



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

EXPRESION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE HSP70 DE *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* EN LA CEPA BL21(DE3) DE *Escherichia coli*.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

MANUEL ALEJANDRO CORNEJO BLANCO

Tijuana, B. C.

Mayo del 2015

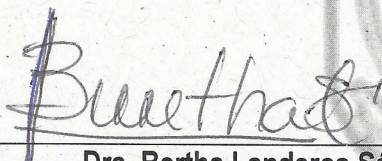
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 235
Tijuana, B. C., a 12 de mayo de 2015.

C. Manuel Alejandro Cornejo Blanco
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción: **Tesis** es propuesto por la **Dra. Bertha Landeros Sánchez** quién es responsables de la calidad del trabajo que usted presenta, referido al tema: ***“Expresión de la proteína recombinante HSP70 de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis en la cepa BL21 (DE3) de Escherichia coli.”***, el cual deberá desarrollar de acuerdo con el siguiente orden:

- I. Introducción
- II. Objetivos y Meta
- III. Materiales y Métodos
- IV. Resultados y Discusión
- V. Conclusiones
- VI. Bibliografía



Dra. Bertha Landeros Sánchez
Director de Tesis



Q. Noemí Hernández Hernández
Subdirectora



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

....A mis padres y a Aracely, por su apoyo incondicional en mi formación tanto como profesionalista como persona, y por entender mis altibajos y estar ahí siempre que los necesito

....A mis hermanos, por considerarme un modelo a seguir y evitar que se extinguiera el niño que hasta hoy aún conservo en mí

....A mis amigos, los cuales estuvieron siempre presentes tanto en los buenos momentos como en los difíciles, y siempre estarán para dar un buen consejo o una palabra de consuelo

....A mi asesora de tesis, la Dra. Bertha Landeros, por su paciencia y guianza durante el trayecto de este trabajo de tesis, y brindarme el espacio y recursos necesarios para llevarlo a conclusión

.....A mis compañeros de laboratorio, quienes además de compartir sus conocimientos, también me brindaron su confianza y sus palabras de ánimo

.....A la UABC, por ser la casa de estudios donde me formé como profesionalista

.....A Isaura, quien confió en mí, me inspiró a crecer, y me dio su amistad y su amor.

“Antes que nada, la preparación es la llave del éxito”

Alexander Graham Bell

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 La paratuberculosis bovina	2
1.2 Diagnóstico de la enfermedad	5
1.3 La enfermedad de Crohn en humanos	7
1.4 El agente causal: <i>Micobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	12
1.5 Tratamiento y vacunación	15
1.6 Proteínas HSP70	18
2. Desarrollo experimental	22
2.1 Objetivo	22
2.2 Materiales y métodos	22
2.2.1 Método de extracción del plásmido pRSET-70	23
2.2.2 Método de transformación por competencia en cloruro de calcio.	25
2.2.3 Condiciones de la PCR	27
2.2.4 Digestión del plásmido	29
2.2.5 Método de inducción	30
2.2.6 Electroinmunotransferencia (Western Blot)	31
2.2.7 Tinción con azul de Coomassie	35
2.3 Resultados	36
3. Discusión de resultados	43
4. Conclusiones	47
5. Referencias	48

Anexo I. Reactivos y soluciones	53
Anexo II. Sitio de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción	57
Anexo III. Insertos de marcadores de peso molecular	58
Anexo IV. Abreviaturas	60

TABLAS Y FIGURAS

	Pág
Tabla 1	27
Tabla 2	29
Tabla 3	30
Tabla 4	32
Figura 1	37
Figura 2	38
Figura 3	39
Figura 4	40
Figura 5	41
Figura 6	42

RESUMEN

La paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne, es una enfermedad infecciosa crónica causada por la micobacteria *Mycobacterium Avium subsp. paratuberculosis* (MAP), esta enfermedad provoca enteritis y linfadenitis granulomatosa en el ganado bovino, y también existe evidencia experimental de que es agente causal de la enfermedad de John, enfermedad infecciosa intestinal en el humano con características etiológicas muy similares.

La paratuberculosis es de difícil tratamiento y se traduce en importantes pérdidas económicas para la industria de la ganadería, a la vez que la enfermedad de Crohn es también de difícil tratamiento y con graves complicaciones para el paciente. Además, este patógeno se transmite de rumiantes a humanos, por lo que es de vital importancia la prevención de la enfermedad y el control de este agente etiológico en ganado bovino.

Una de las proteínas inmunogénicas importantes de MAP en rumiantes es la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), la cual es importante para la supervivencia de la micobacteria en el huésped. Esta proteína genera una respuesta inmune de tipo celular en el huésped por lo que representa una posibilidad potencial para ser utilizada en ganado bovino como una vacuna contra la paratuberculosis. El objetivo de este trabajo fue la transformación de la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* con el vector de expresión pRSET unido al gen de HSP70 de MAP, extraído de la cepa TOP10F' de *E. coli*. Después se indujo la expresión de esta proteína y luego se realizaron pruebas de inmunotransferencia para demostrar la expresión de dicha proteína.

1. INTRODUCCION

1.1 La paratuberculosis bovina

La paratuberculosis (PTCB) es una enfermedad infecciosa crónica causada por una bacteria denominada *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), que afecta tanto a rumiantes domésticos como silvestres, en los que provoca una enteritis y linfadenitis granulomatosa. La inflamación granulomatosa se establece como consecuencia de la producción de citosinas inflamatorias (tipo Th1).

Esta enfermedad se transmite en los animales por vía fecal-oral, a través de la ingestión de bacilos en el agua, leche o alimentos contaminados con heces de animales infectados. Se sospecha que los animales desarrollan signos clínicos notorios de la enfermedad cuando llegan a la edad adulta, donde se observa adelgazamiento progresivo, diarrea y finalmente la muerte de los animales.

En los animales afectados se observa un espectro de lesiones que van desde formas focales de resistencia hasta formas difusas histiocitarias y linfoplasmocitarias, lo que ocasiona un desequilibrio proteico debido a una malabsorción de los aminoácidos debido al proceso inflamatorio y a la alta demanda de estos, generada por el incremento en la respuesta inmune celular y humoral; es por esto que uno de los primeros signos de la enfermedad es un edema debajo de la mandíbula. Se observa además un engrosamiento de la pared intestinal por proceso inflamatorio local, aumento de tamaño y serosidad, y dilatación y trombosamiento de los vasos linfáticos por las lesiones granulomatosas. En fases terminales de la enfermedad hay

un cuadro de caquexia con depleción de las reservas de grasas y cuadros diarreicos cada vez más abundantes. [29]

La paratuberculosis o enfermedad de Johne ha sido investigado en especies como cabras, ciervos blancos, ciervos rojos, muflones, camellos, ovinos, ñus, búfalos, llamas, pero en mayor medida se ha estudiado en ganado bovino. La epidemiología está ligada a las características biológicas del microorganismo: lento desarrollo, parasitismo obligado, alta resistencia ambiental, posibilidad de infección congénita y transmisión a través de la leche [7].

Los animales más susceptibles de contraer la infección son los jóvenes, especialmente los menores de 6 meses de edad, pero las manifestaciones clínicas aparecen entre dos y cinco años después. El factor nutricional y hormonal puede influenciar la susceptibilidad a la infección por MAP; en estudios realizados con ratones se demostró que una dieta con reducción de calcio protegió a los animales contra la infección. Por el contrario, en el caso de los bovinos, durante el parto y la lactancia las hormonas prolactina y de crecimiento se incrementan y esto favorece la multiplicación intracelular de MAP [14].

La prevalencia de la enfermedad es muy variable en cuanto a países, ya que se ha detectado en el 2007 una prevalencia del 7 al 55% en los países europeos, 40% en los Estados Unidos en rodeos con más de 300 cabezas de ganado, mientras que en Australia la prevalencia fue de entre 9 y 22% [14].

Se ha demostrado la presencia de MAP en leche pasteurizada en distintos países incluyendo Argentina, además de presencia en cortes cárnicos de cabezas provenientes de ganados con antecedentes de paratuberculosis, especialmente en el hígado. Se cree que estas son las principales vías de contagio de MAP de animales a humanos [29]. De hecho, se estima que países como Holanda y Dinamarca entre el 50 y el 70% de los rebaños destinados a la producción de leche se encuentran contaminados con el patógeno, de acuerdo a pruebas de inmunidad humoral aplicadas a la leche obtenida de estos rebaños. Esto significa que, debido a la inespecificidad de esta prueba, el número de rebaños afectados puede aún ser mayor.

1.2 Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la paratuberculosis (PTBC) es un desafío pues la efectividad de las pruebas diagnósticas depende directamente del estadio clínico en el que se encuentra el animal. Los animales en el estadio silencioso y subclínicos se caracterizan por una alta respuesta inmune celular, mientras en estadios clínicos y avanzados la respuesta inmune humoral es la que predomina. Los animales con PTBC avanzada desarrollan un estado de anergia, donde las pruebas diagnósticas son menos sensibles. [9]

Los cambios en parámetros séricos en la enfermedad clínica, como la disminución de la concentración de proteínas totales, albúmina, triglicéridos y colesterol en el plasma son hallazgos típicos a medida que progresa la enfermedad; no obstante se consideran predictivos y característicos del estado clínico de la enfermedad, pero no son específicos para ser usados como prueba diagnóstica de la misma [14].

Las pruebas diagnósticas en los primeros estadios son la intradermorreacción o test de Johnina, en el cuello de los animales, e Interferón Gama (INF- γ), en cultivos celulares en animales jóvenes. El inconveniente es que estas pruebas presentan reacciones cruzadas con otras micobacterias ambientales, además de falsos negativos frecuentes en animales muy jóvenes. Varios estudios han demostrado que el ensayo de INF- γ es más efectivo para la detección de la etapa temprana de la enfermedad que las pruebas basadas en anticuerpos, aunque este ensayo no se recomienda para etapas tardías de la enfermedad, donde predomina

la respuesta inmune tipo Th2, y menos en etapas más tardías donde existe un estado de anergia completa o desactivación inmunitaria en los animales [27].

En los animales clínicamente infectados las técnicas de diagnóstico se utilizan técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), inmunodifusión en gel de agar y fijación de complemento, ya que estos animales tienen una respuesta inmune humoral detectable. La fijación del complemento se ha utilizado durante muchos años como la prueba estándar usada en los bovinos; es adecuada para animales clínicamente sospechosos, pero no es completamente confiable para el control de la población. Aun así, esta prueba se solicita para la importación de ganado [21].

Una nueva prueba serológica basada en Citometría de Flujo ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el ELISA comercial. Además, desde que se descubrió el inserto atípico específico de IS900 en el genoma de MAP por Green en 1989, se ha decidido utilizar la reacción en cadena de polimerasa (PCR) como prueba confirmatoria ya que ocupa cantidades mínimas de ADN bacteriano. El elemento de inserción IS900, específico de MAP, codifica para proteínas como la proteína de expresión dependiente de hospedero (HED, por sus siglas en inglés Host expression dependent) con funciones de inducción de la respuesta inmune [14].

1.3 La enfermedad de Crohn en humanos

La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa, forman parte de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). La incidencia de estas enfermedades, las cuales son multifactoriales, se ha incrementado paralelamente al desarrollo de las sociedades, y estadísticamente se ha observado un aumento de estas en países desarrollados de Europa, el Reino Unido y Estados Unidos, además de países en vías de desarrollo de Asia y América Latina. Entre 10 y 15% de los casos de EII no se pueden clasificar entre colitis ulcerosa y EC por los que se denominan “colitis intermedia”. Las EII se caracterizan por su cronicidad, evolución con recaídas y limitada eficacia terapéutica.

Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación transmural que puede involucrar segmentos de todo el tracto gastrointestinal, y cuyo principal síntoma es diarrea intermitente, hemorragia, fiebre, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso. Estos síntomas, junto con la mala absorción que se genera por la inflamación, obligan al paciente a utilizar nutrición parenteral ya en las etapas clínicas de la enfermedad.

Como factores predisponentes para desarrollar esta enfermedad se han encontrado deficiencias en mecanismos de defensa antibacterianos, polimorfismos genéticos asociados a trastornos en los procesos de autofagia, la activación de componentes de autoinmunidad y la pérdida de integridad de la barrera epitelial.

Se ha demostrado que, tanto en pacientes como en modelos murinos de EII, existen algunos factores genéticos capaces de aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, dentro de estos factores se encuentran: polimorfismos en genes de receptores de reconocimiento de patógenos de tipo Toll 4 (TLR4) e intracelular NOD2/CARD15 [16]. La EC se caracteriza por el desarrollo de inflamación crónica y transmural, que puede comprometer todos los segmentos del tracto digestivo, principalmente íleon terminal, colon y región perianal. Las zonas dañadas forman lesiones en parches, las cuales presentan granulomas no caseificantes en la submucosa, úlceras profundas y fisuras con infiltrado inflamatorio.

Una de las causas probables que contribuyen con el desarrollo de la EC es una menor capacidad de las células de Paneth (CP) de secretar alpha-defensinas 5 y 6, las cuales presentan propiedades bactericidas mediante la activación de la secreción de Interleucina 8 (IL-8), con el consiguiente reclutamiento de leucocitos al sitio de infección. Esto provoca que se favorezca la colonización intestinal por bacterias patógenas provocando la activación constante e inadecuada del sistema inmune.

Actualmente el tratamiento es sintomático, usándose moduladores de la inflamación, esteroides e inmunosupresores [15]. También se utiliza cirugía, suplementos nutricionales (para contrarrestar la malabsorción intestinal) y antibióticos, que, según algunos investigadores, provocan la remisión del cuadro clínico de algunos pacientes por su efecto sobre MAP [23]. Estos antibióticos normalmente son una combinación de claritromicina, rifabutina y/o clofazimina.

En caso de que el paciente no responda a este tratamiento con antibióticos, se opta por la utilización de fármacos inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa; anticuerpos monoclonales (infliximab y adalimumab) y/o un inhibidor competitivo de la unión del TNF a sus receptores de superficie, etanercept [24]. Aunque estudios pediátricos han revelado que estos fármacos paradójicamente provocan psoriasis invertida secundaria en pacientes (estos fármacos son utilizados también para el tratamiento de la psoriasis), las lesiones evolucionan favorablemente con corticosteroides tópicos [24].

Entre los posibles agentes etiológicos de la EC se han descrito distintas bacterias, entre ellas MAP, y los generos *Helicobacter*, *Pseudomonas* y *Yersinia*, además del virus Epstein-Barr, entre otros virus intestinales.

Algunos autores postulan que *M. avium* subsp. *paratuberculosis* es el agente etiológico de la enfermedad de Crohn en humanos, en mayor parte debido a las similitudes fisiopatológicas entre la infección de los bovinos y la enfermedad de Crohn en los humanos [3]. Además con el desarrollo y masificación de las técnicas de diagnóstico molecular se ha incrementado la identificación de pacientes con EC infectados simultáneamente por MAP, como lo ha demostrado el estudio de Naser et. Al [4]

Naser y colaboradores reportaron la presencia de MAP en 46% de los pacientes estudiados con EC, en un estudio realizado en el laboratorio del Department of Molecular Biology and Microbiology, Burnett School of Biomedical Sciences. College of Medicine.

University of Central Florida, Orlando, FL, USA, y en otros dos laboratorios de referencia. En su publicación se hizo énfasis en que para detectar MAP en sangre periférica humana se debían hacer cultivos sanguíneos en medio MGIT™ para, y hacer la detección por PCR anidado, no convencional. [5]

A pesar de esto, existen otros estudios que muestran la ausencia de MAP en la Enfermedad de Crohn, por ejemplo el realizado por Lozano-Leal et al. [4] donde, en un grupo conformado por 73 pacientes con EC y 73 pacientes sanos, no se observa la presencia de MAP en sangre periférica después de realizar un PCR específico para la búsqueda de este patógeno.

MAP se ha cultivado en pacientes con EC a partir de heces, tejido intestinal y sangre periférica. En humanos con hemofilia, SIDA, linfocitopenia y diarrea profusa, mediante biopsia del colon, de hígado y médula ósea han sido detectados MAP por cultivo y PCR. En niños se ha logrado aislar MAP por cultivo de linfonódulos afectados y un hallazgo que refuerza el concepto de zoonosis es que MAP se ha cultivado a partir de la leche materna de mujeres con EC, aislamiento confirmado por PCR - IS900 [8]

Por lo tanto, actualmente no se puede afirmar pero tampoco descartar si MAP está involucrado en la causalidad de la enfermedad de Crohn; si este patógeno es un agente causal o solamente espectador. En el caso de que MAP esté involucrado, se espera que las drogas antimicobacterianas mejoren el cuadro clínico de los pacientes afectados. A pesar de esto un trabajo investigativo en el que se utilizó una terapia antituberculosa estándar (rifampicina,

isoniazida y etambutol) no arrojó resultados de mejora en pacientes que tenían EC. Por otro lado la terapia con rifabutina y claritromicina o azitromicina por 18 meses redujo significativamente la EC activa; sin embargo tiene efectos a la larga contraproducentes a la flora bacteriana intestinal, lo que aumenta la severidad clínica de la enfermedad. [19]

Varios estudios enfatizan el rol de la leche fluida como el principal vector de infección de ganado bovino a humanos, ya que se ha demostrado que la pasteurización no es suficiente para librar a los alimentos de las cepas viables de MAP [7]. Esto se debe a que la naturaleza hidrofóbica de MAP provoca un agregado en superficies líquidas o en las paredes de los tubos pasteurizadores, por lo que las células simples se inactivan con el calor de la pasteurización, pero no así las bacterias que se localizan en los agregados, que pueden mantener su viabilidad, protegiéndose del calor con las células muertas [8].

También se ha encontrado en quesos maduros, aunque el aumento de concentración salina y el descenso de pH disminuye la viabilidad de la bacteria. Además, se observó en los Estados Unidos de América que los tratamientos rutinarios realizados al agua de consumo, MAP sobrevive a concentraciones mayores de 2 ppm de cloro [7].

1.4 El agente causal: *Micobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAP es un patógeno intracelular facultativo, Gram positivo, ácido alcohol resistente por la presencia de ácido micólico en su pared celular, aerobio y cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37° C. Es de crecimiento lento, ya que su tiempo de generación excede las 20 hrs. Como característica especie-específica destacan su dependencia del sideróforo micobactina para el crecimiento in vitro y la presencia del segmento de inserción IS900 en su genoma, la cual se repite de 14 a 18 veces, y que se ha utilizado para la detección específica de este patógeno. La micobactina es un agente quelante del hierro, necesario para el transporte de este mineral dentro de la célula [23]. Existen evidencias de que MAP puede sobrevivir en estado vegetativo como esferoplastos o en forma L (deficientes de pared celular), aunque no crecen en medios de cultivos convencionales.

MAP es una de las micobacterias del complejo avium que han sido secuenciadas por completo; específicamente la cepa k10, cuyo material genético consta de un único cromosoma circular de 4.829.781 pares de bases [23].

Esta micobacteria puede infectar a una amplia variedad de especies animales, e incluso se ha descrito infectando protozoarios para sobrevivir a las condiciones medioambientales. La célula blanco en la infección de hospedero animal es el macrófago, en donde altera la maduración y acidificación del fagosoma y su posterior fusión con los lisosomas. Esto se debe a la estructura de la pared celular de la micobacteria, cuyo principal antígeno de superficie es el LAM (lipoarabinomanano), y con el receptor de transferrina. MAP también evita la

activación de la bomba de protones de la ATPasa interfiriendo con el proceso de acidificación del fagosoma necesario para la maduración del mismo y su posterior fusión con el lisosoma [14].

En un estudio llevado a cabo por Lamont et al. (2012) se realizó un co-cultivo de células epiteliales bovinas con macrófagos derivados de monocitos (MDM) se demostró que la acidificación del fagosoma producida por MAP conlleva a un rápido procesamiento de IL-1 β , cuya producción es crítica para el reclutamiento de los MDM, esto con ayuda de un influjo de calcio extracelular. En este estudio se llegó a la conclusión de que MAP aprovecha este reclutamiento de IL-1 β en el sitio de infección para atravesar eficientemente el epitelio y llegar al macrófago, su célula blanco. [28]

Un estudio en el laboratorio de micobacterias del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, en el que se utilizó la técnica de inmunoblot en sueros de animales con PTBC y de ratones inmunizados con proteínas totales de la bacteria dio como resultados los siguientes antígenos: bacterioferritina, Hsp70, una proteína de estrés térmico descrita como antígeno en otras especies de micobacterias, y una quinasa serina/treonina y Lpp34, una lipoproteína de 32 kDa (2).

Además de las técnicas inmunológicas para detectar MAP mencionadas anteriormente, existen actualmente otras formas de detección de este patógeno, de las cuales solamente pocas

son específicas de MAP, mientras que otras son suplementarias debido a su sencillez y bajo costo.

Entre estas técnicas están el cultivo celular de MAP, la cual es la técnica confirmatoria por excelencia, pero cuyas desventajas son el lento crecimiento del microorganismo (de 8 a 16 semanas en medio Herrold con yema de huevo, 7H9 7H10, etc., todos suplementados con micobactina y piruvato) (9); además de que el medio es fácilmente contaminable y la muestra obtenida en el sitio de infección tiene muy pocas bacterias.

Otra técnica es la Tinción de Ziehl-Neelsen, que detecta directamente a la micobacteria, la cual se tiñe de color rojo con la fucsina básica. Su inconveniente deriva de la escasa cantidad de micobacterias encontradas en el tejido lesionado.

1.5 Tratamiento y vacunación

Se debe tomar en cuenta que aunque se tenga un diagnóstico de infección por MAP, el tratamiento con antibiótico es muy prolongado y costoso, por lo que se considera como mejor opción segregar y eliminar el ganado contaminado para evitar la propagación de la enfermedad entre la población sana del rebaño. Debe tomarse en cuenta que las vacunas contra la paratuberculosis ayudan a prevenir la enfermedad clínica pero no necesariamente evitan la infección. Los animales vacunados contra la paratuberculosis desarrollan tanto hipersensibilidad tipo tardía (DHT) como anticuerpos séricos. Si se requiere diagnosticar a los animales vacunados infectados con MAP, solo se pueden utilizar pruebas de detección en heces [21].

Las vacunas actualmente disponibles contra la paratuberculosis reducen el impacto de la enfermedad, pero no producen una inmunidad protectora en el 100% de la población y son potencialmente inductoras de hipersensibilidad celular frente a *M. bovis* (11). Las vacunas actuales para la paratuberculosis no previenen la infección por MAP, sin embargo, modifican la respuesta inflamatoria del huésped evitando la propagación de las lesiones granulomatosas intestinales, y disminuyendo el número de micobacterias eliminadas por heces, lo cual reduciría la prevalencia de la paratuberculosis en generaciones futuras.

El objetivo sería entonces el implementar un método de prevención de paratuberculosis que no interfiera con los métodos de rutina para el diagnóstico y el control de la tuberculosis bovina.

La primera vacuna disponible para el tratamiento de la paratuberculosis fue desarrollada en 1926 por Vallee y Rinjard a partir de una cepa viva virulenta de MAP reconstituida en parafina líquida y aceite de oliva, diseñada para inoculación por vía subcutánea. A partir de un subcultivo de esta cepa en cultivo libre de micobactina se desarrolló una segunda vacuna. Ambas fueron utilizadas con gran éxito en Francia, y la segunda, en el Reino Unido.

Más adelante se desarrolló una vacuna comercial a partir de una cepa viva atenuada de MAP con referencia 316F reconstituida en un adyuvante oleoso (Neoparasec, Laboratorio Rhone-Merieux), que fue ampliamente utilizada en Francia. Su inconveniente radicaba en la producción de anticuerpos anti-micobacteria, que resultaba en falsos positivos para los ensayos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad. Se intentó más tarde implementar esta vacuna por vía oral, con un resultado de escasa protección contra cepas patógenas de MAP.

Entre las vacunas que se tienen disponibles a la fecha está la de Gudair, comercializada por CZ veterinaria, S.A. España, la cual se realiza a partir de la cepa de MAP 316F inactivada térmicamente y se compone por un adyuvante de aceite mineral. En un estudio realizado por Lozano de Arcenegui et al (2012) se concluyó que esta vacuna no interfiere en el diagnóstico de la tuberculosis durante toda la vida productiva del animal, además de que la reacción de naturaleza celular se mantiene en el tiempo, por lo menos en el caso del ganado caprino. [12]

También en un estudio reciente se ha descrito una vacuna de subunidades de la proteína de estrés al calor de 70 kDa la cual no interfiere con las pruebas de diagnóstico de tuberculosis. [13]

Entre otras vacunas contra MAP en ganado bovino, que usan al microorganismo inactivado por calor, se encuentran: Mycopar (USA, adyuvante de emulsión oleosa) y Lelysatad (Holanda, emulsión oleosa. Además de estas vacunas se encuentran otras de bacterias atenuadas para ganado ovino y caprino, las cuales son económicas y producen una respuesta celular efectiva y cuyo inconveniente es la formación de nódulos de gran tamaño en el sitio de inoculación, sobre todo cuando se utiliza el Adyuvante Completo de Freund, el cual provoca una respuesta inflamatoria crónica [17].

Los inconvenientes actuales de la vacunación contra MAP son la interferencia con los programas de erradicación basados en pruebas inmunológicas y la eliminación de animales identificados como infectados, además de la interferencia por la interpretación de pruebas cutáneas de hipersensibilidad de tipo tardía (DHT) en tuberculosis bovina [21].

1.6 Proteínas Hsp70

Las proteínas de choque térmico de 70 kDA apoyan en un amplio rango de procesos de plegamiento, incluyendo el plegado y ensamblado de proteínas sintetizadas *de novo*, replegamiento de proteínas agregadas o mal plegadas, translocación de proteínas de organelos y secretorias, y el control de la actividad de proteínas regulatorias. Aparentemente todas estas actividades se basan en la propiedad de la Hsp70 para interactuar con segmentos peptídicos hidrofóbicos de las proteínas de forma controlada por ATP. Los genes que codifican para estas proteínas están ampliamente diversificadas a través de la evolución, lo que ha generado chaperonas Hsp70 especializadas, co-chaperonas reclutadas por estas chaperonas, y cooperación de Hsp70 con otros sistemas de chaperonas. [6]

La HSP70 por sí misma, puede activar las células presentadoras de antígenos, a través de los receptores Toll 2, Toll 4 y CD14, induciendo moléculas coestimuladoras y citosinas que regulan la respuesta inmune adaptativa. De hecho, una producción anormal de estas proteínas en la superficie de células cancerígenas puede provocar una reacción de reconocimiento por las células asesinas naturales (NK) o linfocitos T gamma/delta [30]; estos últimos poseen un receptor de linfocitos T (TCR) específico en superficie, representan un 5% del total de los linfocitos T, y se hallan de manera abundante en la mucosa del intestino.

Muchas de las proteínas de la familia de las Hsp70 son expresadas de forma constitutiva y se localizan en varios compartimientos intracelulares. Entre ellas se incluyen la hsp73 citosólica y nuclear, la grp 78, presente en el lumen del retículo endoplásmico, y la grp

75, un componente de la matriz mitocondrial (o cloroplastos en las células vegetales). Siempre que las células son sujetas a un estrés metabólico, por ejemplo, choque térmico, se expresa otro miembro de la familia de las hsp70, la hsp 72; aunque esto solamente es observado en el caso de las células eucariotas, mas no en las procariotas. [15] Según un estudio en el que se evaluó la interacción entre las hsp70s inducibles y las expresadas constitutivamente (Brown et. Al, 1993), se observó que se forma un complejo estable entre ambas proteínas (la hsp 73 y la hsp 72, constitutiva e inducible, respectivamente), la cual es regulada por ATP, son los lisados celulares sin ATP los que lograban coprecipitar ambas proteínas. La proteína constitutiva (hsp73) se relocaliza en el nucléolo después de que la célula sufre el choque térmico, y varias horas después de la recuperación, ambas hsp70 se relocalizan en el citoplasma. [15]

En un estudio se observó que las proteínas de choque térmico, mantienen el estado activo y por lo tanto la longevidad de algunas cinasas, por consiguiente evitan que la célula inicie su apoptosis. Por ejemplo, las Hsp90 se unen a las proteincinasas activadas por mitógenos (MOP, por sus siglas en ingles), mientras que las Hsp70 se unen a proteincinasas C (PKC) maduras que han sido desfosforiladas en el motivo de giro (Thr⁶⁴¹). De hecho la unión de las Hsp70 está regulada por el estado de fosforilación de este motivo. (18) Se sabe además, que en el caso de las PKC, los forbol esteroides aumentan la expresión de Hsp70 así como respuestas de estrés inducidas por calor; en este caso se ha demostrado que la hipertermia febril, así como los forbol esteroides, provocan que la Hsp70 y la PKC se asocien con un componente citoesquelético que contiene espectrina. [18]

En cuanto a su estructura, las proteínas Hsp70 constan de tres dominios funcionales:

1. Un dominio ATPasa en su N terminal. Une ATP y lo hidroliza a ADP y fosforo inorgánico.
2. Dominio de unión al sustrato: Contiene aminoácidos neutros e hidrofóbicos, y es capaz de interactuar con cadenas peptídicas de otras proteínas de hasta 7 residuos de longitud.
3. Un dominio C-terminal en alfa hélice, que interviene como tapa para el dominio de unión al sustrato; en presencia de ATP se permite una fácil unión y liberación de los péptidos, mientras que con ADP se cierra el hueco de unión, atrapando a dicho péptido.

Se sabe que un gran número de proteínas regulatorias de organismos eucariotas son controladas en su actividad biológica por asociación con Hsp70. Entre estas proteínas se incluyen receptores de hormonas esteroideas, cinasas (como la proteincinasa C), y factores de transcripción (HSF, c-Myc, pRb). También, debido a que las chaperonas Hsp70 están involucradas en traducción de señales, regulación de ciclo celular, diferenciación y apoptosis, no es de extrañar que estas proteínas sean factores importantes en el desarrollo de procesos patológicos como la oncogénesis, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes, infecciones virales y envejecimiento [6]. Esto se debe a que la sobreproducción de Hsp70 conduce a un aumento de resistencia contra agentes inductores de apoptosis como el factor de necrosis tumoral alfa, la estaurosporina y la doxorubicina. En muchas células tumorales se

observan niveles elevados de Hsp70 y se correlacionan con un incremento en la malignidad y en la resistencia a terapia.

Se calcula que las chaperonas Hsp70 son responsables del plegamiento de novo del 10 al 20% de las proteínas bacterianas totales, ya que el tamaño promedio de estas últimas es de 35 kDa en *E. coli* por ejemplo. Mientras que en las células eucariotas este tamaño es mayor, con un promedio de 52 kDa de tamaño de las proteínas humanas. Por lo tanto se espera que la participación de las chaperonas Hsp70 sea aún mayor en este tipo de células.

La necesidad de las chaperonas Hsp70 aumenta bajo condiciones de estrés. En parte esto se debe a que las proteínas mutadas (por ejemplo el regulador transmembranal de fibrosis cística, y la superóxido dismutasa mutante) requieren más atención de las chaperonas Hsp70 que de las mismas proteínas en su forma silvestre. Esto permite que las funciones normales de estas proteínas mutadas puedan preservarse. Las condiciones patológicas en las células con proteínas mutantes aparecen cuando se sobrepasa la capacidad total de estas chaperonas, por ejemplo oncogénesis, esclerosis lateral, Parkinson y ataxias espino-cerebelosas. Varios estudios han encontrado niveles elevados de auto-anticuerpos y de HSPs en el desarrollo de estas enfermedades [22].

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo

Expresar la proteína Hsp70 de MAP en *E. coli*, BL21 (DE3), clonada en el vector pRSET-A, y localizado en *E.coli* DH5 α TOP10F, para su posible uso en diagnóstico y como vacuna contra la paratuberculosis.

2.2 Materiales y métodos

Plásmidos y cepas bacterianas.

Para alcanzar este objetivo fue necesaria la inserción del vector de expresión, pRSET-hsp70, en una cepa de *E.coli* con capacidad para expresar proteínas como es la cepa ATCC *E.coli* BL21 (DE3). Este vector tiene a su vez la información necesaria para expresar una “cola de histidinas” (una secuencia de 6 histidinas acopladas a HSP70), lo que le permite la unión a un anticuerpo anti-histidina, utilizado posteriormente en la inmunoelectrotransferencia. Este plásmido se purificó de la cepa de *E.coli* DH5 α TOP10F' y posteriormente se introdujo por competencia en cloruro de calcio 0.1 M, en la cepa de *E.coli* BL21 (DE3). Se utilizó la cepa BL21 (DE3) debido a que esta tiene el ADN del bacteriófago DE3 integrado en el cromosoma. Este bacteriófago contiene a su vez el gen codificante de la T7 RNA polimerasa regulado por el promotor lacUV5 cuya actividad se induce por medio de la adición del inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). (20) Un punto muy importante a considerar es que la inducción de la cepa con IPTG puede provocar expresión no

inducida de proteínas potencialmente tóxicas para la célula, por lo que la inducción debe realizarse en un periodo de tiempo y concentración controlados.

2.2.1. Método de extracción de plásmido pRSET-70

Se tomó una alícuota de 200 μ l de cepa de *E.coli* TOP10F' en medio líquido Luria Bertani (LB) y se dejó creciendo en 15 ml de medio LB líquido con 1 μ l/ml de ampicilina durante 24 hrs a 37° C con agitación constante.. Se procedió a extraer el plásmido en la mayor cantidad posible con el método de lisis alcalina siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se centrifugó el cultivo a 3,800 rpm durante 10 min
2. Se eliminó el sobrenadante
3. El precipitado fue resuspendido en 300 μ l de solución de Glucosa-tris-ácido etildiaminotetraacético (Solución GTE) y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. 600 μ l de solución NaOH/SDS fueron añadidos, mezclados cuidadosamente por inversión del tubo, y la suspensión se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente.
5. De igual manera se mezclaron 500 μ l de solución 5M de Acetato de potasio.
6. Se dejó reposar en hielo por 15 min.
7. La suspensión se centrifugó por 10 min a 3,800 rpm para precipitar restos celulares y ADN cromosomal bacteriano.
8. El sobrenadante fue transferido a otro tubo Falcon y se añadieron 3 ml de etanol puro. El tubo se mantuvo en congelación a 0° C durante un día completo.

9. La mezcla fue centrifugada durante 5 min a 3,800 rpm para precipitar el ADN plasmídico y el ARN; el sobrenadante fue descartado.
10. El precipitado fue lavado con 10 ml de etanol al 70%, centrifugado a 3,800 rpm, decantado y dejado a secar.
11. Se agregaron 300 μ l de Buffer TE y 5 μ l de RNAsa 100 μ g/ml y se mezclaron hasta disolverse el precipitado. La mezcla completa fue transferida a tubos Eppendorff de 1.5 ml.
12. Se incubo la mezcla durante 30 min a 37° C
13. Se añadieron 300 μ l de mezcla de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico 50:49:1 y se agitaron vigorosamente en vortex. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min.
14. La fase superior acuosa fue transferida a nuevos tubos Eppendorff. A cada tubo se le agregaron 30 μ l de Acetato de potasio 5 M y 600 μ l de etanol puro. La mezcla se dejó en reposo a 0° C por 1 hr.
15. Posteriormente, la solución fue centrifugada a 12,000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 μ l de etanol al 70%, y se dejó secar el tubo abierto a 37° C durante 10 min.
16. El precipitado de cada tubo fue disuelto en 50 μ l de agua libre de nucleasas; todas las diluciones fueron concentradas en un solo tubo Eppendorff y puestas en congelación hasta su uso posterior.

Después, el plásmido disuelto fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 30 min, se cortó el fragmento del gel que contenía la banda más intensa y se

purificó por medio del kit comercial QIAquick Gel Extration Kit®. Se guardó en congelación para su uso posterior.

2.2.2 Método de transformación por competencia en cloruro de calcio

0.1M.

Se tomó una alícuota de cultivo de BL21(DE3) y se cultivó en medio LB durante toda la noche con agitación constante a 37° C. De este cultivo fresco se tomó otra alícuota y se volvió a cultivar en 15 ml de medio LB; se dejó en agitación constante hasta llegar a una absorbancia de aproximadamente 0.4 a 600 nm.

Se centrifugó en tubos Falcon de 15 ml durante 10 min a 3800 rpm y después se decantó. El precipitado se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 50 mM y se separó esta suspensión en 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se dejaron en incubación en hielo durante 30 min, después de los cuales ambos tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 3 min.

Luego de esa centrifugación, se decantó y se resuspendió el precipitado de ambos tubos en 200 µl de CaCl₂ 50 mM cada uno. El contenido de cada tubo se dividió a su vez en dos tubos Eppendorf, teniendo así 4 tubos Eppendorf con 100 µl de suspensión. A cada tubo se les agregó respectivamente, la siguiente cantidad de plásmido pRSET-70 diluido en agua libre de nucleasas: 3, 5 y 7 µl, mientras que al cuarto tubo no se le agregó nada. Se dejaron en hielo durante 10 minutos.

Después los 3 tubos que contenían plásmido se transfirieron inmediatamente a un baño de agua a 42° C durante 2 minutos, cuidando que la temperatura se mantuviera constante, luego de los cuales se transfirieron inmediatamente otros 2 minutos a hielo. Después de este choque térmico a cada tubo se le agregaron 0.9 ml de medio LB para completar un volumen total de 1ml en cada tubo. Los 3 tubos con plásmido se incubaron a 37° C por 45 min en una incubadora.

Acto seguido se platearon en 3 cajas petri con medio LB sólido y ampicilina (relación 1000:1 de medio:ampicilina) 100 µl del cultivo de cada tubo, respectivamente, y 40 µl de IPTG 1mM. Se incubaron las cajas durante 48 horas hasta que se obtuvieron clonas de un tamaño propicio para su manipulación. De las 3 cajas en total se tomaron 7 clonas que se crecieron en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina y posteriormente se realizaron pruebas de PCR.

Esta transformación se repitió tiempo después cuando se requirieron más bacterias transformantes para la electroforesis en gel de poliacrilamida y para el Western Blot, ya que para ese entonces no se pudo comprobar, mediante PCR, que estas células mantuvieran aún el plásmido. La única condición diferente fue la concentración del CaCl₂ utilizado, que en esta ocasión fue de 100 mM.

2.2.3 Condiciones de la PCR

Se realizó PCR de 7 clonas obtenidas de la transformación con pRSET-70, más un control positivo (lisado celular de la cepa de clonación del plásmido) y uno negativo. La mezcla para la reacción de PCR fue realizada de la siguiente manera:

Mezcla para 10 reacciones

Reactivo	Cantidad
dNTP's	15 µl
Buffer	25 µl
Oligonucleótidos	50 µl
Agua	92.5 µl
Taq polimerasa	5 µl
DMSO	12.5 µl
Total	200 µl

Tabla 1. Reactivos para 10 reacciones de PCR

La mezcla se dividió en 9 tubos Eppendorff y el sobrante fue descartado, obteniéndose 20 µl por tubo, a los cuales se les agrego 5 µl de lisado celular mezclado con PBS 1X, o en el caso del control negativo, agua libre de nucleasas.

Se realizó la reacción de PCR en el programa HSP70000 bajo las siguientes condiciones de ciclo:

- Tapa del Termociclador se mantiene a 105° C
 1. Templar a 94° C durante 10 min
 2. Desnaturalizar a 94° durante 30 seg
 3. Unión del cebador a 67° C durante 1 min
 4. Elongación a 72° C durante 2 min
 5. Repetición del ciclo (repetición de los paso 2 a 4, 30 veces)
 6. Elongación final a 72° C durante 10 min
 7. Conservación a 4° C, por tiempo indefinido

Las reacciones fueron posteriormente sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, a 100 V durante 30 min, junto con un MPM de 1 kb Quick-Load® 1 kb DNA ladder. De las 7 clonas sometidas a electroforesis, solamente 3 resultaron PCR positivas: la 1, la 3 y la 7 (Ver **fig. 1**)

En la segunda transformación, de 5 clonas sometidas a PCR, 5 resultaron positivas (Ver **fig. 3**). En esta ocasión, en lugar de usar lisados celulares, se utilizaron 3 µl de precipitados celulares lavados por duplicado con agua libre de nucleasas, y el en caso del control positivo, se utilizaron 3 µl de plásmido pRSET-70 disuelto en agua. Las cantidades de reactivo utilizadas fueron las siguientes:

Reactivo	Cantidad
dNTP's	10.5 μ l
Buffer	17.5 μ l
Oligonucleótidos	35 μ l
Agua	78.75 μ l
Taq polimerasa	3.5 μ l
DMSO	8.75 μ l
Total	154 μl

Tabla 2. Reactivos para 7 reacciones de PCR

El marcador de peso molecular utilizado fue Quick-Load® 2-Log DNA ladder (0.1-10.0 kb).

2.2.4 Digestión del plásmido

Posterior a la obtención de clonas PCR positivas se procedió a la digestión del plásmido HSP70 de la clona 3 con enzimas de restricción SacI y HindIII (ver Anexo II para punto de corte de estas enzimas). Esto se realizó con el fin de comprobar que se tienen dos fragmentos en el plásmido, el vector de clonación, pRSET, y el gen de HSP70. Se eligió esta clona debido a que presentó una banda más intensa para HSP70 en la electroforesis.

Para realizar la digestión, se extrajo el plásmido de la clona 3 por el método de lisis alcalina, explicado anteriormente. Después se preparó una mezcla con los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Buffer NE 10X 2.1	2 μ l
Enzima HindIII	1 μ l
Enzima SacI	1 μ l
Agua	6 μ l
Plásmido	10 μ l
Total	20 μl

Tabla 3. Reactivos para una reacción de digestión del plásmido pRSET-70 con enzimas de restricción.

Esta mezcla se agitó en vortex, se centrifugó y se incubó a 37° C durante 2 horas. Inmediatamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% durante 30 minutos a 100V. En un carril se cargó el producto de la reacción de digestión con 5 μ l de buffer de carga, y en el otro se cargó el mismo marcador de peso molecular utilizado anteriormente en la electroforesis de las muestras sometidas a PCR. Se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 2990 pb y otra de aproximadamente 1870 pb, correspondientes a los fragmentos esperados (Ver **fig. 2**).

2.2.5 Método de inducción

Se creció una alícuota de las 5 clonas transformadas con el plásmido durante 24 horas en medio LB con 0.1% de ampicilina a 37° C con agitación constante. De este cultivo fresco se tomaron otras 2 alícuotas por clona (una para inducir y otra para tener como control negativo no inducido) que se crecieron en medio LB sin ampicilina en las mismas condiciones hasta llegar a una absorbancia de entre 0.4 a 0.6 a 600 nm. En ese momento se añadió Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a cada cultivo destinado a la inducción. La

cantidad agregada de IPTG 100 mM fue de 10 μ l por cada ml de cultivo para tener una concentración final de IPTG de 1 mM. Se incubaron los cultivos a 37° C con agitación constante durante 4 horas; al finalizar este tiempo se centrifugaron dichos cultivos a 3800 rpm durante 10 minutos, se extrajo el medio sobrenadante y el precipitado se mantuvo en congelación a 0° C. También se centrifugó y congeló una alícuota de BL21(DE3) sin plásmido, para utilizarse posteriormente como control negativo.

El precipitado se disolvió en solución de lisis hasta tener una solución homogénea y se sometió a cinco choques térmicos seguidos los cuales constaban cada uno en sumergir durante 5 minutos el tubo con el precipitado en solución de acetona con hielo seco a -60° C e inmediatamente sumergirlo en agua caliente a 40° C, y posteriormente agitar la mezcla en vortex durante 20 segundos. Después de este procesamiento se realizó la electroforesis proteica y la electroinmunotransferencia.

2.2.6 Electroinmunotransferencia (Western Blot)

Se realizó una electroinmunotransferencia con el fin de demostrar la expresión de la proteína HSP70. Para este método se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% SDS-mercaptoetanol. Este gel fue preparado de la siguiente manera:

Se preparó una unidad para geles verticales de 100 x 100 x 0.75 mm, lavando los vidrios con agua bidestilada, y posteriormente con solución de etanol al 70%, y secando con

pañños absorbentes no abrasivos. Se mezclaron los reactivos para el gel inferior (separador) y se vertió la mezcla a $\frac{3}{4}$ de la capacidad de la cámara.

Posteriormente se agregó agua bidestilada encima de la mezcla hasta tener una capa de agua de aproximadamente 1 cm, con un borde plano. Se esperó a que polimerizara el gel (se vieron 2 fases donde originalmente solo se apreciaba una) y se absorbió el agua excedente con papel absorbente. Después, se mezclaron los reactivos para el gel concentrador, y la mezcla se vertió sobre el gel separador, llenando por completo la cámara. El molde para los pocillos fue colocado y se esperó hasta que el gel polimerizara para retirarlo. En la siguiente tabla se muestra la proporción de los reactivos utilizados para cada gel (ver **anexo I** para referencia de las soluciones utilizadas).

Reactivos	Gel separador (ml)	Gel concentrador (ml)
Solución de monómeros	2.40	0.33
Tris 1.5 M, pH 8.8	1.50	----
Tris 0.5 M, pH 6.8	----	0.50
SDS 10%	0.12	0.04
Agua bidestilada	2.00	1.22
Persulfato de amonio 10%	0.045	0.025
TEMED	0.003	0.002

Tabla 4. Reactivos para preparar un gel de poliacrilamida, incluyendo el gel separador (inferior) y el gel concentrador (superior).

Antes de cargar las muestras para la electroforesis, se les da un tratamiento para desnaturalizar las proteínas. Las cepas mezcladas con buffer de lisis se centrifugaron a 13,000 rpm durante 3 min. Fueron decantadas, lavadas con PBS 1X y posteriormente centrifugadas de nuevo en las mismas condiciones. Después se tomó una alícuota de 25 µl de cada muestra y se vertió en tubos Eppendorf nuevos, a los cuales se les agregó la misma cantidad de solución reguladora de muestra 2X con azul de bromofenol. La mezcla se desnaturalizó en agua hirviendo por 15 minutos, después de los cuales se retiraron inmediatamente los tubos y se colocaron en hielo molido durante 5 min más. Después de este paso se agregaron 10 µl de las muestras desnaturalizadas y 4 µL del marcador de peso molecular en el gel de poliacrilamida de 15 pocillos en el siguiente orden: (Ver **Fig. 4**). El marcador de peso molecular utilizado fue de la marca Precision Plus Protein Kaleidoscope™ de Biorad®.

Posterior a la carga de las muestras se realizó la electroforesis del gel a un voltaje de 200V durante aproximadamente 45 min (se apagó la fuente de poder cuando se observó suficiente resolución entre las bandas del MPM y la banda azul del regulador de muestra con azul de bromofenol en el borde inferior del gel).

Las proteínas del gel fueron transferidas por electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa durante 90 minutos a un amperaje de 300 mA. Para comprobar que fue exitosa la electrotransferencia se tiñó la membrana con solución de Rojo Ponceau hasta ver la aparición de bandas proteicas. La membrana fue posteriormente sumergida en PBS 1X con 5% de leche

descremada y guardada en refrigeración a 4° C durante >12 horas para bloquear los sitios inespecíficos.

Al finalizar el bloqueo la membrana fue lavada con solución PBS-Tween al 0.1% como mínimo 5 veces hasta eliminar el PBS con leche. Se le añadieron a la membrana 4 µl de anticuerpo Anti-His tag derivado de conejo disueltos en 2 ml de PBS-leche 5% y se incubaron a 37° C durante 1 hora.

Posteriormente, se lavó la membrana de igual manera con PBS-Tween y se le agregaron 0.66 µl de anticuerpo Anti-conejo acoplado a peroxidasa disueltos en 2 ml de PBS-leche. Se incubó de nuevo la membrana 1 hora a 37° C.

Después, la membrana fue lavada 5 veces más con PBS-Tween y se le adicionó suficiente cantidad de solución reveladora de 3-Amino-9-Etilcarbazol y se dejó incubando a 37°C durante 15 minutos protegida de la luz. Una vez aparecidas las bandas, la membrana fue lavada otras 5 veces para detener la reacción y así poder observar los sitios de unión antígeno-anticuerpo.

Esta metodología se repitió después de hacer la tinción de las proteínas con azul de Coomassie (la cual se explicará en el siguiente apartado) utilizando solamente las clonas 2 y 3, con la intención de obtener un resultado más claro. Debido al tiempo que transcurrió entre el Western Blot con las 5 clonas (Figura 4) y el de las 2 clonas (Figura 6), se tuvo la precaución

de resembrar las clonas 2 y 3 en medio solido LB con ampicilina y someterlas a una reacción de PCR para comprobar la permanencia del plásmido en las bacterias, antes de inducir estas últimas nuevamente con IPTG, lisarlas y hacer el Western Blot. Este último se realizó en condiciones casi similares, con las siguientes diferencias en el procedimiento:

- Se utilizó una membrana de polifluoruro de vinilideno en lugar de la de nitrocelulosa
- Se agregaron 20 μ l de muestra en los pocillos en lugar de 10 μ l, debido a que se usaron pocillos de mayor capacidad
- A la solución PBS-5% leche utilizada para bloquear los sitios inespecíficos de la membrana y para incubación con anticuerpos, se le añadió 0.1% Tween 20.
- La electroforesis en el gel de poliacrilamida se llevó a cabo durante 1 hora a 150 V, en lugar de 45 min a 200 V como se realizó anteriormente
- El tiempo de revelado se extendió de 15 minutos, a más de 1 hora, tiempo en el que aparecieron las bandas.

2.2.7 Tinción con azul de Coomasie

Después de seleccionar las clonas que expresaron correctamente la proteína de interés (clona 2 y 3), se realizó otra electroforesis en gel de poliacrilamida con estas 2 clonas exclusivamente, tanto en su forma inducida como no inducida, y la clona BL21(DE3) sin transformar, como control negativo. Esto se hizo con el fin de comprobar que la proteína expresada pesara aproximadamente 70 kDa y además solo fuera expresada por las bacterias transformadas; por lo tanto, que fuera la proteína de interés.

Se inició desnaturalizando las proteínas con el proceso descrito anteriormente. Se cargaron en cada pocillo del gel 20 µl de muestra, y en el pocillo correspondiente al MPM, 4 µl fueron cargados. Se sometió a corriente eléctrica a 200 V durante aproximadamente 45 min hasta que se observara una buena resolución entre las bandas del MPM.

Acto seguido, se sumergió el gel en colorante para tinción de proteínas (azul de Coomasie al 0.125% en Metanol: Acético: Agua) durante una hora con agitación constante. El gel, que estaba teñido de azul en su totalidad, posteriormente fue sumergido en solución decolorante para geles de poliacrilamida y puesto en agitación constante. Esta solución fue cambiada varias veces hasta que se lograron ver las bandas azules sobre un fondo transparente. El gel fue prensado en papel celofán y se dejó secando para su posterior digitalización (ver **Fig. 5**).

2.3. Resultados

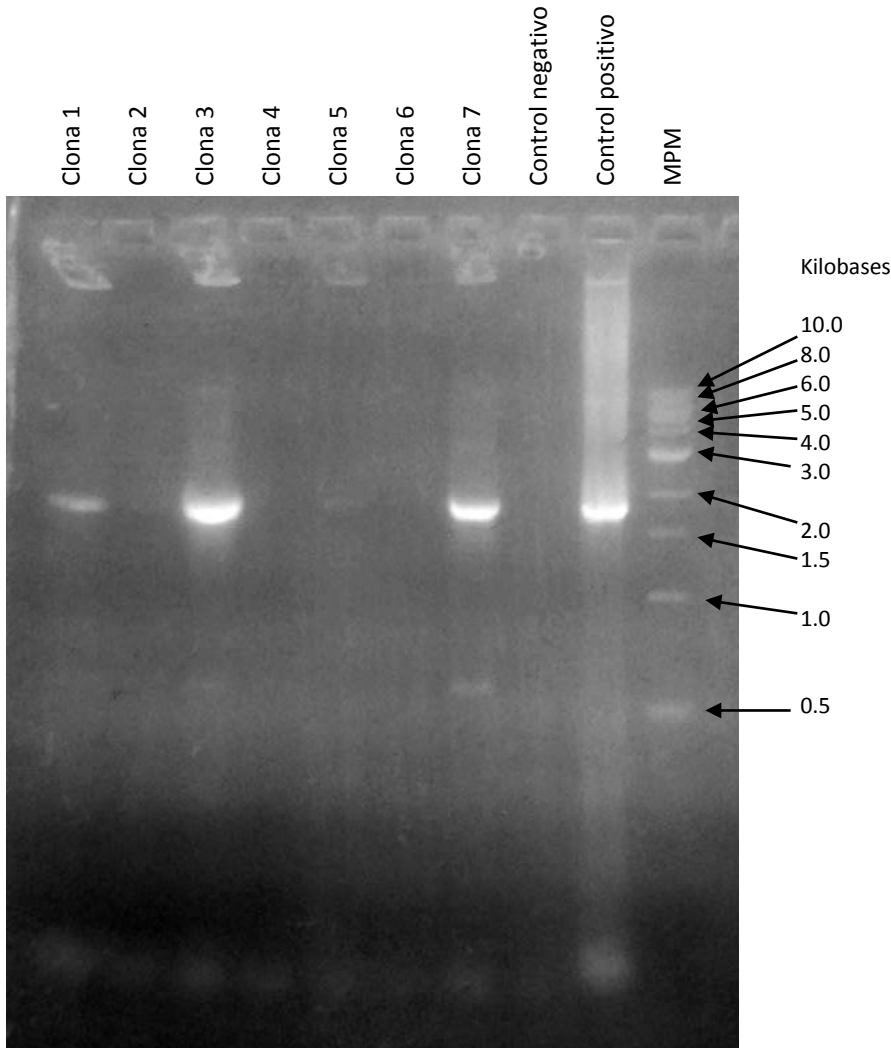


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gen de HSP70 amplificado de clonas transformantes. De Izquierda a derecha se cargaron las muestras en el siguiente orden: Clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Controles negativo y positivo, y marcador de peso molecular Quick-Load® 1 kb DNA ladder. Se observan bandas fuertemente marcadas en las clonas 1, 3, 7 y en el Control positivo, a la altura entre las 1500 y 2000 pb, donde se esperaba ver el gen de HSP70 con un tamaño de 1870 pb. Fotografía tomada el 22/Ago/2014.

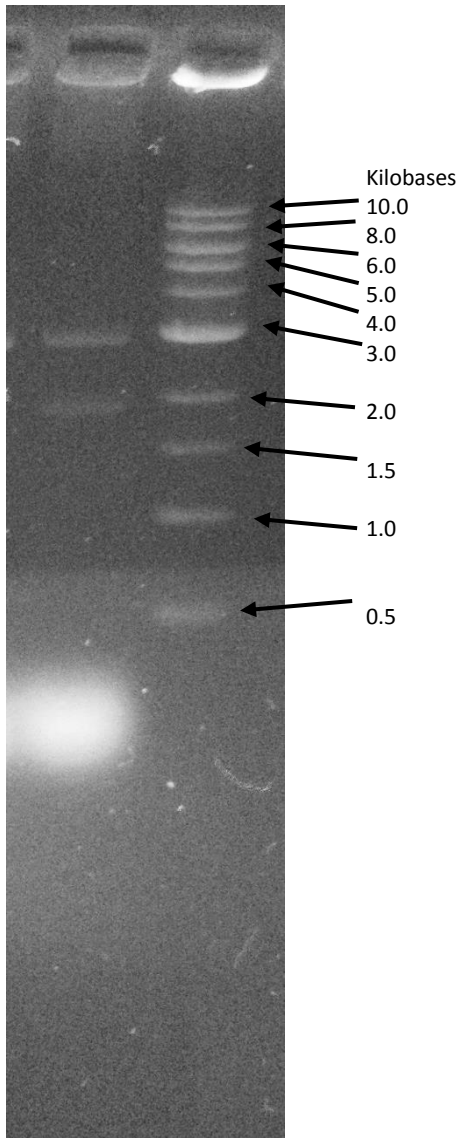


Figura 2. Electroforesis de la reacción de digestión con las enzimas de restricción SacI y HindIII en gel de agarosa al 1.5%, del plásmido purificado extraído de la clona transformante 3. A la izquierda se observa el producto de la digestión del plásmido extraído, y a la derecha el marcador de peso molecular Quick-Load® 1 kb DNA ladder. Se observan dos fragmentos de ADN en la muestra; el superior corresponde al plásmido pRSET, de 2990 pb, mientras que el inferior corresponde al gen de HSP70, de 1870 pb. Fotografía tomada el 11/Nov/2014

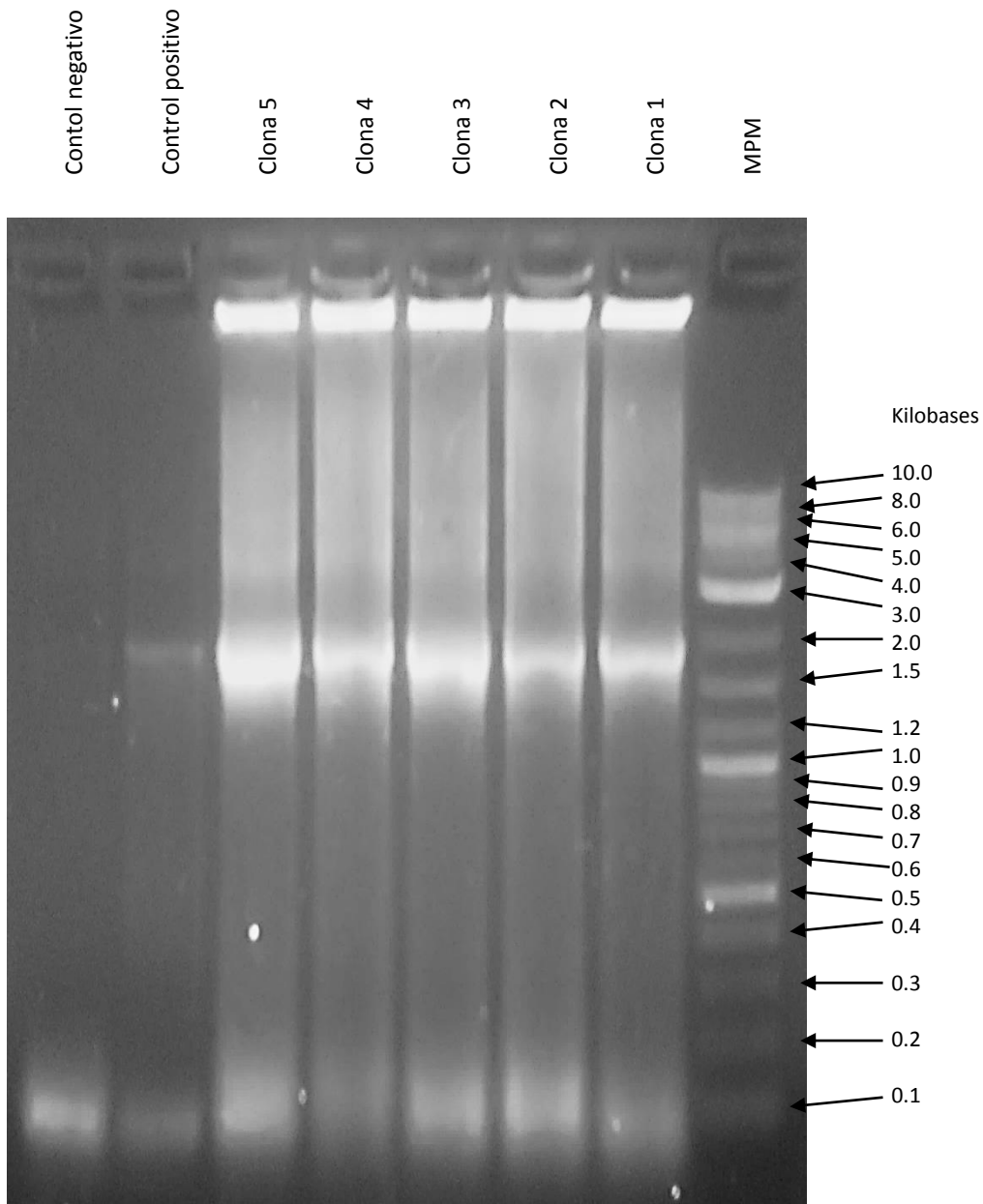


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del gen de HSP70 amplificado de clonas transformantes. De Izquierda a derecha se cargaron las muestras en el siguiente orden: Control negativo, control positivo, clonas 5, 4, 3, 2, 1, y marcador de peso molecular Quick-Load® 2-Log DNA ladder(0.1-10.0 kb). Se observan bandas fuertemente marcadas en todas las clonas y en el Control positivo, a la altura entre las 1500 y 2000 pb. Fotografía tomada el 24/Mar/2015.

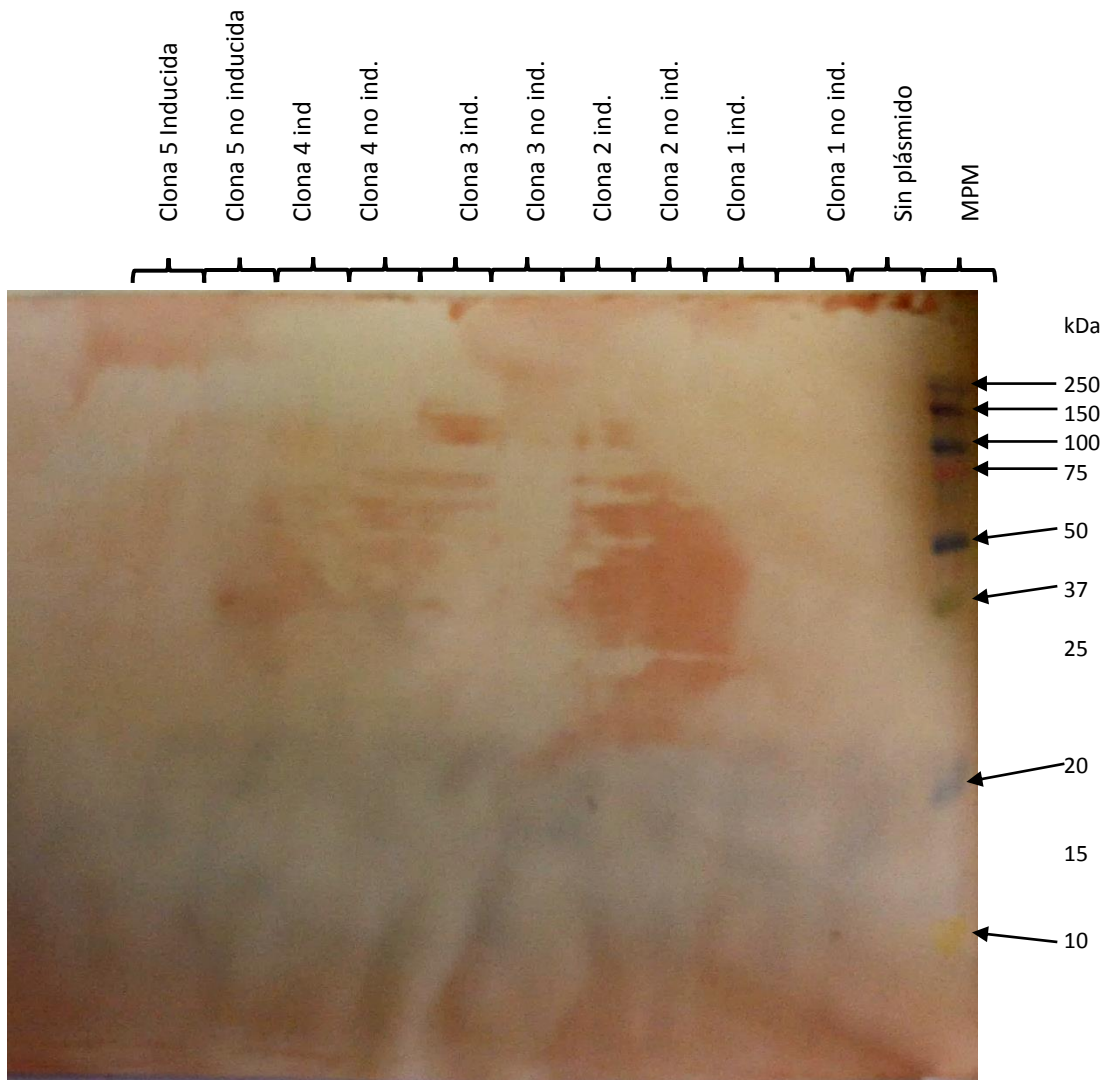


Figura 4. Western Blot después de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de lisado celular de las clonas 1 a 5, inducidas con IPTG y no inducidas, y de lisado celular de BL21(DE3) sin transformar como control negativo. Se puede observar una banda por debajo de la altura de 75 KDa en las clonas inducidas 2 y 3, que corresponden a una banda de aproximadamente 70 KDa. El Marcador de peso molecular es de la marca Precision Plus Protein Kaleidoscope™ de Biorad®. Fotografía tomada el 24/Mar/2015.

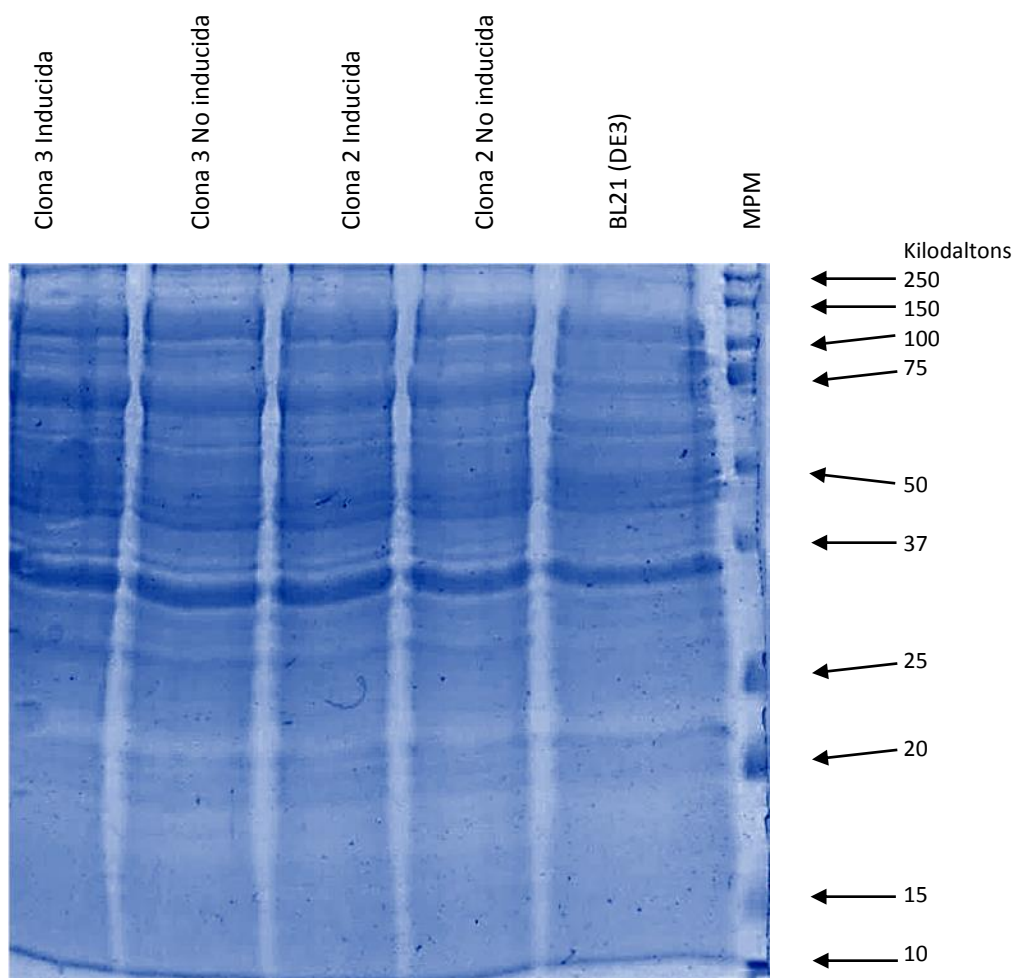


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de lisado celular de las clonas 2 y 3, inducidas con IPTG y no inducidas, y de lisado celular de BL21(DE3) sin transformar como control negativo. El Marcador de peso molecular es de la marca Precision Plus Protein Kaleidoscope™ de Biorad®. Se observa una banda por debajo de la marca de los 75 kDa en ambas clonas, pero más intensa en el caso de las clonas inducidas. En el caso del lisado de BL21(DE3) no se observa dicha banda. Fotografía tomada el 27/Mar/2015.

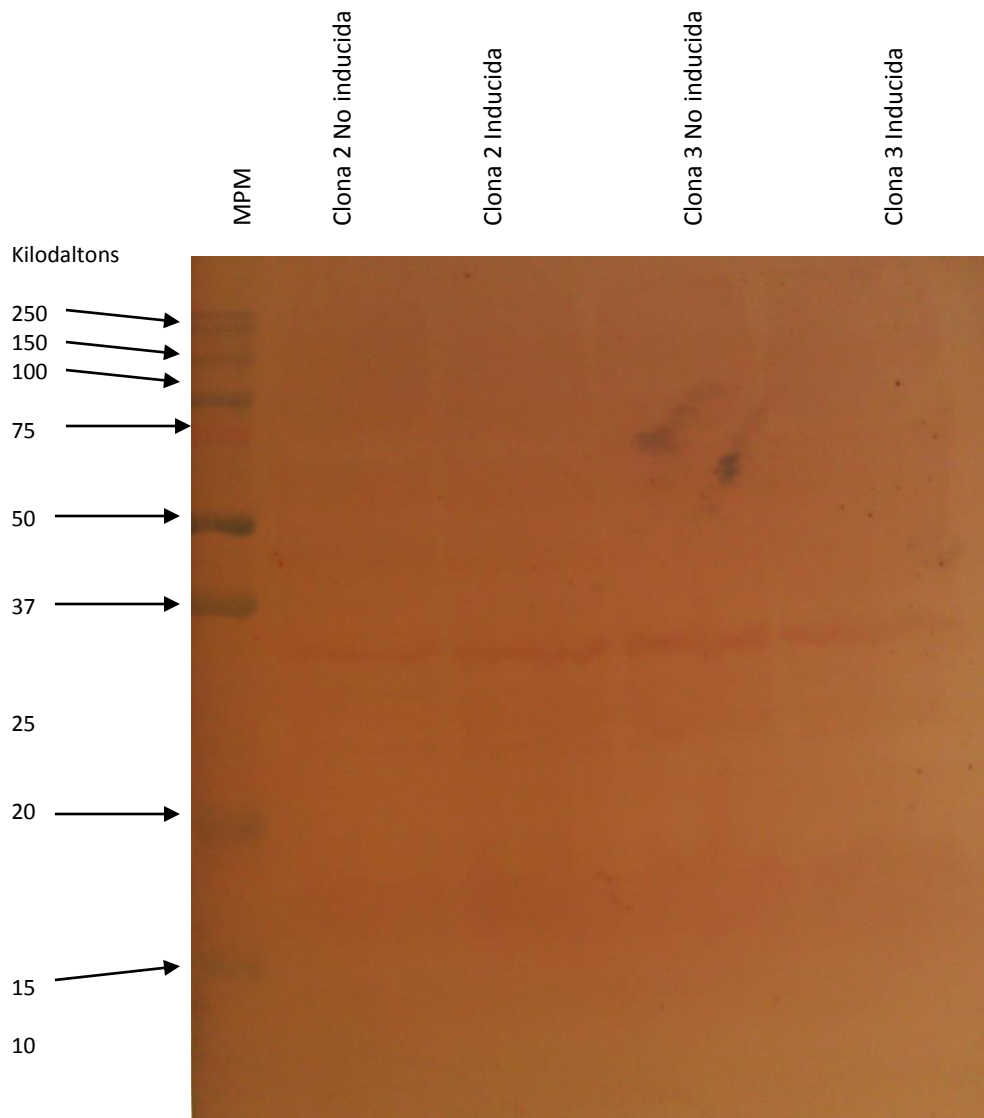


Figura 6. Western Blot después de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de lisado celular de las clonas 2 y 3, inducidas con IPTG y no inducidas, en membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). Se puede observar una banda teñida en ambas clonas de entre 37 y 25 kDa, después de revelar. El Marcador de peso molecular es de la marca Precision Plus Protein Kaleidoscope™ de Biorad®. Fotografía tomada el 08/May/2015.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se seleccionaron 7 clonas crecidas en medio LB solido con ampicilina para realizar amplificación por PCR del gen HSP70. Estas clonas, al contener el plásmido pRSET-70, además de tener el gen necesario para producir HSP70 de MAP, tienen el operón Lac, que inducido artificialmente por IPTG, le permite expresar β -galactosidasa, y un gen con el operón L7 para la expresión de β -lactamasa, que le confiere resistencia a ampicilina. Esto explica por qué al ser resembradas en medio LB con ampicilina lograron crecer. Como se puede apreciar en la **Figura 1**, de esas 7 clonas solo resultaron 3 PCR positivas, sin posible lugar a falsos positivos ya que el experimento se realizó en condiciones que evitaran la contaminación cruzada y se corroboró con el control negativo, en el cual no se produjo contaminación por material genético, y por lo tanto, resultó PCR negativo.

La obtención de 4 clonas PCR negativas pudo haberse dado por las siguientes 2 razones: Obtención e inoculación de una cepa no transformante pero resistente a la ampicilina, o la presencia de restos celulares (las células se lisaron pero no se purificó el ADN sino hasta después) que inhibieron la reacción de PCR. Sin embargo se decidió proseguir el trabajo con la clona 3, porque se observó mayor material genético en esta clona posterior a la reacción de PCR, con respecto a las otras 2 clonas PCR positivas.

En la **Figura 2** se muestran 2 bandas derivadas de la digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis del plásmido purificado de la clona 3. Estas enzimas (SacI y HindIII) cortan en los dos puntos de adhesión entre el gen HSP70 y el vector pRSET, dando como resultado dos segmentos de diferente tamaño, uno de 2990 pares de bases que corresponde al vector pRSET, el cual se observa a la altura entre las bandas de 3000 y 2000 pb según el marcador de peso molecular; el otro segmento es de 1870 pb aproximadamente (se ubica a la altura entre las bandas de 2000 y 1500 pb) y corresponde al gen de HSP70. Con este resultado se comprobó que el plásmido purificado corresponde en efecto a pRSET-70, y por lo tanto, la transformación celular de la cepa BL21 fue exitosa.

En la **Figura 3** se observa otro PCR de una transformación realizada meses después de la anterior, con la diferencia de que todas las clonas seleccionadas del medio sólido, tuvieron el plásmido. Esta nueva transformación se llevó a cabo debido a que se intentó la inducción de la expresión proteica de las clonas transformantes originales, meses después de la transformación, pero sin éxito. Explorando en retrospectiva se revisó si las clonas de la primera transformación mantenían el plásmido, y efectivamente, no lo tenían, por lo que se tuvo que repetir la transformación. Se consideraron dos posibilidades para este fenómeno: la eventual expulsión del plásmido por parte de las bacterias debido a la gradual degradación del antibiótico por acción de las β -lactamasas; o el desplazamiento de la población de las células transformantes por otra población contaminante resistente a la ampicilina.

En cuanto al resultado, la presencia de señales más fuertes en el PCR (ver **Fig. 3**) se debió posiblemente a que en lugar de utilizar plásmido diluido extraído de las clonas transformantes, en esta ocasión se agregaron las células transformantes directamente a la mezcla de reactivos, procurando lavarlas previamente, por duplicado, con agua libre de nucleasas para evitar cualquier interferencia con la reacción. Esto explica la presencia de una banda más débil en el carril del control positivo, que correspondía al producto de la reacción con plásmido diluido en agua. Se demuestra además, que la transformación se puede llevar a cabo tanto con concentraciones de 50 mM como de 100 mM de CaCl₂.

En la **Figura 4** se muestra una fotografía tomada de un Western Blot, en el que se transfirieron los extractos proteicos de las 5 clonas, tanto inducidas como no inducidas con IPTG. Se esperaba observar una banda a una altura aproximada de 70 kDa, que es donde se ubica nuestra proteína de interés, solamente en las clonas inducidas. El resultado obtenido fue una banda en esa altura en las clonas 2 y 3 inducidas, aunque también se observan manchas inespecíficas en otras partes de la membrana, posiblemente por un bloqueo ineficiente de los sitios inespecíficos de la membrana. Sin embargo las bandas anteriormente mencionadas se observan claramente, y se confirma su presencia al hacer la tinción con azul de Coomassie y comparar las clonas transformantes con la cepa BL21 (DE3) no transformante.

Al comparar los carriles en la **Figura 5**, se observa que una banda a una altura ligeramente por debajo de los 75 KDa (presuntamente 70 KDa), está ausente en la cepa

BL21(DE3) sin plásmido, pero no así en las cepas transformantes 2 y 3. Se observa, además, en esa banda en específico, mayor intensidad en las clonas inducidas que en las no inducidas.

La **Figura 6** corresponde a un Western Blot de las mismas cepas utilizadas para la tinción con azul de Coomasie, solo que estas cepas fueron resembradas e inducidas nuevamente con IPTG en las mismas condiciones; esto después de realizar una reacción de PCR con ellas para comprobar la permanencia del plásmido en las bacterias. El Western Blot de la **Figura 6** se realizó con membrana de PVDF, a diferencia del Western Blot de la **Figura 4**, donde se utilizó una membrana de nitrocelulosa, debido a que la membrana de PVDF es más resistente, se le forman menos burbujas que interfieren con el resultado, y permite una unión proteica con mayor eficiencia. Además, se utilizó un menor voltaje para tener mayor resolución de las bandas, incluyendo las del marcador de peso molecular.

En la **Figura 6** se puede observar una banda en ambas cepas, tanto inducidas como no inducidas, de un peso entre 25 y 37 kDa. Este resultado revela que se obtuvo un polipéptido de bajo peso molecular que posee una cola de histidinas, el cual fue detectado por el anticuerpo primario. Existe la posibilidad de que este polipéptido sea un fragmento de la HSP70, la cual podría haber sido escindida *in vivo* después de su expresión en la bacteria por alguna proteasa nativa.

Con estos experimentos se demuestra la expresión exitosa de la proteína HSP70 de MAP, inducida por IPTG, en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* transformada con el plásmido pRSET-70.

4. CONCLUSIONES

La transformación de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* con el plásmido pRSET-70 fue exitosa, como se demuestra con las reacciones de PCR y la digestión del plásmido con las enzimas de restricción. El plásmido se mantiene en las siguientes generaciones de las bacterias transformantes, pero de igual manera se puede perder con el transcurso del tiempo, sobre todo en ausencia del antibiótico ampicilina.

La expresión de la proteína inmunogénica HSP70 de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* inducida mediante adición de una concentración conocida de IPTG también fue exitosa, como lo demostraron tanto la reacción de electroinmunotransferencia con anticuerpos anti-histag, así como la tinción del gel de poliacrilamida con azul de Coomasie.

Se sabe por medio de la literatura que la proteína HSP70 tiene propiedades inmunogénicas, así que en prospectiva se espera que esta proteína dé un resultado positivo en una prueba de seroreactividad con sueros de animales infectados con MAP y que a su vez sirva tanto para su uso en diagnóstico como para vacuna.

5. REFERENCIAS:

1. Prieto Martin, Miguel. “*La paratuberculosis bovina. Diagnóstico y control*”. Tecnología agroalimentaria, No. 11, pp. 39-44. Asturias, 2013.
2. Romano, Marisa. “*Inmunodiagnóstico de la tuberculosis y paratuberculosis bovina. Inmunodiagnóstico empleando proteínas recombinantes*”. Publicaciones INTA. Argentina, 2013.
3. Retamal, Patricio y col. “*Mycobacterium avium subsp paratuberculosis y enfermedad de Crohn: evidencias de una zoonosis.*” Revista Med Chile 2011; 139 pp 794-801
4. Lozano-Leon et al. “*Absence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Crohn`s Disease Patients*”. Inflamm Bowel Dis, vol 12, no. 12 Dec 2006. Pp 1190-1192
5. Naser et al. “*Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) from the Blood of Patients with Crohn`s disease: A Follow-Up Blind Multi Center Investigation*”. The Open Inflammation Journal, 2009, 2. Pp 22-23
6. Mayer y Bukau. “*Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism*” CMLS, Vol 62, Alemania, 2005. Pp 670-684.
7. Cirone et al. “*Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis: presencia en alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn*”. Revista Argentina de Microbiología No. 39. 2007. Pp. 57-68
8. Paolicchi, Fernando. “*Paratuberculosis: implicancia zoonótica con la Enfermedad de Crohn en humanos*”. Grupo de Sanidad Animal, Balcarce, Argentina, 2008

9. Galardoni, M.V. y Mundo, S.L. "Paratuberculosis bovina" Revista Infovet, no. 13(102). Argentina, 2008. Pp 11-14.
10. Quezada, Nataly y Retamal Patricio. "*Paratuberculosis bovina: El desafío*". TecnoVet. No 1, Chile, Marzo de 2010. Pp 26-29
11. Colavecchia, Jolly et al. "*Lipoarabinomano (LAM) de Mycobacterium spp. Respuesta inmune inducida en terneros*" Revista InVet, 8(1). Argentina, 2006. Pp 103-109.
12. Lozano de Arcenegui et Al. "*Estudio sobre la interferencia a largo plazo en el diagnóstico de tuberculosis de la vacunación con Gudair frente a la paratuberculosis en cabras de reposición*". SEOC, España, 2012.
13. Castellanos Rizaldos, Elena. Tesis Doctoral "*Caracterización molecular de aislados de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis. Mapa epidemiológico en España*" Visavet, Universidad Complutense Madrid, España, 2010.
14. Zapata Restrepo, Margarita et al. "*Paratuberculosis bovina: ¿conocemos la situación real de la enfermedad en la ganadería colombiana?*" Revista Colombiana de las Ciencias Pecuarias 2008. Num 21, pp. 420-435.
15. Brown, Randell et al. "*The Constitutive and Stress Inducible Forms of hsp 70 Exhibit Functional Similarities and Interact with One Another in an ATP-dependent Fashion*". The Journal of Cell Biology, Volumen 120, Numero 5, Marzo de 1993 pp.1101-1112.
16. Sepulveda, Sofia et al. "*Enfermedad inflamatoria intestinal: Una Mirada inmunologica*" Revista médica Chile 2008; 136 pp 367-375.

17. Reyes, L.E. et al. “*Nuevos adyuvantes en la vacunacion frente a la paratuberculosis ovina*” XXVII Jornadas científicas y VI Jornadas Internacionales de la SEOC. Pp. 758-761. España, 2002.
18. Gao, Tianyan y Newton, Alexandra. “*The Turn Motif Is a Phosphorylation Switch That Regulates the Binding of Hsp70 to Protein Kinase C*” The Journal of Biological Chemistry. Vol. 277, No. 35. California, EUA, 2002.
19. Calderon, Johan, Zoot y Góngora, Agustín. “*Similaridades clinicopatológicas entre paratuberculosis y enfermedad de Crohn. ¿Posible vinculo zoonótico?*” Revista MVZ Cordoba. Vol. 13, no 1. Pp. 1226-1239. Cordoba, España, 2009.
20. Santos-Etxepare y col. “*Sistemas de expresion de proteínas en Escherichia Coli para la producción de biofármacos. Alternativas y criterios de selección*”. Sitio web Biotech Magazine. Recuperado el 24 de noviembre del 2014 de: <http://www.mkm-pi.com/biotech/sistemas-de-expresion-de-proteinas-en-escherichia-coli-para-la-produccion-de-biofarmacos-alternativas-y-criterios-de-seleccion-3/>
21. “Capítulo 2.1.11. — *Paratuberculosis (enfermedad de Johne)*.” Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008
22. Zurita, Carmelo y col. “*Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune*.” Revista Iberica de Parasitología (2006), num 66, pp 39-46.
23. Alvarez Sanchez, Julio. “*Complejo Mycobacterium Avium: Diagnóstico, caracterizacion molecular e interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis*”. Tesis Doctoral; Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, 2008.

24. Ávila Álvarez, A., García-Alonso, L., Solar Boga, A., García-Silva, J. “*Psoriasis secundaria al tratamiento con infliximab y adalimumab en la enfermedad de Crohn*”. Anales de Pediatría. 2009; 70(3); pp. 278-281.
25. Eguiarte, Luis; Souza, Valeria; Aguirre, Citlali. “*Ecología Molecular*”. Capítulo 17 “*Guía práctica sobre la técnica de PCR*”. Instituto Nacional de ecología. Mexico, 2007. Primera edición. Pp. 517-539.
26. Castro Mussot, Maria Eugenia; Vallejo de Aquino, Paul; Tenorio Trejo, Miguel Ángel. “*Manual de laboratorio de inmunología*”. Instituto Politecnico Nacional. Mexico, D.F, 1998
27. Gioffré, Andrea et al. “*Obtención y evaluación de un derivado proteico purificado de una cepa argentina de Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*”. Revista Argentina de microbiología; 2012; no. 44; pp. 155-164.
28. Lamont, Elise et. Al. “*Infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Results in Rapid Interleukin-1 β Release and Macrophage Transepithelial Migration*”. Infection and Immunity; 2012; Vol 80, num. 9. Pp 3225-3235.
29. Paolicchi, Fernando. “*Paratuberculosis. Generalidades, situacion en el contexto mundial y situacion en argentina*” Jornadas de Villamaría, 2014; Grupo sanidad animal, Balcarce, Argentina.
30. Fiorentino, S., Barreto, A., y Asea, A. “*Proteínas de choque térmico, muerte celular y respuesta antitumoral*” Universitas Scientiarum; Vol 12, no. 2. Bogotá, 2007. Pp. 5-22.

31. Geijo Vázquez, María. *“Estudio de variables inmunológicas y bacteriológicas en relación con la inmunización frente a paratuberculosis en rumiantes”* Tesis Doctorales No. 66. Vitoria-Gasteiz, 2010

ANEXO I. REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. REGULADOR DE MUESTRA 2X PARA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Tris 0.5M, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4.0 ml
Agua bidestilada	0.5 ml
Glicerol	2.0 ml

Dividir en fracciones de 900 µl y congelar. Agregar 100 µl de 2-mercaptoetanol por cada 900 µl de regulador, y una pizca de azul de bromofenol al momento de usarse.

Si se requiere 1x, se diluye volumen a volumen con agua bidestilada.

2. REGULADOR DE CORRIMIENTO TRIS 0.0025M – GLICINA 0.192M – SDS AL 0.1% pH 8.3 PARA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Trizma base	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS al 10%	10 ml
Agua bidestilada hasta	2.0 ml

No se debe ajustar el pH. El regulador del tanque inferior puede ser reusado 4 o 5 veces, el del tanque superior debe ser descartado cada vez.

3. SOLUCION SALINA DE FOSFATOS (PBS) 0.1 M pH 7.4

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio x 12H ₂ O	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g

Agua bidestilada hasta 1 L
Ajustar el pH a 7.4

4. SOLUCION DE MONOMEROS, ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA

Acrilamida 30 g
Bisacrilamida 0.8 g
H₂O bidestilada hasta 100 ml
Filtrar en papel Whatman 1 y guardar en oscuridad a 4°C

5. REGULADOR DEL GEL DE SEPARACION TRIS-HCl 1.5 M, pH 8.8

Trizma base 18.15 g
Agua bidestilada 90 ml
Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado
Agua bidestilada hasta 100 ml
Filtrar en papel Whatman 1 y guardar en oscuridad a 4°C

6. REGULADOR DEL GEL CONCENTRADOR TRIS-HCl 0.5 M, pH 6.8

Trizma base 3.0 g
Agua bidestilada 40 ml
Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado
Agua bidestilada hasta 50 ml
Filtrar en papel Whatman 1 y guardar en oscuridad a 4°C

7. LAURIL SULFATO DE SODIO (DODECIL SULFATO DE SODIO, SDS) AL 10%

SDS 10 g
Agua bidestilada hasta 100 ml

8. PERSULFATO DE AMONIO AL 10%

Persulfato de amonio 100 mg
Agua bidestilada 1.0 ml
Se prepara al momento de usarse

9. REGULADOR DE TRANSFERENCIA (TRIS 0.025 M, GLICINA 0.192M, pH 8.3 METANOL 20% v/v)

Trizma base	9.07 g
Glicina	43.2 g
Metanol	600 ml
Agua bidestilada	2400 ml

10. REGULADOR DE BLOQUEO

Leche descremada Sveltes (Nestle)	5.0 g
PBS 1X	100 ml

11. SOLUCION GTE (LISIS ALCALINA)

50 mM glucosa	0.9 g
25 mM Tris-HCl	0.303 g
10 mM EDTA	2 ml (0.5 M)
Agua bidestilada	Cbp 100 ml

12. SOLUCION NaOH/SDS

0.2 N NaOH	100 μ l (NaOH 10 N)
1% SDS	500 μ l (SDS 10%)
Agua bidestilada	Cbp 5 ml

13. SOLUCION 5M KAc

5M KAc	29.4 g
HAc glacial	11.5 ml
Agua bidestilada	28.5 ml

14. BUFFER DE ACETATOS 50 mM pH 5

Acetato de sodio	410 mg
Ajustar a pH 5 con Ac. Acético concentrado	
Aforar a 100 ml con Agua bidestilada	

Una forma alterna de prepararlo:

Agregar 74 ml de ácido acético 0.2 M (11.55 ml ac. Acético glacial por litro) y

176 ml de acetato de sodio 0.2 M (27.2 g de acetato de sodio trihidratado por litro)

Agregar 750 ml de agua desionizada y mezclar.

15. SOLUCION REVELADORA DE 3-AMINO-9-ETILCARBAZOL

Disolver bien 40 mg de 3-amino-9-etilcarbazol en 5 ml de DMF

Agregar 95 ml de Buffer de acetatos 50 mM pH 5

Adicionar 50 µl de agua oxigenada al 30% justo antes de usarse

16. SOLUCIÓN MADRE PARA TINCIÓN DE PROTEINAS

Azul de Coomassie R250	2.0 g
Agua bidestilada	200 ml

17. COLORANTE DE TRABAJO PARA TINCIÓN DE PROTEINAS: AZUL DE COOMASSIE AL 0.125% EN METANOL: ACÉTICO: AGUA

Solucion de Azul de Coomassie R250	62.5 ml
Metanol absoluto	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml
Agua bidestilada	137.5 ml

Filtrar en papel Whatman 1

18. DECOLORANTE PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Metanol absoluto	500 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua bidestilada	400 ml

19. SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO

Agregar 1.47 g de CaCl_2 y aforar a 100 ml con agua destilada para CaCl_2 0.1 M (para 50 mM, agregar 0.735 g y aforar a 100 ml).

ANEXO II. SITIO DE RECONOCIMIENTO Y CORTE DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

SacI

← → ↻ rebase.neb.com/cgi-bin/reb_get.pl



GOLD STANDARD

SacI

Type II restriction enzyme
subtype: P

Recognition Sequence: [help?](#)
GAGCT⁺C

5' .. G A G C T ↓ C .. 3'
3' .. C ↑ T C G A G .. 5'

HindIII

← → ↻ rebase.neb.com/rebase/enz/HindIII.html



GOLD STANDARD

HindIII

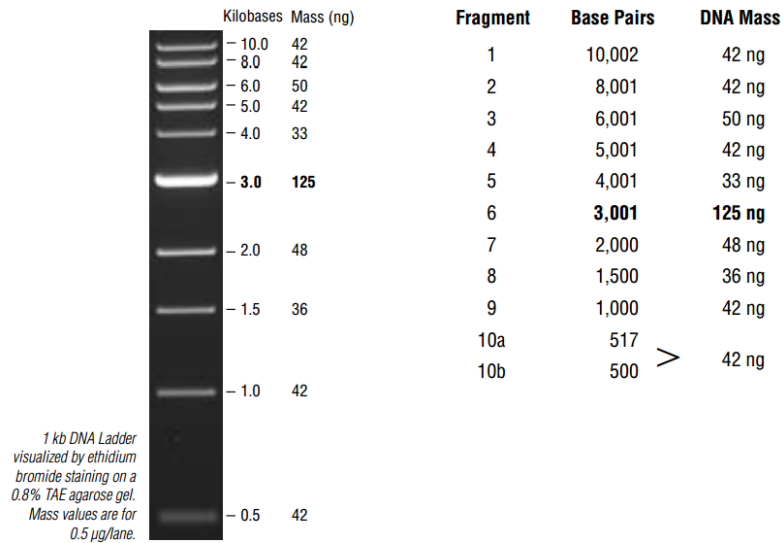
Type II restriction enzyme
subtype: P

Recognition Sequence: [help?](#)
A⁺AGCTT

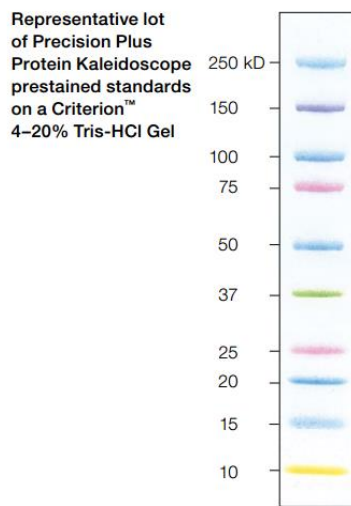
5' .. A ↓ A G C T T .. 3'
3' .. T T C G A ↑ A .. 5'

ANEXO III. INSERTOS DE MARCADORES DE PESO MOLECULAR

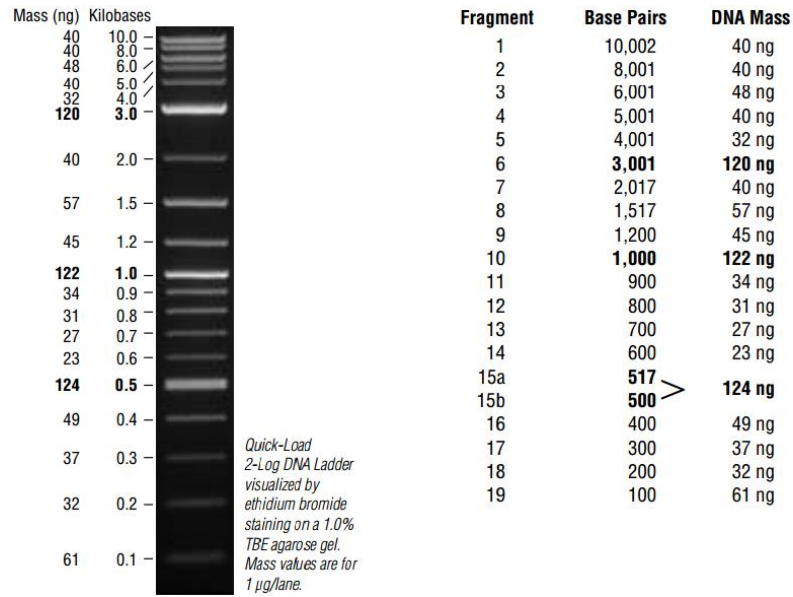
1) Quick-Load® 1 kb DNA ladder



2) Precision Plus Protein Kaleidoscope™ de Biorad®



3) Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)



ANEXO IV. ABREVIATURAS.

A: Amperes

CP: Células de Paneth

DHT: Hipersensibilidad tipo tardía

DMSO: Dimetil sulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

EC: Enfermedad de Crohn

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

EII: Enfermedades inflamatorias intestinales

GTE: Glucosa-tris-EDTA

HED: Host expression dependant (Expresion dependiente del hospedero)

HSP: Proteína de choque térmico

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon Gamma

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kb: Kilobases

KDa: Kilo Daltons

LB: Luria Bertani

M: Molar

MAP: *Mycobacterium avium subespecies paratuberculosis*

MDM: Macrófagos derivados de monocitos

MOP: Proteincinasas activadas por mitógenos

MPM: Marcador de peso molecular

NK: Natural Killers (Células Asesinas Naturales)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Buffer salino de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

PKC: Protein cinasa C

PTBC: Paratuberculosis

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

SDS: Duodecil Sulfato de Sodio (Lauril Sulfato de Sodio)

TCR: Receptor de linfocitos T

V: Volts

WB: Western Blot