



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de QFB

**Estandarización y purificación de la proteína
recombinante CstH de la cepa de ETEC E9034A**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA ELIZABETH MEDINA ARROYO

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: DRA. ARIADNNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA

ASESORA: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

ASESOR: MC OMAR FERNÁNDEZ RIVERA

SINODAL: Q.F.B. GONZALEZ MORENO JOSE OSCAR

SINODAL: Q.F.B. ORDUÑA SANCHEZ MANUEL



Ciudad de México

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al laboratorio de bacteriología intestinal del Hospital Infantil de México Federico
Gómez

Dedicatoria

A mi familia

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Resumen | 7 |
| 2. Introducción | 7 |
| 3. Marco teórico | 9 |
| 3.1. <i>Escherichia coli</i> | 9 |
| 3.1.1. Patotipos intestinales | 10 |
| 3.2. <i>Escherichia coli enterotoxigénica</i> | 14 |
| 3.2.1. Factores de colonización | 15 |
| 3.2.2. Enterotoxina: LT y ST | 16 |
| 3.3. CS3 | 19 |
| 3.3.1. Antecedentes de CS3 | 20 |
| 3.4. Proteínas recombinantes | 21 |
| 3.4.1. Hospederos utilizados | 22 |
| 3.4.2. Vector de expresión | 25 |
| 3.5. Purificación de proteínas recombinantes | 32 |
| 3.5.1. Cromatografía de afinidad | 33 |
| 4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación | 35 |
| 5. Hipótesis | 35 |
| 6. Objetivo | 35 |
| 6.1. Objetivo general | 35 |
| 6.2. Objetivos específicos | 35 |
| 7. Material y métodos | 36 |
| 7.1. Material | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 7.2. Reactivos | 36 |
| 7.3. Equipos | 38 |
| 7.4. Metodología | 38 |
| 8. Resultados | 47 |
| 8.1. Verificación del gen cstH transformante | 47 |
| 8.2. Identificación de la proteína CstH en el ensayo de solubilidad | 48 |
| 8.3. Detección de la proteína CstH por WB del ensayo de solubilidad | 49 |
| 8.4. Identificación de la proteína CstH en su proceso de purificación | 50 |
| 8.5. Detección de la proteína CstH mediante WB del proceso de purificación | 51 |
| 8.6. Proteína CstH purificada | 52 |
| 8.7. Cuantificación de la proteína CstH | 53 |
| 8.8. Cuantificación de la proteína CstH concentrada | 54 |
| 9. Discusión | 55 |
| 10. Conclusiones | 58 |
| 11. Referencias | 59 |
| 12. Anexos | 64 |
| 12.1. Anexo 1. Condiciones de PCR | 64 |
| 12.2. Anexo 2. Reactivos | 65 |
| 12.3. Anexo 3. Elaboración de geles para SDS-PAGE | 67 |
| 12.4. Anexo 4. Cuantificación de CstH | 67 |
| 12.5. Anexo 5. Cuantificación de CstH concentrada | 71 |

Índice de abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| cAMP | Monofosfato de adenosina cíclico |
| Células CaCo-2 | Células epiteliales del colon humano |
| Células HeLa | Células epiteliales del cuello uterino humano |
| CFA | Antígeno factor de colonización |
| CFTR | Canal regulador transmembrana de la fibrosis quística |
| cGMP | Monofosfato de guanosina cíclico intracelular |
| CS | Antígeno de superficie de <i>Escherichia coli</i> |
| EAEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatogena |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica |
| ExPEC | <i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal |
| FC | Factor de colonización |
| GH | Hormona del crecimiento humano |
| GST | Glutation S-transferasa |
| GuHCl | Cloruro de guanidinio |
| IMAC | Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados |
| InPEC | <i>Escherichia coli</i> patógena intestinal |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| LT | Toxina termolabil |
| MAEC | <i>Escherichia coli</i> causante de meningitis |
| MBP | Proteína fijadora de maltosa |
| Ni-NTA | Níquel-ácido nitrilotriacético-agarosa |
| OMV | Vesículas de membrana externa |
| ORF | Secuencia codificadora del gen de interés |
| PCF | Factor de colonización putativo |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PR | Proteína recombinante |
| ST | Toxina termoestable |
| TEMED | Tetrametiletilendiamina |
| UPEC | <i>Escherichia coli</i> uropatogénica |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-B-d-galactopiranosido |
| WB | Western-Blot |

1. Resumen

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es una de las principales causas bacterianas de diarrea, especialmente entre los niños en entornos de bajos recursos, los viajeros y el personal militar de países de altos ingresos, provoca alrededor de 220 millones episodios de diarrea en todo el mundo.¹ La adherencia de ETEC hacia las células intestinales esta mediada por fimbrias de superficie, como es CS3. El presente escrito se enfocó en la principal subunidad de CS3, CstH, el principal objetivo fue la expresión y purificación de la proteína recombinante CstH. Para la obtención de la proteína se amplificó el gen *cstH* a partir de la cepa ETEC E9034A, posteriormente el gen se clono en el vector pLATE 31 y se transformó en el hospedero *E. coli* BL21(DE3), a continuación, se indujo la proteína con IPTG, una vez inducida se realizó un ensayo de solubilidad a partir del cual se determinaron las condiciones de purificación de la proteína, una vez purificada se cuantifico y se concentró. Los geles SDS-PAGE revelados con azul de Coomassie y el análisis por Western-blot revelaron bandas de 14 kDa correspondientes a la proteína CstH, se realizaron 3 inducciones de las cuales se obtuvo en conjunto aproximadamente 10 mg de proteína. El uso de técnicas de biología molecular y proteómica fueron clave para la expresión de la proteína, así como para el seguimiento de esta en su proceso de purificación.

2. Introducción

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es uno de los principales agentes causales de diarrea en la población infantil, además es la principal causa de la diarrea del viajero. La diarrea producida por ETEC está asociada al consumo de

agua y alimentos contaminados, asimismo se asocia a condiciones socioeconómicas bajas y un acceso deficiente a agua potable, por lo que, la mejora del agua y el saneamiento son clave para la reducción de enfermedades atribuibles a ETEC, no obstante, estas prácticas son difíciles de llevar a cabo en poblaciones de escasos recursos.^{2,3} Por otro lado, el principal tratamiento hacia ETEC se enfoca en el reemplazo de líquidos y electrolitos, así como la administración de combinaciones trimetoprim-sulfametoxazol más loperamida o ciprofloxacino y ofloxacino, los cuales no pueden administrarse en pacientes pediátricos.⁴ Sumado a esto el aumento de la resistencia a los antibióticos entre las cepas de ETEC ha obstaculizado la eficacia del tratamiento con antibióticos. Por lo que, la disminución de las infecciones por ETEC se ha centrado sobre todo en la prevención, este es el caso, actualmente se investigan vacunas orales a base de factores de colonización.⁴

Para producir diarrea, las cepas de ETEC primero deben adherirse a receptores específicos en el enterocito, esta adherencia esta medida por fimbrias de superficie, que se designan como factores de colonización, entre los cuales se encuentra CS3.⁵ CS3 es uno de los antígenos fimbriales más prevalentes que se encuentra de los aislados clínicos, y su relevancia deriva de estudios anteriores en los cuales se ha demostrado que tiene un papel en el proceso de adherencia de ETEC hacia las células intestinales, por lo cual, esta fimbria podría ser importante para el desarrollo de blancos terapéuticos a base de factores de colonización.

En consecuencia, es importante el estudio de la fimbria CS3, por lo que, el presente escrito se enfocó en el estudio de la principal subunidad de CS3, CstH, en el cual se aborda el proceso de expresión y purificación de la proteína CstH.

3. Marco Teórico

3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, se aisló por primera vez a partir de heces infantiles y Theodor Escherich lo identificó en 1885. Se caracteriza por ser móvil, aerobio y anaerobio facultativo, con flagelos peritricos, la mayoría forma fimbrias y pili, muchas cepas producen una pequeña microcápsula y ninguna produce esporas.⁴ En las pruebas bioquímicas es positivo al indol (98%), rojo de metilo (99%), descarboxilación de la lisina (90%), produce manitol y gas a partir de la fermentación de la glucosa, así mismo fermenta la lactosa (95%), el D-manitol (98%), el D-sorbitol (94%); mientras que es negativo a la oxidasa (0%), fenilalanina desaminasa (0%) y citrato de Simmons (1%).⁶

Coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida, su nicho ecológico es el intestino delgado y grueso, forma parte de la microbiota intestinal sin causar daño, sin embargo, puede causar daño en pacientes inmunocomprometidos o cuando se violan las barreras gastrointestinales.⁷ Por otra parte, también hay cepas patógenas que han evolucionado al adquirir por transferencia horizontal genes, un conjunto particular de características que les permite causar daño tanto en personas sanas como aquellas con sistema inmune debilitado.⁸

Existen clones de *E. coli* altamente adaptadas que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo que les confiere la capacidad de adaptación a nuevos nichos y les permite causar diversas enfermedades.⁵ Estos atributos de virulencia con frecuencia están codificados en elementos genéticos que pueden movilizarse

en diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en patotipos.⁵ Las infecciones producidas por estos patotipos pueden limitarse a las mucosas o diseminarse; tres síndromes clínicos pueden resultar de la infección por estos patotipos: la infección en vías urinarias, la sepsis y la enfermedad diarreica.⁴

La *E. coli* patógena se divide en general en dos grupos: *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* patógena intestinal (InPEC). Dentro de las ExPEC se encuentran *E. coli* uropatogénica (UPEC) y *E. coli* causante de meningitis (MAEC). Mientras que en las InPEC encontramos 5 patotipos, cada uno definido por sus mecanismos de virulencia, el sitio en el cual causan la infección, las interacciones con la célula huésped y los síntomas clínicos que provocan; estos patotipos son: 1) *E. coli* enteropatógeno (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y 5) *E. coli* enteroagregativa (EAEC).^{8,9} A continuación se describen las principales características de los patotipos intestinales y en la figura 1 se puede observar la interacción de cada patotipo con las células intestinales.

3.1.1 Patotipos intestinales

- 1) *E. coli* enteropatógeno (EPEC). Es la principal causa de enfermedades diarreicas y brotes en lactantes, se caracteriza por provocar fiebre leve, vómito, diarrea acuosa profusa con gran cantidad de moco pero sin sangre.^{10,11} Produce una histopatología característica en el epitelio intestinal conocida como lesión de adherencia y borramiento (A/E), las bacterias se

adhieren íntimamente a las células epiteliales intestinales y provocan cambios en el citoesqueleto, incluida la acumulación de actina polimerizada debajo de las bacterias adheridas, así mismo los trastornos del citoesqueleto se acompañan de una respuesta inflamatoria y diarrea.⁵

- 2) *E. coli enterotoxigénica* (ETEC). Se caracteriza por la producción de factores de colonización, así como la producción de 1 o 2 enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST). El síndrome predominante es diarrea acuosa profusa sin sangre, moco o pus.¹¹
- 3) *E. coli enteroinvasiva* (EIEC). Puede causar colitis inflamatoria invasiva y en ocasiones disentería, así como diarrea acuosa.¹¹ La patogenia comprende la penetración de las células epiteliales, seguida de la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación, movimiento direccional a través del citoplasma y extensión a las células epiteliales adyacentes. Cabe mencionar que EIEC está bioquímica, genética y patogénicamente estrechamente relacionada con *Shigella spp.*⁵
- 4) *E. coli enterohemorrágica* (EHEC). Causa diarrea, colitis hemorrágica con diarrea sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico, el principal reservorio de este patógeno es el tracto gastrointestinal bovino y los brotes iniciales se asociaron con el consumo de hamburguesas poco cocidas.¹⁰ Al igual que EPEC también produce lesiones de adherencia y borramiento, pero en el colon; la característica distintiva es la producción de la toxina shiga (Stx),

cuya absorción sistémica conduce a complicaciones potencialmente mortales.⁵

- 5) *E. coli enteroagregativa* (EAEC). Causa varios brotes de diarrea en el mundo y se asocia principalmente con diarrea levemente inflamatoria en niños pequeños, diarrea persistente en adultos y niños con VIH, así como diarrea aguda en viajeros.⁹ Se adhiere a las células epiteliales en un patrón que se asemeja a una pila de ladrillos en una gruesa biopelícula; también elabora enterotoxinas y citotoxinas secretoras, así como factores de colonización de las fimbrias denominados fimbrias de adherencia agregante (AAF).¹¹

Asimismo, se ha descrito otro patotipo menos definido, el patotipo *E. coli difusamente adherente* (DAEC), que comprende cepas que se adhieren a las células epiteliales en una distribución difusa. A pesar de su clasificación como grupo diferenciado del resto de los patotipos, la designación DAEC como un patotipo diferente a los anteriores requiere más estudios epidemiológicos.⁸

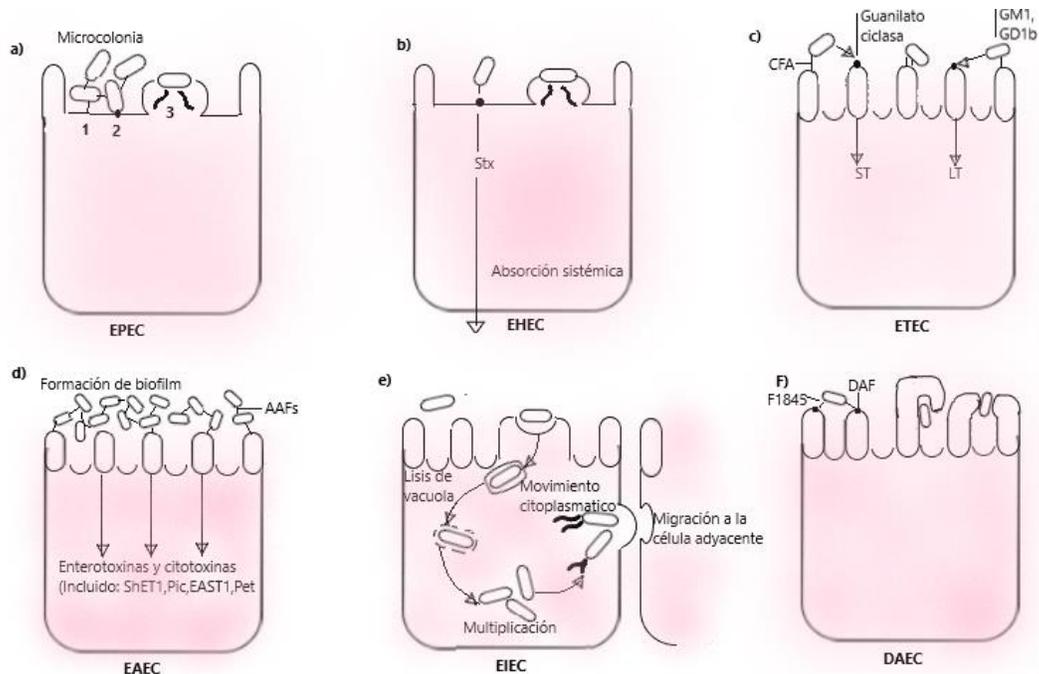


Figura 1. Esquema patológico de *E. coli* diarregénica. Figura modificada, tomada de Kaper J, et. al. (5). a) EPEC tiene atributos de virulencia como el pili formador de bucles mediante el cual la bacteria se une a células epiteliales. Produce: 1. adhesión inicial, 2. translocación de proteínas por secreción tipo III, 3. formación de pedestal. b) EHEC produce una o más citotoxinas de la familia de la toxina Stx. c) ETEC produce factores de colonización designados por CFA así como enterotoxinas: LT y ST. d) EAEC se adhiere al epitelio intestinal en una gruesa biopelícula, el fenotipo agregativo está asociado con factores de virulencia fimbrias (AAFI y AAFII) y citotoxinas (EAST 1 y Pet). e) EIEC invade la célula epitelial y se mueve a través de esta mediante la nucleación de microfilamentos de actina. f) DAEC provoca un efecto de transducción de señal en los enterocitos del intestino que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares similares a dedos que envuelven a la bacteria.¹²

3.2 *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*

Es la etiología bacteriana más común de diarrea en países en vías de desarrollo, sobre todo en la población infantil, así mismo es el principal agente etiológico de la diarrea del viajero. Se estima que causa alrededor de 220 millones de episodios de diarrea en todo el mundo, de los cuales 75 millones se presentan en niños menores de 5 años, lo que resulta entre 18,700-42,000 muertes.¹ La infección se inicia por el consumo de agua y alimentos contaminados, se asocia con condiciones socioeconómicas bajas y acceso deficiente de agua limpia y saneamiento.² La mayor incidencia de casos se presenta en los meses cálidos y húmedos.⁴ El cuadro clínico tiene un inicio brusco con un periodo de incubación corto (14-50 horas), inicia con distensión abdominal y posteriormente diarrea acuosa, (sin sangre, moco o pus) a menudo acompañada por cólicos abdominales y en raras ocasiones con fiebre, deshidratación y/o vómito; suele haber más de 10 evacuaciones al día.^{4,11}

La diarrea por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada en personas sanas o puede provocar una deshidratación intensa.⁷ Las complicaciones son resultado de la pérdida de líquidos y electrolitos, así como de las alteraciones del equilibrio ácido base, en lactantes con buen estado nutricional se han presentado complicaciones como intolerancia a disacáridos mientras que en niños desnutridos las complicaciones pueden ir desde diarrea crónica hasta el empeoramiento del estado nutricional; así mismo se ha reportado hipoglucemia, crisis convulsivas, coma o muerte.⁴

Una vez que el organismo se encuentra en el tubo digestivo, se adhiere, coloniza y prolifera en la superficie del intestino delgado proximal, para después producir la

enfermedad mediante dos mecanismos patogénicos: la producción de factores de colonización (FC) y la producción de una o dos enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST).⁴

3.2.1 Factores de colonización

Para producir diarrea, las cepas de ETEC primero deben adherirse a receptores específicos en el enterocito, esta adherencia está mediada por fimbrias de superficie (pili), la morfología de las fimbrias es muy variable y se han descrito múltiples antígenos denominados factores de colonización (FC) que pueden tomar forma de estructuras fimbriales, fibrilares o no fimbrias; estos FC se designan por CFA (colonization factor antigen), CS (coli surface antigen) o PCF (putative colonization factor) seguido de un número.^{4,5}

Los pili son FC (fimbriales o afimbriales) o adhesinas relacionadas con pili, de modo que los pili son apéndices proteicos parecidos a pelos que sobresalen de la superficie de la célula bacteriana y en general, median la unión de las bacterias a las superficies, se componen de subunidades de proteínas repetitivas, también conocidas como pilinas, las cuales determinan las propiedades antigénicas de cada fimbria; y constan de una única subunidad estructural (homopolimérica) o de más de un tipo de subunidad (heteropolimérica).¹³

Las cepas típicas de ETEC expresan generalmente de una a tres adhesinas fimbriales. Las adhesinas fimbriales más prevalentes a nivel mundial son los CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS5, CS6 y CS21,¹⁴ mientras que los principales CFA asociados con las morfologías descritas en las cepas de ETEC son CFA/I, CFA/II y CFA/IV.

CFA/I es una estructura fimbrialar uniforme de varilla rígida compuesta de un solo tipo antigénico de fimbria, CFA/II consiste de CS3 solo o en combinación con CS1 o CS2 y CFA/IV consiste de CS6 solo o en combinación con CS4 y CS5.¹⁵

3.2.2 Enterotoxinas: LT y ST

Una vez que ETEC se une a la mucosa intestinal puede secretar dos enterotoxinas, la toxina termolábil (LT) y/o la toxina termoestable (ST). Ambos tipos de toxinas mediante la desregulación de los canales iónicos de la membrana epitelial conducen a la pérdida de iones y cantidades masivas de agua.⁸

- Toxina termolábil (LT)

La LT se sintetiza inicialmente como holotoxina en el periplasma y luego se libera a través de dos sistemas de secreción: un sistema de secreción tipo II (T2SS) y vesículas de membrana externa (OMV). ETEC secreta principalmente LT por medio del sistema OMV.¹⁰

La LT es una proteína de peso molecular elevado, que está compuesta por cinco monómeros idénticos dispuestos en forma de anillo para formar una subunidad B pentamérica y una subunidad A unida a la subunidad B por el dominio helicoidal A2.⁸ La subunidad B se une a los receptores de la superficie celular, en particular a los gangliósidos, promoviendo la internalización de la toxina y el transporte retrógrado hasta el retículo endoplásmico, donde el dominio A1 se escinde del dominio A2 y se libera al citoplasma.⁸

El péptido A1 tiene actividad ADP-ribosiltransferasa y actúa transfiriendo la fracción ADP-ribosa del cofactor NAD⁺ a la subunidad alfa de la proteína de unión GTP, que

se vuelve activa y capaz de estimular el adenilato ciclasa, lo que conduce a un aumento intracelular del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP).⁷ Los niveles más altos de AMPc en la célula inducen la activación de la proteína quinasa A, que a su vez conduce a la fosforilación de los canales iónicos, lo que da como resultado la liberación de Cl⁻ así como la disminución de la captación de Na⁺ y, en consecuencia, la liberación masiva de agua a la luz intestinal; el mayor contenido de iones luminales atrae agua de forma pasiva a través de la vía paracelular, lo que produce diarrea osmótica.^{7,8}

Se han descrito 2 LT serológicamente distintos LT-I y LT-II. LT-1 está estrechamente relacionada en estructura y función con la enterotoxina del cólera, producida por *Vibrio cholerae*, y consta de 2 variantes LTp (porcina) y LTh (humana), debido a que se identificaron en cepas porcinas y humanas, respectivamente.⁸ LT-II a su vez presenta las variantes LT-IIa, II-b y II-c, las cuales se han aislado de seres humanos u otros huéspedes, así como de alimentos contaminados y se unen a diferentes receptores.⁸

- Toxina termoestable (ST)

ST es una proteína monomérica pequeña que contiene múltiples residuos de cisteína, cuyos enlaces disulfuro explican la termoestabilidad de estas toxinas.⁴ Inducen la desregulación osmótica, activando directamente la guanilato ciclasa C ubicada en la membrana apical de las células intestinales para producir monofosfato de guanosina cíclico intracelular (cGMP), a través de la hidrólisis del trifosfato de guanosina.¹⁰ El aumento en la concentración de cGMP activa la proteína quinasa que fosforila el canal regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), este

canal activado inhibe el intercambio iónico y la reabsorción de sodio, lo que contribuye a la liberación de agua y sal en la luz intestinal y por lo tanto la pérdida neta de líquidos, lo que provoca diarrea acuosa y secretora.^{8,10}

Se han identificado dos grupos de ST no relacionados, con diferentes características funcionales y estructurales, STI y STII, codificadas por los genes *estA* y *estB*, respectivamente. STI comprende las variantes STh (humana) y STp (porcina); mientras que STII generalmente se encuentra entre los cerdos.⁸

En resumen, la LT estimula la adenilato ciclasa que activa la proteína cinasa dependiente de AMPc dando como resultado la salida de líquidos y electrolitos, mientras que la ST actúa directamente sobre la guanilato ciclasa alterando la absorción de sodio y cloro, este mecanismo de virulencia puede observarse mejor en la figura 2.⁴

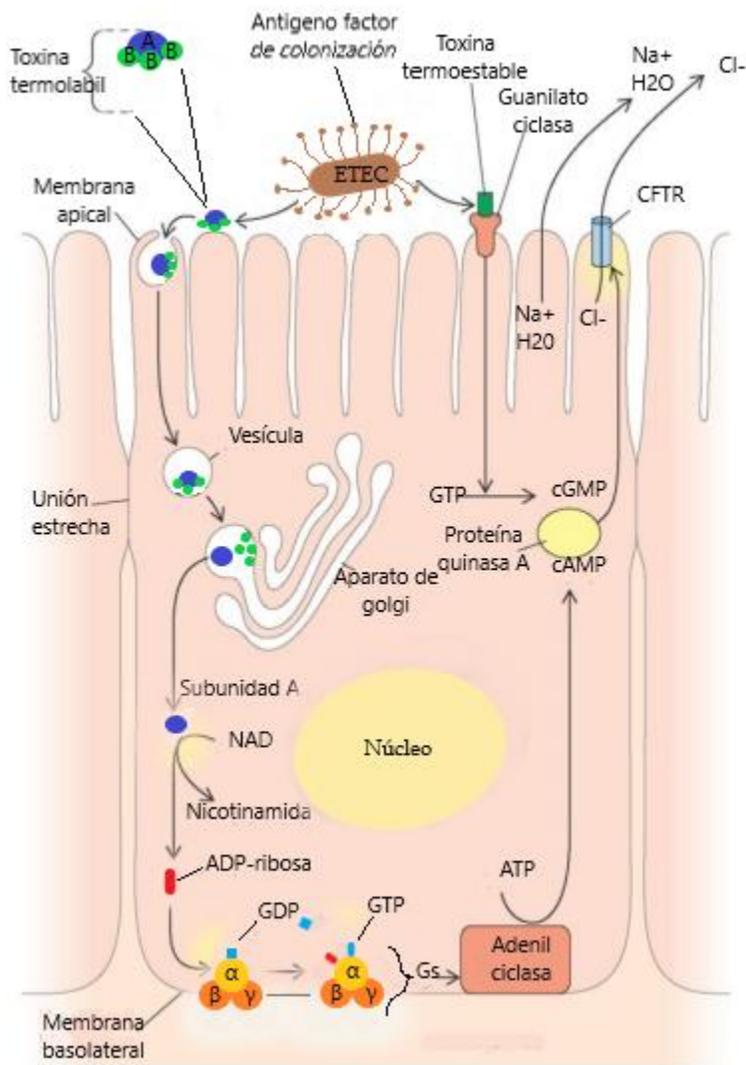


Figura 2. Mecanismo de virulencia de ETEC. Figura modificada, tomada de Mohammad S, et. Al. (16).

3.3 CS3

Es un apéndice angosto con un diámetro de 2 nm que está codificado en el cluster de genes *cstA-H*, donde el gen *cstA* codifica una proteína chaperona putativa, el gen *cstB* codifica para una proteína ujier y los cuatro genes *cstC-F* están contenidos dentro del mismo ORF de *cstB*, cada uno con diferentes puntos de inicio de la

traducción y solo un codón de parada, finalmente, los genes *cstG* y *cstH* codifican subunidades de pilina de las cuales *cstH* es la subunidad principal de pilina.¹⁷

3.3.1 Antecedentes de CS3

En 1984-1985 Levine M, *et. al.* (18), Knutton S, *et. al.* (19), estudiaron voluntarios humanos alimentados con la cepa ETEC E9034A productora de CS3, los voluntarios desarrollaron diarrea y mostraron aumentos significativos de anticuerpos IgG en suero contra CS3, lo que sugiere que esta adhesina se produce *in vivo*, desempeña un papel en la patogénesis y desencadena una respuesta inmunitaria de anticuerpos.^{18,19}

Por otro lado, en 2019 Ares M, *et al.* (17), evaluaron el papel de CS3 en la adherencia de E9034A a las células HeLa (células epiteliales del cuello uterino humano) y CaCo-2 (células epiteliales del colon humano), probando el tipo salvaje, su mutante *cstH* isogénico derivado y las cepas *cstH* complementadas. La adhesión de *cstH* mutante se redujo 10 y 121 veces en comparación con la de tipo salvaje en células HeLa y CaCo-2, respectivamente, mientras que los niveles de adherencia del mutante complementado se restauraron a niveles de tipo salvaje tanto en células CaCo-2 como HeLa, lo cual confirma que se necesita CS3 para la adherencia de ETEC a células intestinales.¹⁷ Lo anterior puede observarse en la figura 3.

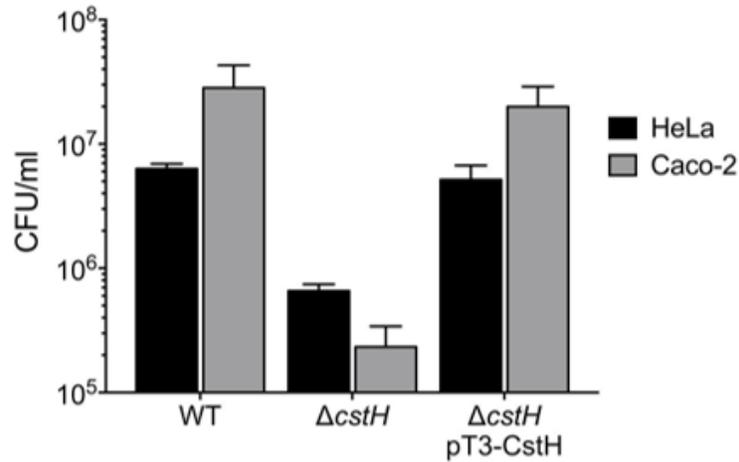


Figura 3. Función de CS3 en la adherencia a células epiteliales. Figura modificada, tomada de Ares M, et al. (17). Cuantificación de las bacterias adherentes en la cepa tipo E9034A (WT), *cstH* mutado y *cstH* restaurado. Las bacterias adherentes se expresaron como UFC después de diluciones en serie en placas.¹⁷

3.4 Proteínas recombinantes (PR)

Anteriormente las proteínas se extraían y purificaban de su fuente natural, como células humanas, microorganismos, tejidos vegetales y animales, sin embargo, esto representaba un problema debido a que las proteínas se obtenían en muy bajas cantidades, tenían un alto riesgo de contaminación, así como elevados costos de producción.³¹ Esto puede observarse en el siguiente ejemplo: la hormona del crecimiento humano (GH), importante para el desarrollo humano, anteriormente presentaba el problema de que solo se obtenía de la hipófisis humana y en cantidades muy pequeñas, así mismo había reportes de contaminación de los extractos hipofisarios con virus que causaban enfermedades neurológicas.^{20,31}

No obstante, en la investigación del DNA recombinante se observó que si ciertos se transferían a bacterias y se expresaban en ellas se podrían obtener cantidades ilimitadas de proteínas, las cuales se conocen como proteínas recombinantes.²⁰ La capacidad de expresar y purificar una proteína recombinante en gran cantidad permite su caracterización bioquímica, su uso en procesos industriales y el desarrollo de productos comerciales.²² En el caso del ejemplo anterior, a partir del año 1985 la GH humana recombinante ha proporcionado un fármaco seguro y fácilmente disponible.³¹

A nivel teórico, los pasos necesarios para obtener una proteína recombinante son los siguientes: se toma un gen de interés, se clona en un vector de expresión, se transforma en el huésped elegido, se induce la proteína y finalmente se realiza la purificación y caracterización de la proteína.²²

3.4.1 Hospederos utilizados

La elección de un sistema de expresión para la producción de alto nivel de proteínas recombinantes depende de muchos factores, entre estos se incluyen: las características de crecimiento celular, los niveles de expresión, la expresión intracelular y la extracelular, las modificaciones postraduccionales, la actividad biológica de la proteína de interés, así como aspectos regulatorios en la producción de proteínas terapéuticas.²⁵

Los sistemas de hospederos incluyen bacterias, levaduras, células de mamíferos, células de insecto, plantas y animales transgénicos, así como algas unicelulares.²⁶ Dentro de los sistemas de expresión bacterianos más utilizados se encuentran *E.*

E. coli, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus carnosus* y *Streptomyces sp.*. Mientras que los sistemas de expresión eucarióticos más frecuentemente usados son baculovirus de insectos, células de mamífero, protozoos, células de plantas y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* y *Kluyveromyces lactis*.²⁴

A continuación, en la tabla 1 se describen las características, ventajas y desventajas de los hospederos más empleados:

| Hospedero | Características | Ventajas | Desventajas |
|---------------------------------|---|---|--|
| <i>E. coli</i> | Se emplea en el desarrollo de vacunas, en la producción de hormonas y en la síntesis de enzimas. | -Cinética de crecimiento rápida. -Fácil manipulación genética. -Bajo costo asociado a medios de cultivo. -Bioquímica y genética bien conocidas. | -Falta de modificaciones postraduccionales. -Formación de cuerpos de inclusión. -Sesgo de codones. -Problemas de endotoxinas. |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Se emplea para producción de hormonas, alimentos y biocombustibles, así como un sistema de expresión para la inhibición de la dipeptidil peptidasa humana IV, CD26. | -Presenta un alto nivel de expresión. -Bajo costo asociado a medios de cultivo. -Alta tolerancia al ambiente. -Capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. | -Sobreexpresión de la proteína recombinante. -Las modificaciones postraduccionales intracelulares pueden conducir a la producción de proteínas hiperglicosiladas. |
| <i>Pichia pastoris</i> | Se emplea en la producción de | -Puede expresar muy bien las | -Hay degradación proteolítica, lo que |

| | | | |
|-----------------------|--|---|---|
| | medicamentos contra el cáncer, antígenos de superficie virales y proteínas antivirales. | proteínas de membrana. -Capacidad para secretar proteínas funcionales y correctamente plegadas. -Proporciona una glicosilación de proteínas reducida. | provoca un rendimiento reducido y pérdida de la actividad biológica. |
| Células de mamífero | Se emplean para la producción de fármacos, anticuerpos monoclonales y la producción de glicoproteínas. | -Expresan PR y complejas. -Capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. | -Altos costos de cultivo. -La clonación del gen requieren mucho tiempo. -Baja producción de la proteína intracelular. |
| Células de insecto | Se emplean en la preparación de la vacuna contra la influenza y partículas similares a virus. | -Fácil de cultivar. -Puede expresar gran cantidad de proteínas. -Expresa muy bien proteínas intracelulares y de membrana. | -Tiempo de cultivo largo. -El patrón de glicosilación no es similar, al de un sistema de expresión de mamíferos. |
| Animales transgénicos | Producen PR que se basan en la terapéutica, como factores de crecimiento, anticuerpos, vacunas, etc. | -Capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. -Las proteínas expresadas tienen altos rendimientos. | -Costos de cultivo y purificación altos. -Los patógenos zoonóticos pueden estar presentes en las preparaciones de las proteínas obtenidas. |
| Plantas transgénicas | Se emplean para la producción de agentes de inmunoterapia tumoral. | -Capacidad para producir proteínas N-glicosiladas. | -Baja producción de PR. -Proceso de purificación caro y complicado. |

Tabla 1. Descripción de los hospederos más empleados como sistemas de expresión. ^{21, 22, 23, 24, 25,}

→ *E. coli* como hospedero

Algunas cepas de *E. coli* comúnmente empleadas para la expresión de proteínas recombinantes son las siguientes:

- BL21: son deficientes de la proteasa lon y la proteasa OmpT.
- BL21(DE3): contiene el profago λ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*.
- BL21(DE3) pLysS: contiene el plásmido pLysS que transporta el gen de la lisozima T7.³⁵
- CD41(DE3) Y CD43 (DE3): contienen mutaciones no caracterizadas que previenen la muerte celular asociada a la expresión de muchas proteínas recombinantes tóxicas.²⁴
- Rosetta (DE3): contiene los genes para los RNAt de los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA.³⁶
- BL21 codon plus y BL21 codon plus (DE3): contienen copias adicionales de los genes *argU*, *ileY* y *leuW*.³⁷

3.4.2 Vectores de expresión

Un vector se define como una molécula de ADN de doble cadena con capacidad de albergar un fragmento de ADN exógeno (de otro origen), de acuerdo con su uso los vectores se clasifican como vectores de clonación o de expresión.²⁹ Los vectores de clonación tienen como finalidad el almacenamiento de secuencias y la obtención de grandes cantidades del ADN insertado, estos pueden ser plásmidos, fagos,

fagémidos, cósmidos y cromosomas artificiales bacterianos o de levadura; mientras que los vectores de expresión pueden tener 2 finalidades: la obtención de ARN producto de la transcripción o bien la producción de una proteína recombinante, por lo que estos vectores contienen secuencias para la transcripción y traducción del gen clonado, cabe mencionar que los vectores de expresión pueden ser plásmidos o fagos.^{28,29}

Dentro de los elementos presentes en un vector de expresión se encuentran: un origen de replicación, un marcador de resistencia, un sitio de clonación múltiple, un promotor, el sitio de unión al ribosoma, una secuencia codificadora, terminadores de la transcripción, etiquetas de afinidad, así como un gen regulador que actúe directa o indirectamente sobre el promotor, modulando su actividad y permitiendo condicionar los niveles de expresión.²⁴ En la figura 4 se pueden observar algunos elementos básicos presentes en un vector para expresión de *E. coli*.

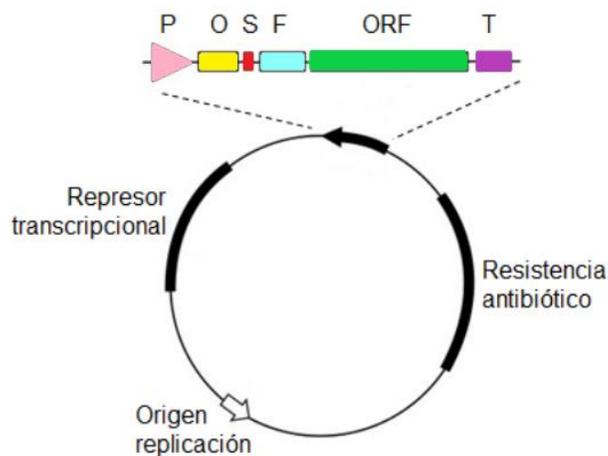


Figura 4. Elementos básicos en la arquitectura de un vector plasmídico empleado para la expresión recombinante en *E. coli*. Figura modificada, tomada de González A, Fillat M. (24). P: promotor, O: operador, S: sitio de unión al ribosoma, F: secuencia de fusión, ORF: secuencia codificadora del gen de interés, T: terminador.²⁴

En seguida, se describen las características de los principales elementos presentes en un vector de expresión:

Origen de replicación

Es una secuencia que provee un sitio de reconocimiento a las proteínas que identifican el sitio de inicio de la replicación.²⁹ Determina el grupo de incompatibilidad de plásmidos y controla el número de copias de plásmidos por célula.³¹

Sitio de clonación múltiple

Es un fragmento de ADN que contiene una serie de sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción muy cercanos entre sí, con una amplia gama de posibilidades de insertar cualquier fragmento de ADN.²⁹

Marcador de selección

Los marcadores de selección permiten identificar a las células que incorporaron el vector de las que no, así mismo se utilizan para impedir el crecimiento de células sin vector.²⁹ Dentro de los marcadores de selección empleados se utilizan genes de resistencia a antibióticos, los más comunes son los que confieren resistencia a ampicilina, kanamicina, tetraciclina y cloranfenicol.^{22,29}

Otro marcador de selección empleado es el gen *lacZ*, el cual codifica la enzima β -galactosidasa, de modo que cuando la célula transformada con el vector se pone en contacto con un sustrato de la enzima, como el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-B-d-galactopiranosido), la enzima lo degrada y produce un color azul que permite identificar las células que introdujeron el vector. Asimismo, existen otros

marcadores como el gen de la proteína verde fluorescente que permite que la célula transformada emita fluorescencia cuando se expone a luz UV.²⁹

Promotor

El promotor es la región del ADN reconocida específicamente por la ARN polimerasa para iniciar la transcripción. Los promotores deben de tener ciertas características como, por ejemplo, ser fuertes, capaces de conseguir niveles una síntesis proteica entre un 10 y un 30% del contenido proteico total de la célula; deben de tener un nivel de expresión basal bajo, es decir, estar estrictamente regulados; y su inducción deberá ser simple y a un bajo costo.^{24,25}

Algunos ejemplos de promotores empleados son los siguientes:

- Promotor *Lac* del operón lactosa de *E. coli*. El operón *lac* es un ejemplo de operón inducible negativo en el que las proteínas b-galactosidasa, permeasa y transacetilasa, son codificadas por los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, respectivamente.³⁰

El promotor *lac* se reprime en ausencia de lactosa y se induce en presencia de alolactosa. El gen regulador *lac I*, con su promotor PI, se transcribe a un RNAm que es traducido a un represor, el represor tiene dos sitios de unión, uno a la alolactosa y otro al DNA en el sitio operador, en ausencia de lactosa el represor se une al sitio del operador *lac O*, bloqueando la unión de la RNA polimerasa y de esta manera impide la transcripción de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*; mientras que en presencia de lactosa se transforma parcialmente en alolactosa, por la enzima b-galactosidasa, que se une al represor y hace que

sea liberado el DNA, la RNA polimerasa se une al promotor y tiene lugar la transcripción.^{23, 30}

Es importante mencionar que la represión nunca anula totalmente la transcripción del operón *lac*, asimismo existen compuestos relacionados con la alolactosa que también pueden unirse al represor e inducir la transcripción, como lo es el isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).³⁰

- Promotor *lacUV5*. Este promotor es relativamente insensible a la regulación mediada por CAP en comparación con el promotor de tipo salvaje y, por lo tanto, el complejo cAMP-CAP-promotor ya no es necesario para que la ARN polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción.³⁴
- Promotor T7. En este sistema el gen de interés se elimina del control directo mediado por el *lac*, en cambio el gen es clonado en un plásmido detrás de un promotor que es reconocido por la ARN polimerasa del bacteriofago T7, que a su vez se inserta en la cepa huésped bajo el control de *lacUV5*; por lo tanto, la polimerasa controlada por *lac*, es inducible con IPTG.³⁴
- Promotor triptófano del operón *trp* de *E. coli*. El operón *trp* es un ejemplo de operón reprimible negativo, en el que los genes *trpE*, *trpD*, *trpC*, *trpB* y *trpA* se transcriben a un solo RNAm, que después es traducido a enzimas que convierten el corismato en triptófano.³⁰

El promotor *trp* se reprime en presencia de triptófano y de induce en ausencia de triptófano. El gen regulador *trpR* codifica un represor el cual necesita ser activado, este represor tiene dos sitios de unión, uno al DNA y otro al

triptófano que actúa como activador; la unión con el triptófano causa un cambio conformacional del represor que lo vuelve capaz de unirse al operador, que se superpone con el promotor, de manera que la RNA polimerasa no puede unirse al promotor y no se transcriben los genes estructurales. Cabe mencionar que el ácido 3-indolacrílico también puede inducir la transcripción.^{23,30}

- Promotor Tac. Es un híbrido de los promotores *trp* y *lacUV5*, es independiente de la represión por catabolitos y posee el operador *lacO* para estar sujeto a represión por el producto del gen *lacI*.³³ Este promotor es 11 veces más potente que los promotores *trp* y *lac*, se emplea cuando la proteína que ha de expresarse es tóxica para *E. coli*, por lo que se necesita una gran cantidad de represor.³²

Etiquetas de afinidad

La adición de una etiqueta de afinidad es importante ya que permite detectar la proteína a lo largo del esquema de expresión y purificación, así mismo las etiquetas facilitan el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad; por otro lado, la adición de algunas etiquetas también puede aumentar la solubilidad de las proteínas.³¹ Se utilizan dos tipos de etiquetas: 1) las etiquetas de fusión, que son polipéptidos grandes, las cuales se utilizan generalmente en proteínas solubles y se emplean para promover el plegamiento de las proteínas y 2) las etiquetas de péptidos cortos que se prefieren si la proteína es insoluble.^{22,31}

Algunos ejemplos de etiquetas de afinidad son los siguientes:

- Etiqueta de histidina (6xHis-tag). Las proteínas fusionadas a esta etiqueta se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), empleando una matriz que contiene iones Ni^{+2} o Co^{+2} , ya que la etiqueta His tiene una alta afinidad a estos a iones.³¹
- Proteína fijadora de maltosa (MBP). La purificación se puede realizar mediante IMAC, empleando una matriz que contiene amilosa o un polímero de maltosa. La adición de MBP también podría proporcionar un mayor nivel de expresión, un plegamiento adecuado y una mayor solubilidad, lo cual se asocia a su probable actividad como chaperona molecular.³¹
- Glutación S-transferasa (GST). La purificación por IMAC se realiza con resinas de sefarosa unidas covalentemente a glutación. Por otro lado, se ha reportado que la adición de una etiqueta GST aumenta la solubilidad de la proteína recombinante, esto probablemente como consecuencia de su actividad chaperona.³¹

Terminador de la transcripción

La ubicación de un terminador de la transcripción en posición upstream al promotor será de utilidad para minimizar transcripciones no deseadas.³¹

3.5 Purificación de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se pueden producir en forma soluble o insoluble. La producción en forma insoluble se da especialmente cuando existen niveles de expresión altos, lo que puede conducir a la formación de agregados insolubles, conocidos como cuerpos de inclusión.⁴⁰

La purificación se puede realizar en condiciones nativas o desnaturizantes, lo cual dependerá de la ubicación y la solubilidad de la proteína, así como de la accesibilidad a la etiqueta de afinidad y la posterior aplicación de la proteína.⁴⁰ En la purificación en condiciones nativas la proteína debe ser soluble, bajo estas condiciones de purificación la etiqueta puede estar oculta por la estructura terciaria de la proteína nativa, por lo que las proteínas solubles pueden requerir desnaturización antes de purificarse.⁴⁰ Mientras que en la purificación en condiciones desnaturizantes la proteína es insoluble y se puede presentar en forma de cuerpos de inclusión, por lo que se emplean desnaturizantes fuertes como el cloruro de guanidinio (GuHCl) o urea para solubilizar los cuerpos de inclusión, por otra parte, en condiciones de desnaturización, la etiqueta quedará completamente expuesta de modo que mejorará la unión a la matriz, asimismo las proteínas purificadas en condiciones desnaturizantes se pueden usar directamente o es posible que se tengan que renaturalizar y plegar.⁴⁰

La purificación de proteínas recombinantes ya sea en condiciones nativas o desnaturizantes se puede realizar mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados.

3.5.1 Cromatografía de afinidad

Es un tipo de cromatografía que utiliza la afinidad específica entre el compuesto de estudio a aislar y una molécula denominada ligando, la cual está unida a una fase estacionaria.

La separación del compuesto de estudio supone una adsorción selectiva de este en la fase estacionaria y la posterior desorción. Para que este proceso se lleve a cabo primeramente se fijan los ligandos en una fase estacionaria, compuesta por una matriz sólida. Posteriormente, se adiciona una fase móvil, que es una disolución tampón, en la cual se encuentra el compuesto de estudio, este último se une al ligando y es retenido, a continuación se adicionan otros tampones para la eliminación de otros compuestos y contaminantes presentes en el compuesto de estudio, que no han sido retenidos, finalmente se procede a la elución del compuesto de estudio, para lo cual se modifican características de la fase móvil de modo la unión con el ligando ya no tenga lugar.^{38,39} En la figura 5 se muestra un esquema que ejemplifica el proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad.

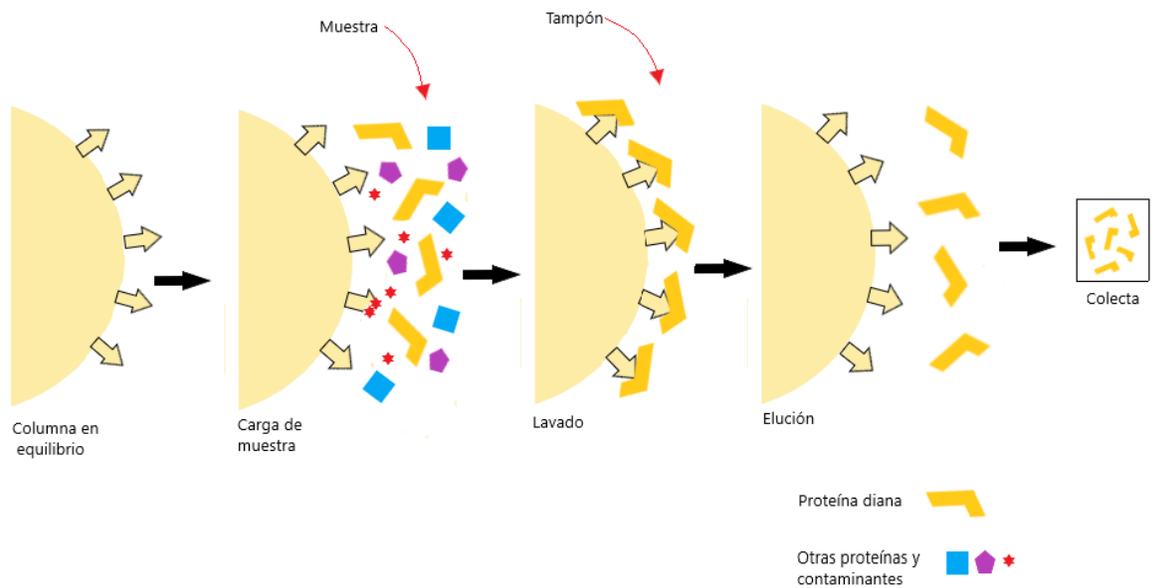


Figura 5. Proceso de cromatografía de afinidad. Figura modificada, tomada de Du M. *et al.*

(27).

En la IMAC el ligando empleado es un metal que tiene afinidad con la etiqueta. La afinidad diferencial de proteínas por los iones metálicos inmovilizados deriva de los enlaces coordinados formados entre los iones metálicos implicados y los grupos donadores de electrones presentes en algunos residuos de aminoácidos (His, Cys, Trp y Arg).⁴¹

4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

E. coli enterotoxigénica es el agente etiológico de la diarrea infantil, así mismo es la causa más importante de la diarrea del viajero provocando alrededor de 220 millones de episodios de diarrea en todo el mundo.¹⁰ Debido a que las infecciones se presentan principalmente en países en vías de desarrollo, donde existen condiciones de saneamiento inadecuadas así como escasez de recursos, la disminución de los casos deberá enfocarse principalmente en el desarrollo de métodos de prevención basados en el desarrollo de vacunas dirigidas a las estructuras que le confieren la capacidad de adherirse a las células intestinales.

5. Hipótesis

La estandarización de un protocolo, utilizando tecnología de DNA recombinante permitirá obtener y purificar la proteína recombinante CstH de ETEC.

6. Objetivo

6.1 Objetivo general

- Expresar y purificar la proteína recombinante CstH

6.2 Objetivos particulares

- Estandarizar un protocolo para la obtención y purificación de la proteína recombinante CstH.
- Verificar la presencia de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE y Western-Blot.

7. Material y métodos

7.1 Material

- Membrana de diálisis
- Micropipeta de 1000, 100 y 10 μ L
- Tubos Amicon Ultra-4
- Tubos Eppendorf de 1.5 y 0.2 mL y
- Tubos Falcon de 50 y 30 mL

Material biológico

Anticuerpos:

- Ms mAb to 6x His tag
- Goat pAb to Ms IgG (HRP)

Cepas:

- ETEC E9034A
- BL21(DE3)
- BL21 *cstH^{epm}* + pLATE31

7.2 Reactivos

- Acrilamida/ Bis-acrilamida 37.5:1
- Agarosa
- Agua libre de nucleasas
- Ampicilina
- Azul de Bromofenol
- Azul de Coomassie

- Bifosfato de sodio
- Caldo LB
- Cloruro de sodio
- Dodecilsulfato sódico
- Etanol
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
- Glicerina
- Glicina
- Glucógeno
- Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate
- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)
- Kit de clonación y expresión LIC aLICator
- Marcador de PM precisión plus protein standards
- Marcador de PM, 100 kb
- Medio LB
- Metanol
- Ni-NTA Agarose
- PCR Master Mix 2x
- Persulfato de amonio
- Rojo de Ponceau
- TAE buffer
- Tetrametiletildiamina (TEMED)
- Tris base

- Tris-HCl
- Tween 20
- Urea
- 2-D Quant kit
- 2-mercaptoetanol

7.3 Equipos

- Agitador
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de electroforesis vertical
- Cámara de transferencia
- Centrifuga
- Foto documentador
- Fuente de poder
- Electroporador
- Espectrofotómetro
- Espectrofotómetros de microvolumen NanoDrop
- Incubadora
- Microcentrífuga
- Potenciómetro
- Sonicador
- Termociclador
- Transiluminador

7.4 Metodología

1) Amplificación del gen *cstH*

Mediante PCR se amplificó el gen *cstH* a partir de la cepa ETEC E9034A, la amplificación del gen se realizó empleando PCR Master Mix (Promega, USA), agua libre de nucleasas (Promega, USA) y los iniciadores CstH reverse y CstH forward recombinante, la reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo T100 (Bio-Rad, USA). Ver anexo 1. Condiciones de PCR. Posteriormente, se tomaron 10 µL del producto de PCR, se cargaron y corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación del gen.

Para la preparación del gel de agarosa al 1% se disolvió 0.3 g de agarosa (Promega, ESP) en 30 mL de TAE buffer (Promega, USA) y se dejó solidificar.

2) Purificación del producto de PCR con glucógeno

En un tubo Eppendorf se colocó el producto de PCR, a este se le adicionó: 1 µL de NaCl 2M (Reproquifin, México), 1 µL de glucógeno 20 mg/mL (Thermo Scientific, USA) y 2.5 volúmenes de etanol al 70% (Protec, México). Se agitó el tubo y se incubó por 30 minutos a -70°C. Una vez terminada la incubación se centrifugó el tubo por 10 minutos a 4000 xg, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 25 µL etanol al 70% frío, a continuación, se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 4000 xg y se desechó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente y se hidrató en 10 µL de agua inyectable.

3) Ajuste de la concentración del producto de PCR

Para la reacción de clonación se ajustó la concentración del producto de PCR a 60 ng/ μ L.

4) Preparación de bacterias electrocompetentes de la cepa BL21(DE3)

Se tomó una colonia de la cepa BL21(DE3) y se inoculó en 3 mL de caldo LB (Merck Alemania), el cultivo se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente, se realizó un subcultivo, para el cual se inocularon 30 mL de caldo LB con 300 μ L del cultivo de toda la noche y se incubó a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6. El cultivo se incubó en hielo por 20 minutos y a continuación se realizaron 4 lavados con agua estéril fría, al realizar el último lavado, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 μ L de agua inyectable.

5) Clonación del vector pLATE 31

a) En un tubo Eppendorf se adicionaron: 2 μ L de 5x LIC Buffer (Thermo Scientific, USA), 1 μ L del producto de PCR (60 ng/ μ L), 7 μ L de agua (Thermo Scientific, USA) y 1 μ L de T4 DNA polimerasa (Thermo Scientific, USA), se agitó por 3-5 segundos y se incubó por 5 minutos. Después, se adicionaron 0.6 μ L de EDTA 0.5 M (Thermo Scientific, USA) y 1 μ L del vector pLATE 31 (Thermo Scientific, USA), se agitó por 3-5 segundos y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

6) Purificación del vector con glucógeno

En un tubo Eppendorf se colocó el vector clonado y a este se le adicionaron: 1 μ L de NaCl 2M (Reproquifin, México), 1 μ L de glucógeno 20 mg/mL (Thermo Scientific,

USA) y 2.5 volúmenes de etanol al 70% (Protec, México). Se agitó el tubo y se incubó por 30 minutos a -70°C . Una vez terminada la incubación se centrifugó el tubo por 10 minutos a 4000 xg, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 25 μL etanol al 70% frío, a continuación, se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 4000 xg y se desechó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se secó a temperatura ambiente y se hidrato en 10 μL de agua inyectable.

7) Electroporación de células

a) En un tubo Eppendorf se adicionaron 5 μL del vector clonado y 100 μL del cultivo de *E. coli* BL21(DE3), se incubó en hielo por 5 minutos, y se electroporo a un voltaje de 1600 V. A continuación, se adicionaron 900 μL de caldo LB (Merck Alemania), se mezcló y se pasó el contenido a otro tubo Eppendorf, se incubo por 3 horas a 37°C y posteriormente se sembró en una placa de agar LB (Merck Alemania) que contenía ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich, USA) y se incubo a 37°C por 24 horas.

8) Verificación del gen *cstH* transformante

Las colonias que crecieron en la placa de agar LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se utilizaron para realizar una PCR, para lo cual se tomó con el asa una colonia y se resuspendió en la reacción de PCR, este proceso se realizó para al menos 10 colonias. La reacción de PCR se llevó a cabo empleando PCR Master Mix (Promega, USA), agua libre de nucleasas (Promega, USA) y los iniciadores CstH reverse y CstH forward recombinante, en un termociclador modelo T100 (Bio-Rad, USA). Ver anexo 1. Condiciones de PCR. Posteriormente, se tomaron 10 μL del

producto de PCR, y se cargaron y corrieron un gel de agarosa al 1% para verificar la amplificación del gen transformante. Una vez verificada la presencia del gen se sembró la cepa transformada en agar LB + ampicilina (100 µg/mL).

Para la preparación del gel de agarosa al 1% se disolvió 0.3 g de agarosa (Promega, ESP) en 30 mL de TAE buffer (Promega, USA) y se dejó solidificar.

9) Inducción

Se tomó una colonia de la cepa transformada y se inoculó en 10 mL caldo LB (Merck Alemania) + ampicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA) y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente, se realizó un subcultivo en caldo LB + ampicilina 100 µg/mL precalentado, para el cual se inocularon 50 mL de medio con 2.5 mL del cultivo de toda la noche y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6. Se tomó una alícuota de 1 mL del subcultivo (control no inducido), y al resto del cultivo se le adicionó IPTG (Goldbio, St. Louis, USA) a una concentración final de 1mM y se incubó durante 6 horas, al terminar la inducción se tomó una segunda muestra de 1 mL (control inducido), y el resto del cultivo se sedimentó por centrifugación por 20 minutos a 4000 xg y el precipitado se almacenó a -20°C. Los controles inducido y no inducido se centrifugaron por 10 minutos a 4000 xg, se eliminó el sobrenadante y se almacenaron a -20°C.

10) Extracción de proteínas por sonicación

Se descongeló el precipitado en hielo y se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis A (ver el anexo 2. Reactivos), el cual se sometió a ultrasonido por 20 minutos en ciclos de 30 x 30 segundos a una amplitud de 70. Posteriormente, se centrifugó el

lisado a 10000 xg a 4°C por 20 minutos, se decantó el sobrenadante (fracción soluble) y el precipitado se resuspendió en 5 mL de tampón de lisis A (fracción insoluble).

11) SDS-PAGE para el ensayo de solubilidad

Se adicionaron 10 µL de tampón de muestra (ver el anexo 2. Reactivos) a 50 µL del control inducido, el control no inducido, la fracción soluble y la fracción insoluble, respectivamente; las muestras se colocaron en baño María a 95°C durante 5 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se prepararon 2 geles de poliacrilamida al 15% en los cuales se cargaron y corrieron las muestras. Ver anexo 3. Elaboración de geles para SDS-PAGE. Uno de los geles se tiñó con azul de azul de Coomassie (Amresco, EUA) y el otro se almacenó en refrigeración para Western blot.

12) Western-Blot para el ensayo de solubilidad

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se sometieron a electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Alemania) la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Fluka, USA) durante 15 minutos para comprobar la transferencia de las proteínas, después se lavó la membrana con agua hasta eliminar todo el colorante, posteriormente, se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS-Tween 20 (Amresco, Ohio, USA) (ver el anexo 2. Reactivos) durante 45 minutos, se lavó por 30 minutos en TBS-Tween 20, se incubó con el anticuerpo de ratón anti 6x His Tag (Abcam, USA) en una dilución 1:10,000 durante 45 minutos, se lavó por 30 minutos en TBS-Tween 20, se incubó con un anticuerpo de cabra anti ratón

conjugado con peroxidasa de rábano (Abcam, USA) en una dilución 1:10,000 durante 45 minutos, se lavó por 30 minutos en TBS-Tween 20 y finalmente se desarrollaron con sustrato de reactivo de detección de anticuerpos Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA).

13) Inducción para purificación

Se tomó una colonia de la cepa transformada y se inoculó en 20 mL caldo LB (Merck, Alemania) + ampicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA) y se incubó toda la noche. Posteriormente se realizó un subcultivo en 1 L caldo LB + ampicilina 100 µg/mL precalentado, en una dilución 1:50, se incubó a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.6. Se adicionó IPTG (Goldbio, St. Louis, USA) a una concentración final de 1mM y se incubó durante 6 horas, al terminar la inducción el cultivo se sedimentó por centrifugación por 20 minutos a 4000 xg rpm y el precipitado se almacenó a -20°C.

14) Purificación mediante condiciones desnaturizantes

Se descongeló el precipitado en hielo, se resuspendió en 40 mL de tampón de lisis B (ver el anexo 2. Reactivos) y se mezcló por 120 minutos a temperatura ambiente evitando la formación de espuma. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 10000 xg y se almacenó el sobrenadante (lisado aclarado) en refrigeración. Se adicionó 1 mL de níquel-ácido nitrilotriacético-agarosa (Ni-NTA) (Qiagen, Alemania) a 5 mL de lisado y se mezcló por 60 minutos en hielo, después se cargó la mezcla lisado-resina en una columna cromatográfica y se recolectó el flujo continuo, a continuación, se lavó 2 veces la columna con 4 mL de tampón C, se almacenaron

las fracciones de lavado, se eluyó la proteína 4 veces con 1 mL de tampón D, seguido de 4 veces con 1 mL de tampón E y se almacenaron las fracciones de elución.

15) SDS-PAGE para fracciones obtenidas de la purificación

Se realizó SDS-PAGE para las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la proteína.

16) Western-Blot para fracciones obtenidas de la purificación

Se realizó Western blot para las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación de la proteína.

17) Diálisis de la proteína

Se utilizaron 10 cm de una membrana de celulosa para diálisis (Sigma Aldrich, Alemania), la cual se hidrató durante 5 minutos en agua, después la membrana se amarró por un extremo con hilo y dentro de la membrana se colocó la proteína, luego se amarró la membrana por el otro extremo y se colocó dentro de un vaso de precipitados, al vaso se adicionó el tampón 1 (ver el anexo 2.Reactivos) y se incubó en agitación con la membrana durante 4 horas, posteriormente se retiró el tampón 1 y se adicionó el tampón 2, se incubó durante 4 horas, se retiró el tampón 2 y se adicionó el tampón 3, se incubó durante 4 horas, se retiró el tampón 3 y se adicionó el tampón 4 y se incubó durante 4 horas. El proceso de diálisis se llevó a cabo en refrigeración.

18) Cuantificación de la proteína

Se determinó la concentración de las proteínas empleando el kit 2-D quant (GE Healthcare, USA).

19) Concentración de la proteína

Se colocó la proteína en tubos Amicon Ultra-4 (Millipore, Alemania) y se centrifugó a 4000 rpm por 20 minutos, después se recolectó la proteína y se almacenó a -20°C.

20) Cuantificación de la proteína concentrada

Se determinó la concentración de las proteínas concentradas empleando el kit 2-D quant (GE Healthcare, USA).

8. Resultados

8.1 Verificación del gen *cstH* transformante

La verificación de la transformación de la cepa *E. coli* BL21(DE3) con el gen *cstH*, se realizó por PCR, tomando 3 colonias al azar empleadas como DNA en la reacción de PCR. Los productos obtenidos se evaluaron mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1%, obteniendo bandas de 700 pb que corresponden al gen *cstH* (Figura 6).

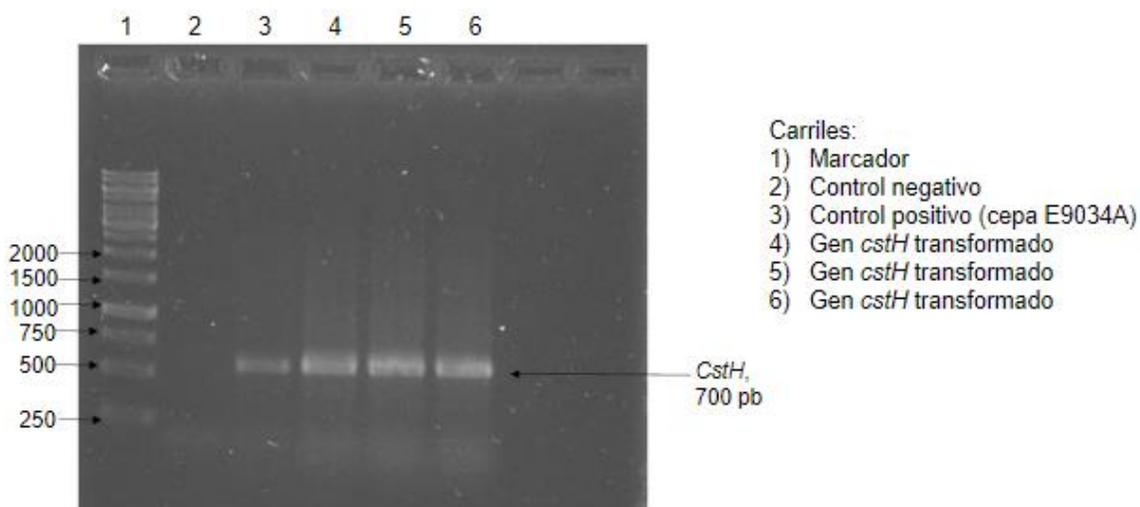


Figura 6. Verificación del gen *cstH* transformante. Gel de agarosa al 1%, en el cual se observa en el carril 1 el marcador de peso de 1kb (GBIO, USA), en el carril 2 el producto de la reacción de PCR sin DNA como control negativo, en el carril 3 la cepa E9034A, empleada como control positivo y en los carriles 4, 5 y 6 el producto de la reacción de PCR de las 3 colonias tomadas para verificar la transformación del gen, en estas bandas se observó el amplificado de 700 pb correspondientes al gen *cstH*.

8.2 Identificación de la proteína CstH en el ensayo de solubilidad

Mediante el ensayo de solubilidad se evaluó en que fracción (soluble o insoluble) se encontraba la proteína CstH, lo cual permitió establecer un esquema de purificación en condiciones nativas o desnaturalizantes. El ensayo de solubilidad se realizó en un gel de poliacrilamida, en el cual se observó una banda de 14kDa en la fracción insoluble, correspondiente a la proteína CstH (Figura 7).

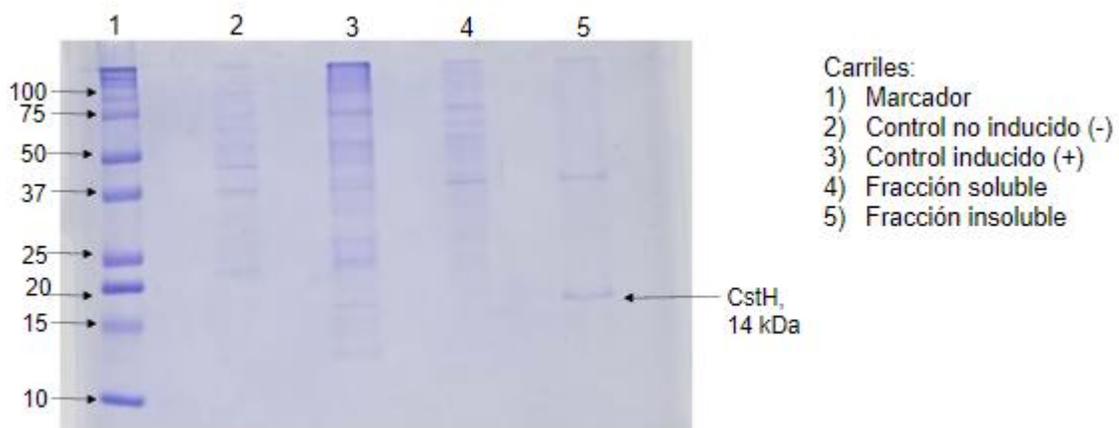


Figura 7. Ensayo de solubilidad de la proteína CstH. Gel de poliacrilamida visualizado mediante tinción con azul de Coomassie. En él se observa en el carril 1 el marcador de peso de 250 kDa precisión plus protein standards (Bio-Rad, EE. UU.), en el carril 2 el control no inducido, en el carril 3 el control inducido, en el carril 4 la fracción soluble y en el carril 5 la fracción insoluble, en la cual se observa una banda de 14 kDa correspondiente a la proteína CstH.

8.3 Detección de la proteína CstH por Western-Blot del ensayo de solubilidad

Con el WB del ensayo de solubilidad se verificó que la banda observada en el gel de poliacrilamida de la Figura 7 correspondía realmente a la proteína CstH. Se observó nuevamente una banda en la fracción insoluble (Figura 8).

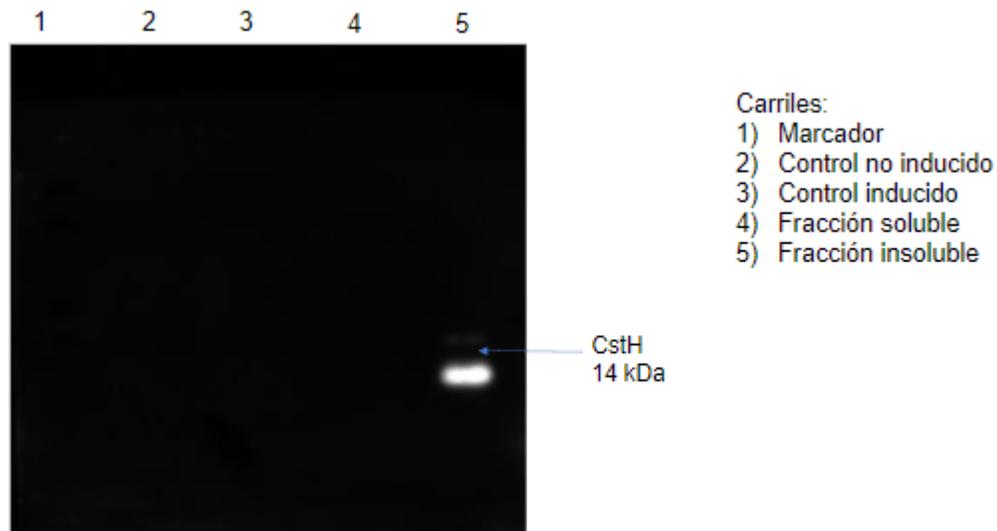


Figura 8. Western-Blot del ensayo de solubilidad de la proteína CstH. Membrana de nitrocelulosa visualizada con Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate. En la membrana se encuentra en el carril 1 el marcador de peso de 250 kDa precisión plus protein standards, en el carril 2 el control no inducido, en el carril 3 el control inducido, en el carril 4 la fracción soluble y en el carril 5 la fracción insoluble, en la cual se observa una banda correspondiente a la proteína CstH.

8.4 Identificación de la proteína CstH en su proceso de purificación

Mediante un gel de poliacrilamida se evaluaron las fracciones obtenidas del proceso de purificación de la proteína CstH. Se observó, de acuerdo con las bandas obtenidas, que la proteína fue eluida en el buffer de elución 2 (Figura 9).

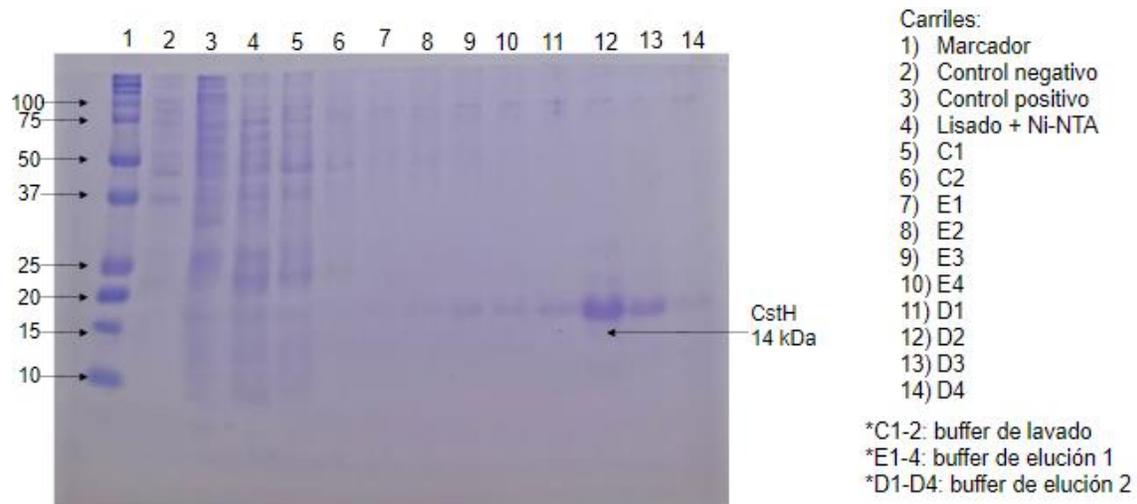


Figura 9. Purificación de la proteína CstH. Gel de poliacrilamida visualizado mediante tinción con azul de coomassie (Amresco, EUA). En él se observa en el carril 1 el marcador de peso de 250 kDa precisión plus protein standards, en el carril 2 el control no inducido como control negativo, en el carril 3 el control inducido como control positivo, en el carril 4 la fracción del lisado + Ni-NTA, en los carriles 5 y 6 las fracciones de lavado, en los carriles 7 al 10 las fracciones del buffer de elución 1 y en los carriles 11 al 14 las fracciones del buffer de elución 2, en las cuales se observa mejor las bandas de 14 kDa correspondientes a la proteína CstH.

8.5 Detección de la proteína CstH mediante Western-Blot del proceso de purificación

El WB del proceso de purificación permitió detectar en que fracciones se encuentran la proteína CstH en mayor cantidad, suficiente para ser detectada mediante esta técnica como se observa en la figura 10.

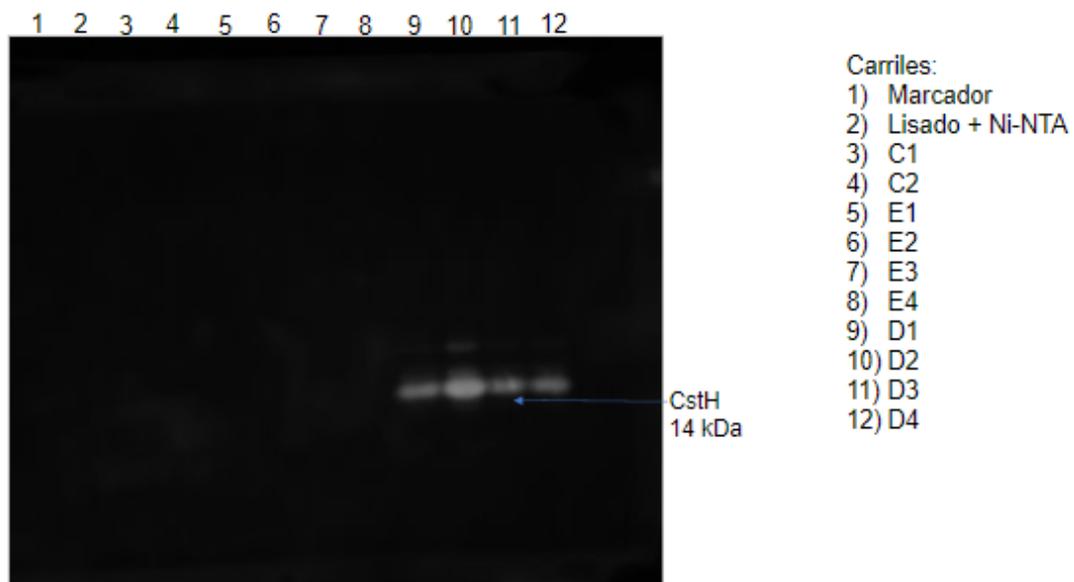


Figura 10. Western-Blot de la purificación de la proteína CstH. Membrana de nitrocelulosa visualizada con Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate. En la membrana se encuentra en el carril 1 el marcador de peso de 250 kDa precisión plus protein standards, en el carril 2 la fracción del lisado + Ni-NTA, en los carriles 3 y 4 las fracciones de lavado, en los carriles 5 al 8 las fracciones del buffer de elución 1 y en los carriles 9 al 12 las fracciones del buffer de elución 2, en las cuales se observan bandas a correspondientes a la proteína CstH.

8.6 Proteína CstH purificada

La purificación de la proteína CstH se comprobó realizando un gel de poliacrilamida en el cual solo se detectó una banda de 14 kDa correspondiente a la proteína CstH (Figura 11).

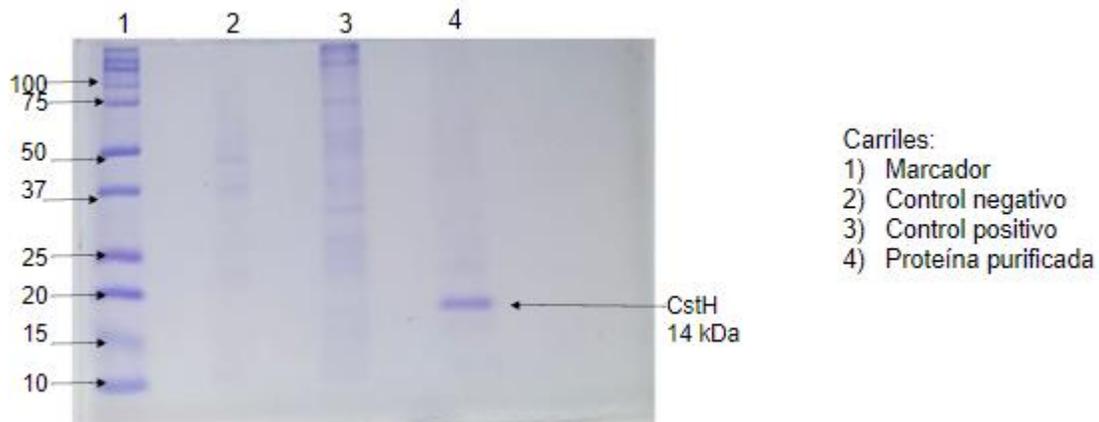


Figura 11. Proteína CstH purificada. Gel de poliacrilamida visualizado mediante tinción con azul de coomassie. En él se observa en el carril 1 el marcador de peso de 250 kDa precisión plus protein standards, en el carril 2 el control no inducido como control negativo, en el carril 3 el control inducido como control positivo y en el carril 4 la proteína CstH purificada.

8.7 Cuantificación de la proteína CstH

Se realizaron 3 inducciones de la proteína, en la tabla 2 puede observarse la concentración obtenida de cada inducción, la concentración que se obtuvo en la primera inducción fue mucho menor comparada con la segunda y con la tercera inducción, lo cual se asoció a las condiciones bajo las cuales se realizó la inducción. Por otro lado, con respecto a la segunda y tercera inducción se observó que se obtiene aproximadamente 5 mg de proteína por cada inducción.

| Muestra | Volumen (mL) | Concentración (μg) |
|-------------------|--------------|---------------------------------|
| Primera inducción | | |
| 1 | 3 | 733.8 |
| 2 | 3 | 329.4 |
| 3 | 3 | 276.6 |
| Segunda inducción | | |
| 4 | 4 | 582.4 |
| 5 | 5.5 | 2479.4 |
| 6 | 7 | 2213.4 |
| Tercera inducción | | |
| 7 | 4 | 777.6 |
| 8 | 4.5 | 1644.3 |
| 9 | 9 | 3659.4 |

Tabla 2. Cuantificación de la proteína CstH, obtenida en la primera, segunda y tercera inducción mediante el kit 2-D quant (GE Healthcare, USA). Mediante el kit se construye una curva estándar a partir de la cual se determina la concentración de la proteína, los datos de la curva estándar y las muestras pueden verse en el anexo 4.

8.8 Cuantificación de la proteína CstH concentrada

La proteína obtenida de las 3 inducciones se concentró para obtener una mayor concentración de proteína en menor volumen, como se puede observar en la tabla 3.

| Muestra | Volumen (mL) | Concentración (μg) |
|---------|--------------|---------------------------------|
| 1 | 1 | 735 |
| 2 | 1 | 512 |
| 3 | 1.5 | 823.5 |
| 4 | 1.5 | 1080 |
| 5 | 1.5 | 1294.5 |
| 6 | 1.5 | 4378.5 |
| 7 | 1.5 | 1167 |

Tabla 3. Cuantificación de la proteína CstH concentrada mediante el kit 2-D quant (GE Healthcare, USA). Mediante el kit se construye una curva estándar a partir de la cual se determina la concentración de la proteína, los datos de la curva estándar y las muestras para la proteína concentrada pueden verse en el anexo 5.

9. Discusión

ETEC es la causa más frecuente de diarrea en los países en vías de desarrollo, es capaz de producir diarrea de leve a grave en lactantes, diarrea del viajero y brotes de diarrea en cuneros.⁴ La colonización de la mucosa del intestino delgado depende de antígenos específicos del factor de colonización (CFA) y de antígenos de superficie (CS); siendo CS3 uno de los antígenos fimbriales más prevalentes que se encuentran en aislados clínicos.⁴²

Las fimbrias median el primer paso en la patogénesis de la diarrea, y considerando su potencial antigénico, pueden ser valiosas en el desarrollo de blancos terapéuticos.⁴² Sin embargo, antes de considerar a una fimbria para el desarrollo de blancos terapéuticos es importante conocer como participa dicha fimbria en la adhesión de ETEC, para lo cual como primer paso se puede producir la principal subunidad de la fimbria y posteriormente estudiarla en un modelo animal.

El presente escrito se enfocó en el proceso de expresión y purificación de la proteína recombinante CstH, el proceso de expresión siguió el procedimiento descrito en el artículo de Tucci P. *et. al* (27) en el cual se determina el gel de interés, así como un vector y hospedero adecuado, luego el gen se clona con un vector para construir un vector de expresión recombinante, el cual posteriormente se transforma en células hospederas para cultivo, cuando se alcanza un DO óptima de 0.5 a 0.7 se adiciona un inductor para estimular la expresión de la proteína y finalmente se procede a su purificación.²⁷

Se empleo el vector de expresión pLATE 31, este tipo de vectores están diseñados para obtener un alto nivel de expresión de proteínas con una expresión basal mínima, empleando elementos del bacteriófago T7 para controlar la expresión de genes, en particular la serie pLATE 31 se caracteriza por presentar una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal.⁴³ Mientras que el hospedero empleado fue la cepa BL21(DE3) la cual se emplea para la expresión de genes clonados en vectores que contienen el promotor del fago T7.²⁷ Bajo estas mismas condiciones Luna-Pineda V. y colaboradores (44) clonaron y expresaron las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP de *Escherichia coli uropatógena*,⁴⁴ así mismo Saldaña S. *et al.* (45) clonaron los genes *IngB* e *Ing* provenientes de ETEC en el plásmido pLATE31 y el plásmido de expresión recombinante pLATE31-IngB y pLATE31-IngC se transformaron en *E. coli* BL21 (DE3).⁴⁵

El esquema de purificación se planteó con base a lo descrito en Tucci P. *et. al* (27); se debe realizar un pretratamiento antes de la purificación, seguido de un fraccionamiento aproximado y finalmente un fraccionamiento fino.²⁷

El pretratamiento tiene como objetivo la liberación de las proteínas recombinantes de la célula, pueden utilizarse diferentes métodos dependiendo de la estructura de la proteína, para CstH se siguió el protocolo descrito en el manual de expresión QIA de Qiagen⁴⁰, en el cual se emplea la sonicación, no obstante, los ciclos de ultrasonido se determinaron empíricamente, así mismo dicho protocolo indica la adición de lisozima para descomponer la pared celular bacteriana. Sin embargo, se observaron los mismos resultados al adicionar o no la enzima, según lo observado mediante análisis SDS-PAGE (figura 7).

Una vez realizado el pretratamiento los extractos de proteínas contienen diferentes impurezas: restos celulares, agregados, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos⁴⁶, por lo que fue necesario separar las proteínas diana de las impurezas, lo cual se conoce como fraccionamiento aproximado.²⁷ En este fraccionamiento se utilizó la centrifugación para CstH, tomando como base lo descrito en el manual de expresión QIA de Qiagen⁴⁰, para sedimentar los restos celulares.

Finalmente, en el fraccionamiento fino se separaron las proteínas diana de otras proteínas provenientes de la célula hospedera, para lo cual se utilizó la etiqueta de afinidad de histidina para purificar la proteína CstH mediante IMAC.

Las condiciones de purificación (nativas o desnaturizantes) se determinaron a partir del ensayo de solubilidad, el cual también depende de la ubicación de la proteína. Mediante lo observado en el gel SDS-PAGE en la figura 7 y el Western blot de la figura 8 se identificó a la proteína CstH en la fracción insoluble, por lo que la purificación se realizó en condiciones desnaturizantes. Bajo estas condiciones se pueden obtener altos niveles de expresión de proteína recombinante que pueden conducir a la formación de cuerpos de inclusión, no obstante, al utilizar desnaturizantes como la urea se solubilizaron completamente los cuerpos de inclusión.⁴⁰

Mediante la purificación en condiciones desnaturizantes se obtuvieron buenos resultados, lo cual puede observarse en la figura 9 y 10, en las cuales se detecta la proteína en el buffer de elución 2, en el cual se eluyen las proteínas debido a una disminución del pH, lo cual corrobora lo descrito en Luna-Pineda V. y colaboradores (44) quienes purificaron las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP bajo condiciones

desnaturalizantes y posteriormente replegaron las proteínas mediante diálisis utilizando un gradiente de urea de 7 a 1 M, sin complicaciones.

Con respecto a los parámetros en las condiciones de cultivo como son la composición del medio, la densidad celular, la concentración del inductor, el tiempo y la temperatura de inducción, así como el uso de inhibidores de proteasas pueden afectar el nivel de expresión de las proteínas. Lo cual puede verse en la Tabla 2, en la que se observa que la cantidad obtenida de proteína en la primera inducción fue menor a la de las otras inducciones, lo cual probablemente se deba a que el lisado aclarado obtenido de la primera inducción se almacenado por una semana sin ningún inhibidor antes de purificarse, mientras que en la segunda y tercera inducción se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), que es un inhibidor de proteasas, y la purificación se realizó inmediatamente después de haber obtenido el lisado.

10. Conclusiones

Mediante de la tecnología de DNA recombinante, así como la aplicación de técnicas de biología molecular y proteómica, se estandarizo un protocolo para la expresión y purificación la proteína CstH. Dentro las técnicas empleadas se utilizaron SDS-PAGE y Werstern-blot para verificar la presencia de la proteína a lo largo de su esquema de expresión y purificación, como puede observase en los resultados obtenidos. En el ensayo de solubilidad se identificó la proteína en la fracción insoluble, lo que llevo a purificar la proteína en condiciones desnaturalizantes, posteriormente en la purificación se detectó la proteína en el eluyente 2, a partir del cual se cuantifico y concentro la proteína, obteniendo aproximadamente 5 mg de proteína por cada inducción.

Este estudio demuestra la eficacia de la tecnología del DNA recombinante en la producción de proteínas recombinantes, al proporcionar información crucial para optimizar los procesos de purificación y obtención de proteínas en cantidades útiles que pueden ser utilidad para futuras investigaciones y aplicaciones biomédicas.

11. Referencias

1. WHO preferred product characteristics for vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Geneva: World Health Organization; 2021
2. Gonzales L, Sjöling A. Los diferentes nichos ecológicos de *Escherichia coli* enterotoxigénica. *Environ Microbiol.* 2016; 18(3): 741-751.
3. Khalil I, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccines: Priority activities to enable product development, licensure, and global access. *ELSEVIER.* 2021; 39(31): 4266-4277.
4. Cabello R. Microbiología y parasitología humana bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 4ª ed. Ciudad de México: Médica Panamericana; 2018
5. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 123-140.
6. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publ Mex.* 2002; 44 (5): 464-475.
7. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *CMR.* 1998; 11(1): 142-201.
8. Gomes T, et. Al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* 2016; 47: 3-30.

9. Pokharel P, Dhakal S, Dozois C. La diversidad de patotipos de *Escherichia coli* y estrategias de vacunación contra ese patógeno versátil. *Microorganisms*. 2023; 11 (2): 344.
10. Pakbin B, Brück W, Rosen J. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (18): 9922.
11. Koneman W. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008
12. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Esquema patogénico de *E. coli* diarreogénica. 2014.
13. Madhavan V, Sakellaris H. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Elsevier sci*. 2014; 90: 155-197.
14. Saldaña S. Biogénesis y regulación de longus: una adhesina de *Escherichia coli enterotoxigénica* [Tesis de doctorado]. CDMX: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
15. Nuñez D. Caracterización Genética de los Operones Ribosómicos de *Escherichia coli Enterotoxigénica*, con Base en los Perfiles de Restricción de su Espacio Intergénico [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
16. Mohammad S, et. Al. Mechanism of virulence of ETEC. 2015
17. Ares M, Abundes J, Rodríguez D, Torres J, De la cruz M. The Coli Surface Antigen CS3 of *Enterotoxigenic Escherichia coli* Is Differentially Regulated by H-NS, CRP, and CpxRA Global Regulators. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1685.

18. Levine M, *et al.* Coli antígenos de superficie 1 y 3 de factor de colonización antígeno II-positivo enterotoxigénico *Escherichia coli*: morfología, purificación y respuestas inmunes en humanos. *IAI*. 1984; 44(2): 409-420.
19. Knutton S, *et al.* Adhesión de *Escherichia coli enterotoxigénica* a enterocitos del intestino delgado humano. *IAI*. 1985; 48(3): 824-831.
20. Curtis H, Barnes S, Schnek A, Flores G. Invitación a la biología. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006
21. Samaniego M. Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en *Escherichia coli* [Tesis de doctorado]. México: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; 2007.
22. Rosano G, Ceccarelli E. Expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*: avances y desafíos. *Frontiers*. 2014; 5: 1-17.
23. García J. *et al.* Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Finlay*. 2013; 22(2): 30-39.
24. González A, Fillat M. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *REB*. 2018; 37(1): 14-27.
25. Makrides S. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(3): 512-538.
26. Tripathi N, Shrivastava. Desarrollos recientes en bioprocesamiento de proteínas recombinantes: huéspedes de expresión y desarrollo de procesos. *Frontiers*. 2019; 7: 420.
27. Du M. *et al.* Avances, aplicaciones, desafíos y perspectivas de la tecnología de purificación de proteínas. *Frontiers*. 2022; 10: 1028691.

28. Rozalén J, Ceña V, Jordán J. Terapia génica. Vectores de expresión. Elsevier. 2003; 22(8): 102-108.
29. Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. México: McGraw-Hill; 2013
30. Pierce B. Genética un enfoque conceptual. 5ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2014
31. Tucci P, Veroli V, Señorale M, Marín M. *Escherichia coli*: The Leading Model for the Production of Recombinant Proteins. En: Castro-Sowinski, S. Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. Microorganisms for Sustainability, vol 1: Springer; 2016. P. 119-147
32. Izquierdo M. Curso de genética molecular e ingeniería genética. Madrid: Pirámide; 2014
33. Vicente M. Avances en ingeniería genética. Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas; 1994
34. Casali N, Preston A. *E. coli* plasmid vectors methods and applications. New Jersey: Humana press; 2003
35. Studier W, Moffatt B. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. J. MoZ. Biol. 1986; 189: 113-130
36. Novagen. Competent Cells What a difference a strain makes. USA
37. Agilent technologies. BL21-CodonPlus Competent Cells. Agilent technologies
38. Freifelder D. Técnicas de bioquímica y biología molecular. España: Reverte; 1981

39. Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J. Bioquímica clínica y patología molecular. 5ª ed. España: Reverte; 1998
40. Quiagen. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5ª ed. USA; 2003.
41. Martínez C. Purificación y evaluación citotóxica de un anticuerpo tipo vNAR neutralizante de TGF- β , aislado del tiburón *Heterodontus francisci* [Tesis de maestría]. México: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California; 2014
42. Lüdi S. et al. Assessing the Expression of Enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific Surface Antigens in Recombinant Strains by Transmission Electron Microscopy and Immunolabeling. J. Histochem. Cytochem. 2006; 5(3).
43. Thermo Scientific. aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System. Thermo Fisher Scientific; 2015
44. Luna-Pineda V. et al. Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*. Front. Microbiol. 2016; 5: 135.
45. Saldaña Z. et al. Effects of *Ing* Mutations on LngA Expression, Processing, and CS21 Assembly in Enterotoxigenic *Escherichia coli* E9034A. Front. Microbiol. 2016; 7: 1201.
46. Royce J, Liderfelt J, Robinson C. Filtration Methods for Use in Recovery Processes. En: Jagschies G, Lindskog E, Galliher P, Lacki K. Biopharm. Process. Países Bajos: ELSEVIER; 2018. P. 295–315.

12. Anexos

12.1. Anexo 1. Condiciones de PCR

- Secuencia de iniciadores (Integrated DNA Technologies, México)

| CstH reverse recombinante | CstH forward recombinante |
|---|---|
| 5'-GTG GTG GTG ATG GTG ATG GCC TTT AAT TGT CGA AGT AAT TGT TAT ATT TGC-3' | 5'-AGA AGG AGA TAT AAC TAT GTT AAA AAT AAA ATA CTT ATT AAT AGG TCT TTC ACT GTC AGC TAT-3' |

Tabla 4. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen *cstH*.

- Condiciones de ciclo térmico

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (min) | Numero de ciclos |
|---------------------------|------------------|--------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 95 | 3 | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 1 | 35 |
| Anillado | 64 | 1 | |
| Extensión | 72 | 1 | |
| Extensión final | 72 | 5 | 1 |

Tabla 5. Condiciones empleadas para la amplificación del gen *cstH*.

12.2. Anexo 2. Reactivos

- IPTG (1 M): 238mg en 1 mL de agua
- Persulfato de amonio al 10%: 1 g en 10 mL
- SDS al 10%: 10 g en 100 mL
- Solución 1.5 M tris-HCl (100 mL): 18.5 g de tris base en 100 mL de agua.
Ajustar a pH 8.8
- Solución 0.5 M tris-HCl (100 mL): 6 g de tris base en 100 mL de agua. Ajustar a pH 6.8
- Tampón 1 (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 6 M (360.4 g) en 1L de agua.
- Tampón 2 (1L): NaH_2PO_4 100 Mm (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 4 M (240.2 g) en 1 L de agua.
- Tampón 3 (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 2 M (120.1g) en 1L de agua.
- Tampón 4(1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2g) en 1 L de agua.
- Tampón C (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 8M (480.5 g) en 1L de agua. Ajustar a pH 6.3

- Tampón D (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 8M (480.5 g) en 1 L de agua. Ajustar a pH 5.9
- Tampón de corrida 1x (1L): 3 g de tris base, 1.44 g de glicina, 1 g de SDS en 1 L de agua. Ajustar a pH 8.3
- Tampón de lisis A (1L): NaH_2PO_4 50mM (6.9 g), NaCl 300 mM (17.54 g), imidazol 10 mM (0.68 g) en 1L de agua. Ajustar a pH 8
- Tampón de lisis B (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 8M (480.5) en 1L de agua. Ajustar a pH 8
- Tampón de muestra 4X (1L): 0.6 mL de tris-HCl 1.5M, 0.8 mL de glicerol, 1.6 mL de SDS10%, 0.4 mL de azul de bromofenol 0.05 %, 0.4 mL de β -mercaptoetanol y 4.2 mL de agua. Ajustar a pH 6.8
- Tampón de transferencia (1L): 3.03 g de tris-base, 14.4 g de glicina, 200 mL de metanol, 0.5 g de SDS en 1L de agua. Ajustar a pH 8.3
- Tampón E (1L): NaH_2PO_4 100 mM (13.8 g), Tris-HCl 10 mM (1.2 g), urea 8M (480.5 g) en 1L de agua. Ajustar a pH 4.5
- TBS (1L): 2.42 g de tris-HCl, 8 g de NaCl en 1L de agua. Ajustar a pH 7.6
- TBS-Tween 20 (0.05%): 1 mL de Tween 20 en 1000 mL de TBS

12.3. Anexo 3. Elaboración de geles para SDS-PAGE

| Reactivo | Gel de corrida (15%) | Gel concentrador (4%) |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| Agua | 2.34 mL | 3.05 mL |
| Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) | 2.50 mL | - |
| Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) | - | 1.25 mL |
| SDS 10% | 0.1 mL | 0.05 mL |
| 30% Acrilamida-Bis | 5 mL | 0.650 mL |
| TEMED | 0.01 mL | 0.01 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 0.05 mL | 0.025 mL |

Tabla 6. Reactivos empleados para la preparación del gel concentrador y gel de corrida

12.4. Anexo 4. Cuantificación de la proteína CstH

→ Primera inducción

| Tubos | Concentración (μg) | Absorbancia |
|-------|---------------------------------|-------------|
| 1 | 0 | 30.7 |
| 2 | 10 | 25.6 |
| 3 | 20 | 22.3 |
| 4 | 30 | 18.6 |
| 5 | 40 | 15.4 |
| 6 | 50 | 13.7 |

Tabla 7. Datos para la construcción de la curva estándar utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant para la primera inducción.

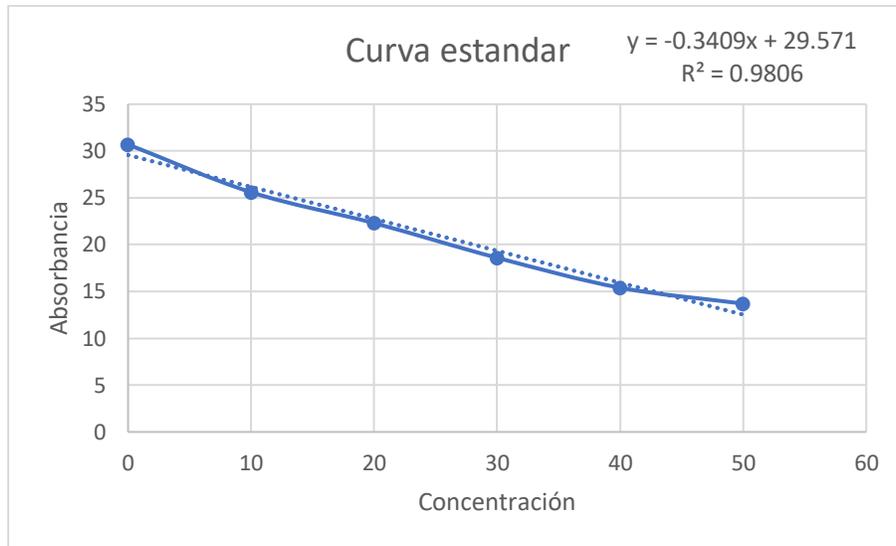


Figura 12. Curva estándar obtenida utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant empleada para calcular la concentración de la proteína CstH obtenida de la primera inducción.

Una vez construida la curva estándar se midió la absorbancia de las muestras para determinar su concentración, la concentración obtenida fue para un volumen de 50 μ L los cuales se emplearon a para la reacción del kit 2-D quant, posteriormente se hizo la relación para determinar la concentración en el volumen total de muestra que se tenía.

| Muestra | Absorbancia | Concentración en 50 μ L | Concentración final |
|---------|-------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1 | 25.4 | 12.23 μ g | 733.8 μ g en 3 mL |
| 2 | 27.7 | 5.49 μ g | 329.4 μ g en 3 mL |
| 3 | 28 | 4.61 μ g | 276.6 μ g en 3 mL |

Tabla 8. Concentración obtenida de acuerdo con la curva estándar de la figura 12, de las muestras 1, 2 y 3 de la proteína CstH obtenidas de la primera inducción.

→ Segunda inducción

| Tubos | Concentración (µg) | Absorbancia |
|-------|--------------------|-------------|
| 1 | 0 | 35.4 |
| 2 | 10 | 27.3 |
| 3 | 20 | 23.8 |
| 4 | 30 | 20.4 |
| 5 | 40 | 18 |
| 6 | 50 | 14.6 |

Tabla 9. Datos para la construcción de la curva estándar utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant para la segunda inducción.

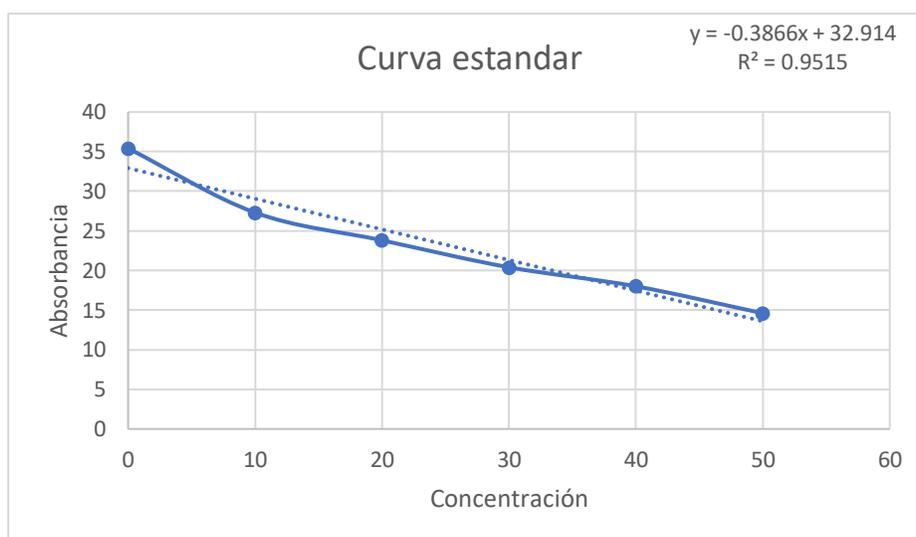


Figura 13. Curva estándar obtenida utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant empleada para calcular la concentración de la proteína CstH obtenida de la segunda inducción.

| Muestra | Absorbancia | Concentración en 50 µL | Concentración final |
|---------|-------------|------------------------|---------------------|
| 4 | 30.1 | 7.28 µg | 582.4 µg en 4 mL |
| 5 | 24.2 | 22.54 µg | 2479.4 µg en 5.5 mL |
| 6 | 26.8 | 15.81 µg | 2213.4 µg en 7 mL |

Tabla 10. Concentración obtenida de acuerdo con la curva estándar de la figura 13, de las muestras 4, 5 y 6 de la proteína CstH obtenidas de la segunda inducción.

→ Tercera inducción

| Tubos | Concentración (µg) | Absorbancia |
|-------|--------------------|-------------|
| 1 | 0 | 30 |
| 2 | 10 | 24.8 |
| 3 | 20 | 21.4 |
| 4 | 30 | 17.9 |
| 5 | 40 | 14.9 |
| 6 | 50 | 12.9 |

Tabla 11. Datos para la construcción de la curva estándar utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant para la tercera inducción.

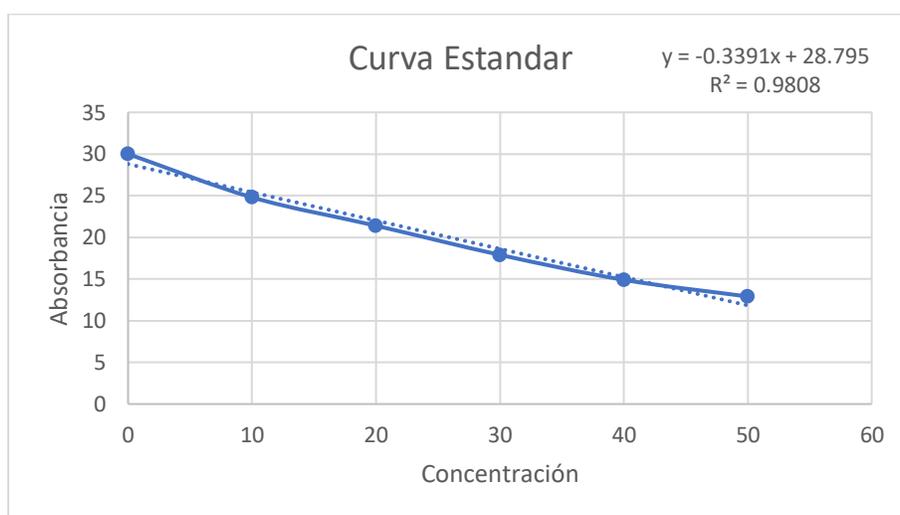


Figura 14. Curva estándar obtenida utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant empleada para calcular la concentración de la proteína CstH obtenida de la tercera inducción.

| Muestra | Absorbancia | Concentración en 50 µL | Concentración final |
|---------|-------------|------------------------|---------------------|
| M7 | 25.5 | 9.72 µg | 777.6 µg en 4 mL |
| M8 | 22.6 | 18.27 µg | 1644.3 µg en 4.5 mL |
| M9 | 21.9 | 20.33 µg | 3659.4 µg en 9 mL |

Tabla 12. Concentración obtenida de acuerdo con la curva estándar de la figura 14, de las muestras 7, 8 y 9 de la proteína CstH obtenidas de la tercera inducción.

12.5. Anexo 5. Cuantificación de la proteína CstH concentrada

→ Primera cuantificación

| Tubos | Concentración (µg) | Absorbancia |
|-------|--------------------|-------------|
| 1 | 0 | 24.5 |
| 2 | 10 | 19.9 |
| 3 | 20 | 18 |
| 4 | 30 | 14.3 |
| 5 | 40 | 10 |
| 6 | 50 | 8.3 |

Tabla 13. Datos para la construcción de la curva estándar utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant para la primera cuantificación de la proteína CstH concentrada.

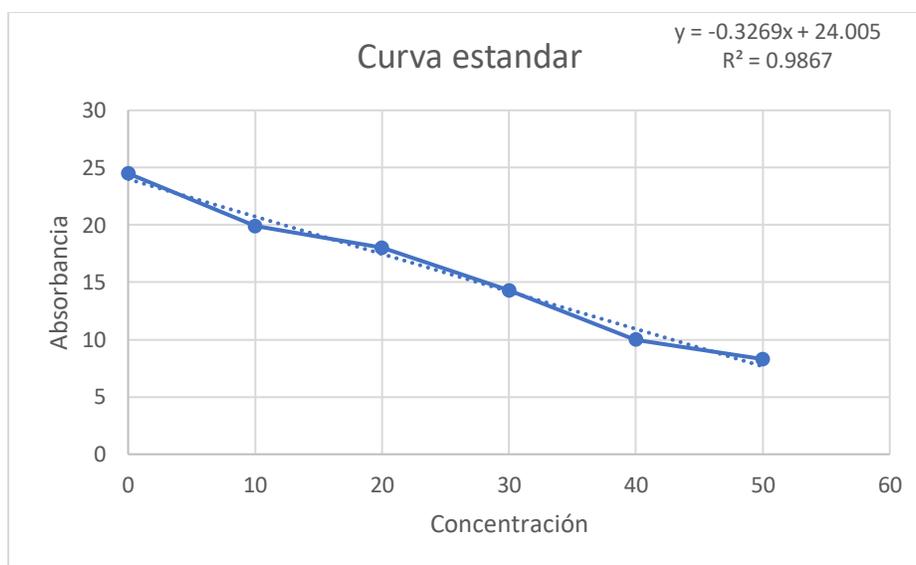


Figura 15. Curva estándar obtenida utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant empleada para determinar la concentración de la proteína CstH concentrada, en la primera cuantificación.

Una vez construida la curva estándar se midió la absorbancia de las muestras para determinar su concentración, la concentración obtenida fue para un volumen de 10 µL los cuales se emplearon a para la reacción del kit 2-D quant, posteriormente se

hizo la relación para determinar la concentración en el volumen total de muestra que se tenía.

| Muestra | Absorbancia | Concentración en 10 mL | Concentración final |
|---------|-------------|------------------------|---------------------|
| 1 | 21.6 | 7.35 µg | 735 en 1 mL |
| 2 | 22.2 | 5.52 µg | 512 en 1 mL |

Tabla 14. Concentración obtenida de acuerdo con la curva estándar de la figura 15, de las muestras 1 y 2 de la proteína CstH concentrada.

→ **Segunda cuantificación**

| Tubos | Concentración (µg) | Absorbancia |
|-------|--------------------|-------------|
| 1 | 0 | 31.2 |
| 2 | 10 | 25.7 |
| 3 | 20 | 22.4 |
| 4 | 30 | 17.9 |
| 5 | 40 | 15.5 |
| 6 | 50 | 13.7 |

Tabla 15. Datos para la construcción de la curva estándar utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant para la segunda cuantificación de la proteína CstH concentrada.

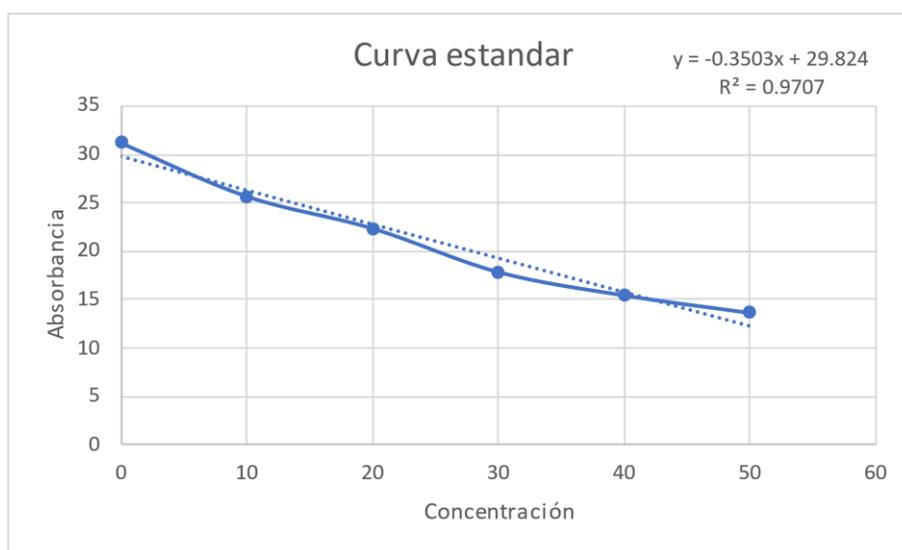


Figura 16. Curva estándar obtenida utilizando la solución estándar BSA 2 mg/mL del kit 2-D quant empleada para determinar la concentración de la proteína CstH concentrada, en la segunda cuantificación.

| Muestra | Absorbancia | Concentración en 10 µl | Concentración final |
|----------------|--------------------|-------------------------------|----------------------------|
| M3 | 27.9 | 5.49 µg | 823.5 µg en 1.5 mL |
| M4 | 27.3 | 7.2 µg | 1080 µg en 1.5 mL |
| M5 | 26.8 | 8.63 µg | 1294.5 µg en 1.5 mL |
| M6 | 19.6 | 29.19 µg | 4378.5 µg en 1.5 mL |
| M7 | 27.1 | 7.78 µg | 1167 µg en 1.5 mL |

Tabla 16. Concentración obtenida de acuerdo con la curva estándar de la figura 16, de las muestras 3, 4, 5, 6 y 7 de la proteína CstH concentrada.