



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CLONACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA FadA DE
Mycobacterium bovis BCG MÉXICO EN *Escherichia coli***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

BRAULIO MANUEL FITZ GONZÁLEZ



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Raúl Garza Velasco
VOCAL: Eduardo Bonilla Espinosa
SECRETARIO: Patricia Orduña Estrada
1er. SUPLENTE: Ruth Edith Martín Fuentes
2° SUPLENTE: Patricia Arzate Barbosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: PROGRAMA DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR MICROBIANA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: DRA. PATRICIA ORDUÑA ESTRADA _____

SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL _____

SUSTENTANTE: FITZ GONZÁLEZ BRAULIO MANUEL _____

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el proyecto BONUS C0009-2014-02-239182 y por Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA-PAPIIT IV200315. El sustentante fue becario del CONACyT en el Programa de Apoyo a Ayudante de Investigador Nacional Nivel III, durante el periodo 01 de septiembre del 2015 al 31 de enero del 2017.

ÍNDICE GENERAL

	Página
JURADO ASIGNADO	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
1. Tuberculosis	1
2. Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2
3. Patología de la tuberculosis	4
3.1 Infección latente por tuberculosis	5
3.2 Tuberculosis activa	5
3.3 Tuberculosis miliar	6
3.4 Tuberculosis meníngea	6
4. Respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
4.1 Formación del granuloma	8
5. Tratamiento contra la tuberculosis	10
5.1 Tuberculosis multidrogo-resistente (MDR-TB)	12
6. Diagnóstico de la tuberculosis	13
6.1 Radiografía de tórax	13

6.2 Baciloscopía	14
6.3 Cultivo	15
6.4 Pruebas bioquímicas	17
6.5 Prueba de la tuberculina	18
6.6 Ensayos de liberación de interferón-gamma	19
6.6.1 QuantiFERON-Gold In Tube	19
6.6.2 TB-SPOT TB	20
7. Biomarcadores	20
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
METODOLOGÍA	25
Materiales	25
1. Clonación del gen <i>fadA</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG México	25
1.1 Amplificación del gen por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	25
1.2 Restricción con las enzimas BamHI y XhoI	27
1.3 Ligación del inserto con el vector	27
1.4 Transformación en <i>Escherichia coli</i>	29

1.5 Extracción de DNA plasmídico	30
2. Sobre-expresión de la proteína FadA de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG México	31
2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	32
2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida de 1 dimensión (1D SDS-PAGE)	33
2.3 Western blot	33
3. Purificación de la proteína recombinante FadA de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG México	34
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO I	57

ABREVIATURAS

¹⁴ C	Carbono 14
1D-SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de 1 dimensión
Am	Amikacina
APS	Persulfato de Amonio
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolil-fosfato
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CD4	Cluster de diferenciación 4
CD8	Cluster de diferenciación 8
CFP-10	Proteína de cultivo de filtrado de 10 KDa
Cm	Capreomicina
Cs	Cicloserina
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Etambutol
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ESAT-6	Blanco antigénico secretor temprano de 6 KDa
Eto	Etionamida
GTP	Guanosín trifosfato
H	Isoniazida
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
IFN-γ	Interferón gamma
IGRAs	Ensayos de liberación de interferón-gamma
IL-10	Interleucina 10

IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiránidósido
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de Potasio
KHz	Kilohertz
Km	Kanamicina
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Caldo Luria
Lfx	Levofloxacina
M	Concentración molar
m/v	masa/volumen
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MGIT	Indicador de crecimiento de micobacterias en tubo
mM	Milimolar
MNT	Micobacterias No Tuberculosas
NBT	Nitroazul de tetrazolio
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno
Ofx	Ofloxacina
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PHA	Fitohemaglutinina
pmol	Picomol
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo
PPD	Derivado proteico purificado
Pto	Protionamida
QFT-GIT	Quantiferon-Gold In Tube

R	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
S	Streptomycin
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TB	Tuberculosis
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TST	Prueba cutánea con tuberculina
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Z	Pirazinamida
λ	Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es un problema importante de salud a nivel mundial, siendo en conjunto con el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) la principal causa de mortalidad por un patógeno [2]. En 2015, la OMS estimó 10.4 millones de nuevos casos de TB a nivel mundial, sobresaliendo China e India con un mayor número de casos (Figura 1). La mortalidad fue de 1.8 millones debido a esta enfermedad. De estas muertes, 0.4 millones fueron en sujetos VIH positivo [2].

En México, en el 2015, se reportaron 20, 561 casos, de los cuales 16,462 fueron de TB pulmonar. En este mismo año, la incidencia fue de 17 casos por cada 100,000 habitantes [3].

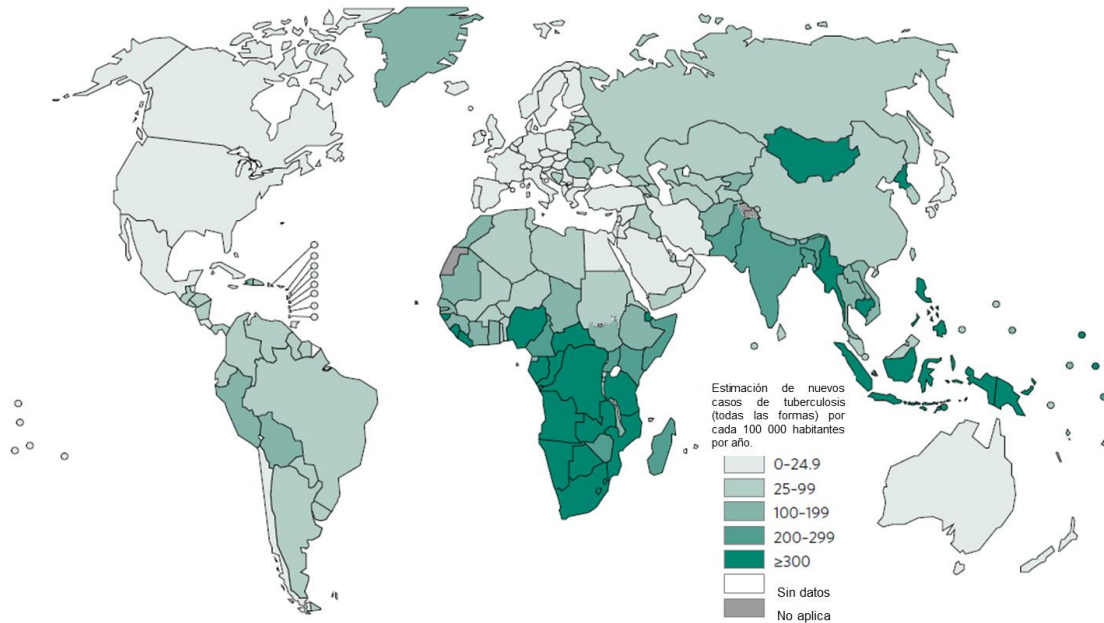


Figura 1. Incidencia de tuberculosis a nivel mundial (nuevos casos de cualquier tipo de TB por cada 100,000 habitantes), modificado de la OMS [2].

2. Características de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) es el agente causal de la TB en los humanos. Este microorganismo es aerobio estricto, inmóvil, de morfología bacilar, no forma esporas y no posee flagelo ni cápsula. Posee una pared celular gruesa con una gran cantidad de lípidos que se calcula sea el 60% del peso seco de la bacteria [4]. La pared celular de las micobacterias consta de 4 capas: La más interna está constituida por peptidoglicano, con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico con cadenas cortas de alanina. Esta es la capa que da rigidez y forma a la bacteria. La segunda capa posee arabinogalactano que se encuentran unido a los ácidos micólicos de la tercera capa. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el *factor cordón* (trehalosa 6,6.-dimicolato) y por mucósidos (Figura 2). La estructura de la pared celular de las micobacterias les confiere una alta resistencia celular a múltiples agentes antimicrobianos; así como la propiedad de ser bacilos ácido-alcohol resistentes, lo que permite la utilización de la tinción de Ziehl Neelsen para su identificación. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanano, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos [4] [5].

M. tuberculosis es una bacteria de crecimiento lento con un tiempo de duplicación de 16 a 18 h en condiciones óptimas. El cultivo microbiológico se observa de 1 a 3 semanas o más después de la incubación para obtener un crecimiento apreciable en los medios de cultivo estándar como el medio Lowenstein-Jensen [6].

Comparada con otras bacterias no esporuladas, *M. tuberculosis* posee una gran resistencia a los ácidos y bases, a determinados desinfectantes químicos, así como a la desecación y a la congelación, lo que les permite sobrevivir durante semanas o meses en el medio ambiente, tanto en superficies de objetos inanimados como en el suelo. Sin embargo, deben permanecer en la oscuridad ya que los rayos ultravioletas son letales para la micobacteria. También, el calor (pasteurización) y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído,

etanol (70%), glutaraldehído (2%), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado, entre otros, son eficaces para la eliminación de esta bacteria [6].

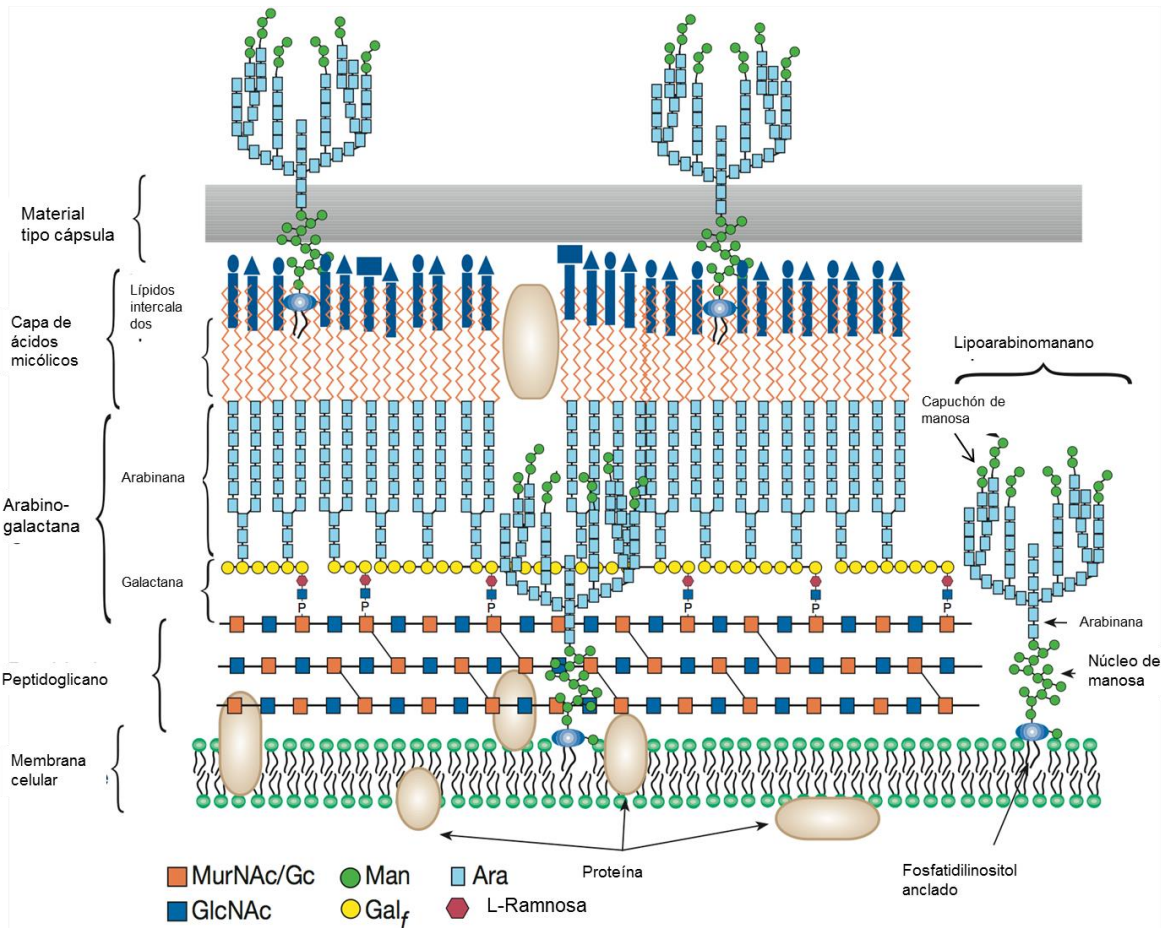


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. Modificado de Esko J.D. [7].

M. tuberculosis pertenece al complejo Mycobacterium tuberculosis el cual incluye diversas especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*. Todas estas bacterias causan tuberculosis en diferentes organismos, por ejemplo, *M. bovis* produce tuberculosis en el ganado vacuno, *M. caprae* produce tuberculosis en cabras [8]. La vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guérin), que representa la única vacuna aprobada contra la tuberculosis, es una subcepa de *M. bovis* atenuada, por lo tanto también pertenece al complejo *M. tuberculosis* [9].

Existe otro grupo de micobacterias que no producen tuberculosis, estas bacterias se clasifican dentro del complejo de las micobacterias no tuberculosas (MNT). Las MNT se encuentran en el medio ambiente, como en el agua o en el suelo. Algunos ejemplos de MNT son *M. kansasii*, el complejo *M. avium* y *M. marinum* [10].

M. leprae no pertenece a los grupos mencionados anteriormente, es un microorganismo intracelular obligado con características únicas, y es el agente causal de la lepra. Entre estas características se destaca un genoma reducido y la incapacidad de cultivarlo *in vitro*. [11].

3. Patología de la tuberculosis

La TB es una enfermedad infecciosa crónica cuyo agente etiológico es *M. tuberculosis*, su principal órgano blanco es el pulmón y se transmite de persona a persona a través de microgotas expelidas durante la tos. [2].

Cuando las microgotas son inhaladas viajan a través de los conductos nasales hacia las vías respiratorias altas, los bronquios y terminan en los alvéolos de los pulmones. [12].

La TB pulmonar presenta generalmente dos fases: una infección latente por tuberculosis y la tuberculosis activa. En la infección latente no hay sintomatología y los individuos infectados son incapaces de transmitir la enfermedad. Mientras que, la TB activa es la responsable de la transmisión de la enfermedad. Alrededor del 10% de las personas con infección latente desarrollan la enfermedad y presentan la TB activa en alguna etapa de su vida. [13].

La TB también se presenta de forma extrapulmonar, es decir, en cualquier órgano, como el riñón [14], el ojo [15] e, inclusive, en la médula espinal [16]. Si la bacteria afecta varios órganos se le llama tuberculosis miliar o diseminada [17].

3.1 Infección latente por tuberculosis

La infección latente por tuberculosis se define como la infección por *M. tuberculosis* en ausencia de signos y síntomas. La bacteria presente está en “equilibrio” con el sistema inmune del hospedero. Esto es porque el sistema inmune contiene a la bacteria dentro de una estructura llamada granuloma, en el que participan tanto células del sistema inmune innato como del sistema inmune adquirido. Cuando el paciente llega a presentar alguna inmunodeficiencia, la infección latente puede activarse y convertirse en una tuberculosis pulmonar [18].

El riesgo de activación de la infección latente es del 5 al 10 % en población general, este riesgo incrementa a medida de que la edad incrementa y depende de varios factores, como el estado inmunológico del paciente, cáncer, enfermedades metabólicas, entre otros. En los pacientes VIH positivo, el riesgo de activación de la infección latente aumenta hasta 100 veces, ya que se encuentran inmunocomprometidos. [19] [20].

Al día de hoy, se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar métodos de diagnóstico que, de forma directa, ayuden a diagnosticar la infección latente y los resultados son muy escasos o inexistentes [18].

3.2 Tuberculosis activa

La TB activa se origina por un desequilibrio entre el sistema inmune del hospedero y la micobacteria. En esta etapa, la bacteria escapa del granuloma, se reproduce con mayor rapidez, estimula más intensamente al sistema inmunológico y provoca que se presenten los síntomas de la enfermedad. La infección inicial ocurre predominantemente en el pulmón y los signos y síntomas de la tuberculosis pulmonar son: tos crónica que, puede durar semanas a meses, acompañada de tos con sangre o expectoraciones con sangre, dolor en el pecho, pérdida de peso, fiebre intermitente y/o sudoraciones nocturnas, resfriado, poco apetito y debilidad o languidez [12].

Existen diferentes métodos de diagnóstico directo para determinar una TB activa aunque, con frecuencia, se sospecha tardíamente de esta enfermedad. En el caso de una TB pulmonar se emplean métodos clásicos como el cultivo, una radiografía de tórax y baciloscopia. La TB extrapulmonar requiere de una biopsia del órgano afectado o una muestra del líquido (si es que lo hay) para realizar el cultivo, con frecuencia este diagnóstico es invasivo y resulta complicado la obtención de estas muestras en la población infantil [21].

3.3 Tuberculosis miliar

La TB miliar o diseminada es una TB pulmonar no controlada que se extiende a dos o más órganos de manera simultánea. Esto ocurre principalmente por una depresión del sistema inmune, como la que se presenta en una infección por VIH [22].

Se sabe que una TB extrapulmonar puede estar relacionada con la administración de medicamentos inmunosupresores, especialmente del tipo de los glucocorticosteroides [23].

3.4 Tuberculosis meníngea

Es una de las formas más frecuente de TB extrapulmonar y se desarrolla en 1% de los pacientes que padecen TB pulmonar. En el 2015 se registraron, en México, 284 nuevos casos de TB meníngea, siendo la población más afectada las personas entre 25 y 44 años de edad [3].

La TB meníngea se presenta a partir de la diseminación hemática de *M. tuberculosis* desde el pulmón a las meninges [24]. Para el aislamiento de *M. tuberculosis* se necesita obtener una muestra de líquido cefalorraquídeo [25].

El conocimiento sobre el porqué algunas personas desarrollan una TB extrapulmonar en el sistema nervioso central es muy poco concluyente. Sin embargo, se tienen evidencias de que, incluso después de recibir un tratamiento adecuado, los pacientes con TB meníngea pueden presentar secuelas neuropsicológicas crónicas, como deterioro cognitivo, deficiencia motora y atrofia óptica [25].

4. Respuesta inmune contra *M. tuberculosis*

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que estimula principalmente una respuesta de tipo celular. Cuando una persona tiene TB pulmonar, durante sus episodios de tos, expelle pequeñas gotas que contienen a la bacteria. Estas gotas, al ser inhaladas por un sujeto sano, se alojan en los alvéolos, lo que provoca que los bacilos sean engullidos por los macrófagos y las células dendríticas presentes en el pulmón. Los macrófagos fagocitan a la micobacteria pero ésta es capaz de inhibir la formación del fagolisosoma, lo que permite que la micobacteria sobreviva dentro del macrófago. De hecho, sólo algunos macrófagos son capaces de inhibir o causar la muerte de las micobacterias [26].

Las células dendríticas también son capaces de fagocitar a la micobacteria y, aquellas que logran hacerlo, maduran y migran hacia los nódulos linfáticos para activar a los linfocitos T, los cuales migran hacia el pulmón reconociendo el foco de infección. Al llegar al pulmón se forman lesiones granulomatosas para contener a la bacteria, controlando así la diseminación y una neumonía de consecuencias graves [26].

En este sentido, la protección contra la TB está asociada a una respuesta de linfocitos T de tipo Th1. Los antígenos son presentados a los linfocitos T CD4+ por el MHC-II, mientras que el MHC-I presenta los antígenos a los linfocitos T CD8+. Cuando el antígeno es presentado a los linfocitos T CD4+, estos secretan IFN- γ , con lo que los macrófagos se activan mejorando radicalmente su eficacia para fagocitar a las micobacterias [27].

4.1 Formación del granuloma

Un granuloma es una conformación organizada de células del sistema inmune capaz de contener una infección bacteriana. En el caso de la TB podría referirse también como tuberculoma [28].

Los granulomas se caracterizan por presentar una tasa elevada de rotación entre poblaciones de macrófagos como: células gigantes (fusión de dos o más macrófagos), células espumosas (macrófagos con un alto nivel de lípidos) y macrófagos epiteliales, entre otros. En el granuloma también se pueden encontrar neutrófilos y linfocitos T (Figura 3) [29] [28].

La fase inicial de formación del granuloma inicia una vez que la micobacteria se encuentra en los alvéolos del pulmón; dentro de este compartimiento los macrófagos y células dendríticas alveolares liberan citocinas y quimiocinas, reclutando así células mononucleares (macrófagos) y linfocitos T. Una vez reclutados los linfocitos T el granuloma alcanza una estructura estable. Cuando el granuloma está en una fase “sólida”, numerosos macrófagos se encuentran “activados” y producen citocinas y agentes antimicrobianos que ayudan a la lisis y contención de las micobacterias, lo que impacta en la disminución del crecimiento celular [30].

A medida que la infección avanza hacia una enfermedad activa, el macrófago adquiere propiedades anti-inflamatorias, así como un elevado metabolismo de lípidos, lo que provoca la formación de células espumosas. Este proceso promueve la necrosis en el centro del granuloma y la diseminación de la bacteria (Figura 3) [30]

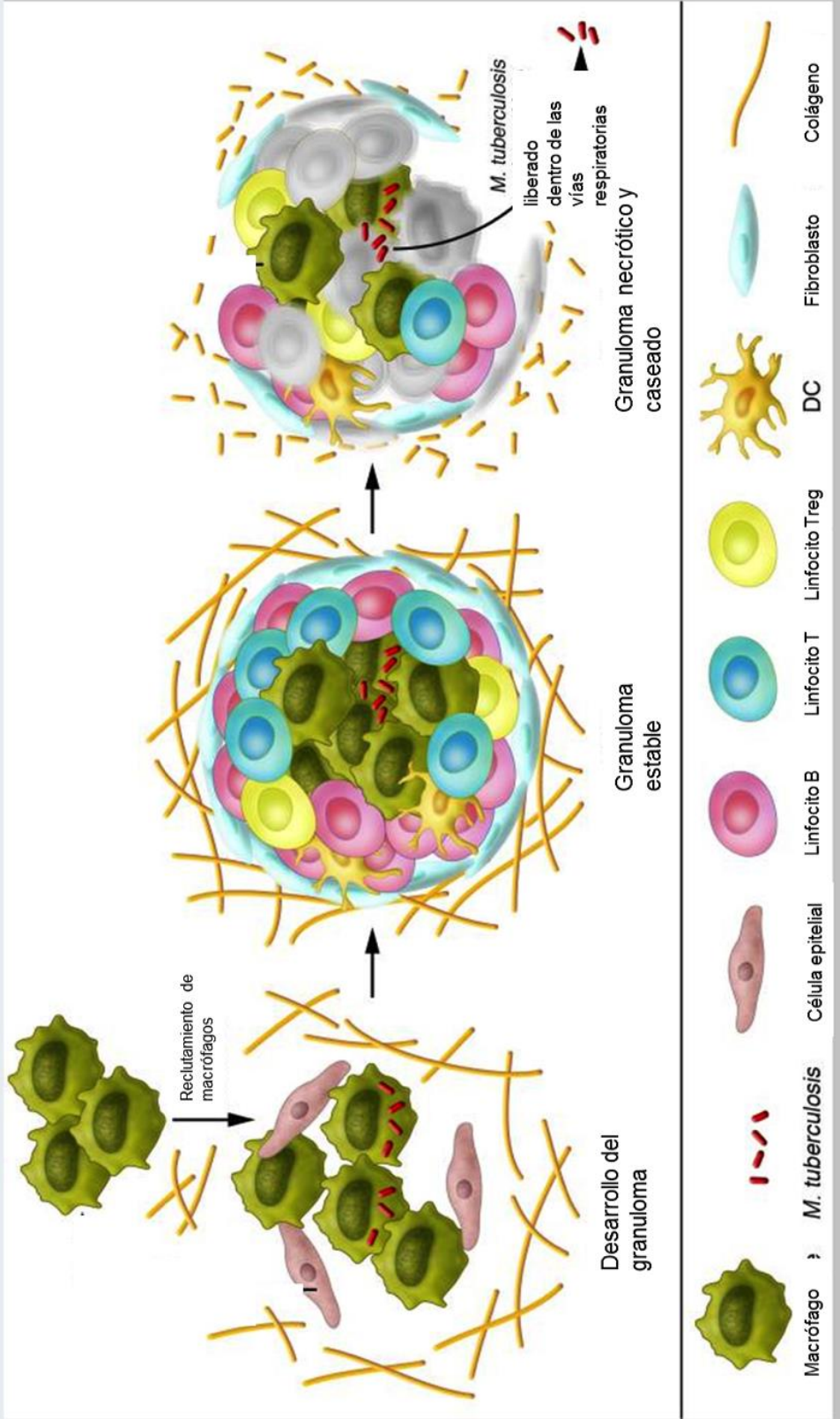


Figura 3. Etapas de la formación del granuloma. Modificado de Salgame [1].

5. Tratamiento contra la tuberculosis

La TB es curable si se diagnostica a tiempo y con el apego del 100% al tratamiento. El objetivo del tratamiento, además de curar al paciente, es evitar que se continúe una cadena de contagio por *M. tuberculosis* [31].

En 1996 se inició la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES), con la finalidad de aumentar las tasas de curación y de disminuir la mortalidad, morbilidad y la transmisión de la TB [32].

La Organización Mundial de la Salud definió la estrategia TAES bajo los siguientes puntos:

- Que el gobierno garantice los recursos necesarios para tener un buen control sobre la TB. Entre estos recursos se encuentran el suministro suficiente de medicamentos e insumos para el laboratorio en todos los servicios y las unidades de salud [32].
- “Organización de la detección, diagnóstico y tratamiento de casos” [32].
- Que a los pacientes que acudan a los servicios de salud, con tos y expectoraciones, se les realice un examen de esputo para diagnosticar a tiempo la TB (en caso de que se presente la infección) [32].
- Que los pacientes que tengan un diagnóstico confirmado de TB reciban un tratamiento acortado estrictamente supervisado y que éste sea personalizado [32].
- Que exista un registro y seguimiento de los casos, hasta la mejoría total del paciente [32].

El tratamiento se administra de acuerdo a la situación del paciente (Tabla 1). Si el paciente representa un caso nuevo se administra el tratamiento primario; cuando el paciente abandona el tratamiento u ocurre una recaída se utiliza un retratamiento con fármacos de 1ª línea por un periodo más largo; cuando hay un

fracaso al tratamiento y al retratamiento primario se utiliza un tratamiento estandarizado con fármacos de 2ª línea; si resulta un fracaso al tratamiento estandarizado se procede a utilizar un tratamiento personalizado a cada paciente (Tabla 1) [33].

Tabla 1.- Esquema de tratamiento de la tuberculosis. Modificado de [33].

Casos Nuevos	Tratamiento primario (fármacos de primera línea).
	Isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol diariamente durante 2 meses. Posteriormente se administra Isoniacida y rifampicina 3 veces por semana durante 4 meses.
Abandono o recaída	Retratamiento con fármacos de primera línea.
	Isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina diariamente durante 2 meses. Posteriormente se administra isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante 1 mes. Después se administra isoniacida, rifampicina y etambutol 3 veces a la semana por 5 meses.
Fracaso al tratamiento y retratamiento primario	Estandarizado (fármacos de primera y segunda línea).
	Se administra kanamicina o amikacina o capreomicina, levofloxacina, protionamida, cicloserina, pirazinamida y etambutol diariamente durante 6 meses. Posteriormente se administra levofloxacina, protionamida, cicloserina, pirazinamida y etambutol diariamente durante 18 meses
Fracaso al tratamiento estandarizado	Retratamiento individualizado

Los medicamentos de primera línea son:

- Isoniazida (H).- Utiliza una catalasa para que se genere el fármaco que inhibe la síntesis de ácidos micólicos. [34].
- Rifampicina (R).- Macrólido que inhibe la síntesis de la RNA polimerasa [35].

- Pirazinamida (Z).- El ácido pirazinoico derivado del profármaco bacteriostático es el que lleva a cabo la función que actúa en medio ácido. [35].
- Etambutol (E).- Es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de arabinogalactano [36].
- Estreptomina (S).- Es un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos que inhibe la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo la síntesis de proteínas [37].

5.1 Tuberculosis multidrogo-resistente (MDR-TB)

La MDR-TB surgió como una entidad clínica en la década de los noventa, debido a un uso excesivo de rifampicina a nivel mundial. En los últimos años los casos de MDR-TB aumentaron en el mundo, con un total de 480, 000 nuevos casos durante 2015, de los cuales el 45 % se ubican en China, India y Rusia [38] [2]

Se considera MDR-TB a la enfermedad causada por bacterias resistentes, al menos, a isoniazida y rifampicina. Cuando el microorganismo es resistente a la isoniazida, rifampicina y, al menos, a alguna fluoroquinolona y a un fármaco de segunda línea, se le considera como tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB) [39].

Actualmente, se considera que uno de cada 5 pacientes con MDR-TB tiene un tratamiento adecuado, y sólo el 50% logra curarse. Existen varias razones para la ausencia de un tratamiento adecuado; una de ellas es un inadecuado diagnóstico de la MDR-TB, ya que se requiere mayor tiempo para determinar si la micobacteria es resistente a algún antibiótico. Otra se relaciona con el largo y complicado tratamiento ya que, debido a esto, existe una tasa significativa de abandono, además de que algunos antibióticos son muy caros. Es por ello que se requiere un diagnóstico más rápido y más eficiente para la TB [40].

6. Diagnóstico de la tuberculosis

El diagnóstico de la TB pulmonar es algo que no debe dejarse a un lado. Se debe realizar la búsqueda entre la población referida a los servicios de salud, así como en los individuos que presenten una tos inexplicable por más de dos semanas, personas que han tenido contacto con pacientes enfermos de TB y grupos de riesgo como personas inmunocomprometidas (como pacientes con VIH) o inmigrantes. El diagnóstico oportuno en estas poblaciones podría aumentar hasta un 46% la detección de enfermos de TB [41].

El diagnóstico de TB pulmonar contempla, inicialmente, realizar una baciloscopia a partir de muestras de esputo o lavado broncoalveolar con la finalidad de identificar a la bacteria. Paralelamente se realiza el cultivo en medios convencionales y una radiografía de tórax para observar si hay alguna lesión en el pulmón. También se debe realizar la prueba de la tuberculina, la cual se describe posteriormente. Después de obtener los resultados del cultivo (que pueden tardar de 15 días hasta 2 meses) se realizan las pruebas bioquímicas para la identificación de *M. tuberculosis* [41].

6.1 Radiografía de tórax

Para el diagnóstico de la TB se realiza, de manera rutinaria, una radiografía de tórax, en donde el objetivo es identificar las lesiones causadas por la micobacteria, como las cavidades formadas por el granuloma o, en una enfermedad avanzada, la presencia de cuerpos cavernosos (Figura 4). Esta prueba de diagnóstico solo es sugestiva, ya que *M. tuberculosis* no es el único agente que puede causar estas lesiones. Algunos ejemplos de microorganismos que pueden causar patologías que afectan los pulmones son *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*, entre otros. En el diagnóstico diferencial no hay que descartar linfoma, cáncer pulmonar o una infección por algún otro patógeno [41].

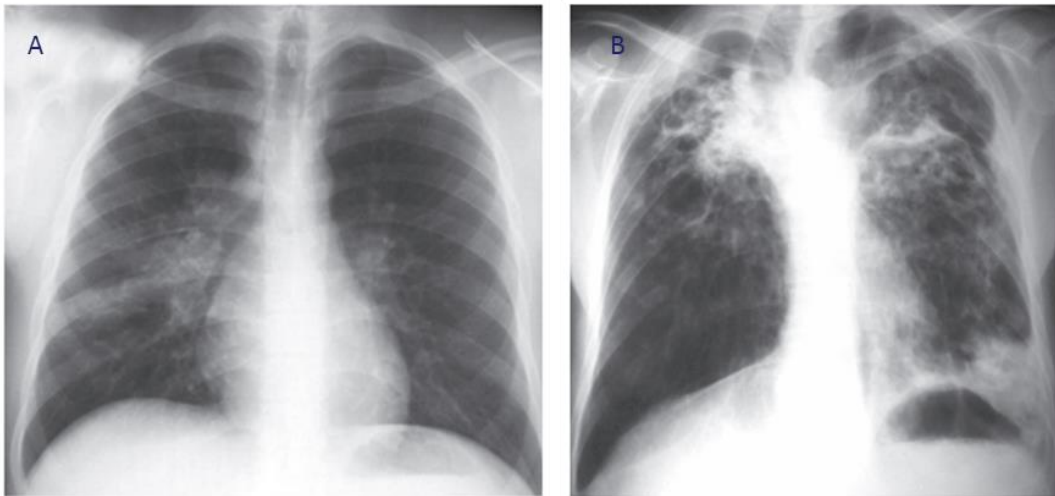


Figura 4. Manifestaciones de TB pulmonar primaria (A); Adenopatías a nivel del hilio pulmonar derecho, asociado a imágenes parenquimatosas. TB activa (B); se puede observar una reducción del lóbulo derecho, así como las lesiones cavernosas características de una TB activa. Modificado de Miranda G. G: [42].

6.2 Baciloscopía

La baciloscopía es una prueba altamente específica para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Consiste en tomar una muestra biológica, normalmente esputo, y realizar una tinción de Ziehl Neelsen para la búsqueda de BAAR. Esta prueba, por sí sola, sólo sugiere la presencia de BAAR en la muestra, ya que las micobacterias no son los únicos microorganismos que dan positivos a la tinción de Ziehl Neelsen; también dan positivo bacterias como *Nocardia* sp. Un problema con esta técnica es que se requieren de 1 a 9 bacilos, al menos, en 10 campos para concluir que la muestra es positiva; se presentan falsos positivos, por lo que es conveniente tomar 3 muestras de esputo en diferentes tiempos [31]. Una ventaja de esta prueba es que es barata, siempre está disponible y es muy simple [43]. Cuando se detectan los BAAR, se procede a realizar los cultivos [41].

6.3 Cultivo

El cultivo es una prueba de diagnóstico microbiológico fundamental para demostrar la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras analizadas. Existen medios selectivos que contienen diversos antibióticos, estos inhiben el crecimiento de otras bacterias presentes en la muestra. Los medios menos selectivos solo contienen otras sustancias que inhiben el crecimiento bacteriano, por ejemplo, colorantes como el verde de malaquita. La concentración del colorante es muy importante para mantener un equilibrio entre el crecimiento de las micobacterias y el de otras bacterias contaminantes [44].

En general, para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas se prefieren medios no selectivos, líquidos o una combinación de sólido + líquido.

- Medios sólidos.- Se dividen en dos grupos: los confeccionados a base de huevo y los que son a base de agar. Los que son a base de huevo tienen la ventaja de presentar una recuperación muy alta de las especies de micobacterias, además de que se almacena de 2 a 8°C hasta por 6 meses. El medio más utilizado es el medio Lowenstein-Jensen, que adicionalmente contiene verde de malaquita. Las colonias en este medio son color crema, rugosas o cremosas y amarillentas [45]
- Los medios a base de agar son medios sintéticos, como el Middlebrook 7H10 y Middlebrook 7H11, suelen ser transparentes y permiten una detección más rápida de las micobacterias (de 10 a 12 días). Un inconveniente con estos medios es que su vida media es de 1 mes a 2-8°C. Además, contienen una concentración muy baja de verde de malaquita, lo que provoca que el medio pueda contaminarse muy fácilmente [46].
- Medios líquidos.- Estos medios están más enriquecidos que los medios sólidos, por lo que permiten una mayor recuperación de micobacterias en menor tiempo; generalmente se utilizan para realizar pruebas bioquímicas o de sensibilidad a antibióticos. Una desventaja de estos medios es que no se

puede apreciar la morfología de las colonias ni se puede observar si hay cultivos mixtos. En estos medios se debe verificar el crecimiento entre los 5 y 7 días después de la inoculación; posteriormente se realiza la lectura cada semana por un máximo de 8 semanas. *M. tuberculosis* presenta un crecimiento denso alrededor del día 21 [46].

Existen los medios convencionales como el Middlebrook 7H9 o el Dubos, pero también existen medios comerciales que se elaboran a partir de los convencionales, con la diferencia de obtener un rendimiento mayor. Hay medios que son de lectura manual y sistemas de detección automática [46].

- Medios de lectura manual.- Los más utilizados son el MB Redox y MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube). El primero utiliza el medio selectivo de Kirchner con suplementos de antibiótico y de enriquecimiento. Se utiliza una sal de tetrazoilo como indicador redox: cuando hay crecimiento bacteriano, la sal se reduce y se precipita en la pared bacteriana dando un color entre rosa y violeta [47].

El segundo, el MGIT, es fluorométrico y consta del medio Middlebrook 7H9 con un compuesto fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicona. Este medio se revisa con luz ultravioleta y se observa un brillo anaranjado fluorescente, debido a la disminución de oxígeno en el medio [48].

- Sistemas de detección automática y semiautomática.- Estos sistemas detectan el crecimiento de micobacterias de una manera más rápida. Entre estos encontramos los siguientes [46]:
 - Sistema BACTEC 460TB.- Utiliza el medio Middlebrook 7H12 que es un caldo Middlebrook 7H9 que contiene ácido palmítico marcado con ^{14}C . Cuando es utilizado este sustrato por la bacteria, lo metaboliza y produce $^{14}\text{CO}_2$. La cantidad de

$^{14}\text{CO}_2$ es directamente proporcional a la cantidad de micobacterias existentes en el medio [49].

- Sistema ESP culture System II. - Es un sistema automático no radiométrico de monitorización continua, para la detección y determinación de la sensibilidad de micobacterias. El medio base consta de Middlebrook 7H9 con antibióticos como suplemento. La detección se realiza mediante sensores de presión que detectan el consumo de oxígeno [50].
- Sistema MB/BacT ALERT 3D.- Sistema automatizado de cultivo colorimétrico que detecta la producción de CO_2 como indicador de crecimiento bacteriano. El medio utilizado es el Middlebrook 7H9 suplementado con factores de crecimiento y una solución antibiótica para las muestras de origen no estéril. Con una monitorización continua, los cultivos permanecen en el incubador-lector sin un manejo adicional hasta que el equipo notifica si se presenta un crecimiento positivo, o bien, si es negativo tras el periodo de incubación fijado [51].
- Sistema BACTEC MGIT 960.- Este sistema utiliza el medio MGIT, que detecta consumo de O_2 mediante unos sensores fluorométricos. No es útil para muestras de sangre [52].

6.4 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son importantes para identificar diversas especies de micobacterias, tanto del complejo *M. tuberculosis* como MNT, por lo que, si el paciente tiene una infección por micobacterias, se prescribe un tratamiento adecuado [53].

Las pruebas bioquímicas que nos permiten distinguir entre el complejo *M. tuberculosis* y las MNT son la reducción de nitrato, la acumulación de niacina y la prueba de la catalasa a 68°C (Tabla 2). Pero se añaden más pruebas para distinguir entre especies de micobacterias, incluso entre los complejos, como se muestra en la Tabla 2 [54].

Tabla 2. Diferentes pruebas bioquímicas de algunas especies de micobacterias [53].

Microorganismo	Reducción de nitrato	Acumulación de niacina	Hidrólisis de Tween 80	Ureasa	Pirazinamidasasa	Catalasa a 68°C
<i>M. bovis</i> BCG México	-	-	-	+	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	±	+	+	-
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	+	+
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-	-
<i>M. smegmatis</i>	-	-	+	-	+	-
<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	-	+	+
<i>M. microtii</i>	-	+	-	+	+	-
<i>M. kansasii</i>	+	-	+	+	-	+

6.5 Prueba de la tuberculina

La prueba de la tuberculina o TST por sus siglas en inglés (tuberculin skin test) es una prueba en la cual se administra un Derivado Proteico Purificado (PPD) al paciente. El PPD consiste en una mezcla de alrededor de 200 antígenos derivados de un cultivo de *M. tuberculosis*, que muestra reactividad cruzada con la vacuna BCG y con algunas MNT. Para llevar a cabo esta prueba, se administra una unidad de PPD por vía intradérmica en el brazo del paciente; transcurridas 72 h después de la administración, se mide el diámetro de la induración en el brazo. Esta induración ocurre debido a que se presenta una hipersensibilidad de tipo IV, la cual es una respuesta celular tardía mediada por los linfocitos Th1. El resultado positivo se basa en la medición de la induración, sin tomar en cuenta el

hematoma. La lectura es positiva si la induración mide ≥ 10 mm en pacientes inmunocompetentes, y ≥ 5 mm en pacientes inmunodeprimidos, como los que padecen de VIH [55] [31].

6.6 Ensayos de liberación de Interferón-gamma

Recientemente se ha implementado la medición del interferón gamma (IFN- γ) en ensayos llamados de liberación de interferón-gamma (IGRA, por sus siglas en inglés). Estos ensayos miden la cantidad de IFN- γ liberado por los linfocitos T que estuvieron expuestos a inmunógenos de *M. tuberculosis*. Entre estos ensayos existen el QFT-GIT (QuantiFERON-Gold In Tube) y el T-SPOT TB [56].

6.6.1 QuantiFERON-Gold In Tube

El QuantiFERON-Gold In Tube utiliza sangre venosa heparinizada recolectada directamente del paciente. La muestra es depositada en 3 tubos: uno que corresponde al control positivo, el segundo al negativo y el tercero a la muestra a determinar. El tubo control positivo contiene fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés). La fitohemaglutinina es una lectina que estimula a los linfocitos T, provocando la liberación de IFN- γ . El tubo muestra contiene 3 péptidos antigénicos de *M. tuberculosis*: ESAT-6 (Blanco antigénico secretor temprano de 6 KDa), CFP-10 (Proteína de cultivo de filtrado de 10 KDa) y un antígeno específico de *M. tuberculosis* (TB7.7). Los linfocitos T activados son estimulados por estos antígenos, lo que induce la liberación de IFN- γ , si el paciente presenta la infección. El tubo control negativo corresponde al blanco. Los tubos se dejan incubando 24 h a 37°C, se centrifugan y, con el sobrenadante, se realiza una prueba de ELISA que cuantifica al IFN- γ secretado por los linfocitos T [55].

Una desventaja de este ensayo es que no todos los péptidos antigénicos son específicos de *M. tuberculosis*, ya que también se comparten con *M. microti* y

otras MNT. Además, no es muy confiable, por lo que se sugiere usarlo en conjunto con los demás métodos de diagnóstico [56].

6.6.2 TB-SPOT TB

El TB-SPOT TB también utiliza sangre periférica venosa pero, a diferencia del QuantiFERON, la sangre es procesada para obtener células mononucleares. Estas células se resuspenden en medio AIM-V y se distribuyen en 4 pozos (250,000 células por pozo): un control negativo, uno positivo y dos para antígenos específicos micobacterianos (ESAT-6 y CFP-10). La suspensión se coloca en una placa de 96 pozos los cuales tienen adherido un anticuerpo monoclonal dirigido contra IFN- γ , y se incuba de 16 a 20 h a 37°C. Después de la incubación se lava con PBS y se incuba con otro anticuerpo dirigido a IFN- γ y con un reactivo colorimétrico (BCIP/NBT), aquellos anticuerpos conjugados que se hayan adherido al IFN- γ , se observan como puntos. El ensayo es positivo si en los pozos donde se encuentran los antígenos específicos hay más de 6 puntos, el control negativo debe tener máximo 5 puntos [57].

7. Biomarcadores

A pesar de que se cuenta con varias técnicas para realizar el diagnóstico de la TB, así como su tratamiento, las cifras de nuevos casos y las muertes debido a esta enfermedad son muy altas. Esto último ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico temprano de la TB, en especial para la infección latente, ya que es en esta etapa que el tratamiento impedirá que el sujeto sea infecto-contagioso. Una propuesta es el uso de biomarcadores, los cuales se definen como aquellos parámetros medibles que indican un proceso biológico normal o patológico, así como una respuesta farmacológica o intervención terapéutica [58].

Para el diagnóstico de la TB se ha propuesto el uso de biomarcadores tanto del hospedero como del patógeno. Por parte del hospedero se han realizado estudios donde se mide en células (como linfocitos T), la producción de proteínas o alguna otra molécula del hospedero para diagnosticar la TB. En la actualidad se tienen los ensayos de IGRA (antes descritos) donde se mide la liberación de IFN- γ producida por los linfocitos T. También se han realizado estudios de búsqueda de biomarcadores de inflamación en saliva, por la dificultad de obtener muestras de esputo en niños para diagnosticar TB. Algunos de los biomarcadores propuestos son las citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-6, entre otros. Su principal desventaja es que no son específicos de la TB, ya que otras infecciones bacterianas también producen estas citocinas. [59].

En la búsqueda de biomarcadores por parte del hospedero en diferentes fluidos corporales, desde sangre hasta orina, se ha propuesto el uso de la proteína IP10, una quimiocina secretada por monocitos y células endoteliales que se presenta cuando hay inflamación. Esta proteína se detectó tanto en sangre como en la orina de sujetos con TB [58]. En la orina también se ha propuesto el uso de la neopterinina que es un derivado de la guanósina trifosfato que participa en la síntesis de GTP, y es secretada por monocitos y macrófagos activados, células dendríticas y células endoteliales. Este marcador, al igual que la proteína IP10, también son marcadores de activación del sistema inmune, por lo que son inespecíficos. [60].

En el caso de la búsqueda de biomarcadores del patógeno se ha propuesto el uso de diversos componentes micobacterianos. Un ejemplo es el uso del ensayo Xpert®MTB/RIF, el cual identifica la presencia del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* por PCR en tiempo real. Además de observar la presencia de *M. tuberculosis*, este ensayo también permite determinar si la micobacteria tiene resistencia a rifampicina. Para observar la presencia de *M. tuberculosis* se amplifica una porción (81 pb) del gen *rpoB* que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa II, mientras que, para observar la resistencia a rifampicina se busca mutaciones en la región determinante de resistencia a rifampicina (RRDR, por sus siglas en inglés). La ventaja de este método es que se reduce el tiempo de espera para el

tratamiento; su desventaja es su alto costo y pocos pacientes tienen acceso a él [61].

También se ha propuesto la búsqueda del lipoarabinomanano en la orina (LAM) para efectuar el diagnóstico de la TB; uno de los principales inconvenientes de esta detección es que tiene baja especificidad. En pacientes coinfectados con VIH, la especificidad aumenta pero sigue siendo alrededor del 50% [62].

La proteína TB31.7 también se ha propuesto como un biomarcador, ya que es una proteína de estrés universal que funciona como una chaperona durante la tuberculosis latente. Los ensayos realizados mostraron que esta proteína es útil para el diagnóstico de la TB, pero no es específica para la infección latente. De hecho, no se encontraron diferencias en la expresión de esta proteína entre la infección latente y la TB activa [63].

Siguiendo esta búsqueda de biomarcadores, en el trabajo realizado por Orduña Estrada y colaboradores se llevó a cabo la identificación de proteínas de *M. bovis* BCG México reactivas inmunogénicamente con los sueros de pacientes con TB. De estas proteínas se seleccionaron proteínas de estrés, que se relacionan con la infección latente, y que fueran homólogas a las proteínas de *M. tuberculosis*. Una de las proteínas identificadas como antigénicas fue FadA, que participa en el metabolismo de lípidos [64].

La proteína FadA es una enzima con actividad de tiolasa que participa en el metabolismo de lípidos, específicamente en la β -oxidación de ácidos grasos. Esta enzima separa la 3-cetoacil coenzima A por un grupo tiol de una coenzima A que origina como productos una acil coenzima A y una acetil coenzima A [65].

Esta proteína aún no ha sido caracterizada en su estructura y función. Todo lo que se conoce es por inferencia, debido a la homología que presenta con proteínas de otros microorganismos [65]. Es por ello que resulta indispensable conocer sus características bioquímicas, así como sus propiedades inmunogénicas.

JUSTIFICACIÓN

La TB es una enfermedad con alta incidencia a nivel mundial y, a falta de un diagnóstico temprano, continúa presentando un alto nivel de transmisión, con secuelas graves en los individuos que la padecen. Es por ello que es necesario desarrollar nuevos métodos de diagnóstico temprano que sean accesibles. Una opción es el uso de biomarcadores.

La caracterización de la proteína FadA es necesaria para determinar su potencial como biomarcador de la TB. Inicialmente se debe contar con la proteína purificada para posteriormente llevar a cabo ensayos inmunológicos que permitan determinar su utilidad como biomarcador.

HIPÓTESIS

Si se logra clonar el gen *fadA* de *M. bovis* BCG México en *Escherichia coli* TOP 10, entonces esta bacteria podrá expresar el antígeno FadA.

OBJETIVO GENERAL

Realizar la clonación del gen *fadA* de *M. bovis* BCG México en una cepa de *Escherichia coli* y, secuencialmente, purificar la proteína FadA que produce dicha enterobacteria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Clonar el gen *fadA* de *M. bovis* BCG en el vector pTrcHisA en *Escherichia coli* TOP 10.
- Sobre-expresar la proteína recombinante FadA de *M. bovis* BCG en la cepa de *Escherichia coli* TOP 10.
- Purificar la proteína recombinante FadA por cromatografía de afinidad.

METODOLOGÍA

La metodología se dividió en tres etapas: La primera parte comprendió la clonación del gen *fadA* de *M. bovis* BCG México en el vector pTrcHisA en *Escherichia coli* TOP 10. La segunda parte comprendió la sobre-expresión de la proteína FadA recombinante en *Escherichia coli* TOP 10. Y, finalmente, en la tercera parte se realizó la purificación de la proteína FadA recombinante por medio de cromatografía por afinidad.

Materiales

Para llevar a cabo este estudio se emplearon las cepas *M. bovis* BCG México y *Escherichia coli* TOP 10 que fueron obtenidas de la colección del Programa de Inmunología Molecular Microbiana (Facultad de Medicina, UNAM), así como el vector pTrcHisA proporcionado por el mismo.

Los medios de cultivo y reactivos utilizados se describen en el Anexo I.

1. Clonación del gen *fadA* de *Mycobacterium bovis* BCG México

1.1 Amplificación del gen *fadA* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen *fadA* de *M. bovis* BCG México se realizó por medio de la técnica de PCR, con un volumen final de 30 μ L, bajo las siguientes condiciones: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 6.6 μ M de dNTPs, 20 pmol de cada oligo (*Forward* y *Reverse*), DMSO 1x, 1 unidad de *Taq* DNA

polimerasa, 100 ng de DNA y H₂O cbp 30 µL. Las condiciones en el termociclador fueron: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 60°C por 0.5 minutos y extensión a 72°C por 1.2 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (m/v) en TBE 0.5X (ver Anexo I). El gel fue teñido con bromuro de etidio. Se espera una banda de cerca de 1300 pb correspondiente al gen *fadA*.

Las secuencias de los *primers* que se utilizaron para la amplificación fueron las siguientes:

Primer Forward: 5´ GGAG**GGATCC**ATGTCCGAAGAAGCCTTCATCTACG 3´

Primer Reverse: 5´ CTG**CTCGAG**GATTGTGTTGTCTGGCATGCTGTTA 3´

La secuencia resaltada en color negro indica los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción. En el *primer Forward* se encuentra la secuencia de reconocimiento para la enzima BamHI, mientras que en el *primer Reverse* se encuentra la secuencia de reconocimiento para la enzima XhoI.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizó su purificación con el kit *MinElute® PCR Purification Kit* de QIAGEN. Los productos purificados fueron cuantificados en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente analizados por medio de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (m/v) en TBE 0.5X; esto con la finalidad de corroborar que se purificó el producto de interés.

Ya con el producto de PCR purificado, se procedió a la clonación del gen *fadA* en el vector pTrcHisA.

1.2 Restricción con las enzimas BamHI y XhoI

Como parte de la estrategia de clonación, se verificó que la secuencia del gen *fadA* no tuviera sitios de restricción para BamHI y XhoI, los cuales se encontraban en el vector pTrcHisA y fueron utilizados para llevar a cabo la clonación (Figura 5).

Tanto el inserto (producto de PCR) como el vector se trataron con las enzimas BamHI y XhoI cuyos cortes dejan extremos cohesivos y, por lo tanto, dificultan que el vector produzca una autoligación (Figura 6).

Se utilizó un volumen final de 25 μL tanto para la restricción del gen, como para el vector pTrcHisA. Se utilizó el Buffer 3 1X (New England Biolabs, NEB), 20 unidades de la enzima BamHI (NEB), 20 unidades de la enzima XhoI (NEB) y 10 μL de DNA (concentración de 242.9 ng/ μL). Para el vector se utilizaron las mismas cantidades de Buffer y de enzimas, solo cambió el volumen de DNA que fue de 1 μL (concentración de 2461.1 ng/ μL). Las muestras se dejaron incubando a 37°C por 4 h.

1.3 Ligación del inserto con el vector

En el protocolo de ligación se ocuparon los controles recomendados en "*Molecular Cloning-A Laboratory Manual. Protocol 19.- Blunt-enden cloning into Plasmid vector*". La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL : 3 μL del vector pTrcHisA tratado con enzimas de restricción (concentración de 98.4 ng/ μL), 7 μL del gen *fadA* (concentración de 97.16 ng/ μL) tratado con enzimas de restricción, Buffer de ligasa 1x (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, pH 7.5 (GIBCO BRL), y 20 U de DNA ligasa (GIBCO BRL). La muestra se incubó a 4°C toda la noche.

Para los controles, sólo se sustituyeron los volúmenes del vector, del inserto o de la enzima, por agua grado biología molecular.

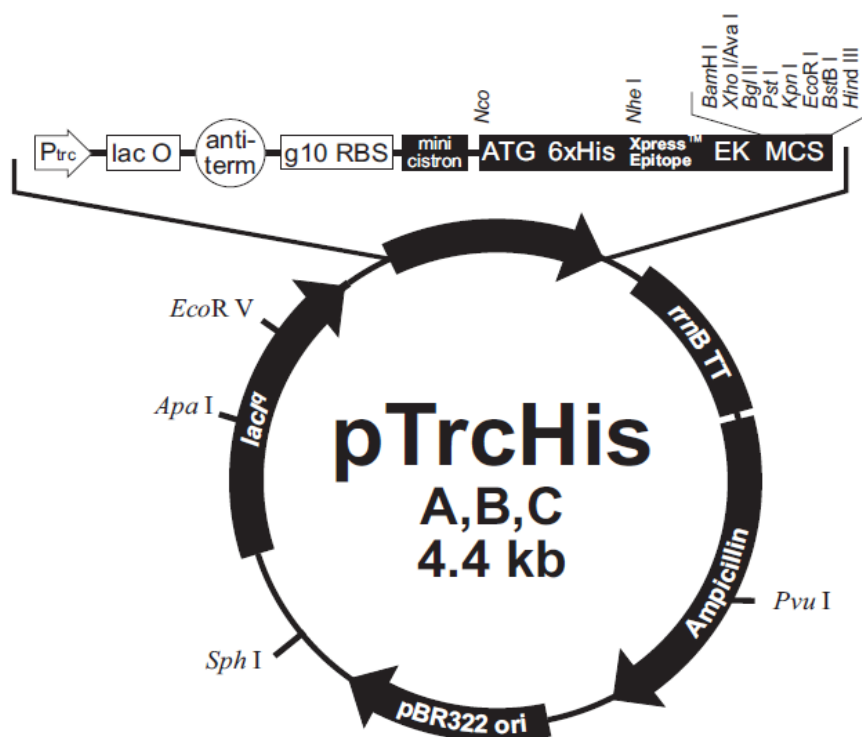


Figura 5. Mapa del vector pTrcHis. En él se puede observar el sitio de clonación múltiple (MCS) donde se encuentran los sitios de corte de las enzimas de restricción para poder introducir el gen *fadA*. Se observa el operador de lactosa (*lac O*) que permitirá la replicación y traducción de la proteína FadA gracias a la inducción por IPTG, que es un análogo de la lactosa. Después de la secuencia ATG, el vector contiene una secuencia que codifica para 6 histidinas, lo que ayuda a la detección y posterior purificación de la proteína. También se observa una región que codifica para un cassette de resistencia a ampicilina, lo que permite la selección de aquellas colonias que adquirieron el vector al momento de la transformación [66].

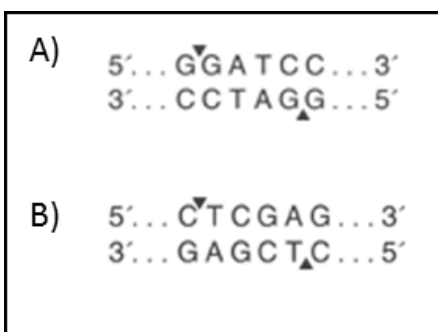


Figura 6. Sitios de corte de las enzimas BamHI (A) y XhoI (B) (New England Biolabs).

Tabla 3.- Controles para la ligación, modificado de Sambrook [67].

Control	DNA	Ligasa
A	Vector	+
B	Inserto	+
C	Vector + inserto	+
D	Vector	-
E	Vector + inserto	-
F	Vector sin tratamiento	-

1.4 Transformación en *Escherichia coli*

La transformación se llevó a cabo por choque térmico. Previamente, se prepararon células quimio-competentes. Brevemente, se creció *Escherichia coli* TOP 10 en caldo Luria (ver Anexo I) toda la noche a 37°C. Se tomaron 2 mL de este cultivo y se inocularon 100 mL de caldo Luria. El cultivo se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) entre 0.3 y 0.4. En seguida, el cultivo se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 50 mL de CaCl₂ 0.1 M. Se incubó en hielo durante toda la noche. Se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 4.37 mL de CaCl₂ 0.1 M y 0.63 mL de glicerol al 100%. Se prepararon alícuotas de 100 µL y se congelaron inmediatamente a -70°C.

Para la transformación se utilizaron 20 ng de DNA de la reacción de ligación y una alícuota de células competentes previamente descongelada. La reacción se incubó en hielo por 30 minutos e inmediatamente se hizo el choque térmico, la mezcla se puso en el thermoblock a 42°C por 2 minutos e inmediatamente en hielo. Pasado este tiempo se agregó 1 mL de medio Luria y se incubó a 37°C en agitación (250 rpm). Después de incubar, se inocularon 300 µL del cultivo en una caja Petri con agar Luria + ampicilina (100µg/mL). Los controles se procesaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

1.5 Extracción de DNA plasmídico

De las colonias que desarrollaron en el medio Luria + ampicilina (100 µg/ mL) (ver Anexo I), se seleccionaron algunas para extraer el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina; esto con la finalidad de comprobar que se insertó el gen *FadA* en el vector pTrcHisA.

La extracción del DNA se realizó a partir de un cultivo, de las colonias seleccionadas, de caldo Luria + ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se dejó incubando toda la noche a 37°C con agitación (150 rpm). Transcurrido este tiempo, se centrifugó el cultivo a 12,000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla obtenida se colocó en un tubo eppendorf y se resuspendió en 200 µL de la solución I (ver Anexo I); inmediatamente se agregaron 200 µL de la solución II fresca (ver Anexo I). La muestra se mezcló por inversión durante 5 minutos y se incubó en hielo por 5 minutos más. Al término de la incubación, se adicionaron 200 µL de la solución III fría (ver Anexo I) a la muestra y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se centrifugó por 10 minutos a velocidad máxima (13,000 rpm), el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se adicionaron 800 µL de etanol absoluto. El DNA plasmídico se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Al término, el tubo se centrifugó a velocidad máxima por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70% centrifugando por 1 minuto a velocidad máxima. Se descartó el sobrenadante y el DNA precipitado se secó a 65°C para eliminar los residuos de etanol. Una vez eliminado el etanol, el DNA se resuspendió en 100 µL de agua grado biología molecular y se adicionó 1 µL de RNAsa. Se dejó incubando 1 h a 37°C. Al término de la incubación, el DNA se precipitó nuevamente con etanol absoluto siguiendo la metodología descrita anteriormente. El DNA plasmídico obtenido se cuantificó determinando la absorbancia de la muestra a 600 nm en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Para observar la presencia del gen *FadA* se realizó una PCR descrita

en el punto 1.1 y, posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se corrió a 100 v por 1 h.

También se realizó una extracción de DNA plasmídico mediante el *High Pure Plasmid Isolation Kit* de ROCHE siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, esta extracción se realizó a partir de dos colonias con la finalidad de secuenciar la muestra y comprobar que la clonación se llevó a cabo de manera eficiente. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Seqtrace 0.9.0 (<http://seqtrace.googlecode.com/>). Posteriormente se realizó un alineamiento con el programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, NCBI), en el cual se comparó la secuencia obtenida con el genoma de *M. bovis* BCG México.

2. Sobre-expresión de la proteína FadA de *Mycobacterium bovis* BCG en *E. coli*

La sobre-expresión de la proteína FadA en *E. coli* TOP10 se realizó a partir de las colonias que resultaron positivas después de la clonación. Se seleccionó una colonia, de las colonias secuenciadas, para realizar los ensayos de sobre-expresión.

El protocolo de sobreexpresión se describe a continuación. Inicialmente, se efectuó un pre-cultivo en caldo Luria + ampicilina (100 µg/mL) (ver Anexo I) con la cepa clonada y se incubó a 37°C toda la noche (se realizaron tres cultivos: uno con IPTG, otro sin IPTG y otro como control; los dos primeros cultivos se realizaron con la cepa clonada, el tercero con el plásmido vacío). De este precultivo se tomó una alícuota y se inoculó un matraz con 100 mL de medio, el cual se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9. Cuando se alcanzó esta densidad óptica, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.1 mM al medio para inducir la sobre-expresión, se incubó a 20°C por 16 h. Transcurrido este tiempo se determinó la biomasa del cultivo centrifugando a 8,000 rpm, 4°C por 15 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió en Buffer Tris 20 mM a una concentración final de 1g/mL. La muestra

obtenida se sonicó en hielo con un poder acústico del 40% por 8 minutos (intervalos de 2 minutos, dejando 1 minuto entre cada intervalo para que la muestra se enfriara) utilizando 2 pulsos/1s a 20 KHz. Durante los intervalos de sonicación se agregó PMSF a una concentración final de 20 mM, el cual fue utilizado como inhibidor de proteasas.

El lisado de las células se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C, con la finalidad de obtener las proteínas del sobrenadante.

2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para realizar la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se utilizó una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA por sus siglas en inglés) (1mg/mL) de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 4.- Preparación de la curva patrón de albúmina.

μL de BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0	1	3	5	8	10
H ₂ Od (μL)	100	99	97	95	92	90

La curva patrón se realizó por duplicado en una placa de 96 pozos. En esa misma placa se incluyeron diluciones 1:100 de los sobrenadantes de los lisados de proteína.

A cada uno de los pozos se le adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford (ver Anexo I) y la placa se dejó incubando en oscuridad por 5 minutos. La placa se leyó en el equipo GENios Plus de Tecan, el cual nos permitió determinar la absorbancia a una $\lambda=595$ nm. La concentración de proteína en cada una de las muestras se calculó a partir de la regresión lineal de la curva estándar; a todas las mediciones se le restó el blanco para obtener la concentración final.

2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida de 1 dimensión (1D SDS-PAGE)

Ya con las proteínas cuantificadas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se realizaron dos geles de poliacrilamida siguiendo el esquema descrito en la Tabla 5. Los geles se cargaron con 20 µg de proteína total de cada muestra en los pozos; como marcador de peso molecular se utilizó el Dual color Marker (BIO-RAD). Las muestras incluidas en cada gel fueron las siguientes: el control negativo, muestra sin inducir con IPTG y la muestra inducida con IPTG.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 v por 3 h en solución amortiguadora de corrida (ver Anexo I). Una vez que concluyó la electroforesis, uno de los geles se tiñó con una solución de Silver blue (ver Anexo I) toda la noche a 4°C, y el segundo se utilizó para realizar el Western blot.

2.3 Western blot

El gel obtenido de la electroforesis (1D SDS-PAGE) se transfirió a una membrana de PVDF con poro de 0.45 µm (GE Healthcare). La transferencia se realizó en una cámara de transferencia Trans-Blot SD (Semy-Dry Electrophoretic Transfer Cell de BIO-RAD) donde se colocaron el gel y la membrana. La transferencia se llevó a cabo a 10 v por una hora en solución amortiguadora de transferencia (ver Anexo I). Al finalizar la transferencia, la membrana se bloqueó con una solución de leche al 5% en TBS-T (ver Anexo I) toda la noche a 4°C en un oscilador orbital (Cole Parmer). Posteriormente, se efectuaron dos lavados con TBS-T para eliminar el exceso de solución de bloqueo. Después se adicionó el anticuerpo primario (dilución 1:500 en TBS-T de IgG₁ de ratón anti-histidina, de Santa Cruz Biotechnology, Inc) y la membrana se dejó incubando por una hora a temperatura ambiente.

Al término, la membrana se lavó 5 veces con TBS-T y en seguida se adicionó el anticuerpo secundario (dilución 1:1000 en TBS-T de IgG total de cabra anti-ratón

acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)). La membrana se dejó incubando una hora y se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno.

Tabla 5.- Reactivos para el 1D SDS-PAGE.

Reactivo	Volumen (mL)	
	Gel al 12 %	Gel concentrador
H ₂ O	3,3	3,05
Acrilamida al 30 % (ver Anexo I)	4,0	0,650
Tris pH 8.0 1.5 M	2,5	1,25
SDS 10 %	0,2	0,05
APS 10 %	0,2	0,06
TEMED	0,004	0.010

Finalmente, el revelado de la membrana se llevó a cabo en una placa fotográfica. A la membrana se le adicionó luminol (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) para que se produjera la quimioluminiscencia y se pudiera corroborar la presencia de la proteína FadA, esto debido a la identificación de la cola de histidinas que posee la proteína expresada.

3. Purificación de la proteína recombinante FadA de *Mycobacterium bovis* BCG México

Para llevar a cabo la purificación de la proteína se realizó el protocolo de expresión descrito anteriormente, pero utilizando un volumen inicial de 500 mL de cultivo para obtener una mayor cantidad de proteína.

El sobrenadante obtenido después de centrifugar el cultivo y lisar las células, se filtró utilizando una membrana de 0.45 µm (GE Healthcare) para eliminar restos celulares. Del volumen total obtenido (3 mL), se utilizaron volúmenes de 1 mL para inyectar en la columna debido a la alta concentración de proteína que tenía cada una de las alícuotas. La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de Bradford descrito previamente.

La columna se empaquetó con una resina de agarosa y Ni-NTA (QIAGEN) para que, por afinidad, la proteína FadA (con colas de histidina) se quedara adherida al Níquel. Después del empaquetado, se adicionaron 5 mL de solución amortiguadora de equilibrio (ver Anexo I) a la columna y se desechó, por gravedad, este volumen para, posteriormente adicionar 1 mL del sobrenadante de proteínas. Por gravedad se obtuvo 1 mL de volumen muerto (correspondiente a la solución de equilibrio). Posteriormente se añadieron 10, 15 y 20 mL de la solución amortiguadora de lavado (ver Anexo I). Se agregaron volúmenes de 4 mL de solución amortiguadora de lavado, ya que con ese volumen se llenaba la columna. En los lavados se recuperó, por gravedad, la proteína que no se pegó a la columna, mientras que la proteína FadA y aquellas que tuvieran una secuencia de histidinas se quedaron pegadas en la columna, se recolectaron 5 fracciones de lavado de aproximadamente 1 mL cada una.

Después de los lavados se agregó la solución amortiguadora de elución (ver Anexo I), que contenía una concentración alta de imidazol (200 mM) con el fin de poder despegar la proteína FadA de la columna. Se añadieron 10 mL de la solución de elución (ver Anexo I) y se obtuvieron 11 fracciones de elución recolectando cada fracción por gravedad. La elución 0 corresponde al último volumen de lavado y 10 fracciones correspondientes a la solución amortiguadora de elución donde, en una de ellas, se encuentra la proteína FadA.

Las fracciones obtenidas después de la elución se cuantificaron por el método de Bradford para determinar qué fracciones contenían la mayor concentración de proteínas.

Finalmente, se seleccionaron las fracciones con mayor concentración de proteína y se hicieron dos geles de poliacrilamida. Un gel se tiñó con Silver blue, mientras que el otro se transfirió a una membrana de PVDF para realizar el Western blot (ver punto 3 de la sección de metodología). Ello permitió identificar en qué fracción se encontraba la proteína de interés.

RESULTADOS

1. Clonación del gen *fadA* de *Mycobacterium bovis* BCG México.

La amplificación del gen *fadA* se realizó mediante PCR. Los productos obtenidos se presentan en la Figura 7A, donde se observa una banda de aproximadamente 1,300 pb (carriles 3-5), que corresponde al tamaño del gen *fadA* más las secuencias de los *primers* descritas en la sección 1.1 de la metodología. La amplificación se realizó por triplicado y los productos fueron purificados con el kit *MinElute® PCR Purification Kit* (QIAGEN); en la Figura 7B se observa el DNA del amplicón limpio, es decir, sin rastros de dNTPs.

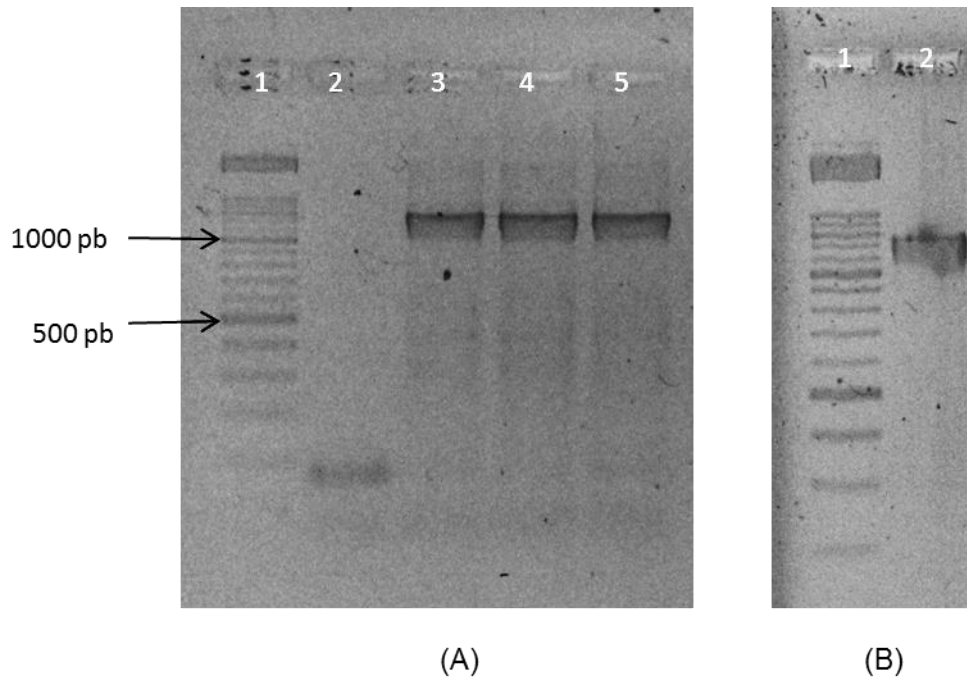


Figura 7. Imagen representativa de los productos de PCR del gen *FadA*. A) Productos de PCR Carril 1: Marcador molecular de 100 pb; carril 2: Control negativo; carril 3-5: gen *fadA* amplificado de *M. bovis* BCG México. B) Productos de PCR purificados. Carril 1: Marcador molecular de 100 pb; carril 2: amplicón del gen *fadA* purificado. En ambos casos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt.

Con el producto de PCR purificado se realizó su restricción, al igual que la restricción del vector pTrcHisA utilizando las enzimas BamHI y XhoI para ambas secuencias. En la figura 8 están representados los fragmentos obtenidos después de la restricción: se observa una banda correspondiente al gen *fadA* de aproximadamente 1300 pb (carril 2) y una banda por encima de las 4 Kb (carril 3) que corresponde al plásmido pTrcHisA en forma lineal.

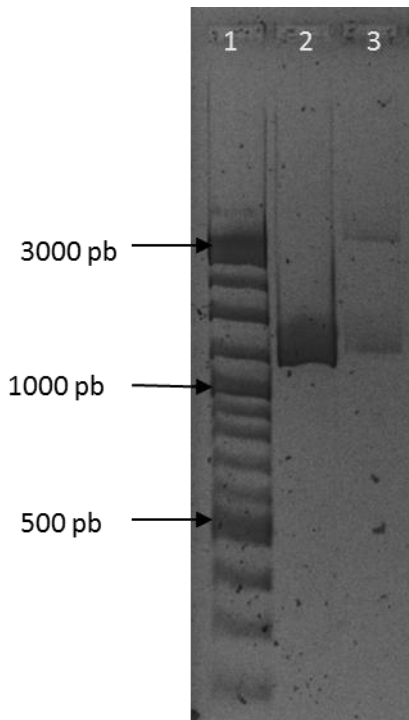


Figura 8. Imagen representativa del gen *fadA* y el plásmido pTrcHisA digeridos con las enzimas de restricción BamHI y XhoI. Carril 1: Marcador molecular 2-log; carril 2: producto de PCR correspondiente al gen *fadA*; carril 3: vector pTrcHisA. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con BrEt.

Durante el proceso de ligación y transformación se realizaron diversos controles. En la muestra A, que contenía el control positivo de la ligación, se utilizó el vector tratado (vector + ligasa); la muestra B fue el control negativo de la ligación (inserto + ligasa); la muestra C la muestra problema (vector + inserto + ligasa); la muestra D el vector sin la enzima ligasa, para observar la autoligación; la muestra E el vector y el inserto tratados pero sin ligasa, también para observar si había una autoligación; y, la muestra F contenía el vector sin tratamiento y sin ligasa, como

control positivo de la transformación. La muestra B, que no contenía el vector, también funcionó como control negativo de la transformación, ya que el medio contenía ampicilina y la muestra no adquirió resistencia, por lo tanto, no habría crecimiento en el medio.

La transformación por choque térmico fue muy eficiente ya que se obtuvieron 700 UFC/mL, además de que la autoligación que se presentó fue mínima, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Número de UFC/mL obtenidas después de la transformación.

Muestra	A	B	C	D	E	F
UFC/mL	200	0	700	30	0	incontables

De las colonias que crecieron en la muestra C, se seleccionaron 10 para extraer el DNA plasmídico. Con este DNA se realizó una PCR para corroborar la presencia del gen *fadA* dentro del plásmido. En la figura 9 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir del DNA plasmídico de las 10 colonias seleccionadas, se detectó que prácticamente todas las colonias seleccionadas presentaron una amplificación positiva correspondiente al gen *fadA*, a excepción de la colonia 3 (carril 6).

De las colonias que resultaron positivas, se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico de la colonia 5 (carril 8, Figura 9) con el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (ROCHE), y se secuenció el DNA obtenido con los oligos descritos previamente para el gen *fadA*.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BLASTn, en donde se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias obtenidas con el gen *fadA* de *M. bovis* BCG México. El alineamiento obtenido mostró una identidad del 99% (ver Figura 9).

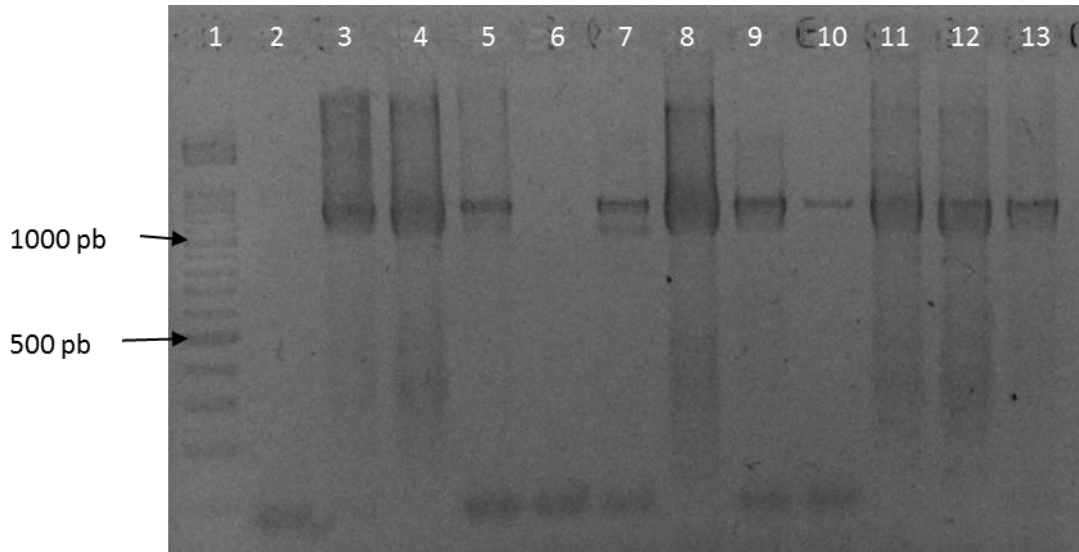


Figura 9. Imagen representativa de la amplificación del gen *fadA* en las colonias seleccionadas de la transformación. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con BrEt. Carril 1: Marcador molecular 100 pb; carril 2: control negativo; carril 3: control positivo; carril 4-13: muestras problema.

2. Sobre-expresión de la proteína FadA de *Mycobacterium bovis* BCG en *E. coli*

Los ensayos de sobre-expresión fueron realizados con la colonia 5, la cual fue secuenciada previamente. La sobre-expresión de la proteína se indujo con IPTG, a partir del cultivo obtenido se recuperó la biomasa y se obtuvieron las proteínas por sonicación. Para comprobar que las bacterias se lisaron y que se recuperó la mayor cantidad de proteína, se realizó una tinción de Gram antes y después de sonicar (Figura 10).

Mycobacterium bovis BCG str. Mexico acyl-CoA acetyltransferase (*fadA*) gene, complete cds
 Sequence ID: [JN034608.1](#) Length: 1212 Number of Matches: 1

Range 1: 59 to 1137		GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1969 bits(1066)	0.0	1074/1080(99%)	1/1080(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ACGGNTCNTTGCACGAAGTCAAGCCATTGAGCCTGGNCGTGGCCCTGATCGACGAGCTGC			60	
Sbjct 59	ACGGATCGTTGCACGAAGTCAAGCCATTGAGCCTGGTGTGGCCCTGATCGACGAGCTGC			118	
Query 61	GCAAGCGCCATCCCGACCTCGACGAGAACCTGATCAGCGACGTATCTTGGGCTGCGTCT			120	
Sbjct 119	GCAAGCGCCATCCCGACCTCGACGAGAACCTGATCAGCGACGTATCTTGGGCTGCGTCT			178	
Query 121	CACCGGTGGGCGACAGGGCGGGGACATCGCCCGCGCCGAGTGTGGCATCGGGCATGC			180	
Sbjct 179	CACCGGTGGGCGACAGGGCGGGGACATCGCCCGCGCCGAGTGTGGCATCGGGCATGC			238	
Query 181	CGGTCACTCCGGCGGTGTGCAGCTCAACCGGTTCTGCGCGTCCGGCTGGAGGCCGTC			240	
Sbjct 239	CGGTCACTCCGGCGGTGTGCAGCTCAACCGGTTCTGCGCGTCCGGCTGGAGGCCGTC			298	
Query 241	ACACCGCCGCGCANAAGGTGCGTTCGGGCTGGGATGACCTGGTGTGGCCGGCGGCGTGG			300	
Sbjct 299	ACACCGCCGCGCANAAGGTGCGTTCGGGCTGGGATGACCTGGTGTGGCCGGCGGCGTGG			358	
Query 301	AGTCGATGAGCCGGGTGCCGATGGGCTCCGACGGCGGGCGCTATGGGCTGGACCCGGCGA			360	
Sbjct 359	AGTCGATGAGCCGGGTGCCGATGGGCTCCGACGGCGGGCGCTATGGGCTGGACCCGGCGA			418	
Query 361	CCAACACGACGTATGTTTCGTCGCCAGGGCATCGCGCCGACCTGATCGCCACCATCG			420	
Sbjct 419	CCAACACGACGTATGTTTCGTCGCCAGGGCATCGCGCCGACCTGATCGCCACCATCG			478	
Query 421	AGGGCTTCTCCCGGAAGACGTGACGCTACGCGCTACGACGCGAGAAAAGGGCGCCG			480	
Sbjct 479	AGGGCTTCTCCCGGAAGACGTGACGCTACGCGCTACGACGCGAGAAAAGGGCGCCG			538	
Query 481	AGGCGTGGTCGGGCGGCTACTTCGCCAAGTCGGTGGTCCGCGTGCAGCAGAACGGCC			540	
Sbjct 539	AGGCGTGGTCGGGCGGCTACTTCGCCAAGTCGGTGGTCCGCGTGCAGCAGAACGGCC			598	
Query 541	TGCTGATCCTCGATCATGACGAACACATGCGGCGGGACACCAAGGAGGGTCTGGCCA			600	
Sbjct 599	TGCTGATCCTCGATCATGACGAACACATGCGGCGGGACACCAAGGAGGGTCTGGCCA			658	
Query 601	AGCTGAAGCCGGCTTCGAAGGCCTGGCCGCGCTGGGCGGTTTCGACGACGTGGCGCTGC			660	
Sbjct 659	AGCTGAAGCCGGCTTCGAAGGCCTGGCCGCGCTGGGCGGTTTCGACGACGTGGCGCTGC			718	
Query 661	AGAAGTACCACCTGGGGTGGAAAAGATCAACCACGTACACACCGGCGGCAACAGCTCGGG			720	
Sbjct 719	AGAAGTACCACCTGGGGTGGAAAAGATCAACCACGTACACACCGGCGGCAACAGCTCGGG			777	
Query 721	ATCGTCGACGGTGCCGCGCTGGTGTGATGATCGGTTCCGCGGCGCCGGCAAGTTGCAGGGC			780	
Sbjct 778	ATCGTCGACGGTGCCGCGCTGGTGTGATGATCGGTTCCGCGGCGCCGGCAAGTTGCAGGGC			837	
Query 781	CTGACTCCGCGGGCGCGCATCGTCGCCACCGCCACCAGCGGCGCCGACCCGGTGTATG			840	
Sbjct 838	CTGACTCCGCGGGCGCGCATCGTCGCCACCGCCACCAGCGGCGCCGACCCGGTGTATG			897	
Query 841	CTCACCGGCCCCACCCGGCCACCCGCAAGGTGCTCGACCGCGCCGGGCTGACCGTCGAC			900	
Sbjct 898	CTCACCGGCCCCACCCGGCCACCCGCAAGGTGCTCGACCGCGCCGGGCTGACCGTCGAC			957	
Query 901	GACATCGACCTGTTTCGAGCTCAACGAGGCGTTCGCGTGGTGGTGTGAAAGTCCAGAAG			960	
Sbjct 958	GACATCGACCTGTTTCGAGCTCAACGAGGCGTTCGCGTGGTGGTGTGAAAGTCCAGAAG			1017	
Query 961	GACCTCAACATTCCTCGACGAGAAGCTCAACGTCAACGGTGGCGCCATCGCGATGGGCCAC			1020	
Sbjct 1018	GACCTCAACATTCCTCGACGAGAAGCTCAACGTCAACGGTGGCGCCATCGCGATGGGCCAC			1077	
Query 1021	CCGCTGGGTGCCNCCGGCGCGATGATCCTGGGACCATGGTCGACGAACTGGAGCGCCGC			1080	
Sbjct 1078	CCGCTGGGTGCCNCCGGCGCGATGATCCTGGGACCATGGTCGACGAACTGGAGCGCCGC			1137	

Figura 9. Alineamiento de las secuencias problema con el gen *fadA* de *M. bovis* BCG México. Programa BLASTn (NCBI), parámetros estándar.

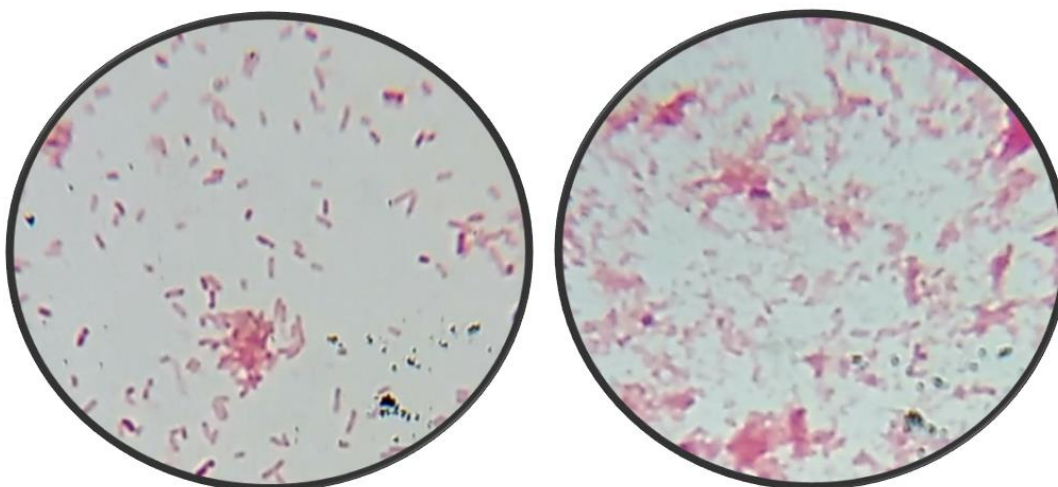


Figura 10. Tinción de Gram de la cepa de *Escherichia coli* con un aumento de 1,000 veces. Del lado izquierdo se observa la muestra antes de la lisis. Del lado derecho se observa la muestra después de la lisis.

Una vez obtenidas las proteínas totales, se procedió a realizar la cuantificación por el método de Bradford. Se realizó una curva patrón por duplicado utilizando BSA (gráfica 1) con la que se determinó la concentración de los sobrenadantes de los lisados.

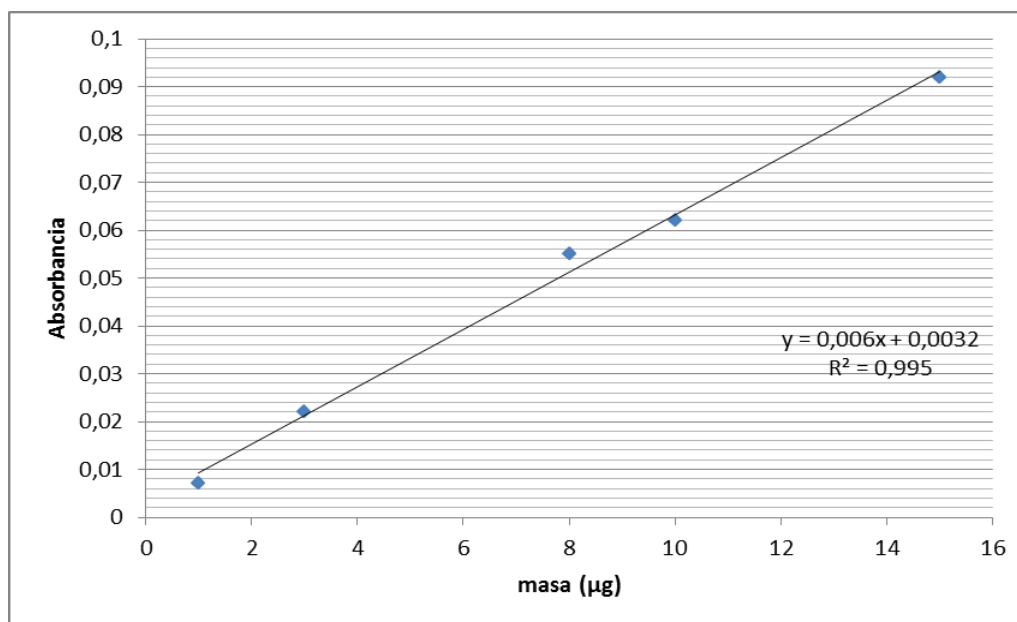


Figura 11. Curva patrón representativa de BSA para la cuantificación de proteínas.

Como las muestras de proteína total estaban muy concentradas, se hicieron diluciones 1:10 para cuantificar. Las muestras se cuantificaron igual que la curva patrón y, por medio de la regresión lineal, se calculó la concentración de estas (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración de proteína total en las muestras estudiadas.

	Con IPTG			Sin IPTG		
	Alícuota I	Alícuota II	Alícuota III	Alícuota I	Alícuota II	Alícuota III
Absorbancia	0,038	0,034	0,037	0,06	0,046	0,05
Concentración real ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	58,01	51,35	56,35	94,65	71,34	78,00

En la figura 12A se observan los perfiles proteicos obtenidos de cada una de las muestras. La proteína FadA tiene una masa de alrededor de 42 KDa, la zona en donde se esperaba encontrar la proteína se enmarcó en un recuadro, sin embargo, no observamos claramente la sobreexpresión de la proteína en las muestras inducidas con IPTG (carriles 2-4). Por otra parte, en la Figura 12B se muestra el inmunoproteoma realizado con el anticuerpo anti-histidina, donde se observa una banda reconocida por un anticuerpo secundario, esta banda corresponde a la proteína FadA, la cual contiene una cola de histidinas. En la imagen también se observa que las muestras 1-3 fueron las que presentaron una mayor intensidad, estas corresponden a las muestras inducidas con IPTG.

3. Purificación de la proteína recombinante FadA de *Mycobacterium bovis* BCG México

Una vez que se confirmó que la proteína FadA de *M. bovis* BCG se sobre-expresó en *Escherichia coli*, se llevó a cabo la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en columnas de Níquel. En la Figura 13 se muestra la concentración de proteína obtenida en cada una las fracciones del ensayo de purificación, la

fracción 1 fue la que mostró una mayor cantidad de proteína, por lo que inferimos que en ésta fracción es donde se encuentra la proteína FadA.

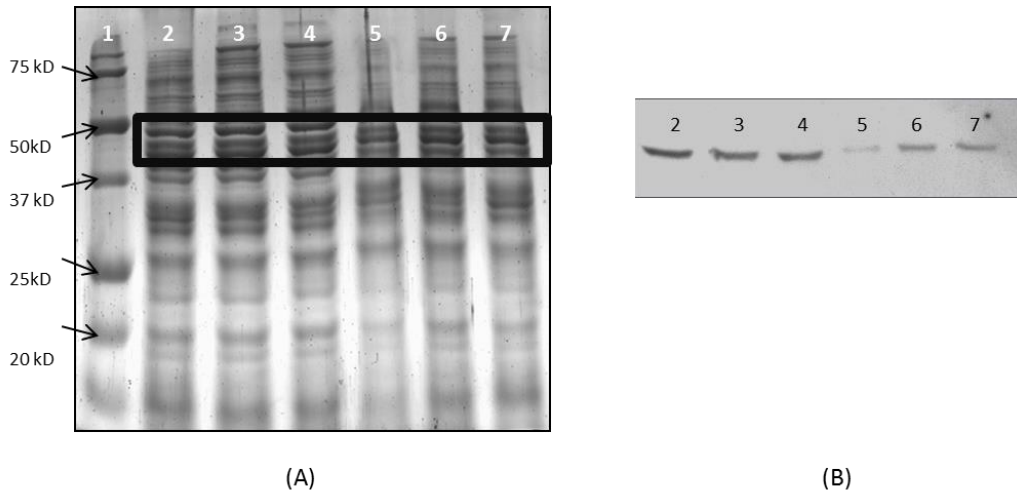


Figura 12. Análisis de la sobre-expresión de la proteína FadA en *Escherichia Coli*. A) Perfil proteico de las muestras procesadas en el ensayo de sobre-expresión. B) Inmunoproteoma para identificación de la proteína FadA. Carriles: 1, Marcador de peso molecular Dual Color (BIO-RAD); 2, Muestra IPTG I; 3, muestra IPTG II; 4, muestra IPTG III; 5, muestra s/IPTG I; 6, muestra s/IPTG II; 7, muestra s/IPTG III.

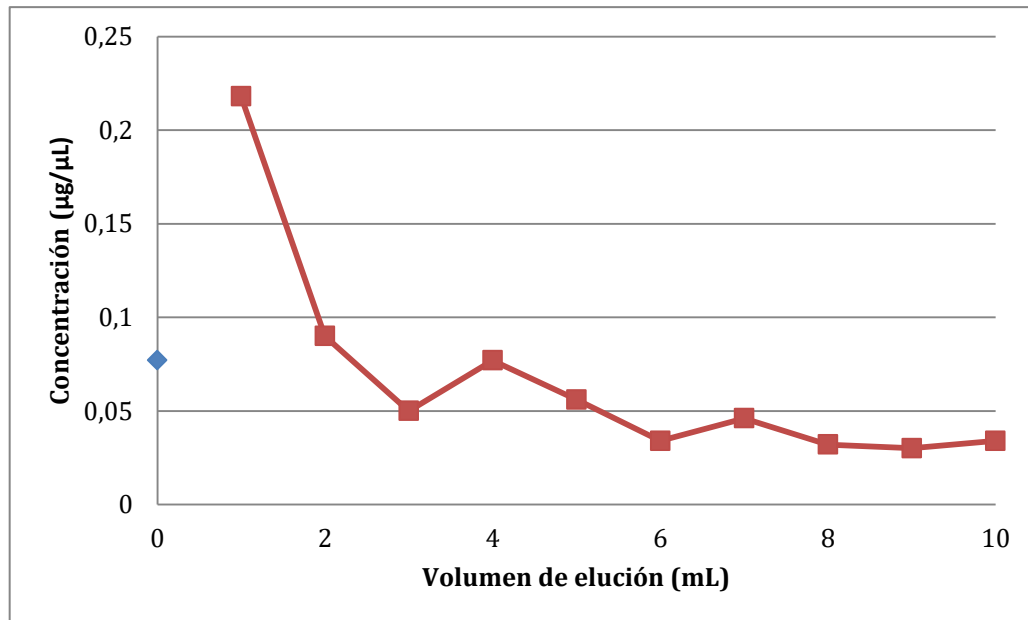


Figura 13. Concentración de proteína por cada fracción obtenida durante el ensayo de purificación.

Con la finalidad de confirmar en qué fracción del ensayo de purificación eluyó la proteína FadA, se realizó un Inmunoblot. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos, es importante mencionar que únicamente se analizaron las fracciones 0, 1, 2 y 4 donde se observó un pico en la concentración de proteínas. En la figura 14A, electroforesis en gel de poliacrilamida, se observa un corrimiento de proteínas únicamente en la fracción 1, de las cuales la más intensa corresponde a la proteína FadA. Lo anterior se comprobó en el inmunoproteoma (Figura 14B), donde se observa sólo una banda en el carril correspondiente a la fracción 1, a la misma altura que la banda intensa mostrada en el gel de la Figura 14A.

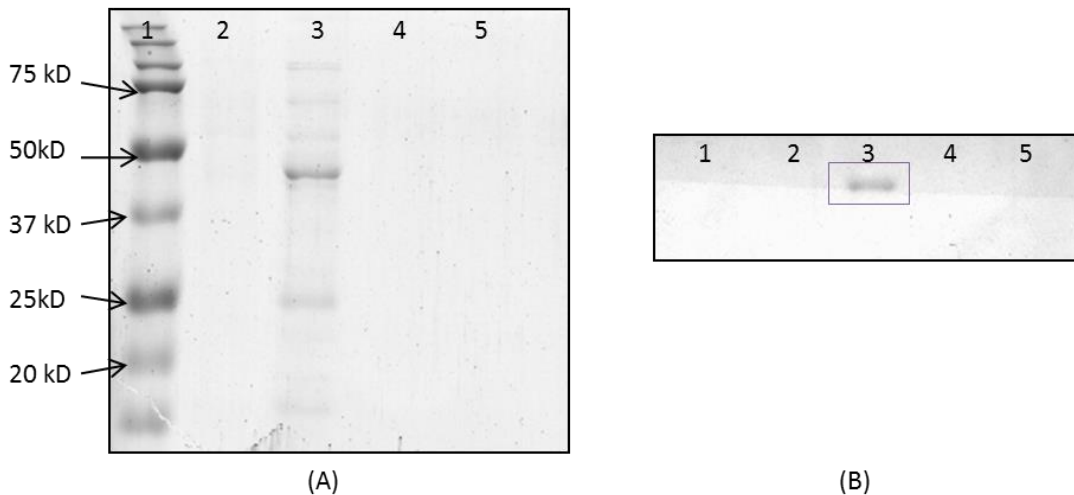


Figura 14. Análisis de las fracciones obtenidas en el ensayo de purificación. A) Perfil proteico de las fracciones, obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida de 1 dimensión. B) Imagen representativa del inmunoproteoma de la proteína FadA. Carriles: 1, Marcador molecular Dual Color (BIO-RAD); 2, Fracción 0; 3, Fracción 1; 4, Fracción 2; 5, Fracción 4.

Al final de la purificación, por cada gramo de proteína total se obtuvieron 3.95 mg de la proteína FadA, lo que representa un 0.4%.

DISCUSIÓN

Hoy en día se cuenta con vacuna, tratamiento y diagnóstico asociados a la TB, sin embargo, esta enfermedad continúa siendo un problema de salud a nivel mundial. Actualmente, uno de los retos es el desarrollo de métodos diagnósticos que permitan la detección temprana y rápida de la TB. Una propuesta es el uso de biomarcadores, tanto provenientes de la bacteria, como del hospedero [58].

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se identificaron 35 proteínas antigénicas en *M. bovis* BCG México (algunas de las cuales son homólogas a las proteínas de *M. tuberculosis*) que fueron reconocidas por sueros de pacientes con tuberculosis [64]. Dentro de estas proteínas, se encontró FadA, una proteína de estrés con actividad de tiolasa que participa en el metabolismo de lípidos, en específico en la β -oxidación. A pesar de que esta proteína se encuentra codificada en el genoma del complejo *M. tuberculosis*, a la fecha poco se conoce acerca de su función, estructura y antigenicidad. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue obtener la proteína FadA purificada, lo que permitirá que en futuros trabajos se realice su caracterización.

La proteína FadA de *M. bovis* BCG México se clonó en *Escherichia coli* TOP 10, cepa a partir de la cual se realizó la sobreexpresión y posterior purificación de la proteína.

Se utilizó *Escherichia coli* TOP 10 para obtener la proteína recombinante debido a que se necesita tener una cantidad grande de proteína, para los ensayos posteriores de caracterización, en un corto tiempo y esta bacteria ha mostrado ser muy exitosa para la obtención de proteínas recombinantes con un buen rendimiento [68].

En este caso en específico, una gran ventaja es el tiempo de duplicación de *Escherichia coli* (20 minutos) que permite obtener cultivos en fase estacionaria en un corto tiempo; en contraste, el tiempo de duplicación en las cepas del complejo *M. tuberculosis* es de alrededor de 18-24 horas [69]. Adicionalmente, *Escherichia coli* no necesita medios costosos para su crecimiento, como el caso del medio

Luria. Por último, llevar a cabo una transformación con DNA exógeno en *Escherichia coli* es relativamente más fácil y sencillo [70].

Con respecto al vector, éste es útil para obtener altos niveles de expresión gracias a que posee un promotor *trc* (región -35 del promotor *trp* y región -10 del promotor *lac*) y a la región de anti-terminación *rrnB*, que es una región del operón *rrnB* que presenta una alta activación río arriba de la región promotora. Además contiene una copia del gen *lacI^q*, el cual codifica para la proteína represora de *lac*, que sirve para tener un control eficiente de la transcripción de la proteína FadA recombinante. La traducción es mejorada por la presencia de un minicistrón que provee un reinicio traduccional altamente eficiente en el marco abierto de lectura (ORF) del sitio múltiple de clonación (MCS). El gen *fadA* es posicionado río abajo y en marco con una secuencia que codifica para el péptido de fusión N-terminal constituido por 6 residuos de histidina consecutivos, que sirve para la purificación por afinidad. Por último, el vector posee un origen de replicación, un cassette de resistencia a ampicilina, un operador de lactosa y una sección de terminación transcripcional [66].

La sobre-expresión de la proteína FadA en *Escherichia coli* fue la parte de la metodología que presentó más retos. Inicialmente, es preciso considerar que no todas las proteínas se comportan de la misma manera, por lo se tienen que establecer condiciones de sobre-expresión adecuadas para cada una. Cambios en la temperatura de incubación, la concentración de IPTG y la densidad óptica a la que se lleva a cabo la inducción con IPTG, son las principales condiciones que tuvieron que revisarse para llevar a cabo la sobre-expresión.

Como punto de partida, utilizamos las condiciones establecidas en un proyecto anterior de nuestro grupo de trabajo: una DO_{600nm} de 0.8 para la inducción con IPTG, una concentración final de 0.1 mM de IPTG e incubación a 16°C por 16 h [71]. En el primer ensayo no se logró sobre-expresar la proteína, por lo que se cambió la concentración de IPTG a 1 mM y la DO_{600nm} de inducción a 0.6, que es la media logarítmica de la curva de crecimiento de *Escherichia coli* [66]. Este segundo ensayo tampoco resultó exitoso, por lo que se decidió regresar a las

condiciones iniciales y cambiar sólo una condición, con la finalidad de ir modificando una variable a la vez. Después de cambiar las condiciones varias veces, se logró sobre-expresar la proteína FadA bajo las siguientes condiciones: DO_{600nm} de 0.9 para la inducción con IPTG, una concentración final de IPTG 0.1 mM y una temperatura de incubación de 20°C por 16 h, corroborando su sobre-expresión en el Inmunoproteoma. De esta forma, la DO_{600nm} óptima fue mayor a la media logarítmica reportada para *Escherichia coli*. Lo anterior puede explicarse debido a que en la fase *log*, la bacteria tiene un metabolismo activo, por lo que utiliza su maquinaria de reproducción para poder duplicarse; si adicionamos IPTG al medio, la maquinaria de la bacteria comienza a trabajar más lento, porque se deben expresar las proteínas que se encuentran en el plásmido, lo que provocaría el aumento del tiempo de duplicación de la bacteria, o bien que la maquinaria no funcionara adecuadamente; por ello no se pudo observar una sobre-expresión a esa densidad óptica [69]. Por otra parte, la sobreexpresión de proteínas debe realizarse a bajas temperaturas (10-20°C), ya que la expresión a temperaturas altas (37°C) ocasiona que las regiones hidrofóbicas de los polipéptidos se presenten en mayores concentraciones, provocando que interaccionen entre sí favoreciendo que los polipéptidos sean inestables y se unan formando agregados denominados cuerpos de inclusión. Al formarse estos cuerpos de inclusión, algunas proteínas que son solubles pueden quedar atrapadas en estos agregados, generando un desequilibrio entre las proteínas solubles y las insolubles [69].

Otro factor clave en el protocolo fue la lisis de las bacterias por sonicación, siendo crítico la realización de la lisis en contenedores de acero inoxidable, lo que ayudó a mantener la muestra fría (en hielo), evitándose la desnaturalización de las proteínas por calor. En resumen, el establecimiento de las condiciones descritas anteriormente permitió realizar, de manera reproducible, la sobre-expresión de la proteína FadA en *Escherichia coli*.

La proteína recombinante FadA sobre-expresada se procedió a la purificación por medio de cromatografía de afinidad, con columnas de Níquel con agarosa. En este método se emplea de Níquel como agente quelante al cual se le unirán con mayor

afinidad las proteínas que tengan secuencias de 6 histidinas en su composición; tal es el caso de la proteína recombinante FadA a la cual se le adicionó una cola de 6 histidinas. En el QIAexpress Ni-NTA Protein Purification System (QIAGEN), el Níquel tiene la característica de poseer 4 regiones quelantes que permiten obtener una mayor estabilidad del metal dentro de la columna, evitando que pueda desprenderse de la agarosa durante los lavados. La histidina es un aminoácido básico, mientras que el Níquel posee una carga positiva, por lo que el metal atrapa a las histidinas formando un complejo entre el metal y el aminoácido. Para retirar las proteínas que están formando un complejo con el Níquel, se debe utilizar un competidor para que desplace las proteínas; en este caso se utilizó imidazol en concentraciones altas (200 mM). El imidazol se une con mayor fuerza al Níquel, lo que origina que se desprendan las proteínas que contienen la secuencia de histidinas, permitiendo recuperarlas en la solución amortiguadora de elución [72].

Este proyecto representa el punto de partida para llevar a cabo la caracterización de la proteína FadA de *M. tuberculosis* y su posterior evaluación como biomarcador en el diagnóstico de la TB. Cabe recordar que, a pesar de contar con una gran variedad de métodos de diagnóstico, un tratamiento y una vacuna, la tuberculosis sigue siendo un problema de salud a nivel mundial. El uso de biomarcadores para el diagnóstico temprano de la TB favorecerá el tratamiento oportuno de la enfermedad, lo cual impactaría en una menor transmisión de la enfermedad.

CONCLUSIONES

El vector pTrcHisA representa una buena opción para la clonación y sobre-expresión de las proteínas de *M. bovis* BCG México en *Escherichia coli*. En nuestro caso en particular, se logró clonar y sobre-expresar de manera exitosa la proteína FadA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salgame, P., *MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers*. J Clin Invest, 2011. 121(5): p. 1686-8.
2. WHO, *Global tuberculosis control 2016*. 2016.
3. Epidemiología, D.G.d. *Anuario de morbilidad 1984-2015*. 2016; Available from:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html.
4. Grzegorzewicz, A.E., et al., *Assembling of the Mycobacterium tuberculosis Cell Wall Core*. J Biol Chem, 2016.
5. Michael T. Madigan, J.M.M., Paul V. Dunlap, David P.Clark, *BROCK: Biología de los microorganismos*. 12 ed. 2009. 1259.
6. Patrick R. Murray, E.J.B., James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, Robert H. Tenover, *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. 2003. 1212.
7. Esko, J.D., T.L. Doering, and C.R.H. Raetz, *Eubacteria and Archaea*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009: Cold Spring Harbor (NY).
8. Faksri, K., et al., *In silico region of difference (RD) analysis of Mycobacterium tuberculosis complex from sequence reads using RD-Analyzer*. BMC Genomics, 2016. 17(1): p. 847.
9. Brewer, T.F. and G.A. Colditz, *Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis*. Clin Infect Dis, 1995. 20(1): p. 126-35.
10. Briancesco, R., et al., *Nontuberculous mycobacteria: an emerging risk in engineered environmental habitats*. Annals of Microbiology, 2014. 64(2): p. 735-740.
11. Miyamoto, Y., et al., *Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of Mycobacterium leprae*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. 10(8): p. e0004881.

12. Auguste, P., et al., *Accurate diagnosis of latent tuberculosis in children, people who are immunocompromised or at risk from immunosuppression and recent arrivals from countries with a high incidence of tuberculosis: systematic review and economic evaluation*. Health Technol Assess, 2016. 20(38): p. 1-678.
13. Haukaas, F.S., et al., *Immigrant screening for latent tuberculosis in Norway: a cost-effectiveness analysis*. Eur J Health Econ, 2016.
14. Balani, A., et al., *Renal tuberculosis with lobar calcification*. Indian J Nephrol, 2016. 26(2): p. 149-50.
15. Ostheimer, T.A., et al., *Intraocular tuberculosis presenting as a large anterior chamber mass*. Ocul Immunol Inflamm, 2015. 23(1): p. 100-1.
16. Ekinçi, S., et al., *Spinal Tuberculosis*. J Exp Neurosci, 2015. 9: p. 89-90.
17. Figueroa, D., N. Guzman, and C. Isache, *Tuberculous Enteritis: A Rare Complication of Miliary Tuberculosis*. Case Rep Infect Dis, 2016. 2016: p. 6949834.
18. Yun, K.W., et al., *Usefulness of interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in young children*. Korean J Pediatr, 2016. 59(6): p. 256-61.
19. Olivieri, R., et al., *Using IFN-gamma release assay to confirm tuberculin skin test improves the screening of latent tuberculosis infection in Italian healthcare workers*. J Occup Med Toxicol, 2016. 11: p. 29.
20. Lin, P.L., et al., *PET CT Identifies Reactivation Risk in Cynomolgus Macaques with Latent M. tuberculosis*. PLoS Pathog, 2016. 12(7): p. e1005739.
21. Bholla, M., et al., *Evaluation of Xpert(R) MTB/RIF and Ustar EasyNAT TB IAD for diagnosis of tuberculous lymphadenitis of children in Tanzania: a prospective descriptive study*. BMC Infect Dis, 2016. 16: p. 246.
22. Bayhan, G.I. and G. Tanir, *Response to "Miliary tuberculosis disease complicated by Pott's abscess in an infant: Seven-year follow-up"*. Lung India, 2016. 33(1): p. 115.

23. Freire, P.S., et al., *Miliary tuberculosis: a severe opportunistic infection in juvenile systemic lupus erythematosus patients*. Rev Bras Reumatol Engl Ed, 2016. 56(3): p. 274-9.
24. Zhao, Y., et al., *Genetic polymorphisms of CCL1 rs2072069 G/A and TLR2 rs3804099 T/C in pulmonary or meningeal tuberculosis patients*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(10): p. 12608-20.
25. Chen, H.L., et al., *Structural deficits and cognitive impairment in tuberculous meningitis*. BMC Infect Dis, 2015. 15: p. 279.
26. Kaufmann, S.H., *New issues in tuberculosis*. Ann Rheum Dis, 2004. 63 Suppl 2: p. ii50-ii56.
27. Kenneth Murphy, P.T., Mark Walport, *Inmunobiología de Janeway*. 7th ed. 2009. 887.
28. Lugo-Villarino, G., et al., *Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas*. Front Immunol, 2012. 3: p. 405.
29. Zucchi, F.C., et al., *The contribution of a murine CNS-TB model for the understanding of the host-pathogen interactions in the formation of granulomas*. J Neurosci Methods, 2012. 206(1): p. 88-93.
30. Shi, L., E.A. Eugenin, and S. Subbian, *Immunometabolism in Tuberculosis*. Front Immunol, 2016. 7: p. 150.
31. Salud, S.d. *Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de casos nuevos de Tuberculosis pulmonar*. 2009.
32. Salud, S.d. *Programa de acción: Tuberculosis*. 2001.
33. Salud, S.d., *NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis*. 2013: México.
34. Timmins, G.S. and V. Deretic, *Mechanisms of action of isoniazid*. Mol Microbiol, 2006. 62(5): p. 1220-7.
35. WHO. *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades micobacterianas*. 2016; Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5513s/2.3.html>.
36. Yendapally, R. and R.E. Lee, *Design, synthesis, and evaluation of novel ethambutol analogues*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. 18(5): p. 1607-11.

37. Pelchovich, G., A. Zhuravlev, and U. Gophna, *Effect of ribosome-targeting antibiotics on streptomycin-resistant Mycobacterium mutants in the rpsL gene*. Int J Antimicrob Agents, 2013. 42(2): p. 129-32.
38. Zhao, W., et al., *Interactions of linezolid and second-line anti-tuberculosis agents against multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo*. Int J Infect Dis, 2016. 52: p. 23-28.
39. Raveendran, R., J.K. Oberoi, and C. Wattal, *Multidrug-resistant pulmonary & extrapulmonary tuberculosis: A 13 years retrospective hospital-based analysis*. Indian J Med Res, 2015. 142(5): p. 575-82.
40. London, L., H. Cox, and F. Coomans, *Multidrug-Resistant TB: Implementing the Right to Health through the Right to Enjoy the Benefits of Scientific Progress*. Health Hum Rights, 2016. 18(1): p. 25-41.
41. Salud, S.d., *Estándares para la atención de la Tuberculosis en México*. 2009.
42. Miranda G, G., et al., *MANIFESTACIONES RADIOGRAFICAS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR*. Revista chilena de radiología, 2004. 10: p. 178-182.
43. Kang, H.K., et al., *Clinical significance of smear positivity for acid-fast bacilli after ≥ 5 months of treatment in patients with drug-susceptible pulmonary tuberculosis*. Medicine (Baltimore), 2016. 95(31): p. e4540.
44. Murray P.R., R.K.S., Pfaller M. A., *Medical Microbiology*. 2005.
45. González-Martin, J., *Microbiología de la tuberculosis*. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología, 2014. 15(1): p. 25-33.
46. Barrera, L., *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Normas y guía técnica: Parte II, cultivo*. 2008.
47. Piersimoni, C., et al., *Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteria growth indicator tube (MGIT), and Lowenstein-Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999. 34(4): p. 293-9.

48. Battaglioli, T., et al., *Manual liquid culture on simple Middlebrook 7H9 or MGIT for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis*. Trop Med Int Health, 2014. 19(12): p. 1500-3.
49. Aggarwal, P., et al., *Comparison of the radiometric BACTEC 460 TB culture system and Lowenstein-Jensen medium for the isolation of mycobacteria in cutaneous tuberculosis and their drug susceptibility pattern*. Int J Dermatol, 2008. 47(7): p. 681-7.
50. Woods, G.L., et al., *Clinical evaluation of difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria*. J Clin Microbiol, 1997. 35(1): p. 121-4.
51. María Rosarys Martínez-Romero, M.S.-A., Grechen García-León, Lilian Mederos-Cuervo, Beatriz Vega-Riverón, Raúl Díaz-Rodríguez, *Evaluación del sistema automatizado BacT ALERT 3D para el aislamiento de micobacterias en el LNRTB-IPK*. Neumol Cir Torax, 2012. 71(4): p. 6.
52. Demers, A.M., et al., *Direct Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis for Pyrazinamide by Use of the Bactec MGIT 960 System*. J Clin Microbiol, 2016. 54(5): p. 1276-81.
53. Hayashi, D., et al., *Biochemical characteristics among Mycobacterium bovis BCG substrains*. FEMS Microbiol Lett, 2010. 306(2): p. 103-9.
54. Epidemiología, D.G.d. *Laboratorio de micobacterias*. 2015; Available from: http://www.indre.salud.gob.mx/interior/lab_micobacterias.html.
55. Kruczak, K., L. Mastalerz, and K. Sladek, *Interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for diagnosing latent Mycobacterium tuberculosis infection in at-risk groups in Poland*. Int J Mycobacteriol, 2016. 5(1): p. 27-33.
56. Azghay, M., et al., *Utility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in adult, pulmonary and extrapulmonary, active tuberculosis diagnosis*. Int J Infect Dis, 2016. 44: p. 25-30.
57. Simsek, H., et al., *Comparison of tuberculin skin testing and T-SPOT.TB for diagnosis of latent and active tuberculosis*. Jpn J Infect Dis, 2010. 63(2): p. 99-102.

58. Goletti, D., et al., *Tuberculosis Biomarkers: From Diagnosis to Protection*. Infect Dis Rep, 2016. 8(2): p. 6568.
59. Phalane, K.G., et al., *Differential Expression of Host Biomarkers in Saliva and Serum Samples from Individuals with Suspected Pulmonary Tuberculosis*. Mediators of Inflammation, 2013. 2013: p. 10.
60. Eisenhut, M., et al., *Determination of Urinary Neopterin/Creatinine Ratio to Distinguish Active Tuberculosis from Latent Mycobacterium tuberculosis Infection*. J Biomark, 2016. 2016: p. 5643853.
61. Oxlade, O., et al., *Xpert(R)MTB/RIF for the Diagnosis of Tuberculosis in a Remote Arctic Setting: Impact on Cost and Time to Treatment Initiation*. PLoS One, 2016. 11(3): p. e0150119.
62. Minion, J., et al., *Diagnosing tuberculosis with urine lipoarabinomannan: systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2011. 38(6): p. 1398-405.
63. Jain, R.K., et al., *Mycobacterial dormancy regulon protein Rv2623 as a novel biomarker for the diagnosis of latent and active tuberculous meningitis*. Dis Markers, 2013. 35(5): p. 311-6.
64. Orduna, P., et al., *Genomic and proteomic analyses of Mycobacterium bovis BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection*. BMC Genomics, 2011. 12: p. 493.
65. Anbazhagan, P., et al., *Phylogenetic relationships and classification of thiolases and thiolase-like proteins of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis*. Tuberculosis (Edinb), 2014. 94(4): p. 405-12.
66. Invitrogen. *pTrcHis A, B and C. Vectors of Expression of Recombinant Proteins Containing N-Terminal 6xHis Tags in E. coli*. 2008.
67. Joseph Sambrook, D.W.R., *MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual*. 3rd ed. 2001.
68. Sezonov, G., D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari, *Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth*. J Bacteriol, 2007. 189(23): p. 8746-9.
69. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. Front Microbiol, 2014. 5: p. 172.

70. Pope, B. and H.M. Kent, *High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 1996. 24(3): p. 536-7.
71. Castro, L.C., *Caracterización de la respuesta inmune de proteínas de estrés oxidativo en BCG México*, in *Facultad de Medicina*. 2016, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
72. QIAGEN, *QIAexpress Ni-NTA Fast Start Handbook*. 2006.

ANEXO I

Preparación de medios y soluciones

1. Medios

- Medio sólido Luria Broth (LB)

Luria Broth Base (Invitrogen) 12.5 g

Agar (BD) 7.5 g

H₂O c.b.p. 500 mL

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Vaciar en cajas petri en condiciones de asepsia. Guardar a 4°C

- Medio líquido LB

Luria Broth Base (Invitrogen) 12.5 g

H₂O c.b.p. 500 mL

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Almacenar a 4°C

2. Soluciones utilizadas en la clonación

- TBE 5X

Tris-Base (SIGMA) 54 g

Ácido Bórico (SIGMA) 27.5 g

EDTA 0.5 M (SIGMA), pH 8 20 mL

H₂O c.b.p. 1 L

- Solución I

Glucosa (SIGMA) 50 mM

EDTA (SIGMA) 10 mM

Tris-HCl (SIGMA) 25 mM

H₂O c.b.p. 100 mL

- Solución II

NaOH (SIGMA) 0.2 N

SDS (SIGMA) 1%

H₂O c.b.p. 10 mL

Esta solución se preparó al momento de utilizarla.

- Solución III

Acetato de potasio (SIGMA) 5 M 60 mL

Ácido acético glacial (J.T.BAKER) 40 mL

Esta solución debe estar fría al momento de su uso.

3. Soluciones utilizadas en la sobre-expresión, electroforesis y/o Western blot.

- Acrilamida al 30 %

Acrilamida (SIGMA) 29.1 g

Bisacrilamida (SIGMA) 0.9 g

H₂O c.b.p. 100 mL

Desgasificar por 30 minutos al vacío. Filtrar con whatman del #1 y guardar en frasco ámbar a 4°C

- Silver blue

H₃PO₄ (J.T.BAKER) 10 % m/v

Sulfato de amonio (J.T. BAKER) 10 % m/v

CBB G-250 (BIO-RAD) 0.12 % m/v

Metanol (AZ) 20 % v/v

H₂O c.b.p.

La solución final no se filtra, ya que es una solución coloide. Se almacena en frasco ámbar.

- Reactivo de Bradford

CBB G-250 (BIO-RAD)	0.01 % m/v
Etanol al 96% (AZ)	5 % v/v
H ₃ PO ₄ (J.T.BAKER)	10 % v/v
H ₂ O	c.b.p. 100 mL

- Solución amortiguadora de Laemmli (2X)

SDS (SIGMA)	4 % m/v
Glicerol (SIGMA)	20 % v/v
Tris-HCl (SIGMA) pH 6.8	125 mM
Azul de bromofenol (SIGMA)	0.02 % m/v
H ₂ O	c.b.p.

La solución se almacena a temperatura ambiente. Cuando se utilice para la preparación de geles desnaturizantes, se debe agregar β-mercaptoetanol a una concentración de 10 % v/v para que, al mezclar con la muestra de proteínas, quede a una concentración de 5 % v/v.

- TBS 10X

Tris-Base (SIGMA)	12.11 g
NaCl (SIGMA)	43.8 g
H ₂ O	c.b.p. 500 mL

Ajustar el pH a 7.4

- TBS-T

TBS 10X	100 mL
Tween 20 (SIGMA)	0.05 %
H ₂ O	c.b.p. 1 L

- Solución amortiguadora de corrida 5X

Glicina (SIGMA)	192 mM
Tris-Base (SIGMA)	25 mM
SDS (SIGMA)	0.1 %

- Solución amortiguadora de transferencia

Tris-Base (SIGMA)	25 mM
Glicina (SIGMA)	192 mM
Metanol (AZ)	20 %

Ajustar el pH a 8.3

4. Soluciones utilizadas en la purificación

- Solución amortiguadora de equilibrio

Tris-Base (SIGMA)	20 mM
-------------------	-------

Ajustar el pH a 7.5

- Solución amortiguadora de lavado

Tris-Base (SIGMA)	20 mM
Imidazol (SIGMA)	10 mM

Ajustar el pH a 7.5

- Solución amortiguadora de elución

Tris-Base (SIGMA)	20 mM
Imidazol (SIGMA)	200 mM

Ajustar el pH a 7.5