica para el péptido de fusión N-terminal de 6 residuos de histidina en serie, que sirve para la purificación por afinidad a metales, un epítipo para un anticuerpo específico del fabricante y un sitio de ruptura para la enzima enterocinasa. Por último, el vector posee un origen de replicación, un casete de resistencia a ampicilina, un operador de lactosa y una sección de terminación transcripcional (50).

La cepa de *E. coli* TOP10 competente se transformó con la reacción de ligación entre el vector pTrcHis y el gen *ahpC* usando los protocolos de competencia y transformación. Se seleccionaron 20 colonias las cuales se resembraron en agar Luria (LB) con ampicilina 100 µg/mL. Cada colonia se tomó para resiembra, se creció en 10mL de caldo Luria con ampicilina 100 µg/mL en tubo y se realizó el protocolo de extracción de vectores por lisis alcalina (30). Una vez extraído el plásmido se realizó un ensayo de restricción con las enzimas BamHI e HindIII con el fin de liberar al gen *ahpC* y verificar la clona por medio de electroforesis en geles de agarosa (Revisar Anexo I para metodologías).

Sobreexpresión del vector por inducción con IPTG

Mejora de las condiciones de inducción

Se inoculó 1 mL de caldo Luria con ampicilina con una o dos colonias que contenían al vector sin el gen como control negativo y al vector recombinante y se incubó toda la noche a 37°C. Se inocularon 5 mL de caldo Luria con ampicilina con 50 µL del cultivo pasado y se incubó por aproximadamente 2 horas a 37°C en agitación hasta que se obtuvo una DO ($\lambda=660\text{nm}$) de entre 0.6 y 0.8. Se transfirió 1 mL de cada cultivo sin inducir (alícuotas de tiempo cero) a tubos de microcentrifuga marcados adecuadamente. Inmediatamente las alícuotas del tiempo cero se procesaron como se menciona posteriormente.

El restante de cada cultivo se indujo con IPTG a una concentración aproximada de 1 mM y se continuó la incubación con aeración a 20°C o 37°C (la concentración y la temperatura de inducción se ajustaron empíricamente hasta encontrar las condiciones óptimas de sobreexpresión). Durante períodos de tiempo de 1, 2, 4 y 6 horas, se transfirió 1 mL de cada cultivo a tubos de microcentrifuga, se midió su DO ($\lambda=660\text{ nm}$) de entre 0.6 y 0.8, se centrifugó a máxima velocidad por un minuto a temperatura ambiente y se removieron los sobrenadantes.

Se resuspendió cada pastilla en 500 µL de buffer Tris 20 mM pH 7.5 y se sonicó la muestra con un 20% del pulso, por 10 pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso de 10 segundos. Se removieron los residuos insolubles por centrifugación a 10000 g por 15 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante. Se cuantificó por medio del método de Bradford comparando contra una curva patrón con Albúmina Sérica Bovina (BSA), para cargar 50µg de proteína con buffer de Laemmli (calentando a 95°C por 5 minutos) en un gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para la electroforesis a 8-15 V. Se tiñó el gel con azul de Coomasie 0.25% o con Silver Blue.

Expresión de la proteína.

Se inocularon 50 mL de caldo Luria con ampicilina en un matraz de 250 mL con colonias de *E. coli* conteniendo al vector recombinante para incubar toda la noche a 37°C. Se inocularon 450 mL de caldo Luria con ampicilina con 50 mL del cultivo de la noche anterior. Se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO ($\lambda=660\text{ nm}$) de entre 0.6 y 0.8. Se indujo la expresión con IPTG 1mM a 20°C toda la noche según las condiciones

óptimas previamente establecidas hasta una DO ($\lambda=660$ nm) de entre 1.0 y 1.5. Al término de tiempo adecuado de inducción, se colectaron las células por centrifugación a 10000 g por 15 minutos a 4°C en tubos falcon de 50 mL.

Purificación de las proteínas con cola de histidina.

Purificación de las proteínas con cola de histidina.

Para proceder con la purificación por cromatografía de afinidad, se mezcló por inversión el recipiente con la resina cromatográfica de Ni²⁺ y se transfirieron 2 mL a una columna de vidrio o de polipropileno de 7 mm de largo y se dejó que la resina descendiera por gravedad. La resina se lavó con agua estéril.

Para preparar la muestra se utilizaron las células de la sobreexpresión previamente centrifugadas a 10000 g por 15 minutos a 4°C (todo se manejó en hielo), se les quitó el sobrenadante, se pesó y se resuspendió a una concentración de 1 g/mL (1 g de peso húmedo o biomasa) con Tris 20 mM pH 7.5. La muestra se sonicó con 20% del pulso, por 10 pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso de 10 segundos. Se removieron los residuos insolubles por centrifugación a 10000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró en una membrana de 0.45 μ m (centrifugando de nuevo a 15500 g por 10 minutos para asegurarse de que no tuviera agregados que pudieran obstruir la columna).

Para realizar la purificación se utilizó un equipo de cromatografía AKTA Explorer, el cual fue brindado por la Dra. Clara Espitia, con la colaboración de la Dra. Cristina Parada. De manera breve, se lavó primero la columna con el buffer de elución (Tris 20 mM pH 7.5, Imidazol 300 mM) para eliminar impurezas con un flujo de 1 mL/min, después se equilibró la columna con el buffer de carga. El equipo fue programado para realizar una cromatografía por gradiente de concentración de Imidazol. Consistió de tres pasos: la carga de la muestra en la columna, el lavado de la columna (con buffer de lavado Tris 20 mM pH 7.5, Imidazol 20 mM) y la elución. El equipo construyó un cromatograma con los valores de las absorbancias a una $\lambda=280$ nm. Las fracciones de distintos volúmenes se recolectaron: del programa de carga y de lavado se colectaron fracciones de 2 mL con un flujo de 1 mL/min y del programa de elución se colectaron fracciones de 1 mL con un flujo de 1 mL/min. Finalmente, se analizaron alícuotas de cada fracción de interés por medio de una electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%.

Detección de la proteína por anticuerpo antihistidina.

En un SDS-PAGE al 12% se realizó la electroforesis de la fracción en la que se observó la banda del tamaño esperado. Terminada la electroforesis, el gel se mantuvo en Buffer de transferencia (Tris-Glicina 1X con metanol al 20%) por unos minutos. La membrana de transferencia se activó con metanol puro, se lavó con H₂O y se equilibró en el buffer de transferencia por 10 minutos. Se transfirió el gel a la membrana durante una hora a 10 Volts. Posteriormente la membrana se removió del casete, se lavó brevemente con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) y se realizó la inmunodetección.

La membrana de PVDF se bloqueó con TBS-Tween (Buffer salino de Tris con Tween) con leche al 1%, se lavó con TBS-Tween y se incubó con el Ab primario (Anti-His, IgG1 de ratón, Sta. Cruz) a una concentración de 1:2000. Se volvió a lavar y se incubó con el Ab secundario por una hora (Anti-IgG1 de ratón acoplado a fosfatasa alcalina) a una concentración de 1:1000. Se lavó, se secó la membrana y en cuarto oscuro, dentro de un casete, se le agregó el sustrato al Ab secundario para generar luminiscencia. Se reveló en película fotográfica con soluciones de revelado y fijado.

Estimulación de células dendríticas murinas con la proteína.

Obtención de CD a partir de precursores de médula ósea de ratón

Los ratones Balb/c machos de 6-8 semanas de edad utilizados en este estudio fueron proporcionados por el Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron mantenidos en cajas de aislamiento dentro del bioterio. Todos los experimentos fueron llevados a cabo según las normas de ética locales del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las CD fueron obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones Balb/c machos de 6-8 semanas de edad con el método descrito por Lutz y colaboradores con ligeras modificaciones (23). Los fémures y tibias de un ratón fueron obtenidos completamente libres de tejido muscular. Los huesos fueron colocados en PBS pH 7.4, 0.01 M. Las epífisis de ambos extremos fueron cortadas y se extrajo la médula ósea por irrigaciones sucesivas con medio PBS1X con una jeringa de 1 mL con aguja 25 G 5/8. Las epífisis se disgregaron sobre una malla de nylon y la suspensión celular se colocó junto

con la anterior en un tubo de 15 mL. A las células se les realizaron cuatro lavados con PBS 1X, se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 6 mL de Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) suplementado y fueron contadas las células en cámara de Neubauer. Para la obtención de CD de monocitos de médula ósea, 2 mL de la suspensión celular fueron cultivados en presencia de GM-CSF en placas de Petri bacteriológicas de 15 x 100 mm de diámetro, agregando RPMI 1640 hasta llegar a un volumen de 10 mL y 20 ng/mL de proteína recombinante GM-CSF. Por ratón se obtuvieron dos cajas de Petri. El cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂ hasta el día tres en el que se cambió el medio, agregando 10 mL más de RPMI 1640 suplementado por placa con su respectivo GM-CSF recombinante a 20 ng/mL. Las CD fueron cosechadas al día cinco y empleadas para los distintos experimentos.

Co-cultivo de las CD con la proteína recombinante y Citometría de Flujo

Al día cinco de cultivo, 5×10^6 CD inmaduras fueron expuestas ante distintas concentraciones de la proteína recombinante AhpC: 1 µg, 3 µg y 6 µg por 24 horas a 37°C. La incubación fue realizada en 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (para asegurar la esterilidad del medio). Las células fueron cosechadas y marcadas con los anticuerpos fluorescentes para determinar la expresión de CD86, CD80, CD40, PD-L1 y PD-L2, así como la producción de IL-12p40 y TNF por citometría de flujo. El LPS (LPS [*Salmonella typhimurium*], donado por el Dr. Rodolfo Pastelín, Facultad de Química, UNAM) se utilizó como un control positivo de activación de las CD a una concentración de 0.1 µg/mL.

La determinación de la expresión de los marcadores de superficie se realizó por citometría de flujo. El sobrenadante de esos cultivos se conservó a -70°C para su posterior evaluación de la secreción de las citocinas utilizando el kit de CBA.

La expresión de las moléculas de superficie fue determinada por inmunofluorescencia y analizada por citometría de flujo con anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE) α-CD86-PE, α-CD80-PE, α-CD40-PE, α-PD-L2-PE, α-PD-L1-PE y α-MHCII-PE (Pharmigen-BD Biosciences). Las células también fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD11b con isotiocianato de fluoresceína (α-CD11b-FITC) y anti-CD11c con aloficocianina (α-CD11c-APC). Se realizaron seis ensayos en los que se utilizaron tres anticuerpos: anti-CD11c

FITC, anti-CD11b APC y una de las moléculas restantes marcada con PE por cada ensayo. Para el marcaje de las moléculas se consideraron 250,000 células dendríticas por ensayo, por lo cual se consideró un número total de 1.5×10^6 células para poder realizar los seis ensayos. Realizada esta cuenta, después del día cinco se evaluó viabilidad y número células con el método de exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer. Se utilizó una placa de 24 pozos y se estimularon 1.5×10^6 células por pozo. Se realizaron seis estímulos: un control negativo sin estímulo, control positivo con *Mycobacterium Bovis* BCG México 1931(MOI 1:1), control positivo de lipopolisacárido (LPS) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LPS [*E. coli* 026:B6], de Sigma Aldrich) y tres concentraciones distintas de la proteína AhpC (2 μg , 6 μg y 12 μg por cada millón de células) durante 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Después, las células se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se guardó a -20°C para el análisis de citocinas. Las células se resuspendieron en PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%, luego se incubaron por 20 min a 4°C con los anticuerpos (dilución correspondiente para cada uno); en seguida se lavaron y se resuspendieron en FACS buffer (PBS, 5% de suero fetal bovino (FBS), 0.1% azida de sodio) para su análisis por citometría de flujo (FACS Calibur flow cytometer [BD Biosciences]). Los resultados fueron evaluados utilizando el software FlowJo (TreeStar Inc, Ashland Oregon, USA).

Determinación de la secreción de citocinas

La secreción de las citocinas se determinó por CBA (Cytometric Bead Array) y fue analizada por citometría de flujo con el kit de inflamación de BD (Mouse Inflammation Kit, Pharmingen-BD Biosciences). La detección de las citocinas en el sobrenadante de cultivo se realizó con una mezcla de perlas acopladas con los anticuerpos marcados con PE anti-IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70 (Pharmingen-BD Biosciences). La cantidad de cada citocina en los sobrenadantes se extrapoló utilizando una curva estándar basada en cantidades conocidas de citocinas recombinantes. El intervalo de las concentraciones de los estándares fue de 20 a 5000 pg/mL . Los resultados fueron evaluados utilizando el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, Oregón, USA) (Figura 8).

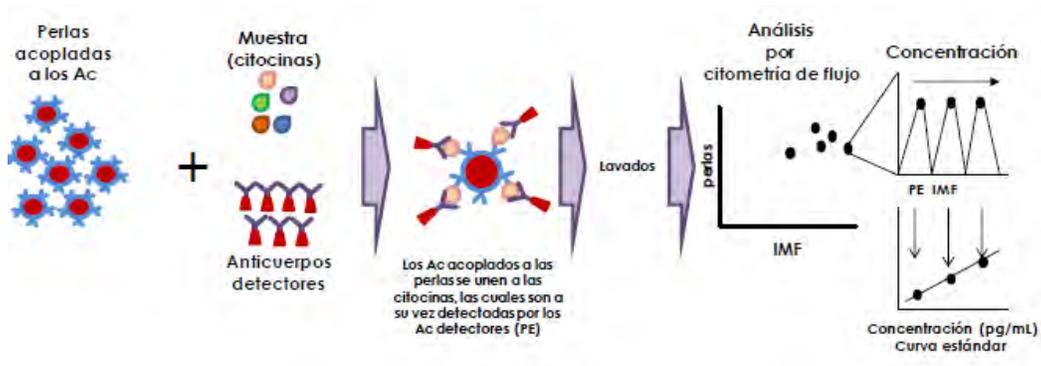


Figura 8. Detección de citocinas por CBA. Las perlas acopladas a los anticuerpos (Ac) se agregan con la muestra, se unen a las citocinas, las cuales son detectadas por Ac detectores. Se analiza por citometría de flujo y comparando con curvas estándar se define la concentración final (3).

Resultados

Clonación del gen *AhpC* de BCG México 1931 en el vector pTrcHisA en *Escherichia coli* DH5 α

Obtención de la secuencia del gen *AhpC* y diseño de oligonucleótidos.

Los primers diseñados se muestran a continuación en la tabla 1:

Tabla 1. Propiedades de los primers diseñados para el gen *ahpC*. Amarillo: codón de inicio; rojo: codón de paro; verde: sitio de corte para BamHI; azul: sitio de corte para HindIII.

Secuencia (5'- 3')	Localización en genoma de BCG México
F-GATGGATCCATGCCACTGCTAACCATGGCGA	2670728- 2670748
R-CACAAGCTTAACCAGATCCCGGTTAGGGCG	2671307 - 2671338

Los primers fueron diseñados para contener los sitios de restricción BamHI, señalados en verde, y los HindIII, señalados en azul. El oligo forward contuvo a BamHI y el reverse a HindIII debido a la dirección que se le quería dar al producto de PCR en el sitio múltiple de clonación del plásmido pTrcHisA, ya que BamHI es el primer sitio de restricción disponible y está río arriba de HindIII (Fig. 9). El gen *ahpC* tiene un tamaño de 588 pares de bases (pb), y el producto planeado con estos primers fue de 619 pb, siendo flanqueado en 3' por una región intergénica no codificante de 13 pb después del codón de término y comenzando directamente desde el codón de inicio en 5'. Se buscó que los oligos abarcaran al menos 15 pb del gen, para posteriormente adicionarle los sitios de restricción y unos cuantos nucleótidos de más para el correcto funcionamiento de la enzima (8).

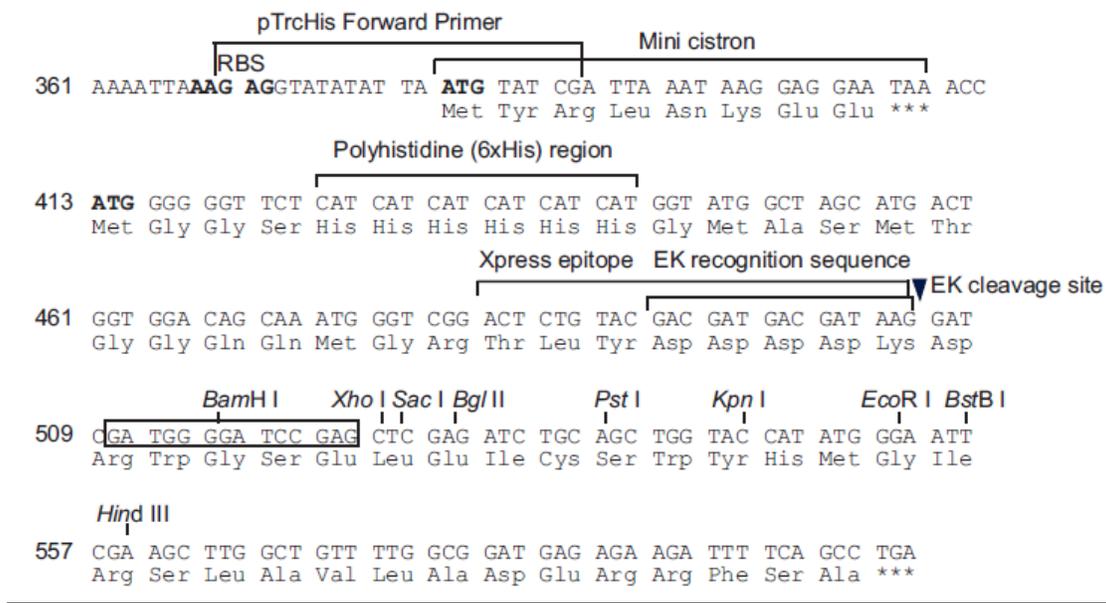


Figura 9. Sitio múltiple de clonación del vector pTrcHisA.

Amplificación del gen por PCR

La mezcla de reacción y las condiciones usadas para amplificar el gen fueron las siguientes (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones para PCR

H ₂ O	32μL
Buffer 10X Pfu Ultra Hf	5μL
DMSO	5μL
dNTPs (10mM)	1μL
Primer F 20pm	2μL
Primer R 20pm	2μL
DNA BCG Mex	2μL
Pfu Ultra Hf DNA pol (2.5U/μL)	1μL
TOTAL	50μL

94°C – 4 min.

94°C – 1 min.

62°C – 30 seg.

72°C – 1 min.

72°C – 10 min.

} 30 ciclos

El producto amplificado obtenido se muestra a continuación en la figura 10:

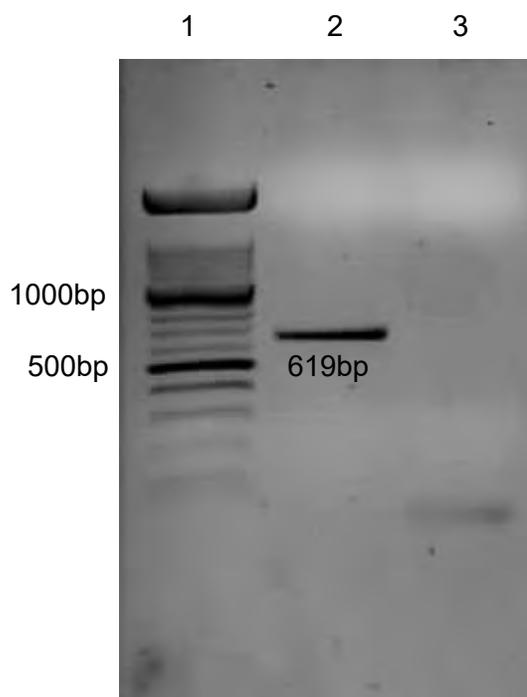


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt, corrido por 1 hora a 100Volts. Carril 1: Marcador molecular de 100pb; carril 2: producto de PCR del gen *ahpC* con un tamaño aproximado de 650pb; carril 3: control de reactivos sin DNA.

El producto obtenido es de aprox. 650 pb, de un esperado de 619 pb, por lo que se purificó con el kit de purificación MinElute PCR Purification Kit de Qiagen (7).

Se puede observar que la amplificación del gen en la figura 10 muestra un producto del tamaño esperado con respecto a lo planeado en el diseño de los primers. Se utilizó el vector pTrcHisA (Fig. 9), ya que es un vector comercial especializado para la expresión de proteínas en *E. coli*, el cual fue utilizado por varias características intrínsecas a este: Posee un promotor *trc* (posee la región -10 del promotor *lac* y la región -35 del promotor *trp*) el cual le ayuda a lograr altos niveles de expresión en cualquier cepa de *E. coli* (50), agrega a la proteína en el extremo N-terminal una cola de seis histidinas permitiendo su purificación por medio de cromatografía de afinidad con una resina de níquel, mejora la traducción debido a la presencia de un mini-cistrión, el cual ayuda a reiniciar de manera eficiente el proceso de traducción del marco abierto de lectura del sitio múltiple de clonación, entre otras características. El vector fue clonado en *E. coli* DH5 α , ya que era la cepa recomendada para dicho vector, al ser deficiente en *recA* y *endA*.

Clonación del gen

El método empleado para la clonación del vector pTrcHisA en *E. coli* fue la electroporación, el cual es uno de los métodos más utilizados para dicho fin, ofrece buenos rendimientos respecto a otros métodos, como los químicos (37). Una vez estandarizadas las condiciones, la transformación del vector se llevó a buen término sin inconvenientes.

En cuanto a la clonación y la transformación, de las 20 colonias que se tomaron para probar si contenían el plásmido recombinante, se hicieron 2 ensayos. En el primer ensayo se realizó un corte sólo con una enzima de restricción para linearizar e identificar las clonas posibles de manera tentativa. Se observaron algunas bandas más grandes en las cuales se encontraba el inserto cuando se comparaba con la restricción del vector control. El vector tiene un tamaño de 4400 bp mientras que el inserto es de 619 bp, por lo que su suma generaría fragmentos linearizados de 5019 bp. De las 20 colonias, se probaron 6 posibles colonias positivas, junto con otras 4 pero que se sospechaba no poseían el inserto. A estas muestras se les aplicó una doble restricción con BamHI y HindIII, considerando un buffer adecuado dependiendo de la compañía productora de las enzimas, los volúmenes pertinentes considerando los distintos niveles de actividad en el buffer y el tiempo adecuado de corte.

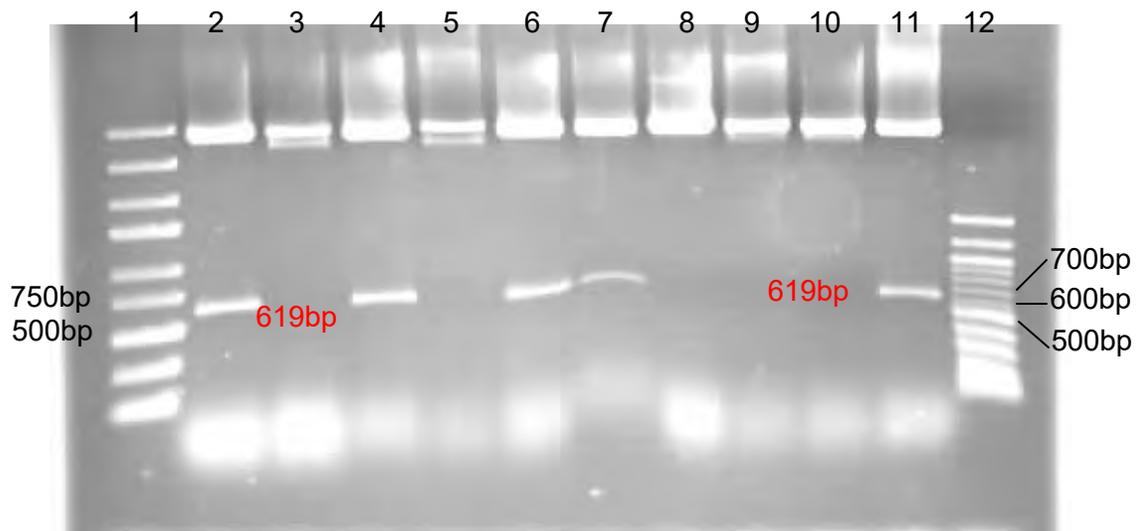


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt. Carril 1 y 12: marcadores moleculares de peso, GeneExpress Ladder de 100-5000bp y marcador de 100bp respectivamente; carril 2-11: clonas cortadas con BamHI y HindIII. En los carriles 2, 4, 6, 7 y 11 se libera el inserto de 619 bp y se lineariza el vector en 4400 bp. Los carriles 3, 5, 8, 9 y 10 solo linearizan el vector.

De las clonas aparentemente positivas, solo una fue negativa; en las demás los resultados esperados fueron confirmados. Las clonas estudiadas en los carriles 2, 4, 6, 7 y 10 fueron positivas al liberar el inserto, mientras que las demás dieron un resultado negativo al no liberar al inserto (figura 11). A las 5 clonas se les extrajo el plásmido recombinante con el inserto para secuenciar y verificar el resultado. La secuenciación se realizó en el Instituto de Biología de la UNAM. A continuación se muestra el resultado de la secuenciación de 1 de las clonas:

Tabla 3. Alineamiento de las cadenas F y R secuenciadas de una clona positiva con un fragmento teórico de la clona pTrcHisA-*ahpC*.

Cadena secuenciada	Tamaño (bp)	Cobertura (%)	Identidad (%)
F	932	66	99
R	983	72	100

En la tabla 3 se muestran los resultados de las secuencias de las cadenas obtenidas para la clona positiva. Empleando el programa BLAST, las cadenas fueron comparadas con un fragmento teórico de la clona construida con el vector pTrcHisA, con la secuencia del gen *ahpC*, el cual tiene tamaño de 782 bp (11). Para la secuenciación se usaron de primers los oligos previamente diseñados para *ahpC*, de manera que se obtuvo la secuencia de 2 cadenas: la secuencia de la cadena F del oligo forward y la R del oligo reverse. Se observa que una de las cadenas tuvo el 99% de identidad, contrario al 100% que se esperaba. Ya que en las secuencias recibidas las primeras bases secuenciadas con frecuencia no tienen muy buena calidad, se analizaron conjuntamente las 2 cadenas para determinar la secuencia. De este modo, con la cadena F se analizó fundamentalmente el final del gen y su continuación en el vector y con la cadena R se analizó el inicio del gen y la sección anterior que incluye el sitio que codifica para la cola de histidinas, entre otras cosas (Figura 12). De este modo se verificó que la identidad era del 100%.

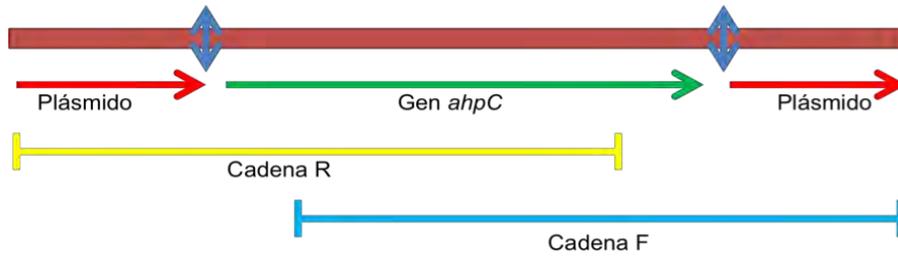


Figura 12. Representación gráfica de la cobertura de las cadenas resultantes de la secuenciación con un fragmento teórico de la clona pTrcHisA-*ahpC*. La cadena R (amarillo) y la cadena F (azul) complementan la secuencia de *ahpC* (verde), así como una pequeña sección del plásmido (rojo).

Sobreexpresión por inducción con IPTG

Primero se realizó un ensayo induciendo con 1 mM de IPTG a 37°C después de llegar a una DO ($\lambda=660$ nm) de 0.7, tomando alícuotas por 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 20 horas para determinar el tiempo óptimo de mayor acumulación de la proteína. Las alícuotas fueron centrifugadas, resuspendidas en buffer Tris 20 mM pH 7.5, sonicadas y centrifugadas para analizar el sobrenadante por medio de electroforesis SDS-PAGE al 12%, después de cuantificar las proteínas solubles totales (los valores de la cuantificación de proteínas solubles totales por curva estándar de albúmina sérica bovina, BSA, están en la figura 13).

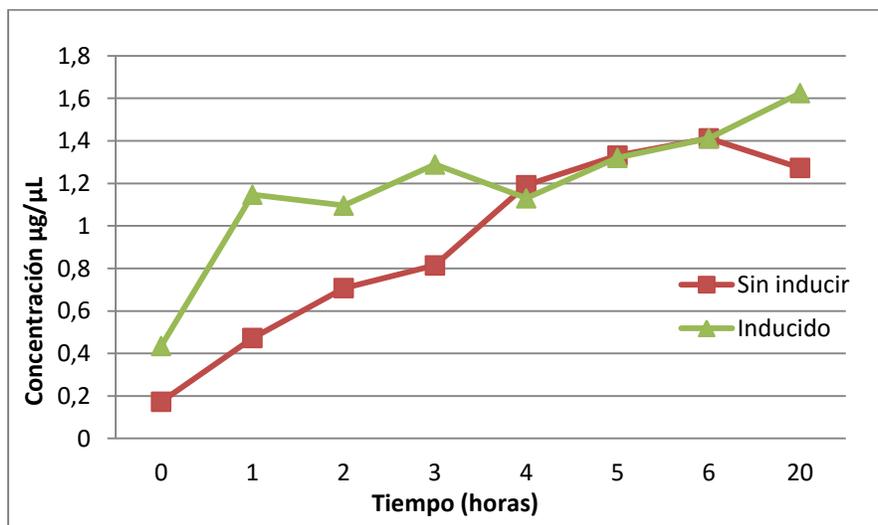


Figura 13. Gráfica de concentración de proteínas totales contra tiempo de los cultivos inducidos con 1mM de IPTG a 37°C hasta a una DO ($\lambda=660$ nm) de 0.7 a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 20. En rojo el cultivo sin inducir y en verde el cultivo inducido.

De dos cultivos (inducido con IPTG y sin inducir) se comparó la capacidad de expresión de la proteína recombinante. Después de cuantificar las proteínas solubles totales, se realizaron dos electroforesis de SDS-PAGE al 12% en los que se analizaron las muestras de las fracciones solubles del sonicado de los cultivos por alícuota (de diluciones preparadas considerando las distintas concentraciones de las muestras para llegar a una concentración final de proteína de 25 µg por pozo) junto con el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards de Biorad) de 10 kDa hasta 250 kDa. En la Figura 14 se observa un gel de SDS-PAGE con las fracciones solubles de los sonicados de los cultivos inducidos con IPTG a distintos tiempos.

Los patrones que se observaron fueron similares; sin embargo, se puede observar en las bandas cercanas a 25 Kda que conforme aumenta el tiempo de sobreexpresión, va incrementándose la expresión de una banda particular, la cual se asumió que podía ser la proteína buscada (ya que tiene un tamaño de 25 Kda). La banda se puede ver de manera más clara en los carriles 6, 7 y 8, los cuales corresponden a 4, 5 y 6 horas de inducción. Con 20 horas de inducción, la banda buscada comenzó a verse menos clara, sugiriendo que la proteína soluble disminuyó, probablemente debido a que la bacteria puede estar agregando el exceso de proteína en cuerpos de inclusión. Fue por esto que se decidió trabajar con 4 horas de inducción.

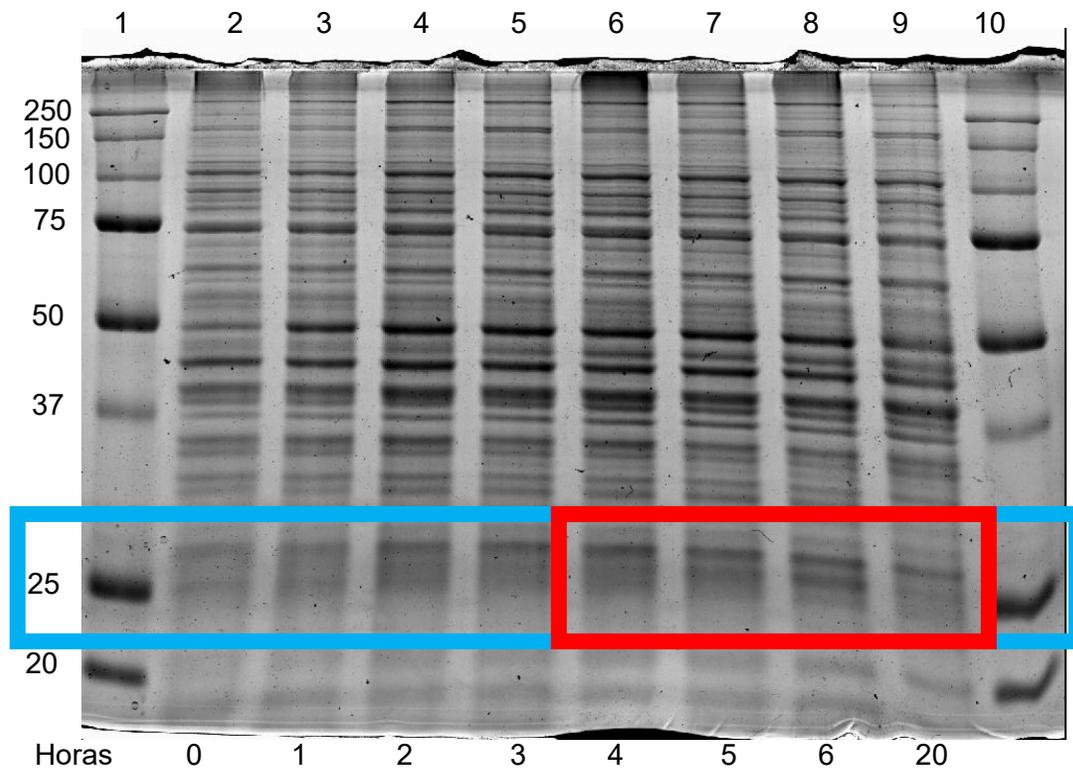


Figura 14. Gel de poliacrilamida al 12% con SDS del sonicado fracción soluble de la clona *E. coli* ahpC inducida con 1mM de IPTG. Carriles 1 y 10: marcador molecular (Precision Plus Protein Standards; carriles 2 al 9: alícuotas de las fracciones a distintos tiempos de cultivo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 20 horas respectivamente. En azul se marca la zona de 25kDa en la que se esperaba obtener la banda de la proteína AhpC, en rojo se marcan específicamente los cultivos (4, 5 y 6 horas) en los que se observa el aumento en la intensidad de una banda particular de 25kDa, hasta su disminución en el cultivo de 20 horas.

En el siguiente se cambió la temperatura de inducción y las concentraciones utilizadas de IPTG. Se prepararon 5 cultivos a partir de un precultivo con la clona *E. coli* ahpC durante toda la noche e inoculando en 50mL de medio LB con antibiótico a 37°C hasta que llegaron a una DO ($\lambda=660$ nm) de 0.6 a 0.8.

Alcanzada la DO, se prepararon distintos cultivos, manteniendo un tiempo de inducción de 4 horas. Se trabajó con el cultivo completo después del tiempo de inducción de los cultivos con IPTG. Una vez centrifugado el paquete bacteriano se resuspendió en 500 μ L de buffer Tris 20mM pH 7.5, se sonicó, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante fue analizado por medio de electroforesis en SDS-PAGE al 12% (los valores de la cuantificación de proteínas totales por curva estándar de albúmina sérica bovina, BSA, están en la tabla 4, figura 15).

Tabla 4. Concentración de proteínas totales de los cultivos inducidos con distintas concentraciones de IPTG y distintas temperaturas por 4 horas.

Cultivo	Temperatura de Inducción (°C)	Concentración de IPTG	Conc. (mg/mL)
0	37	Sin inducir	2.1500
1		1.5 mM	1.6832
2		1 mM	1.2341
3	25	1.5 mM	1.1763
4		1 mM	1.3225

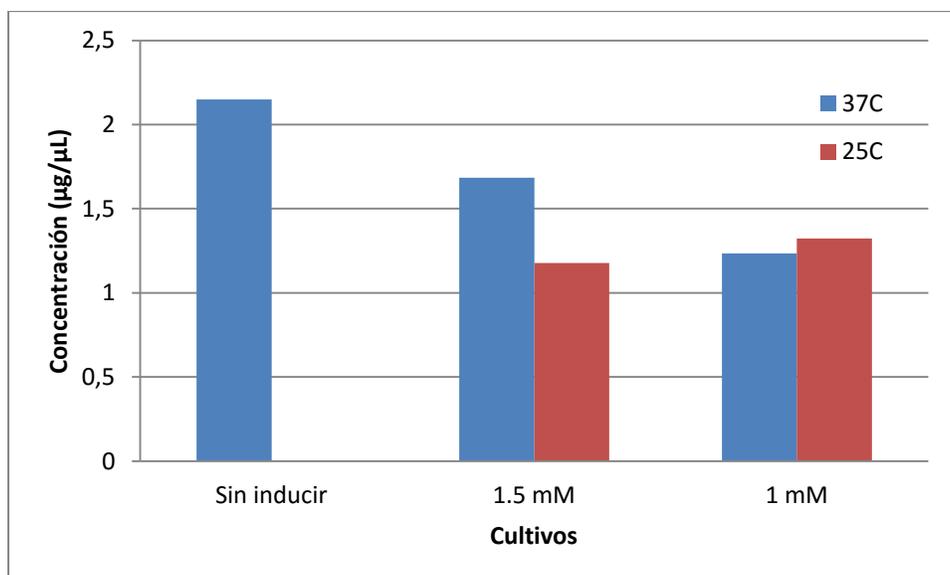


Figura 15. Gráfica de concentración de proteínas totales de los cultivos inducidos con distintas concentraciones de IPTG y distintas temperaturas. En el eje de las equis se indica la concentración de IPTG utilizada, las barras rojas representan los cultivos a 25°C, las azules a 37°C.

Después de cuantificar, se cargaron 50µg de proteína por carril en los SDS-PAGE, con el MM (Precision Plus Protein Standards de Biorad) que va desde 10kDa hasta 250kDa. En la figura 16 se observan los patrones de las distintas condiciones de los cultivos de la clona *E. coli* mencionados en la tabla 4. En la banda de 25kDa se observan diferencias entre los cultivos, teniendo la mayor densidad de las bandas los cultivos inducidos con 1mM de IPTG, tanto a 37°C como a 25°C. La diferencia observada entre bandas no fue muy grande, por lo que para decidir la mejor condición, se le realizó un análisis densitométrico al gel. Los datos de las bandas fueron, para una inducción con 1.5 mM de IPTG, de 0.31 para 37°C y de 0.29 para 25°C, y para una inducción con 1 mM de IPTG de 0.32 para 37°C y 0.33 para 25°C. La inducción con una concentración mayor de IPTG resultaba ligeramente menor, por lo que se decidió utilizar una concentración 1 mM. En cuanto a la temperatura, resultó más complicado decidir con la información obtenida en el

gel, ya que la diferencia entre los datos no es muy grande. Para decidir, se consideraron no solo los resultados de esta figura si no también los de la figura 14, en la que se observó que a mayores tiempos de inducción la proteína podría agregarse, disminuyendo su concentración en la fracción soluble. Se sabe que para la sobreexpresión de proteínas, si existe el riesgo de que la proteína pueda agregarse en cuerpos de inclusión, se recomienda trabajar a temperaturas menores de inducción (53, 54). Por esta razón, se decidió trabajar a 25°C. Las condiciones establecidas finalmente fueron utilizar 1mM de IPTG para inducir a 25°C por 4 horas.

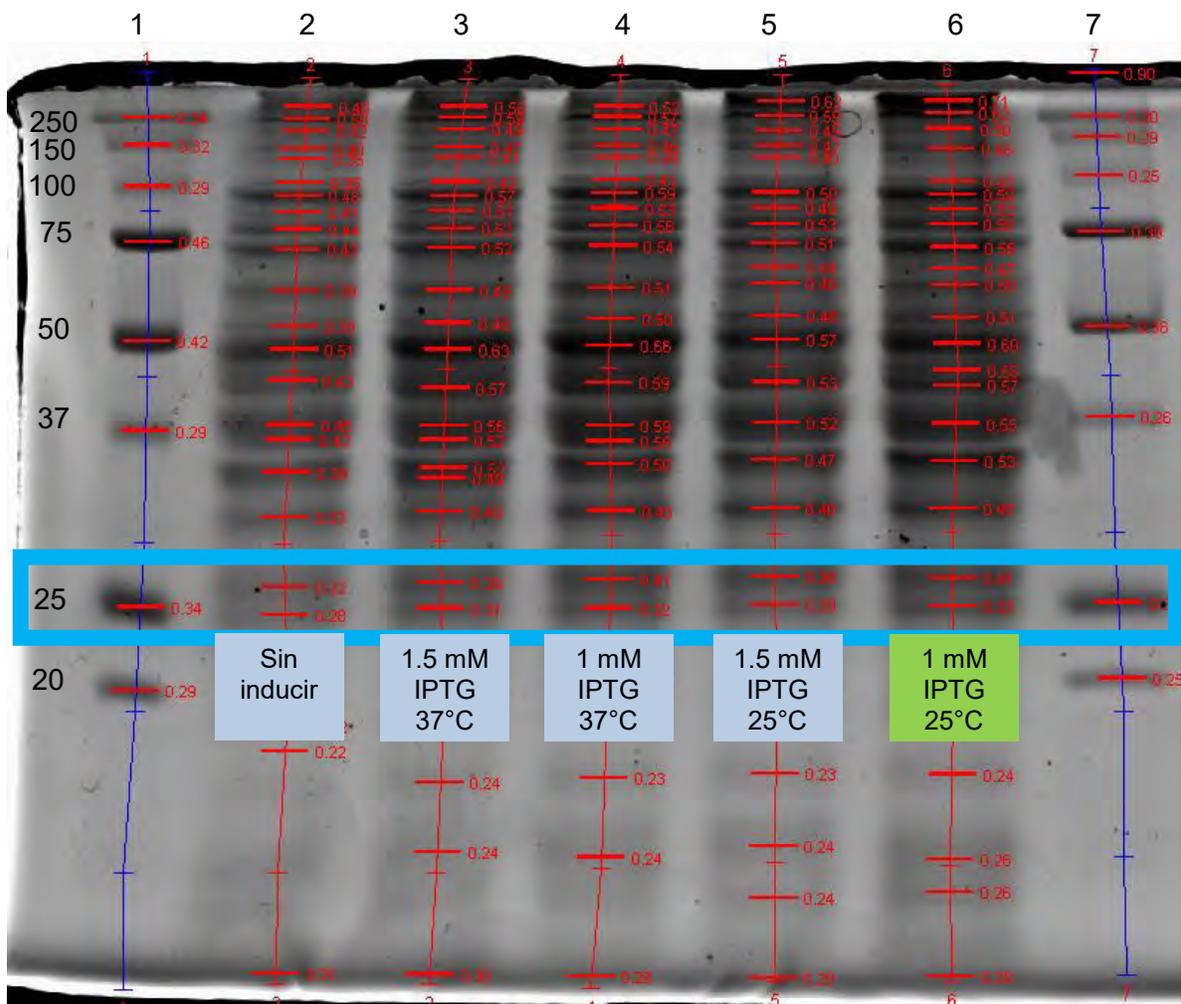


Figura 16. Electroforesis en SDS-PAGE al 12% del cultivo con la clona *E. coli* *ahpC* inducida bajo distintas condiciones. Carriles 1 y 7: MPM; carril 2: cultivo 0 sin inducir, 4 h a 37°C; carril 3: cultivo 1 inducido con IPTG 1.5mM, 4 h. a 37°C; carril 4: cultivo 2 inducido con IPTG 1mM, 4 h. a 37°C; carril 5: cultivo 3 inducido con IPTG 1.5mM, 4 h. a 25°C y carril 6: cultivo 4 inducido con IPTG 1mM, 4 h. a 25°C. En rojo se encuentran marcadas las densidades ópticas de las bandas medidas con el programa Quantity One.

Purificación de las proteínas con cola de histidinas

Purificación

La sobreexpresión se llevó a cabo en un litro de cultivo de la clona *E. coli* ahpC a 25°C con 1 mM de IPTG, el cual fue purificado como se especificó anteriormente. En la figura 17 se presenta el cromatograma de la purificación de la proteína. El cromatograma está dividido en 3 secciones distintas, por los distintos programas de purificación que maneja el equipo utilizado. En la primera parte, se realizó la inyección de la muestra. De las fracciones 1 a 4 se eliminaron todas las proteínas que no se unieron a la columna de níquel. En la fracción 4 comenzó el primer programa de purificación, que consistió en el lavado de la columna con una baja concentración de imidazol para eliminar todas las proteínas que se pudieron unir de forma no específica a la columna, terminando hasta obtenerse la fracción número 13. En la fracción 17 comenzó el segundo programa, que consistió en aumentar la concentración de imidazol para poder eluir la proteína unida de forma específica a la columna. El programa terminó en la fracción 23. Como se observa, se obtuvieron al menos tres picos distintos en la sección de elución de la purificación. Las fracciones más representativas del eluido fueron las del rango 19 a 23.

Se procedió a realizar una electroforesis en SDS-PAGE para analizar la purificación con las distintas fracciones obtenidas: 2, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 29. Se seleccionó la fracción 2 por ser la más representativa de la primera parte de la purificación (cuando la muestra se inyecta), la fracción 9 por ser representativa del periodo de lavado con 20 mM de Imidazol (para eliminar proteínas inespecíficas que se unieron a la columna), de la 18 a la 23 se seleccionaron por ser importantes en cuanto al eluido, y la 29 se seleccionó por observarse el último pico distinto de la elución.

En el gel no se observaron bandas en ninguna fracción del eluido, por lo que se procedió a concentrar las muestras con unidades de filtración Millipore Amicon Ultra 3K. Las fracciones 19, 20, 21, 22 y 23 se concentraron en 500 microlitros de buffer Tris 20 mM pH 7.5. La electroforesis en SDS-PAGE se repitió (Fig. 18). El enriquecimiento de una banda de aproximadamente 25 kDa se observó en la fracción concentrada de eluidos, que concuerda con el tamaño esperado de la proteína.

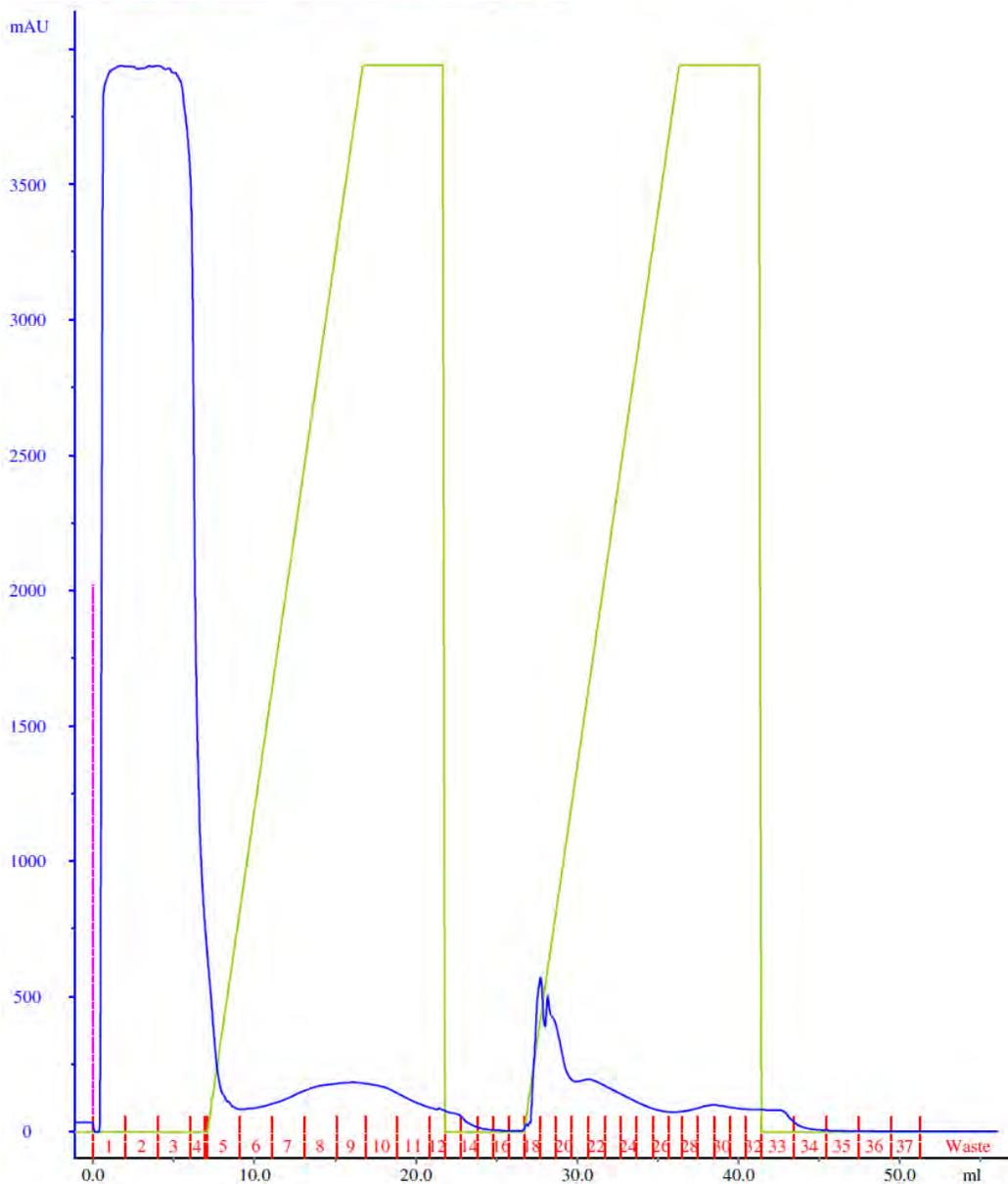


Figura 17. Cromatograma de purificación de cultivo de *E. coli ahpC* (inducido con 1 mM de IPTG a 25°C) por gradiente de imidazol 300 mM en columna de níquel de 7mm de largo. Se colectaron fracciones de 2 mL con un flujo de 1 mL/min. En rojo se observan las distintas fracciones recolectadas. En azul se representa la curva generada por las absorbancias detectadas a una $\lambda = 280$ nm por las proteínas del cultivo. En morado se representa el momento en el que se inyectó la muestra en el equipo. En verde se representan los programas de lavado (primer pico) y elución (segundo pico) generados por el equipo AKTA.

Detección de la proteína

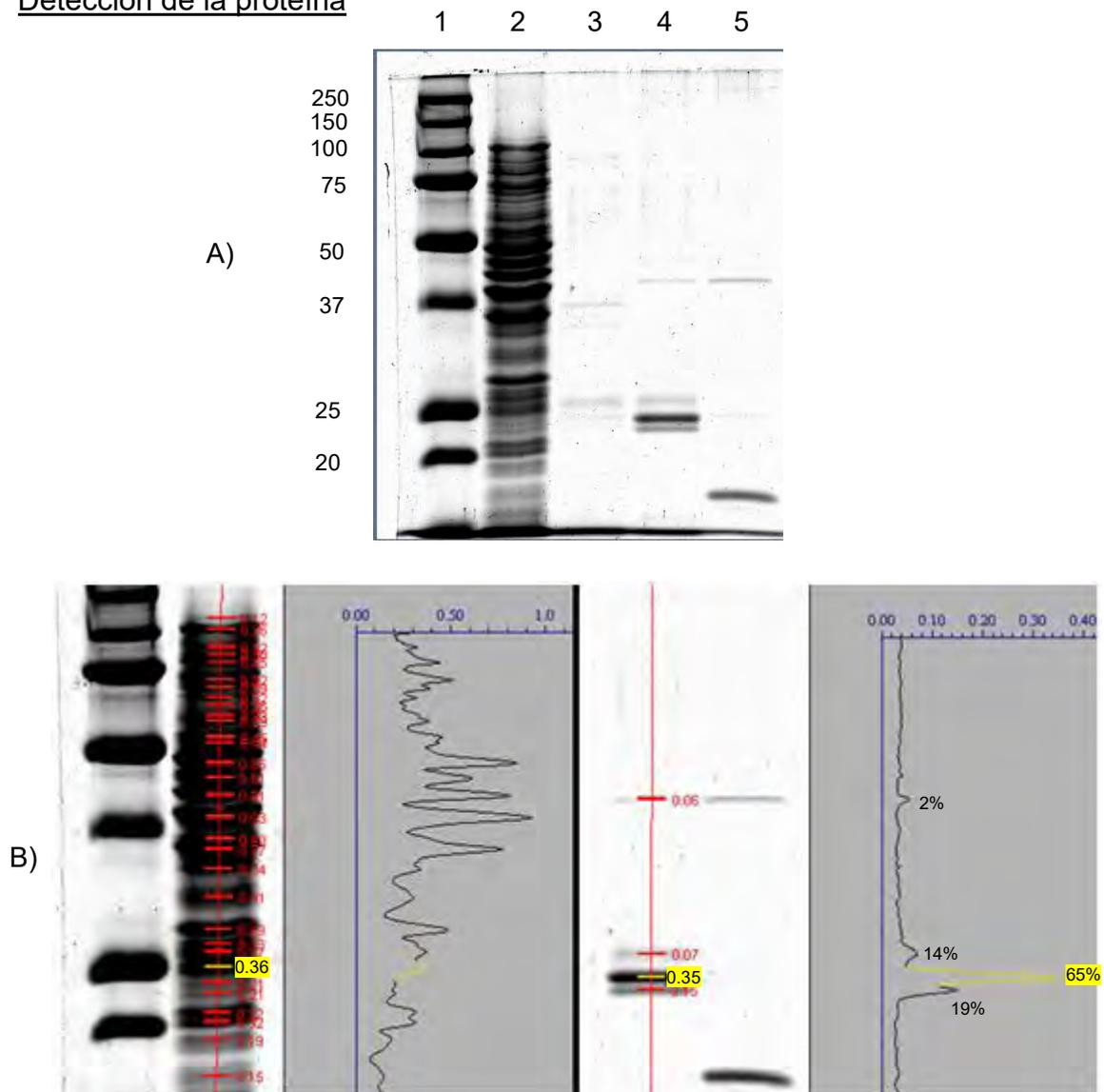


Figura 18. A) Electroforesis SDS-PAGE al 12% del enriquecimiento de la proteína AhpC teñido con Silver Blue. Carril 1: MPM; carril 2: fracción 2 (representativa del primer paso de la purificación: el paso de la muestra completa por la columna); carril 3: fracción 9 (representativa del segundo paso de purificación, el lavado de la columna); carril 4: fracción con enriquecimiento de proteína AhpC; carril 5: fracción 29 (último pico con absorbancia en la purificación de la parte de eluido). B) Análisis densitométrico del enriquecimiento de la proteína. En amarillo se resaltan los valores de la proteína, con un enriquecimiento del 65%.

En la figura 18 se observa el gel mencionado anteriormente, así como un análisis densitométrico (con el programa Quantity One) del mismo en el que se aprecia el nivel de enriquecimiento de la proteína. Por medio de este análisis se sabe que, de los 150 μ g de

proteína final en la fracción enriquecida, el 65% de la proteína está formada por la proteína inducida. Además, con este mismo análisis, comparando todo el carril de proteína soluble total con el pico representativo de la proteína enriquecida, se encuentra que el rendimiento de la purificación fue del 2.96%.

La proteína enriquecida AhpC que migra a 25 kDa requería ser identificada por lo que se realizó la inmunodetección con anticuerpos contra antihistidina para detectar la etiqueta de histidinas introducida en la proteína. Se realizó una electroforesis en 2 SDS-PAGE de la fracción enriquecida de AhpC; se transfirió a una membrana PVDF para la inmunodetección y el SDS-PAGE fue teñido con Silver Blue. En la Figura 19 se muestra la comparación del gel teñido y su duplicado detectado por inmuno Blot. La banda enriquecida fue detectada con el anticuerpo antihistidina, confirmando que la proteína recombinante AhpC migró a 25 kDa. En el gel, se aprecian marcadas, además de la banda buscada, otras bandas en el marcador molecular, específicamente la de 75 kDa y 100 kDa, lo cual pudo deberse a un bloqueo insuficiente en la técnica de revelado, generando posibles uniones inespecíficas con las proteínas del marcador.

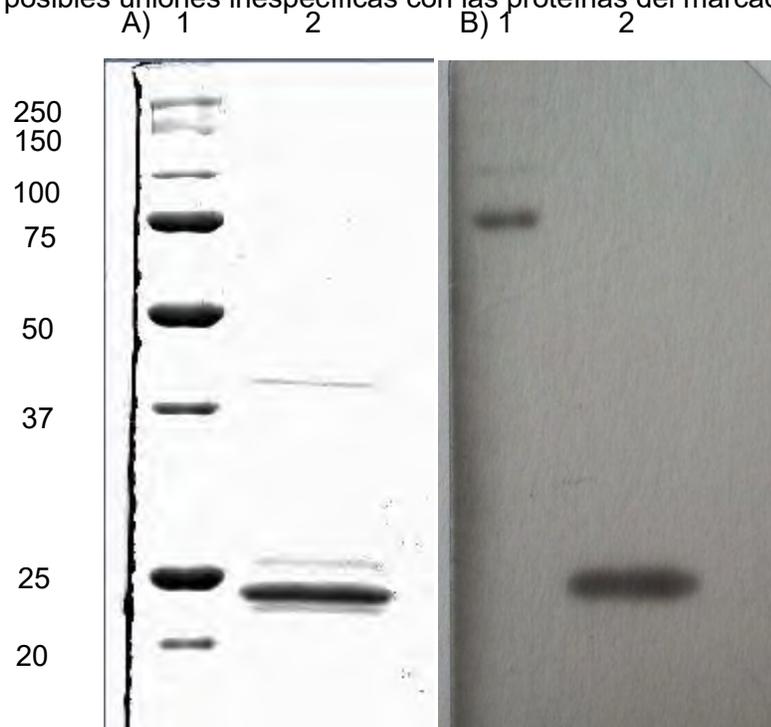


Figura 19. A) Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con Silver Blue y B) Inmunodetección de la proteína recombinante enriquecida AhpC de *M. bovis* BCG México A) Carril 1: MM; carril 2: AhpC recombinante. B) Inmuno Blot revelado con antihistidina.

Estimulación de células dendríticas murinas con la proteína

Análisis por citometría de flujo de la expresión de receptores

En el análisis de los datos de citometría de flujo, el primer escrutinio consistió en la generación de gráficos de puntos (dot plot) de tamaño en área versus tamaño en altura (FSC-A vs FSC-H). Sobre éstos gráficos se generaron ventanas (gates) en las que se seleccionaron los singletes (singlets) distribuidos en la diagonal. Los singletes son los eventos obtenidos tras la interrogación de células individuales y no tras la interrogación de dos o más células unidas (Fig. 20-A).

A partir de las ventanas de singletes, se generaron gráficos de puntos emparentados de tamaño versus complejidad ambos en área (FSC-A vs SSC-A), en los cuales se generaron ventanas para la selección de las poblaciones de interés, considerando la no inclusión de detritos y de subpoblaciones celulares que no son de interés. Se seleccionaron los linfocitos y BMDC (Fig. 20-B). Para lo anterior se tuvo en cuenta el tamaño, la granularidad y la densidad celular de las subpoblaciones de interés.

A partir de la selección de las poblaciones de interés se generaron gráficos de puntos emparentados de FITC versus APC para contrastar la expresión de las moléculas marcadas con dichos fluorocromos (CD11c vs CD11b). De forma automática éstos gráficos de puntos generan cuatro cuadrantes en los que se distribuyen las subpoblaciones conforme a la expresión de los marcadores seleccionados en los ejes (Q1: CD11b+/CD11c-; Q2: CD11b+/CD11c+; Q3: CD11b-/CD11c+; Q4: CD11b-/CD11c-). Se seleccionaron los cuadrantes de interés Q3: CD11b-/CD11c+. Los porcentajes de BMDC se capturaron para subsecuente análisis estadístico (Fig. 20-C).

A partir del cuadrante de interés se generaron histogramas emparentados en los que se reporta los niveles bajos, medios y altos de MHC-II, PD-L1, PD-L2, CD40, CD80 y CD86 expresados por las BMDC en términos de intensidad media de fluorescencia (IMF). Las IMF de cada molécula se capturaron para subsecuente análisis estadístico (Fig. 20-D).

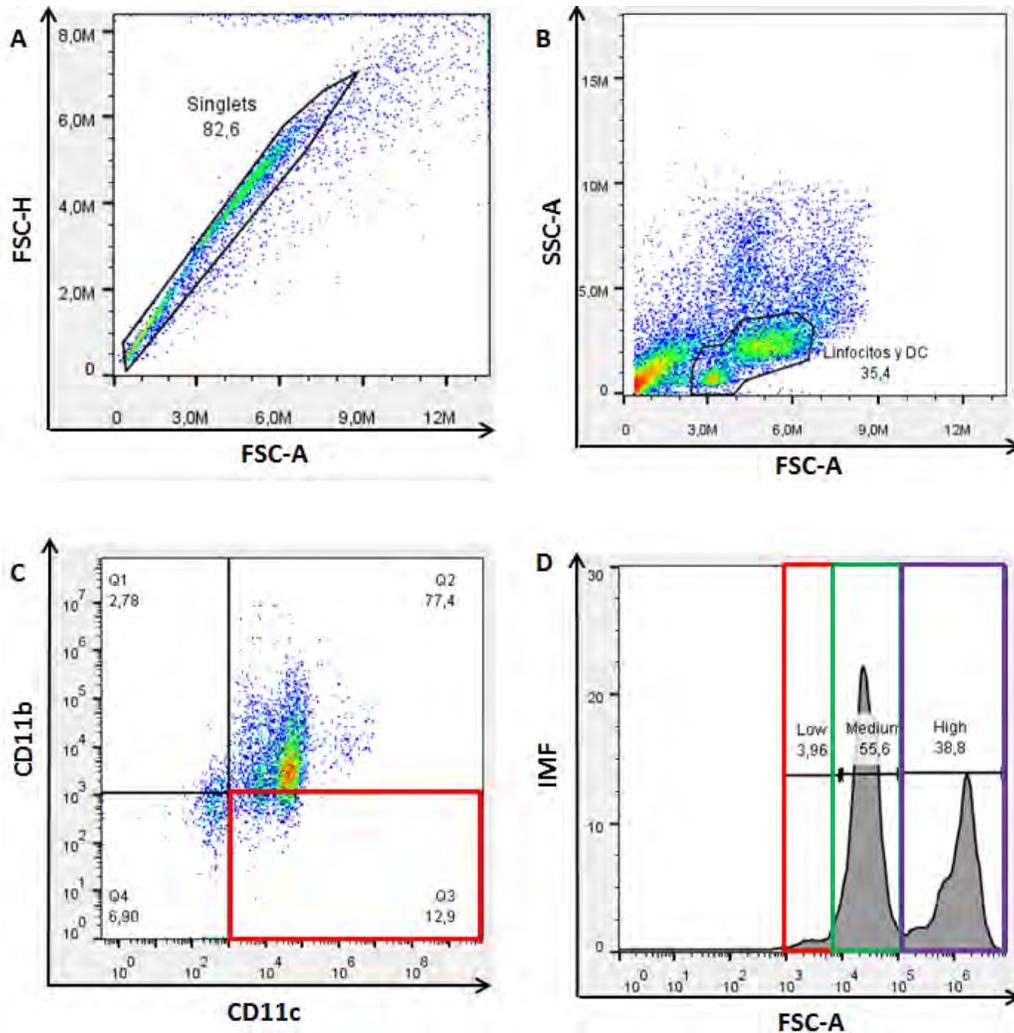


Figura 20. Análisis de citometría de flujo para la selección de las células dendríticas derivadas de médula ósea. A) Selección de singlets. B) Selección de las subpoblaciones de interés. C) Selección de células de interés BMDC, Q3: (CD11c+/CD11b-). D) Selección de los niveles (bajo, medio y alto) de marcadores expresados por BMDC en IMF.

En la figura 20-C se reporta que del total de células que se sometieron a diferenciación, solo el 12.9% fue CD11c+/CD11b-.

Revisando la IMF particular de este grupo celular, comparado con el tamaño de las células, se puede ver una diferenciación en 3 poblaciones distintas de células CD11c+/CD11b-. Estas poblaciones se separaron en **High**, **Medium** y **Low**. Usualmente, para el estudio de un grupo celular, se trabaja con la intensidad media de fluorescencia de la población en general, sin embargo, después de realizar los análisis estadísticos de la población, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la

expresión de ninguna molécula coestimuladora ni coinhibidora, por lo que, con la finalidad de realizar un análisis exhaustivo, se decidió estudiar las poblaciones particulares.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism versión 6.00 para PC. Las variables presentadas son continuas con distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba T- no pareada o un análisis ANOVA de una vía según lo apropiado, y los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD).

A continuación, se presenta el porcentaje de BMDC (CD11c+/CD11b-) del total de células asociadas a los diferentes estímulos (Fig. 21), sobre las que se analiza la expresión de moléculas MHC-II, PD-L1, PD-L2, CD40, CD80 y CD86 en niveles bajo, medio y alto (Fig. 22-27).

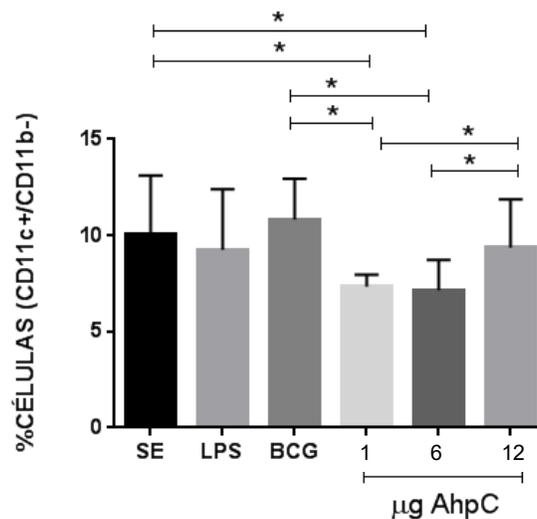


Figura 21. Porcentaje de BMDC (CD11c+/CD11b-). SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimadas con LPS. BCG: Estimadas con BCG. 1; 6; 12: Estimadas con 1, 6 y 12 μ g del péptido AhpC respectivamente. Medias \pm SD. Diferencias estadísticamente significativas con prueba T no pareada *P<0,05.

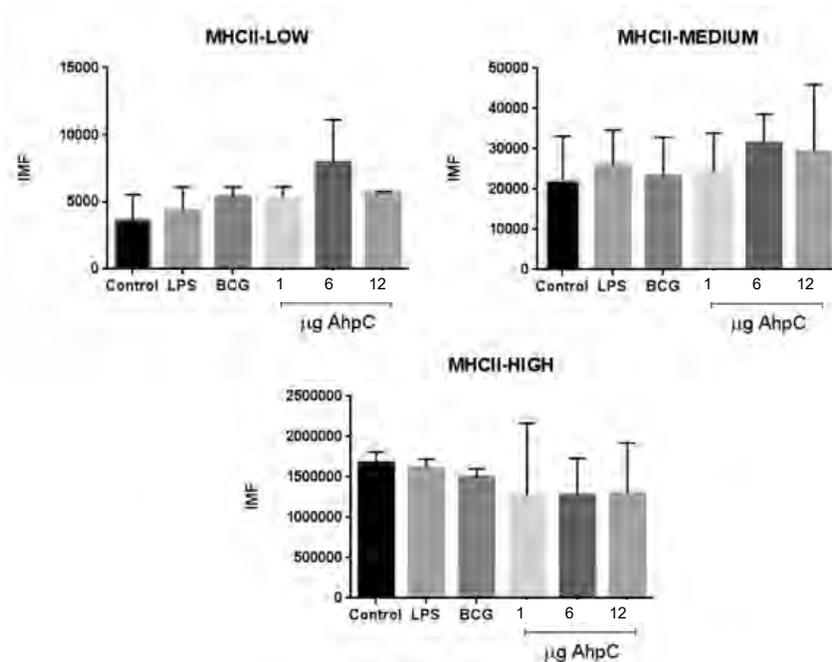


Figura 22. Niveles de MHC-II bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 µg del péptido AhpC respectivamente. Media±SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la expresión de la molécula MHCII (Fig. 22), no se observaron diferencias significativas en ninguna de las poblaciones, ni siquiera en los controles positivos (LPS y BCG) en los que se esperaba un incremento en la expresión.

Para las moléculas PDL1 (Fig. 23), se sabe que el LPS induce su expresión, aunque en menor medida que las demás moléculas coestimuladoras (55), pero no se observa ningún cambio, ni con los controles, ni con la proteína (Fig. 23).

En PDL2 se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la población Low de CDs (Fig. 24). Se sabe que la expresión de PDL2 no es estimulada con LPS (56, 57) ni con *M. bovis* BCG (51), por lo que concuerda que no haya diferencias con estos controles. La proteína pareció incrementar la expresión de este marcador, llegando a un nivel máximo con 6 µg.

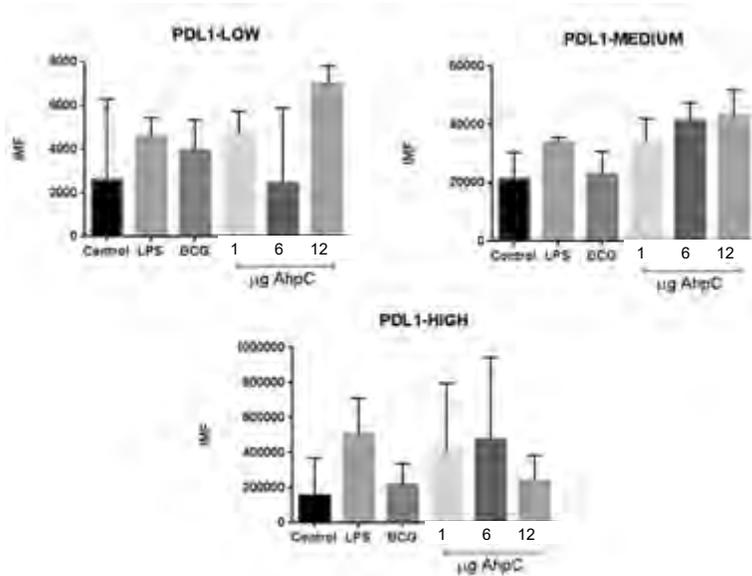


Figura 23. Niveles de PD-L1 bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 µg del péptido AhpC respectivamente. Media±SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

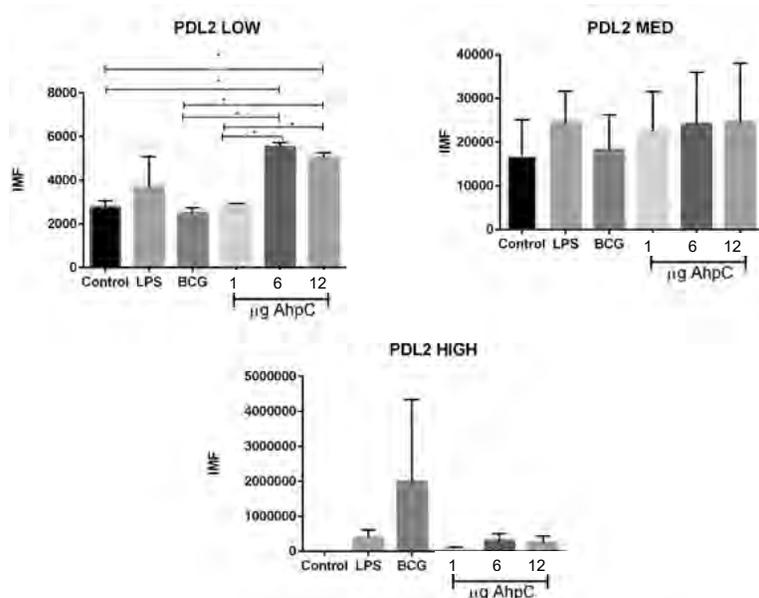


Figura 24. Niveles de PD-L2 bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 µg del péptido AhpC respectivamente. Medias ±SD. Diferencias estadísticamente significativas *P<0,05.

En las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 (Fig. 25-27) se esperaba que LPS estimulara su expresión (58) así como BCG, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los estímulos en ninguna de las poblaciones estudiadas.

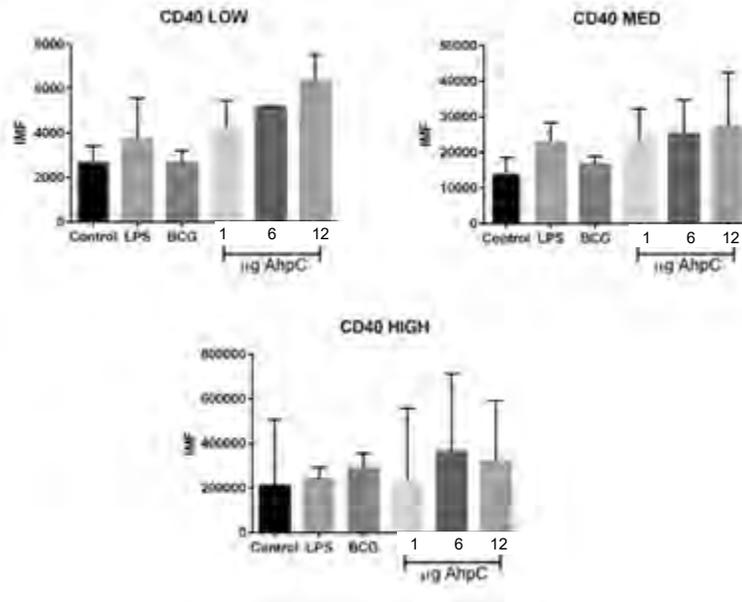


Figura 25. Niveles de CD40 bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimadas con LPS. BCG: Estimadas con BCG. 1; 6; 12: Estimadas con 1, 6 y 12 µg del péptido AhpC respectivamente. Media±SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

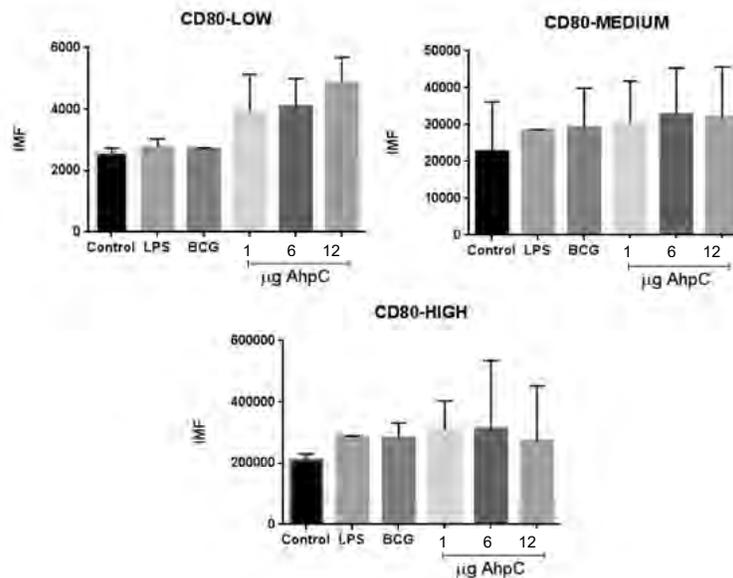


Figura 26. Niveles de CD80 bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μg del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

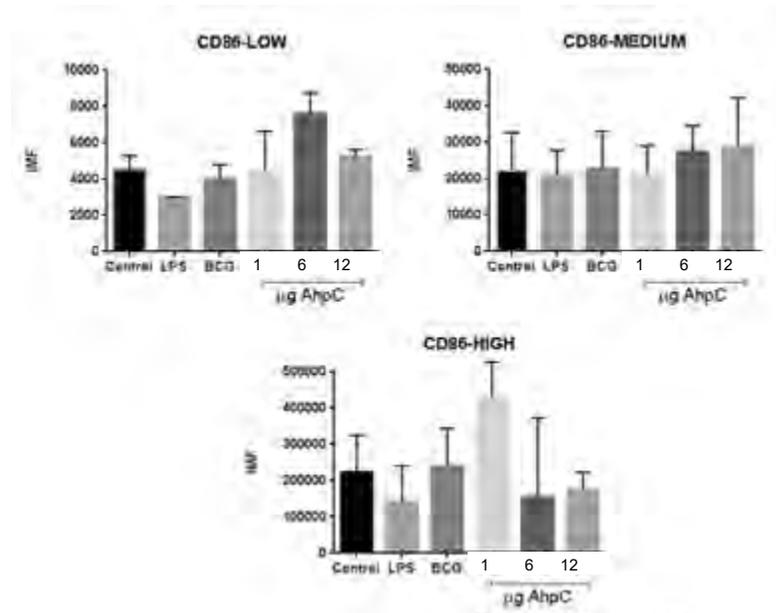


Figura 27. Niveles de CD86 bajo, medio y alto expresados por las BMDC estimuladas. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μg del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

Determinación de la secreción de citocinas

Después de recolectar el sobrenadante, se determinó la concentración de citocinas secretadas por las células de la población en general, de la cual, el 12% estaba formada por células CD11c+/CD11b- como se explicó anteriormente. Es probable que el resto de células estuviera formado por macrófagos derivados de macrófagos (59), así como de células no diferenciadas.

Los análisis estadísticos también se realizaron con el programa informático GraphPad Prism versión 6.00 para PC con los datos de Intensidad Media de Fluorescencia. Las variables presentadas son continuas con distribución normal, por lo que se les aplicó la prueba T- no pareada, y los datos se presentan como media \pm desviación estándar. A

continuación, se presenta el análisis de la secreción de IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF (Fig. 28-32).

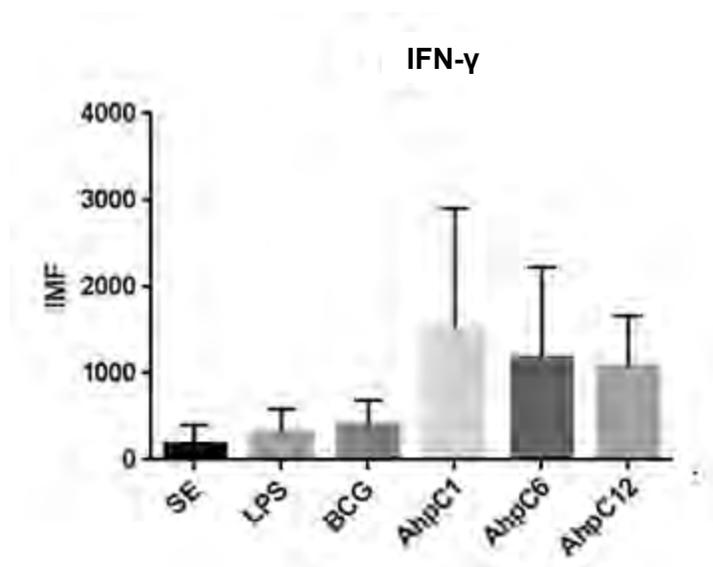


Figura 28. Niveles de IFN- γ expresados en los sobrenadantes. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μ g del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la secreción de IFN- γ (Fig. 28), se esperaba que tanto el control LPS como la vacuna BCG lo indujeran; sin embargo, no se observaron diferencias entre el control sin estímulo y estos controles positivos. No hubo diferencia entre la secreción de citocinas provocada por la proteína AhpC.

Para IL-6 (Fig. 29) también se esperaba que tanto LPS como BCG México estimularan su expresión. En este caso solo se observó una diferencia significativa entre LPS y el control negativo, lo cual es interesante, ya que fue una de las dos citocinas en la que se lograron encontrar diferencias significativas. Por otro lado, se observaron diferencias entre las proteínas y el control negativo, sugiriendo que la expresión de IL-6 es dosis dependiente.

La otra citocina en la que se encontraron diferencias significativas fue IL-10 (Fig. 30). En este caso, no se esperaba que LPS ni BCG estimularan la producción de dicha citocina, pero se puede ver que BCG logró estimular, con una diferencia discreta pero significativa, su producción. Para la proteína solo se observó una diferencia entre la concentración más alta de la proteína y el control negativo, así como también con BCG.

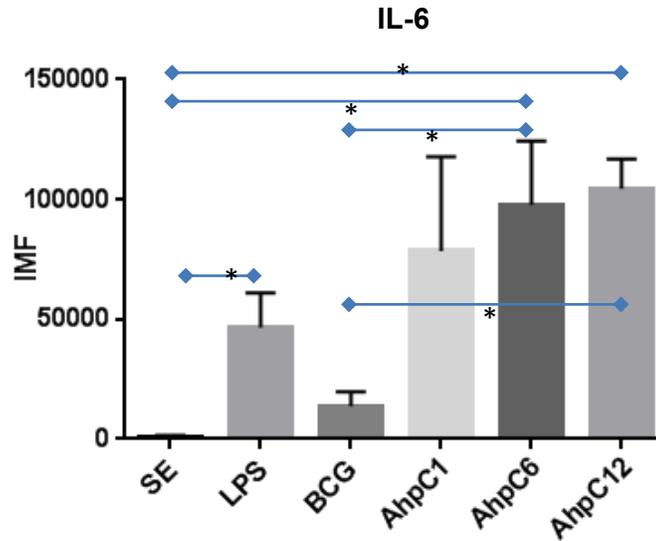


Figura 29. Niveles de IL-6 expresados en los sobrenadantes. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μg del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Cada línea muestra una diferencia estadísticamente significativa entre dos barras distintas.

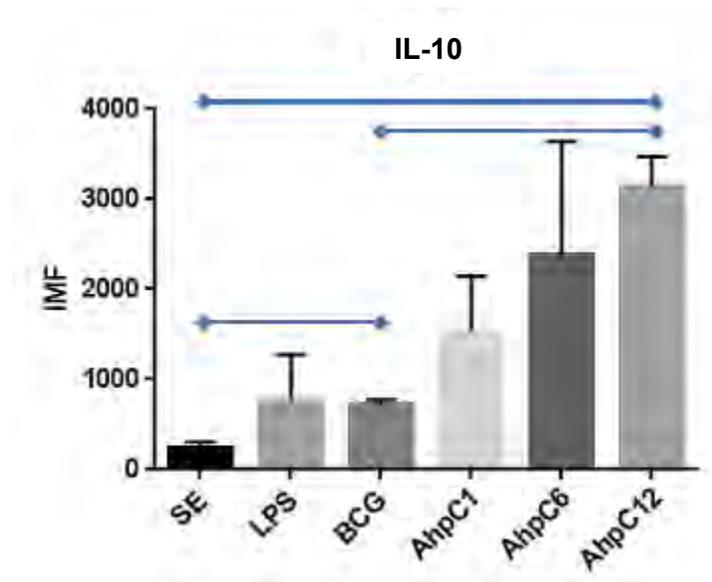


Figura 30. Niveles de IL-10 expresados en los sobrenadantes. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μg del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Cada línea muestra una diferencia estadísticamente significativa entre dos barras distintas.

Por último, para las citocinas IL-12 y TNF- α (Fig. 31 y 32), también se esperaba que LPS estimulara su expresión, así como BCG, pero no se observó ninguna diferencia, ni con los controles ni con las distintas concentraciones de la proteína.

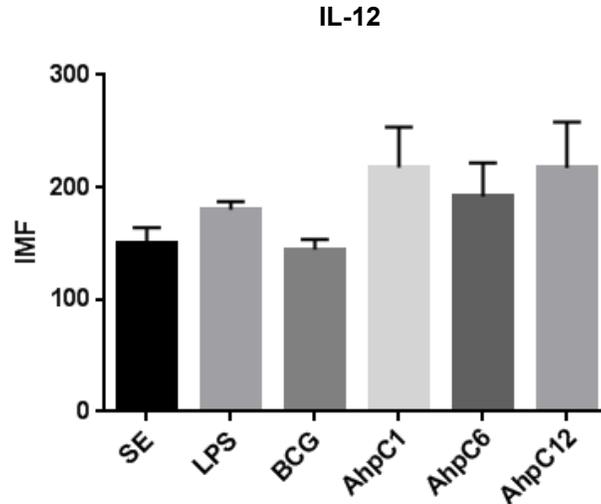


Figura 31. Niveles de IL-12 expresados en los sobrenadantes. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μ g del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

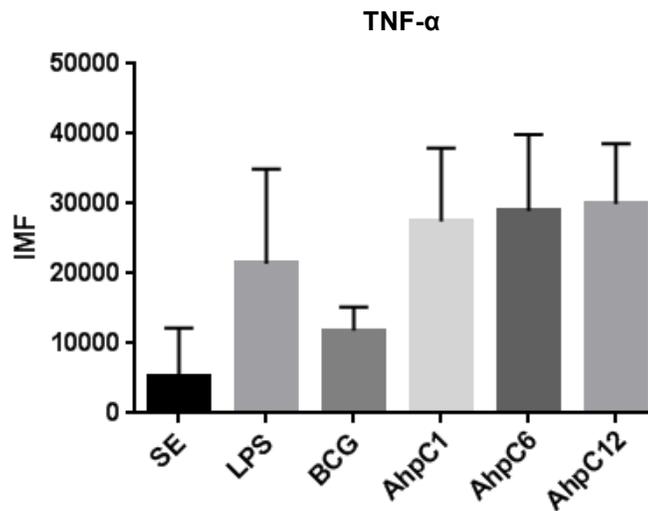


Figura 32. Niveles de TNF- α expresados en los sobrenadantes. SE: Sin estímulo o control. LPS: Estimuladas con LPS. BCG: Estimuladas con BCG. 1; 6; 12: Estimuladas con 1, 6 y 12 μ g del péptido AhpC respectivamente. Media \pm SD. Sin diferencias estadísticamente significativas.

Discusión

Los resultados obtenidos al analizar por citometría de flujo la expresión de receptores en la superficie de las CDs, arrojaron mayoritariamente tendencias conservadas sin diferencias estadísticas significativas excepto para la molécula PDL2 y solo en la población Low (Figura 24). Para las demás moléculas de superficie no se encontraron diferencias ni siquiera con el estímulo de los controles positivos. A continuación se presentan 2 tablas (Tabla 5 y Tabla 6) en las que se reporta lo esperado por los distintos controles utilizados (BCG y LPS):

Tabla 5. Expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas por células dendríticas estimuladas con LPS o *M. bovis* BCG.

Molécula de superficie	Estímulo con LPS	Estímulo con BCG	Referencias
MHCII	↑↑↑	↑↑↑	63, 64, 58, 51
CD80	↑↑↑	↑↑↑	63, 64, 58, 51
CD86	↑↑↑	↑↑↑	63, 64, 58, 51
CD40	↑↑↑	↑↑↑	63, 64, 58, 51
PD-L1	-	↑	55, 56, 57, 51
PD-L2	-	↑	55, 56, 57, 51

↑=Incremento discreto; ↑↑↑=Alto incremento

Tabla 6. Secreción de citocinas por células dendríticas estimuladas con LPS o *M. bovis* BCG.

Citocina	Estímulo con LPS	Estímulo con BCG	Referencias
IFN- γ	↑↑↑	↑↑↑	66, 51, 60, 61
IL-12	↑↑↑	↑↑↑	62, 51, 60, 61
TNF- α	↑↑↑	↑↑↑	62, 51, 60, 61
IL-6	↑↑↑	↑↑↑	65, 51, 60, 61
IL-10	↑	↑	62, 51, 60, 61

↑=Incremento discreto; ↑↑↑=Alto incremento

En el caso de PD-L2, se sabe que ninguno de los estímulos utilizados como control inducen su expresión (BCG puede inducir la expresión, pero a niveles bajos comparado con el tipo de respuesta generada por las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 [51]), por lo que no hay diferencias entre la expresión de ésta molécula en la superficie de las CDs estimuladas con LPS, BCG y las CDs sin estímulo. Las tendencias

apuntan a que respecto al control negativo, la proteína AhpC induce la expresión de PDL2. Podría parecer controversial encontrar esta propiedad en la proteína de la única vacuna que concede protección en contra de la tuberculosis, pero no se debe olvidar que varios estudios han relacionado una respuesta moduladora con las micobacterias. Un estudio menciona que en los casos de tuberculosis severa, varios grupos de células del sistema inmune sobreexpresan PDL2 (67) y el estudio de Mendoza-Coronel (51), en el que se analizó la interacción de una micobacteria no tuberculosa, *M. avium*, directamente con las CD8, encontró que ésta logra inducir la expresión de dicho marcador con lo que puede modular la respuesta inmune de la vacuna.

Considerando que el porcentaje de identidad entre las secuencias de esta proteína en las distintas bacterias del género es muy alto (basta realizar un estudio de alineación con la secuencia de AhpC para descubrir que el rango de identidad va del 85% al 99% en el anexo II), se podría relacionar a esta proteína con la respuesta moduladora de la respuesta inmune a ciertos niveles de expresión. Lo anterior podría explicarse más fácilmente si se recuerda que además AhpC ayuda a la sobrevivencia de *M. tuberculosis* dentro de macrófagos y CD8 (27, 49). Tal vez la proteína actúa a otro nivel más allá de la neutralización del ambiente altamente oxidativo generado por estas células inmunes. Por último, se sabe que algunas de las proteínas relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo de micobacterias logran generar respuestas inmunomoduladoras (69).

Todo lo anterior solo es presuntivo, ya que para corroborar la acción moduladora de la proteína en términos de la inducción de expresión de PDL2 sobre la superficie de las CD8, es preciso realizar estudios más detallados, en los que además se confirme una mayor pureza de la proteína analizada, ya que por el momento solo se puede adjudicar esta respuesta a un 65% de la proteína utilizada, entre otras cosas, pero sobre esto se discutirá más adelante. Además, no se debe olvidar que hay una gran diferencia entre la respuesta inmune humana y la respuesta murina (71), por lo que también se debe de considerar realizar este análisis con células dendríticas humanas para verificar el tipo de respuesta obtenido.

Respecto a la expresión de las demás moléculas (CD80, CD86, CD40 y PDL1) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de la proteína ni entre los diferentes estímulos, incluidos los controles, lo cual pudo deberse a varios factores, como pudo ser el proceso de obtención y diferenciación de células dendríticas, así como su consecuente estimulación. Se sabe que una maduración

previa de las células dendríticas a los estímulos reduce su capacidad procesadora de antígenos, aumentando la expresión de las moléculas coestimuladoras, así como de MHCII previo a su presentación con el estímulo (68). Si este fue el caso, es probable que con la capacidad procesadora de antígenos disminuida, la estimulación tanto con controles como con la proteína fuera insuficiente para generar un cambio en la respuesta, aún cuando se utilizara estímulos tan fuertes como LPS y BCG, de los cuales ya se conoce su respuesta. Con respecto a esto se sabe que las CDs alteran su expresión considerando el momento en el que se les estimula. Un estudio en el que estimuló con LPS (el cual es un potente activador de la respuesta inmune) a células dendríticas derivadas de médula ósea recién diferenciadas y diferenciadas cerca de 24 horas después demuestra cambios importantes entre la secreción de las citocinas IL-10 e IL-6 (70), lo que podría explicar lo observado.

Otro de los factores que influyó en estos resultados fue el número de experimentos realizado. Solo se realizaron dos experimentos independientes sin duplicados internos, debido a que no se obtuvo un número adecuado de CDs para realizar el estudio. La demanda de un experimento con su duplicado es de mínimo veinte millones de CDs, obteniéndose aproximadamente cinco millones de CDs por cada ratón sacrificado (23) y de lo cual se estableció que para el presente trabajo se requerían ocho ratones (40 millones de células) para realizar dos experimentos independientes con su respectivo duplicado (Fig. 33). En el presente trabajo, por cada experimento (es decir; por cada ratón) se obtuvieron como máximo tres millones de CDs indicando cerca de la mitad de los rendimientos esperados (aproximadamente veinticuatro millones de células finales). La obtención de rendimientos diferentes a los reportados en la literatura implica la necesidad, para siguientes trabajos de investigación, de estandarizar las técnicas implicadas en la obtención de CDs.

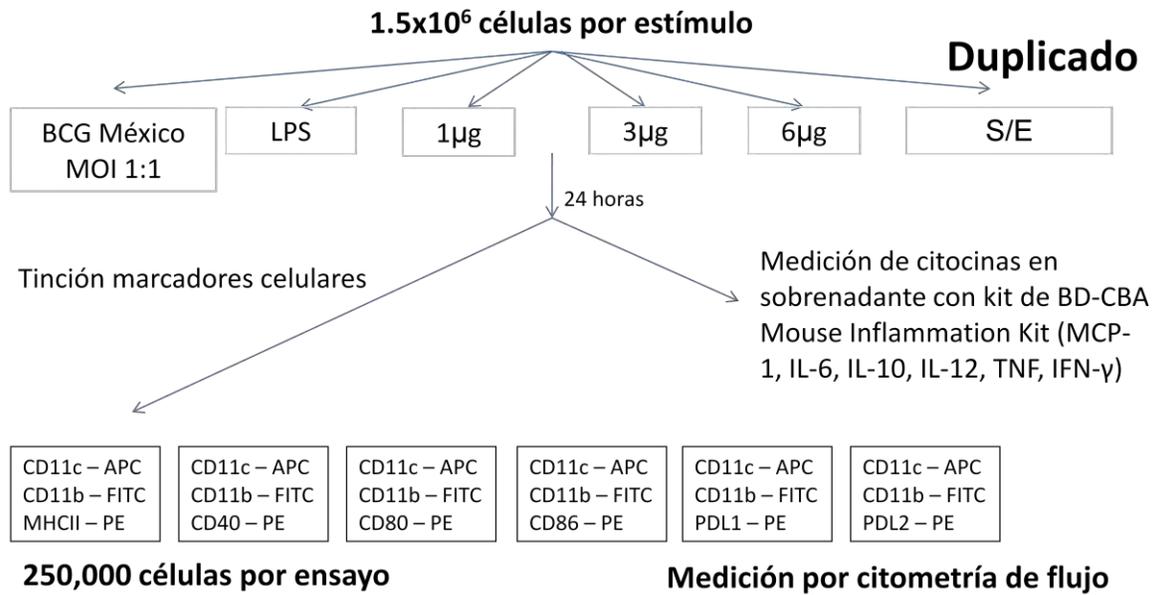


Figura 33. Metodología de estimulación y marcaje de células dendríticas. De un total de 10 millones de células, se dividieron millón y medio por estímulo (1 para estimular BCG México, 1 para estimular con LPS y así sucesivamente), para que una vez realizado el estímulo, se pudieran tomar 250,000 células por ensayo de citometría de flujo, considerando los esquemas de marcaje de receptores descritos en los cuadros inferiores. Al final las citosinas secretadas fueron separadas y medidas.

Además de una obtención más grande de células dendríticas, el diseño experimental pudo haberse optimizado para utilizar un número menor de células por estudio. Por estímulo se tuvieron que realizar 7 ensayos distintos, considerando que solo se contaba con anticuerpos con 3 tipos de fluorocromos distintos (un ensayo para medir CD11c con APC, CD11b con FITC y MHCII con PE, otro ensayo para medir CD11c con APC, CD11b con FITC y CD80 con PE, y así sucesivamente). Tomando esto en cuenta, se sugiere para estudios posteriores que se diseñen estudios en los que se mida la mayor cantidad de moléculas de superficie por ensayo considerando el uso de más fluorocromos, con el propósito de utilizar un menor número de células dendríticas así como para reducir el error experimental.

En cuanto a las citocinas secretadas 24 horas posterior a los diferentes estímulos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas solo en la secreción de IL-6 e IL-10 (lo cual, podría estar relacionado con lo anteriormente mencionado sobre la previa

estimulación de las células dendríticas [70]). Con respecto a TNF- α , IFN- γ e IL-12 no se encontraron estas diferencias.

La inducción en el incremento de la expresión de dichas moléculas, parece ser directamente dependiente de la concentración de la proteína. Estas citocinas pueden ser producto no solo de las células que lograron diferenciarse en células dendríticas, si no de otras células inmunes diferenciadas en el cultivo de células derivadas de médula ósea (como macrófagos [59]). Solamente cerca del 10% de las células totales lograron ser diferenciadas (Figura 21), por lo que es difícil establecer una relación directa entre la secreción de citocinas y las células dendríticas.

Por lo anterior, se proponen para siguientes proyectos otras estrategias de estudio: La primera estrategia consiste en realizar tinciones intracelulares de las citocinas, así como tinción de factores de transcripción, para adjudicar directamente los cambios a las células de estudio. La segunda consiste en que, posterior a la diferenciación de células derivadas de médula ósea, se realice un sorting por citometría de flujo para separar las células dendríticas, estimularlas y así medir la secreción únicamente relacionada con estas. Por último, para realizar un estudio más completo y así determinar qué tipo de activación y de respuesta está generando la proteína en las CDs, es preciso realizar ensayos funcionales en los que se rete a linfocitos T autólogos con las CDs.

Además de lo mencionado anteriormente, también se debe tomar en cuenta el proceso de purificación y sobreexpresión de la proteína. La cantidad final de proteína obtenida fue muy baja (150 μ g, lo cual también fue una de las razones por las que se plantearon los estímulos de 1 μ g, 6 μ g y 12 μ g para las células inmunes). Esto podría aumentar mejorando las condiciones de sobreexpresión de la clona:

Comenzando por el organismo utilizado: *E. coli* DH5 α . Se utilizó *E. coli* ya que es un organismo ampliamente utilizado para la expresión de proteínas, incluso de *Mycobacterium* (74). Particularmente, aunque *E. coli* DH5 α es una cepa utilizada por sus buenas condiciones de estabilidad para mantener insertos, hay mejores cepas para la producción de proteínas, como *E. coli* BL21 (71). Podría considerarse para otros estudios intentar utilizar incluso una micobacteria como sistema de expresión *M. smegmatis*, ya que muchos de los problemas encontrados en este experimento, como la agregación de la proteína, podría resolverse utilizando a esta micobacteria (75). Por otro lado, en cuanto a la proteína como tal, se observó que posiblemente se agregaba en cuerpos de inclusión

en la figura 15, al verse una disminución en la banda de la proteína buscada entre los tiempos de 6 horas y 20 horas. Aunque esto se tomó en cuenta para las condiciones de sobreexpresión, estudios posteriores deberán considerar inducir a temperaturas más bajas para ayudar a tener una cantidad más grande de proteína inducida funcional soluble (53, 54, 73).

Al analizar las fracciones de la purificación por medio de densitometría después de haber realizado la cromatografía de afinidad, se observó que la proteína de estudio representaba un 65% del total de proteínas de la muestra, que además fue confirmada por inmunodetección. Si bien la cromatografía ayudó a enriquecer la proteína, no fue suficiente para generar una buena pureza. Uno de los factores que se puede modificar para aumentar la pureza, es aumentar la cantidad de Imidazol utilizada en el buffer de lavado de la columna, para así eliminar una mayor cantidad de proteínas inespecíficas (40, 41). O bien, si se contara con una cantidad mayor de proteína con la cual trabajar, se podría repetir el proceso de cromatografía por columna de níquel para enriquecer aún más la fracción.

Para verificar el proceso de purificación de la proteína, otra de las cosas que se deberán tomar en cuenta en un futuro al momento de realizar tanto los western blots como inmunoblots identificando por anticuerpos antihistidinas, es que se necesita comparar a la proteína purificada contra la proteína soluble tanto del cultivo sin inducir como del cultivo inducido, para monitorear paso por paso el experimento y así poder tener un mayor control sobre las variables involucradas, lo cual no fue realizado en este proyecto. Ya con la proteína purificada se requerirán realizar ensayos que demuestren tanto la funcionalidad de ésta como su estructura, así como obtener su secuenciación, para garantizar que se está trabajando con la proteína estudiada y así poder asignarle con la mayor certeza posible el papel que juegue en la respuesta inmunológica.

Aunque este trabajo es meramente inicial, constituye la base para estudios ulteriores en los que se decida investigar el papel, no solo de esta proteína, si no de otras relacionadas con la respuesta inmunológica generada por la vacuna de *M. bovis* BCG.

Conclusiones

Al estimular células dendríticas derivadas de médula ósea con la proteína AhpC recombinante de *M. bovis* BCG México expresada en *E. coli*, se encontró un incremento en la producción de la molécula de superficie PDL2. Por otro lado, se observó un incremento en la secreción de las citocinas IL6 e IL10 en el medio de diferenciación. Lo anterior parece indicar que AhpC no activó la maduración de células dendríticas murinas para conseguir una respuesta inmunológica protectora, pero para verificarlo, se deberán realizar estudios más detallados en los que se consideren las variables aquí descritas.

Perspectivas

En el presente trabajo se planteó el estudio de la proteína de estrés AhpC de *M. bovis* BCG México, la cual está relacionada con la primera respuesta de la vacuna con el hospedero, con una de las células más importantes en la definición de la respuesta inmune adaptativa, con la finalidad de comprender a fondo cómo es que confiere protección. Aunque este estudio fue preliminar, ayudó a establecer las bases para próximas contribuciones que consideren las áreas de oportunidad aquí encontradas en este trabajo.

Estas áreas incluyen: la estandarización de protocolos de sobreexpresión y de purificación de moléculas micobacterianas en sistemas como *E. coli*, que son sencillos y fácilmente manejables, así como la definición de la secuencia, estructura y funcionalidad de las proteínas obtenidas. En cuanto al estudio inmunológico, se deberá considerar mejoras en la estandarización de los métodos de diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea y de análisis de las moléculas de superficie y citocinas secretadas, separando las células diferenciadas del resto para lograr una respuesta más relacionada con la proteína de estudio.

Además, se deberá extender el estudio para incluir a otras proteínas que tengan distintos niveles de participación en la respuesta inmunológica, así como ampliar el enfoque para estudiar la interacción de éstas con otras células del sistema inmunológico, para así lograr definir los mecanismos involucrados en la respuesta generada por la vacuna.

Bibliografía

1. Mostowy S, Imwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol. 2005;187:6386-6395.
2. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:3684-9.
3. Mendoza Coronel, Elizabeth. Modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG como consecuencia de la interacción de células dendríticas con *Mycobacterium avium*. Tesis Doctorado. México 2011.
4. Flores Moreno, Karen. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra BCG México. México 2010. Tesis Licenciatura.
5. Anónimo. 2011. "Global tuberculosis control 2011". WHO 2011.
6. Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B. BCG vaccines, their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Hum Vaccin. 2009;5(2):70-78; 2009.
7. Ritz N, Hanekom WA, Robins-Browne R, Britton WJ, Curtis N. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. FEMS Microbiol Rev. 2008;32: 821-841.
8. Orduña Estrada Patricia. Caracterización genómica de M. bovis BCG México. 2012. Tesis Doctorado.
9. Brosch R, Gordon SV, Garnier Tet al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104: 5596–5601.
10. Wu B, Huang C, Garcia L et al. Unique Gene expression profiles in infants vaccinated with different strains of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guerin. Infect Immun. 2007;75: 3658–3664.
11. Orduña P, Cevallos MA, Ponce-de-León S, Arvizu A, Hernández-González IL, Mendoza-Hernández G, López-Vidal Y. Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. BMC Genomics. 2011;12:493.
12. Qamra R, Mande SC, Coates ARM, Henderson B. The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2005;85: 385-394.

13. Wolfe LM, Mahaffey SB, Kruh NA, Dobos KM. Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J Proteome Res. 2010;9:5816-5826
14. Atassi MZ. Protein Reviews. Volume 7: Cell Stress Proteins. Capítulo 2. Springer Science. 2007.
15. Chowdhury R, Sahu GK, Das J. Stress response in pathogenic bacteria. J Biosci. 1996;21(2):149-160.
16. Imlay, JA. How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. Adv Microb Physiol. 2002;46:111–153.
17. Lund PA. Multiple chaperonins in bacteria – why so many? FEMS Microbiol Rev. 2009;33:785-800.
18. Wolfe LM, Mahaffey SB, Kruh NA, Dobos KM. Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J Proteome Res. 2010;9:5816-5826.
19. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 6ta edición. Elsevier, 2008.
20. Cooper AM. Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2009;27:393-422.
21. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of Human Dendritic Cells Following Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol. 1997;159:635-643.
22. Jaeger T. Peroxiredoxin Systems in Mycobacteria. Capítulo 9 de Peroxiredoxin Systems, Structures and Functions. Subcellular Biochemistry Volume 44. Springer 2007.
23. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J. Immunol Methods 1999;223:77-92.
24. Koshkin A, Knudsen GM, Ortiz-de-Montellano PR. Intermolecular interactions in the AhpC/AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Biochem Biophys. 2004;427:41-47.
25. Bryk R, Griffin P, Nathan C. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. 2000. Nature 407;211-215.
26. Trujillo M, Mauri P, Benazzi L, Comini M, De-Palma A, Flohé L, Radi R, Stehr M, Singh M, Ursini F, Jaeger T. The Mycobacterial Thioredoxin Peroxidase Can Act as a One-cysteine Peroxiredoxin. J Biol Chem. 2006;281(29):20555-66.

27. Jaeger T, Flohé L. The thiol-based redox networks of pathogens: Unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors*. 2006;27:109-120.
28. Mishra Y, Hall M, Chaurasia N, Rai LC, Jansson S, Schröder WP, Sauer UH. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2011;F67:1203-1206.
29. Guimaraes BG, Souchon H, Honore N, Saint-Joanis B, Brosch R, Shepard W, Cole ST, Alzari PM. Structure and Mechanism of the Alkyl Hydroperoxidase AhpC, a Key Element of the *Mycobacterium tuberculosis* Defense System against Oxidative Stress. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25735-42.
30. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 2a. edición. *Molecular Cloning, a laboratory manual*.
31. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166:557-580.
32. Hanahan, D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In *DNA Cloning: a practical approach*. Volume 1, Glover, D.M., 1985 pp. 109-135. Oxford University Press.
33. Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transforation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972;69:2110-2114.
34. WHO, 2015. "Global tuberculosis control 2014". WHO 2015.
35. High Pure PCR Product Purification Kit. REF 11732676001. Qiagen.
36. <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>
37. Seidman CE, Struhl K, Sheen J, Jessen T. 1997. Introduction of plasmid DNA into cells. *Curr Protoc Mol Biol*. 1.8.1-1.8.10.
38. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. 1991. *Current protocols in immunology*. John Wiley and Sons: New York.
39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
40. Manual de QIAGEN de columnas de Ni²⁺ para purificación de proteínas.
41. *Recombinant protein purification handbook. Principles and methods*. GE Healthcare.

42. Chauhan R, Mande SC. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem. J.* 2001;354, 209:215.
43. Mishra Y, Hall M, Chaurasia N, Chand Rai L, Jansson S, Schrodera WP, Sauerb UH. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Acta Cryst.* 2011;F67, 1203–1206.
44. Guimara BG, Souchon H, Honore N, Saint-Joanis B, Brosch R, Shepard W, Cole ST, Alzari PM. Structure and Mechanism of the Alkyl Hydroperoxidase AhpC, a Key Element of the *Mycobacterium tuberculosis* Defense System against Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005;280(27-8), 25735–42.
45. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, Santangelo MP, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013; 4(1), 3-66.
46. Abdallah AM, Cawthorne GAH, Otto TD, Coll, F, Guerra-Assunção JA, Gao G, Naeem R, Ansari H, Malas TB, Adroubi SA, Verboom T, Ummels R, Zhang H, Panigrahi AK, McNerney R, Brosch R, Clark TG, Behr MA, Bitter W, Pain A. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Scientific Reports*, 2015; 5:15443.
47. Gengenbacher M, Kauffmann SHE. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(3):514-532.
48. Springer B, Master S, Sander P, Zahrt T, McFalone M, Song J, Papavinasundaram KG, Colston MJ, Boettger E, Deretic V. Silencing of Oxidative Stress Response in *Mycobacterium tuberculosis*: Expression Patterns of *ahpC* in Virulent and Avirulent Strains and Effect of *ahpC* Inactivation. *Infection and Immunity*, 2001;Oct, 5967-5973.
49. Mendum TA, Wu H, Kierzek AM, Stewart GR. Lipid metabolism and Type VII secretion systems dominate the genome scale virulence profile of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *BMC Genomics* 2015; 16:372.
50. Manual de Invitrogen para el uso del vector de expresión de proteínas recombinantes pTrcHisA, B y C.

51. Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz LC, López-Vidal Y. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to *Mycobacterium avium* downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* 2011;91, 36-46.
52. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96
53. Ghosh S, Rasheedi S, Rahim SS, Banerjee S, Choudhary RK, Chakhaiyar P, Ehtesham NZ, Mukhopadhyay S, Hasnain SE. Method for enhancing solubility of the expressed recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques*. 2004; 37(3), 418.
54. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014; 17(5), 172.
55. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll DM, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC1. *J Immunol*. 2002; 15; 169(10), 5538-45.
56. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, Kurahara C, Lott F, Sun N, Welcher AA, Dong C. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103(31), 11695-700.
57. Mouse Anti-Human PD-L2, Inserto producto Real Tech Product: 101-M604.
58. Villadangos JA, Cardoso M, Steptoe RJ, van Berkel D, Pooley J, Carbone FR, Shortman K. MHC Class II Expression Is Regulated in Dendritic Cells Independently of Invariant Chain Degradation. *Immunity*, 2001; 14(6), 739-49.
59. Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, Goubau D, Reis e Sousa C. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 2015; 42(6), 1197-211.
60. Satchidanandam V, Kumar N, Jumani RS, Challu V, Elangovan S, Khan NA. The Glycosylated Rv1860 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Inhibits Dendritic Cell Mediated TH1 and TH17 Polarization of T Cells and Abrogates Protective Immunity Conferred by BCG. *PLoS Pathog*, 2014; 10(6), e1004176.
61. Xu Z, Meng C, Qiang B, Gu H, Sun L, Yin Y, Pan Z, Chen X, Jiao X. Differential Effects of *Mycobacterium bovis* BCG on Macrophages and Dendritic Cells from Murine Spleen. *Int J Mol Sci*, 2015; 16(10), 24127-38.

62. Qi H, Denning TL, Soong L. Differential Induction of Interleukin-10 and Interleukin-12 in Dendritic Cells by Microbial Toll-Like Receptor Activators and Skewing of T-Cell Cytokine Profiles. *Infect Immun*, 2003; 71(6), 3337-42.
63. Burzyn D, Rassa JC, Kim D, Nepomnaschy I, Ross SR, Piazzon I. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus. *J Virol*, 2004; 78(2), 576-84.
64. Kalupahana RS, Mastroeni P, Maskell D, Blacklaws BA. Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunology*, 2005; 115(4), 462-72.
65. Moghaddami M, James M, Whittle SL, Cleland LG. Synovial fluid myeloid dendritic cells display important differences compared to monocyte-derived dendritic cells prepared in vitro. *Clin Trans Immunology*, 2014; 8;3 (8), e23.
66. Fricke I, Mitchell D, Mittelstädt J, Lehan N, Heine H, Goldmann T, Böhle A, Brandau S. Mycobacteria Induce IFN- γ Production in Human Dendritic Cells via Triggering of TLR2. *J Immunol*, 2006; 1;176(9), 5173-82.
67. Qiu L, Huang D, Chen CY, Wang R, Shen L, Shen Y, Hunt R, Estep J, Haynes BF, Jacobs WR Jr, Letvin N, Du G, Chen ZW. Severe tuberculosis induces unbalanced up-regulation of gene networks and overexpression of IL-22, MIP-1 α , CCL27, IP-10, CCR4, CCR5, CXCR3, PD1, PDL2, IL-3, IFN-beta, TIM1, and TLR2 but low antigen-specific cellular responses. *J Infect Dis*, 2008; 15; 198(10), 1514-9.
68. Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke GW 3rd, Tzakis AG, Ricordi C, Miller J, Esquenzai V. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. *Hum immunol*, 2004; 65(2), 93-103.
69. Spiering R, van der Zee R, Wagenaar J, van Eden W, Broere F. Mycobacterial and mouse HSP70 have immuno-modulatory effects on dendritic cells. *Cell Stress Chaperones*, 2013; 18(4), 439-46.
70. Jiang HR, Muckersie E, Robertson M, Xu H, Liversidge J, Forrester JV. Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture. *J Leukoc Biol*, 2002; 72(5), 978-85.
71. Klechevsky E. Functional Diversity of Human Dendritic Cells. *Adv Exp Med Biol*, 2015; 850, 43-54.

72. Phue JN, Lee SJ, Trinh L, Shiloach J. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnol Bioeng*, 2008; 1;101(4), 831-6.
73. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2010; Capítulo 5, Unidad 5.24, 1-29.
74. Fang Z, Schubert WD, Gey van Pittius NC. Expression and production of soluble *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mycosin-3. *Biochem Biophys Rep*, 2016; 5, 448-452.
75. Bashiri G, Baker EN. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. *Protein Sci*, 2015; 24(1), 1-10.

Anexo I

Para preparar las células electrocompetentes se estriaron las bacterias a preparar en una caja LB sin antibiótico y se dejaron crecer a 37°C toda la noche. Se seleccionó una colonia y se inoculó en medio LB sin antibiótico a 37°C toda la noche. Se inocularon 200 mL de LB con el cultivo anterior y se colocaron a 37°C en agitación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm. Se enfrió y se centrifugó 5 minutos a 5000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en glicerol al 10% después de lavar con glicerol para guardar a -80°C.

Para transformar por electroporación, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se añadió el DNA (libre de sales) a transformar. Se dio un pulso en electroporador (para celdas de 0.1 mm, 12000 V, para celdas de 0.2 mm-24000 V). Se añadió medio SOC (o LB) y se incubó una hora a 37°C. Se plaqueó en medio selectivo (con ampicilina).

Para el método de lisis alcalina se incubaron bacterias transformadas en caldo Luria a 37°C toda la noche. Se centrifugó a 10000 g y se resuspendió la pastilla en Solución I (las soluciones se describen en la tabla 1), dejando reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µL de solución II (preparada al momento) y se dejó 5 minutos en hielo. Por último, se adicionaron 150 µL de solución III y se dejó 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 15500 g por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, al que se adicionó RNAsa y Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 15500 g, 4°C por 10 minutos y se recuperó la fase líquida, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol frío al 100% y se dejó toda la noche a 2°C. Se centrifugó a 15500 g, 4°C por 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó con etanol al 70%, se secó la pastilla por completo y se resuspendió en agua de PCR.

Tabla 1. Soluciones para la lisis alcalina.

Solución 1	Solución 2	Solución 3
Preparar en 100 mL	Para 2 mL	Para una solución 3M
Glucosa 50 mM	NaOH 10N 40 µL	CH ₃ CO ₂ K 5M 60mL
Tris-HCl (pH 8) 25mM	SDS 10% 200µL	CH ₃ COOH glacial 11.5mL
EDTA (pH 8) 10mM	Agua 1.760 mL	Agua 28.5 mL

Anexo II

Resultado de ensayo BLAST para comparar secuencias de la proteína AhpC del género *Mycobacterium*:

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI Sign in to NCBI

BLAST® >> blastp suite >> RID-G4Y0UT5K015 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Your search is limited to records matching entrez query: txid1763 [ORGN].
Edit and Resubmit Save Search Strategies > Formatting options > Download You Tube How to read this page Blast report description

M. tuberculosisH37Rv|Rv2428|ahpC

RID G4Y0UT5K015 (Expires on 04-05 22:20 pm)	Database Name nr
Query ID Id Query_358850	Description All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
Description M. tuberculosisH37Rv Rv2428 ahpC	Program BLASTP 2.3.1+ > Citation
Molecule type amino acid	
Query Length 195	

Other reports: > Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results] [Related Structures] [Multiple alignment]

New Analyze your query with SmartBLAST

Graphic Summary

Show Conserved Domains

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

Query seq. 1 25 50 75 100 125 150 175 195

dimer interface catalytic triad decamer (pentamer of dimers) interface peroxidatic and resolving cysteines

Specific hits PRX_Typ2cys

Superfamilies Thioredoxin_like superfamily

Multi-domains AhpC

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

WP_031744655 alkyl hydroperoxide reductase [Mycobacterium tuberculosis. S=400 E=9.7e-148]

Color key for alignment scores

Score Range	Color
<40	Black
40-50	Blue
50-80	Green
80-200	Pink
>=200	Red

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Mycobacteriaceae	high GC Gram+		100	
· Mycobacterium	high GC Gram+		5	
· · Mycobacterium tuberculosis complex	high GC Gram+	402	2	Mycobacterium tuberculosis complex hits
· · Mycobacterium tuberculosis	high GC Gram+	401	60	Mycobacterium tuberculosis hits
· · Mycobacterium canettii	high GC Gram+	400	3	Mycobacterium canettii hits
· · Mycobacterium tuberculosis H37Rv	high GC Gram+	393	1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv hits
· · Mycobacterium tuberculosis str. Haarlem/NITR202	high GC Gram+	388	1	Mycobacterium tuberculosis str. Haarlem hits
· · Mycobacterium gordonae	high GC Gram+	382	1	Mycobacterium gordonae hits
· · Mycobacterium asiaticum	high GC Gram+	379	1	Mycobacterium asiaticum hits
· · Mycobacterium kansasii	high GC Gram+	375	2	Mycobacterium kansasii hits
· · Mycobacterium qastri	high GC Gram+	374	1	Mycobacterium qastri hits
· · Mycobacterium ulcerans Agy99	high GC Gram+	372	1	Mycobacterium ulcerans Agy99 hits
· · Mycobacterium kansasii 824	high GC Gram+	372	1	Mycobacterium kansasii 824 hits
· · Mycobacterium marinum	high GC Gram+	370	1	Mycobacterium marinum hits
· · Mycobacterium bohemicum DSM 44277	high GC Gram+	369	1	Mycobacterium bohemicum DSM 44277 hits
· · Mycobacterium avium complex (MAC)	high GC Gram+	368	1	Mycobacterium avium complex (MAC) hits
· · Mycobacterium avium	high GC Gram+	367	3	Mycobacterium avium hits
· · Mycobacterium haemophilum	high GC Gram+	367	1	Mycobacterium haemophilum hits
· · Mycobacterium kansasii 732	high GC Gram+	366	1	Mycobacterium kansasii 732 hits
· · Mycobacterium kyorinense	high GC Gram+	365	1	Mycobacterium kyorinense hits
· · Mycobacterium triplex	high GC Gram+	364	1	Mycobacterium triplex hits
· · Mycobacterium genavense	high GC Gram+	363	1	Mycobacterium genavense hits
· · Mycobacterium parascrofulaceum	high GC Gram+	363	1	Mycobacterium parascrofulaceum hits
· · Mycobacterium lentiflavum	high GC Gram+	362	1	Mycobacterium lentiflavum hits
· · Mycobacterium celatum	high GC Gram+	361	1	Mycobacterium celatum hits
· · Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis	high GC Gram+	361	1	Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis hits
· · Mycobacterium nebraskense	high GC Gram+	360	1	Mycobacterium nebraskense hits
· · Mycobacterium europaeum	high GC Gram+	360	1	Mycobacterium europaeum hits
· · Mycobacterium leprae	high GC Gram+	357	1	Mycobacterium leprae hits
· · Mycobacterium simiae	high GC Gram+	357	2	Mycobacterium simiae hits
· · Mycobacterium xenopi	high GC Gram+	356	1	Mycobacterium xenopi hits
· Mycobacterium	high GC Gram+	372	5	Mycobacterium hits

Secuencia en formato FASTA de la proteína AhpC de *M. bovis* BCG México:

>M. tuberculosisH37Rv|Rv2428|ahpC

```
MPLLTIGDQFPAYQLTALIGDLSKVDKQPGDYFTTITSDHEPGKWRVFFWPKDFTFV
CPTEIAAFSKLNDEFEDRDAQILGVSIDSEFAHFQWRAQHNDLKTLPFPMLSDIKRELSQA
AGVLNADGVADRVTFIVDPNNEIQFVSATAGSVGRNVDEVLRVLDALQSDELCA CNWRK
GDPTLDAGELLKASA
```