



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN
ANIMAL SUSTENTABLE

**Producción de las proteínas recombinantes RpfB,
RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp.**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

I.B. Jessica Saldaña Zepeda

Co Dirigido por

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

M.C. Susana Flores Villalva

Asesores

Dr. Feliciano Milián Suazo

Dra. Elba Rodríguez Hernández

M.S.P.A.S. Yezenia Rubio Venegas

Santiago de Querétaro, Qro., 01 de noviembre del 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE



**Producción de las proteínas recombinantes RpfB,
RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp.**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

I.B. Jessica Saldaña Zepeda

Co Dirigido por

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

M.C. Susana Flores Villalva

Asesores

Dr. Feliciano Milián Suazo

Dra. Elba Rodríguez Hernández

M.S.P.A.S. Yezenia Rubio Venegas

**Campus Juriquilla
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2017**



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Producción de las proteínas recombinantes RpfB, RipA,
ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en
Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta
I.B. Jessica Saldaña Zepeda

SINODALES

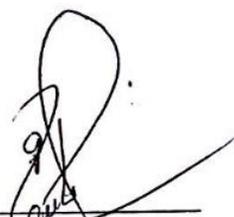
Dr. Germinal J. Cantó Alarcón
Presidente.

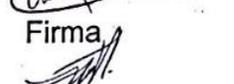
M. C. Susana Flores Villalva
Secretario.

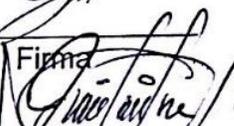
Dr. Feliciano Milián Suazo
Vocal.

Dra. Elba Rodríguez Hernández
Suplente.

M.S.P.A.S Yezenia Rubio Venegas
Suplente.


Firma

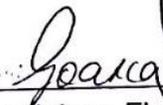

Firma


Firma


Firma


Firma


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2017
México

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad bacteriana crónica del ganado causada por *Mycobacterium bovis*. El interés mundial en su control y erradicación se justifica debido a que genera pérdidas económicas importantes, además del riesgo que representa en la salud pública. La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, sin embargo, debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico, es necesario incorporar nuevos métodos que permitan mejorar su sensibilidad, especificidad y rapidez. La identificación de proteínas de secreción de *M. bovis* que indican la infección en el hospedero bovino, sería de utilidad en el diseño de nuevos métodos de diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue la producción recombinante y expresión de las proteínas extracelulares y de secreción, RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp. Con este propósito los genes correspondientes se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* y clonados en los vectores de expresión seleccionados. Después de optimizar las condiciones de expresión de las proteínas, se logró obtener cantidad suficiente de RpfB (4,104 µg/L de cultivo), ESAT-6 (8,282 µg/L de cultivo) y CFP-10 (2,093 µg/L de cultivo) para realizar diversos ensayos. En el caso de RipA, el rendimiento fue menor (495 µg/L de cultivo), por lo que se realizó un cultivo a gran escala con el fin de obtener la cantidad necesaria de esta proteína para su evaluación, no obstante, si se determina su utilidad se sugiere emplear un sistema de expresión alternativo. Las proteínas recombinantes mencionadas podrán utilizarse en la producción de anticuerpos, los cuales tienen gran potencial en la identificación de antígenos de *M. bovis* en suero y/o tejidos de bovinos infectados.

(Palabras clave: Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, proteínas de secreción, proteínas recombinantes)

SUMMARY

Bovine tuberculosis is a chronic bacterial disease of cattle caused by *Mycobacterium bovis*. The global interest in its control and eradication is justified because it generates important economic losses, in addition to the risk that it represents for public health. The identification and early elimination of diseased animals is the basis of the programs for the eradication of bovine tuberculosis, however, due to the limitations of the diagnosis, it is necessary to incorporate new methods to improve its sensitivity, specificity and speed. The identification of *M. bovis* secretion proteins indicating infection in the bovine host would be useful in the design of new diagnostic methods. The objective of this work was the recombinant production and expression of extracellular and secretory proteins RpfB, RipA, ESAT-6 and CFP-10 of *Mycobacterium* spp. For this purpose the corresponding genes were amplified by PCR from genomic DNA of *M. tuberculosis* and cloned into the selected expression vectors. After optimizing the expression conditions of the proteins, they were produced and sufficient RpfB (4,104 µg / L culture), ESAT-6 (8,282 µg / L culture) and CFP-10 (2,093 µg / L of culture) to perform several tests. In the case of RipA, the yield was lower (495 µg / L of culture), so it was necessary to perform a large scale culture to obtain the necessary amount of this protein for evaluation, however, if its usefulness is determined it is suggested to employ an alternative expression system. The recombinant proteins mentioned may be used for the production of antibodies, which have great potential in the identification of *M. bovis* antigens in infected bovine serum and / or tissues.

(Key words: Bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, secretion proteins, recombinant proteins)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos y con especial cariño a mi tutor y co-director de tesis, el Dr. Germinal J. Cantó Alarcón. Primero por creer en mí, aceptándome bajo su dirección, y por el apoyo, confianza y comprensión brindados durante mis estudios de posgrado.

A mi co-directora, la maestra Susana Flores Villalva por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por haber compartido su tiempo y conocimientos pero sobre todo por su paciencia y dedicación en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Elba Rodríguez Hernández, al Dr. Feliciano Milián Suazo y a la Maestra Yezenia Rubio Venegas por formar parte de mi Comité Tutoral, por el tiempo dedicado y por sus importantes aportaciones al presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) el apoyo económico otorgado a través de la Beca para Estudios de Maestría # 425069.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1	GENERALIDADES DE LAS MICOBACTERIAS.....	2
2.2	ENFERMEDADES OCASIONADAS POR MICOBACTERIAS	4
2.3	TUBERCULOSIS BOVINA	5
2.3.1	Transmisión	7
2.3.2	Periodo de incubación y respuesta inmune	9
2.3.3	Signos clínicos	10
2.3.4	Control	11
2.4	DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	12
2.5	FACTORES DE VIRULENCIA.....	13
2.5.1	Antígenos de secreción celular	14
2.5.2	Factores de virulencia de superficie celular	18
2.6	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	19
III.	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GENERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
IV.	METODOLOGÍA	23
4.1	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	23

4.2	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>M. tuberculosis</i> Y PCR.....	24
4.3	CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	24
4.4	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	26
4.4.1	Evaluación de inductor.....	26
4.4.2	Western blot.....	27
4.4.3	Fraccionamiento del extracto celular	27
4.4.4	Solubilización de los cuerpos de inclusión.....	28
4.5	PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	28
V.	RESULTADOS.....	30
VI.	DISCUSIÓN	36
VII.	CONCLUSIONES	41
VIII.	LITERATURA CITADA.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Secuencias de oligonucleótidos diseñados	23
2. Protocolo de expresión de las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Situación de la tuberculosis bovina en México, 2017	7
2. Vías de transmisión de <i>M. bovis</i>	8
3. Electroforesis en agarosa de la amplificación por PCR en gradiente de temperatura	30
4. SDS-PAGE y Western blot de los extractos totales de los cultivos antes y después de la inducción de la expresión	31
5. SDS-PAGE de la inducción de la expresión de las proteínas RipA y ESAT-6	32
6. SDS-PAGE de la inducción de la expresión de las proteínas RpfB y CFP-10	32
7. SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles	33
8. SDS-PAGE de la purificación de las proteínas	34

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta al ganado y es causada por *M. bovis*. El interés mundial en el control y erradicación de la TBb se justifica debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona (Hawn et al., 2014), en México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan solo por el desecho de ganado enfermo (SAGARPA, 2011). Se estima además que la TBb disminuye la producción de leche en un 17%, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta en 15% y la fertilidad en un 6%. Por otra parte, la exportación de ganado bovino a los Estados Unidos de América, se ve afectada por la presencia de esta enfermedad, lo que representa una pérdida de divisas de 450 millones de dólares anuales (SAGARPA, 2011). La TBb tiene además carácter zoonótico, por lo que adquiere gran importancia en salud pública (Hewinson et al., 2006). La identificación y eliminación temprana de los animales enfermos es la base de los programas de erradicación de la tuberculosis alrededor del mundo. Una de las limitantes centrales en el control de la tuberculosis es la falta de métodos de diagnóstico confiables y rápidos para determinar infecciones por *M. bovis* en los animales; por lo que es necesario el diseño de métodos novedosos con los que se logre realizar el diagnóstico específico y rápido (Pai et al., 2008). La identificación de proteínas de secreción de *M. bovis* que indican la infección en el hospedero bovino sería de utilidad en el diseño de nuevos métodos diagnósticos y el control de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue la producción recombinante y expresión de las proteínas de secreción RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp., como una primera aproximación a la caracterización de moléculas candidatas para métodos de diagnóstico de la TBb. Las perspectivas del estudio se enfocan en utilizar las proteínas recombinantes en un set de moléculas útiles, ya sea en la producción de anticuerpos, los cuales tienen potencial de ser utilizados en la identificación de antígenos de *M. bovis* en suero y/o tejidos de bovinos infectados, o podrían ser utilizados como antígenos que permitan la inmunodetección de anticuerpos en sueros de animales infectados, lo anterior como un primer acercamiento para el diseño de un nuevo método de diagnóstico de la enfermedad.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LAS MICOBACTERIAS

El orden de los Actinomycetales incluye la familia Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Nocardiaceae y Streptomyetaceae. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género: *Mycobacterium*. El término *Mycobacterium* significa hongo-bacteria, esta denominación se debe al aspecto de los cultivos, que en ciertas formas recuerdan a los de los hongos (Dorronsoro y Torroba, 2007). Las especies que pertenecen al género *Mycobacterium* son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, de morfología variable (bacilar o cocoide), que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula (Godoy et al., 2008; Hansen et al., 2014).

Debido a la composición de su pared celular, las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, siempre que estén protegidos de la luz solar, además son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Las micobacterias resisten la desecación y la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (>65 °C durante 30 minutos) las inactiva, lo que también sucede con el calor de la pasteurización y determinados productos como el óxido de etileno, formaldehído, etanol (70%), glutaraldehído (2%), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado, entre otros (Pfyffer, Brown-Elliott y Wallace, 2003).

La pared celular micobacteriana es una estructura compleja, con múltiples capas cerosas lo que hace a las micobacterias fuertemente hidrofóbicas, muy resistentes a agentes químicos y con una reducida permeabilidad a los diferentes colorantes (Nikaido y Jarlier, 1991; Jarlier y Nikaido, 1994; Chatterjee, 1997; Brennan, 2003). La pared micobacteriana se encuentra conformada por cuatro capas, la más interna es el glicopéptido o peptidoglicano, la cual es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez (Ramírez et al., 2002).

Hacia el exterior, se encuentran otras tres capas compuestas, la primera compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa, la segunda por ácidos micólicos, a los cuales se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura (Ramírez et al., 2002; Gorocica et al., 2005). La tercera capa se encuentra formada por lípidos como los sulfolípidos, que se caracterizan por estar altamente glicosilados, lo que da lugar a moléculas como los lipoarabinomananos (LAM) (Ramírez et al., 2002), estas se extienden desde la membrana plasmática hasta la superficie celular y tienen un papel fundamental en la patogénesis de la bacteria (Gorocica et al., 2005).

En general, las necesidades nutritivas de las micobacterias son sencillas, requieren una fuente de carbono y nitrógeno, así como determinadas sales minerales. La temperatura óptima de crecimiento general en micobacterias suele ser de 35 a 37 °C, aunque esta puede variar ampliamente según la especie. Por otro lado, su crecimiento se ve estimulado por la presencia de CO₂ y ácidos grasos; un caso aparte es *Mycobacterium leprae* que sólo es capaz de crecer en cultivos celulares (Pfyffer et al., 2003).

Algunas especies pueden ser difíciles de cultivar y les puede llevar más de dos meses desarrollarse en cultivo. También pueden tardar más de 20 días para completar su ciclo de división, por lo que las micobacterias que forman colonias claramente visibles a corto plazo (en un período de 7 días) se denominan de crecimiento rápido, mientras que las que requieren períodos prolongados en su desarrollo se denominan de crecimiento lento (Ryan y Ray, 2010). Las micobacterias poseen un genoma con alto contenido de G + C (61-71%) (Hansted et al., 2007; Godoy et al., 2008). Esto es compartido por otros géneros relacionados que también poseen ácidos micólicos en la pared celular, como son *Gordona*, *Tsukamurella*, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Godoy et al., 2008).

2.2 ENFERMEDADES OCASIONADAS POR MICOBACTERIAS

Las micobacterias son un grupo de microorganismos de gran importancia clínica, ya que existen múltiples especies que son agentes causales de diversas infecciones humanas con una importante morbilidad y mortalidad. Algunas enfermedades, como la tuberculosis y la lepra, han ido ligadas a la historia del hombre. A pesar de los esfuerzos realizados para su control, en la actualidad constituyen uno de los problemas sanitarios de mayor gravedad a nivel mundial (Alcaide et al., 2005). Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies (Jiménez-Pajares, 2005; Dorronsoro y Torroba, 2007). Anteriormente, según la velocidad de crecimiento, la morfología y capacidad de pigmentación de las colonias en medios sólidos, las micobacterias se dividieron en diversos grupos: por su velocidad de crecimiento (lento y rápido), por otro lado, se combinaba la posibilidad de no producir pigmento (no cromógenas) o hacerlo en ausencia (escotocromógenas) o presencia de la luz (fotocromógenas). Aunque esta clasificación tiene cierta utilidad microbiológica, en la actualidad, ante la incesante aparición de nuevas especies y las diferentes características fenotípicas que algunas de ellas pueden adoptar, se prefiere realizar una individualización al nivel de especie. Con fines prácticos se establecen tres grupos en función de la entidad nosológica producida: tuberculosis, lepra y las micobacterosis (Alcaide et al., 2005).

La tuberculosis es una enfermedad sistémica, crónica, que afecta principalmente al sistema respiratorio, es causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) (Müller et al., 2013). Los signos clínicos de la tuberculosis pueden tardar meses o años en aparecer, como es el caso de infecciones latentes que se reactivan en situaciones de inmunosupresión (Bezoz et al., 2013). El nombre tuberculosis, se debe a la descripción que en 1680 hizo Silvius en relación a los tubérculos que existían cuando se presentaba dicha enfermedad (Valdivieso y Paola, 2008). El MTC está constituido por un grupo de micobacterias potencialmente patógenas en hombres y animales (Dorronsoro y Torroba, 2007),

los miembros de este complejo comparten 99,95% de identidad a nivel de ADN (Fleischmann et al., 2002) pero poseen una amplia variabilidad fenotípica en cuanto a sus huéspedes, tipo y gravedad de la enfermedad (Chaves et al., 2010). El MTC incluye a *M. tuberculosis*, que afecta a humanos y primates; *M. africanum*, especie causante de tuberculosis humana en el continente africano; *M. bovis*, que infecta principalmente al ganado bovino, además de humanos y otros mamíferos y *M. microti* a pequeños roedores. Posteriormente se propuso incluir subespecies como: *M. cannetti*, una subespecie de *M. tuberculosis* reportada en tuberculosis humana (Richter et al., 2003); *M. caprae*, que infecta al ganado caprino; y *M. pinnipedii*, la especie que causa tuberculosis en pinnípedos (Leão et al., 2004; Herrera-León et al., 2009).

2.3 TUBERCULOSIS BOVINA

La TBb es causada por *M. bovis*, afecta principalmente al ganado (Müller et al., 2013; Torres-Gonzalez, 2013), sin embargo todos los mamíferos, pueden ser huéspedes de esta micobacteria. A nivel mundial, la mayor parte de los casos de tuberculosis zoonótica se deben a *M. bovis*, se calcula que en ciertos países hasta un 10% de los casos de tuberculosis humana son debidos a este patógeno (OIE, 2012) y en menor grado a *M. caprae* (Müller et al., 2013). En algunos países se ha identificado *M. caprae* como una causa frecuente de tuberculosis en bovinos (Prodinger et al., 2005). También se ha registrado la propagación de *M. bovis* de persona a persona (Vaillaud, 1966; Wigle et al., 1972; Collins, Yates y Grange, 1981; Schönfeld, 1982; LoBue et al., 2004).

La TBb es de distribución mundial, aunque es más frecuente en países subdesarrollados. La prevalencia más elevada se registra en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia y América (OIE, 2012). En México, antes de 1992 la prevalencia de la TBb era prácticamente desconocida; sin embargo, a partir del reconocimiento de regiones en Fase de Erradicación de 1994 por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

(SAGARPA), como resultado de las primeras actividades de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina, se establecieron regiones o estados con una prevalencia menor al 2%. Actualmente, las estrategias de la campaña se basan en reducir la prevalencia de la enfermedad en las zonas "A" en estados con reconocimiento internacional o en fase de erradicación, estas zonas están pobladas principalmente por ganado bovino de carne. Las zonas "A" tienen una prevalencia <0.5% y se consideran "en proceso de erradicación". Estas regiones de baja prevalencia han disminuido este parámetro de 0.5% a 0.01% como respuesta a las exigencias del mercado de exportación de becerros. Actualmente, estas incluyen el 85.77% del territorio nacional (SENASICA, 2017) (Figura 1).

El resto del territorio nacional se reconoce por zonas pobladas por ganado lechero, de carne o mixto y zonas que aún no tienen el reconocimiento internacional o nacional, denominadas "B" (SENASICA, 2017). Las zonas "B" ubicadas en las áreas lecheras comprenden 5% del país y el resto (11.65%) comprenden zonas no reconocidas pero integradas mayormente por ganado mixto y de carne susceptibles a ser reconocidas. Estas zonas tienen una prevalencia cuyo rango oscila entre el 1 y el 14.2% (SENASICA, 2017). Actualmente, la prevalencia de la TBb en el ganado en países desarrollados ha sido reducida a niveles mínimos; varios países de Europa y América del Norte, así como Australia, están libres de la enfermedad o a punto de erradicarla totalmente del ganado (Thoen, Hchzemeyer y Himes, 2009), sin embargo, los reservorios existentes en la fauna silvestre pueden dificultar su completa erradicación, debido a que *M. bovis* puede infectar a una amplia variedad de estos animales que pueden actuar como huéspedes reservorios capaces de mantener y diseminar la infección mediante la transmisión intraespecies, o de huéspedes incidentales, cuando la infección no se mantiene en su población (FAO, 2008).

La variedad de animales domésticos y de vida silvestre que sirven como huéspedes y reservorios de la infección cambia según la región. La bacteria ha sido aislada en búfalos, bisontes, ovejas, cabras, caballos, camellos, cerdos, jabalíes,

ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, cudús, elanes, tapires, alces, elefantes, sitatungas, rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo o el lince (OIE, 2012). Las repercusiones económicas de la TBb, se concentran en las pérdidas económicas, debido a las pérdidas en la producción de leche y carne, los decomisos de animales en mataderos, la prohibición del movimiento de los animales y por las campañas de control y erradicación (Spickler et al., 2011). En consecuencia, la TBb es un factor que limita el desarrollo de la industria lechera y de la carne en el comercio internacional, por lo que es esencial controlar y erradicar esta enfermedad (Blanco et al., 2011).



Figura 1. Situación de la tuberculosis bovina en México, 2017. Fuente: SENASICA, 2017.

2.3.1 Transmisión

El mecanismo de transmisión más importante en micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* es la vía aérea. El enfermo tuberculoso, al hablar, estornudar y sobre todo, toser, elimina múltiples gotas aerosolizadas y cargadas de

bacilos. Sin embargo, tan sólo las gotas de 1-5 μm son las que tienen capacidad infecciosa real, al poder alcanzar la región alveolar. Otros mecanismos de transmisión reconocidos son la vía digestiva (ingestión de leche no pasteurizada), urogenital, cutáneo-mucosa, inoculación y transplacentaria (Alcaide et al., 2005; Müller et al., 2013; Torres-Gonzalez et al., 2013). El papel de la ingestión de carne contaminada nunca ha sido dilucidado sistemáticamente, a pesar de que se ha incluido como un elemento de los programas de control de la enfermedad (Enarson, 2006); la transmisión de persona a persona es poco frecuente. Con menor frecuencia, los humanos han contagiado al ganado bovino a través de aerosoles o la orina. *M. bovis* puede sobrevivir varios meses en el medio ambiente, particularmente en lugares fríos, oscuros y húmedos (Spickler et al., 2011) (Figura 2).

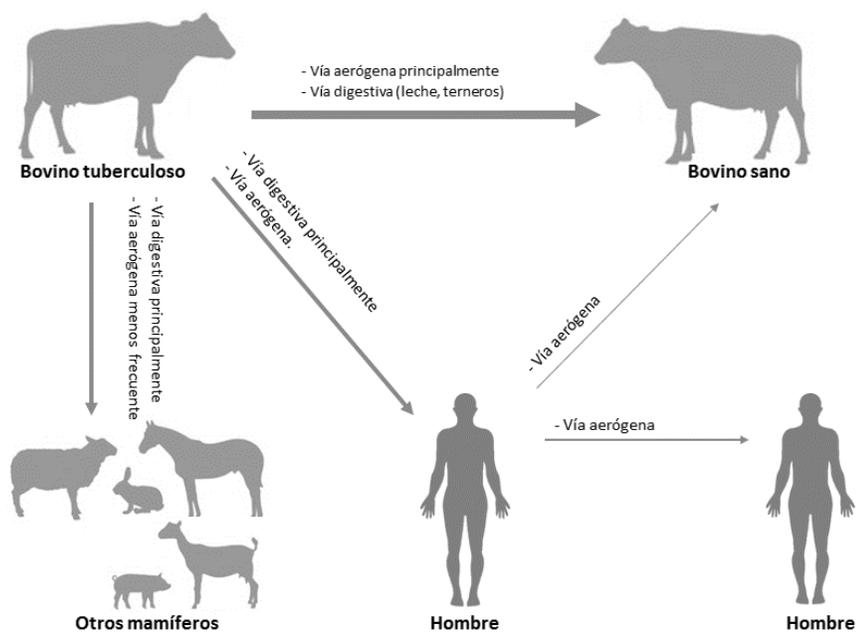


Figura 2. Vías de transmisión de *M. bovis*. Modificado de Garbaccio, s.f.

2.3.2 Período de incubación y respuesta inmune

Los síntomas de la tuberculosis generalmente tardan meses en desarrollarse en el ganado. Las infecciones también pueden permanecer latentes durante años y reactivarse durante períodos de estrés o en animales viejos (Spickler et al., 2011). Se han identificado cuatro etapas que describen el desarrollo de la enfermedad causada por *M. bovis*: la primera se inicia con la entrada del bacilo al organismo (ya sea por vía aerógena o por ingesta de productos contaminados), después los macrófagos y células dendríticas fagocitan al bacilo y lo encapsulan con el fin de formar un fagosoma, el cual es internalizado al citoplasma, donde se une al lisosoma y se obtiene un fagolisosoma que contiene una gran cantidad de lisozimas capaces de formar poros en la pared bacteriana que destruyen al bacilo, cuando la micobacteria evade a este mecanismo, se multiplica hasta liberarse del macrófago (van Crevel, Ottenhoff y van der Meer, 2002).

La destrucción de las micobacterias depende de la propiedad microbicida de los fagocitos y además de la virulencia de la micobacteria. (Höner zu Bentrup y Russell, 2001). Actualmente se sabe que *M. bovis* ha desarrollado la capacidad de evitar la formación del fagolisosoma para evadir el primer ataque de la respuesta inmune, de tal forma que puede crecer y desarrollarse dentro de los macrófagos por períodos prolongados y permanecer latente mientras espera un estado de inmunosupresión del huésped y adquiere la capacidad de desarrollarse y establecer la enfermedad (van Crevel et al., 2002).

En la segunda etapa, cuando los macrófagos han fagocitado al bacilo se secretan citocinas y otras sustancias proinflamatorias, como el interferón gamma (IFN- γ), la cual incrementa la capacidad fagocítica y microbicida de los macrófagos (de Vallière et al., 2005), además de ejercer un efecto inhibitorio sobre la multiplicación del bacilo (Banchereau et al., 2000); sin embargo, una respuesta inflamatoria excesiva puede establecer un estadio crónico que puede lesionar tejido sano y favorecer con esto la formación de granulomas y la diseminación del bacilo (van Crevel et al., 2002; Russell, 2007). Con el objetivo de evitar una respuesta

inflamatoria exacerbada, los macrófagos también secretan citocinas inmunorreguladoras con propiedades antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL10, que ayudan a detener la inflamación, inducir la regeneración tisular y a promover la generación de anticuerpos, apagando la respuesta celular para disminuir el daño a tejido sano (Mosser y Edwards, 2008). Así mismo, el macrófago sintetiza peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y óxido nítrico (NO), los cuales causan oxidación de los compuestos de la pared bacteriana (Liébana et al., 2000). Los macrófagos también actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) y cuando la micobacteria es procesada eficientemente, las moléculas antigénicas del bacilo son convertidas en péptidos pequeños, los cuales presentarán bajo el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II al receptor de los linfocitos T CD8 y CD4, respectivamente, lo que indica que debe ser destruida ya que funciona como reservorio de la infección y de esta manera evitar la diseminación de la micobacteria (Raja, 2004).

En la tercera etapa hay un crecimiento exponencial de las micobacterias y para inhibir el crecimiento extracelular de la micobacteria hay necrosis en el granuloma (Russell, 2007). La cuarta etapa tiene lugar cuando la infección aún no ha sido controlada, con la formación del tejido fibroso alrededor del granuloma, esto con la finalidad de evitar que la infección sea diseminada a otros órganos (van Crevel et al., 2002; Russell, 2007).

2.3.3 Signos clínicos

La tuberculosis generalmente es una enfermedad crónica y debilitante, pero en ocasiones puede ser aguda y de rápido desarrollo, con infecciones tempranas que suelen ser asintomáticas. En la fase tardía, los síntomas frecuentes son emaciación progresiva, fiebre baja fluctuante, debilidad y falta de apetito. Los animales cuyos pulmones se encuentran comprometidos generalmente presentan tos húmeda que empeora en la mañana, durante el clima frío o al hacer ejercicio, ocasionalmente se presenta disnea o taquipnea. En algunos animales los ganglios

linfáticos retrofaríngeos u otros ganglios linfáticos se agrandan, se pueden abrir y supurar; al agrandarse los ganglios linfáticos, pueden obstruir los vasos sanguíneos, las vías respiratorias o el tubo digestivo. Si se ve comprometido el tracto digestivo, se puede observar diarrea intermitente y estreñimiento (Spickler et al., 2011).

La TBb se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas, denominadas tubérculos, en los órganos comprometidos. Los que generalmente son amarillentos y caseosos, calcáreos o calcificados y encapsulados. En los bovinos, los tubérculos se encuentran en los nódulos linfáticos, particularmente los que se encuentran en la cabeza y el tórax. También son frecuentes en los pulmones, bazo, hígado y las superficies de las cavidades corporales. En países con buenos programas de control, el ganado infectado generalmente presenta pocas lesiones a la necropsia. La mayoría de estas lesiones aparecen en los linfonodos asociados con el sistema respiratorio. Sin embargo, las lesiones pequeñas habitualmente se pueden descubrir en los pulmones de estos animales si se seccionan los tejidos. La gravedad de la enfermedad varía según la dosis y virulencia del agente infeccioso y la inmunidad individual. Los animales infectados permanecen asintomáticos, se enferman únicamente después de sufrir estrés o envejecer; o bien, desarrollan una enfermedad crónica, debilitante y mortal. En los países desarrollados, la mayoría de los reactores se detectan durante análisis de rutina y la mortalidad es poco frecuente (Spickler et al., 2011).

2.3.4 Control

Como medidas de control, se utilizan estrategias como la identificación de animales infectados, eliminación y sacrificio, cuarentena de los hatos, y decomiso de órganos y canales (López et al., 2006). La tuberculosis es una enfermedad difícil de controlar debido a la gran cantidad de especies susceptibles, la variación en la patogénesis y la limitada eficacia de los métodos de control actualmente disponibles para los animales salvajes (Kaneene, 2006). El control efectivo requiere una comprensión de la epidemiología de la infección en el sistema ecológico que puede incluir especies de animales domésticos, así como salvajes. También se ve afectado

por las prácticas de gestión en el sistema de producción ganadera, así como las consideraciones sociales hacia la aplicación del control de especies reservorio de animales salvajes (Kaneene, 2006). La introducción de pasteurización de la leche en 1940 se postuló como explicación de una fuerte aceleración en el descenso de la tuberculosis. Desde la perspectiva de salud pública, los programas de erradicación en el ganado y la pasteurización de la leche son los pilares de la prevención de una enfermedad en seres humanos transmitida por bovinos. Además de estas medidas, se debe educar a la población para explicar los peligros del consumo de productos lácteos no pasteurizados en áreas donde la enfermedad de *M. bovis* en humanos es más común (LoBue, 2006). La higiene y la desinfección pueden reducir la propagación del agente dentro del grupo. *M. bovis* es relativamente resistente a los desinfectantes y se inactiva con un tiempo prolongado, también es susceptible al calor húmedo de 121 °C durante un mínimo de 15 minutos (Spickler et al., 2011).

La aparición de *M. bovis* en reservorios de la fauna silvestre complica la tarea de erradicación; el sacrificio reduce la densidad de la población y puede disminuir la transmisión. Actualmente no hay vacunas disponibles contra la TBb en el ganado. Se han intentado tratamientos con antimicrobianos en algunas especies, pero éstos deben ser a largo plazo y pueden producirse mejoras clínicas sin que se produzca la cura bacteriológica. El riesgo de que no se eliminen organismos peligrosos para los humanos y la posible resistencia al fármaco dificultan el tratamiento. En algunos países, éste puede ser ilegal (Spickler et al., 2011).

2.4 DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

La TBb es una enfermedad que durante las etapas temprana e intermedia de la infección provoca predominantemente una respuesta inmune mediada por células, que es conducida principalmente por los linfocitos T helper (Th) de clase 1. A medida que la enfermedad progresa, un cambio de Th1 a Th2 se asocia con una disminución de respuesta inmune mediada por células y el desarrollo de respuestas

serológicas (Schiller et al., 2010). Debido a esto, las principales técnicas de diagnóstico se basan en la detección de la respuesta inmune mediada por células: La prueba cutánea de la tuberculina intradérmica y el ensayo del IFN- γ son las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la TBb en los programas de erradicación en todo el mundo (Casal et al., 2012).

Tanto la prueba cutánea de la tuberculina intradérmica como el ensayo del IFN- γ , se basan en la respuesta celular inmunitaria del animal infectado, hacia el derivado proteico purificado (PPD). El PPD es el reactivo convencional que actualmente se utiliza, es una mezcla escasamente definida de proteínas, lípidos y carbohidratos obtenidos a partir de un cultivo de la cepa AN5 de *M. bovis* (OIE, 2011). Ambas pruebas presentan un problema de reactividad cruzada antigénica del PPD con *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), lo que resulta en una escasa especificidad en las poblaciones vacunadas con BCG (Liu et al., 2004). El PPD carece de especificidad también debido a que algunos de sus componentes antigénicos están presentes en micobacterias ambientales no patógenas (Dunn et al., 2005).

2.5 FACTORES DE VIRULENCIA

En la actualidad no se conoce con claridad cuáles son los principales factores de virulencia de las bacterias patógenas pertenecientes al género *Mycobacterium*. Esto se debe a que los patógenos de este género no tienen los factores de virulencia clásicos que poseen otras bacterias patógenas (Smith, 2003), pero gracias a la combinación de diferentes estrategias experimentales, como el desarrollo de métodos para crear mutaciones en genes específicos, así como la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* y *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Marri, Bannantine y Golding, 2006), ha sido posible el estudio de la fisiología y la patogenicidad de estos microorganismos (Ryndak, Wang y Smith, 2008).

La genómica ha hecho posible la elucidación del mapa genético completo de *M. bovis* (Garnier et al., 2003) y *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998), lo que ha proporcionado importantes conocimientos sobre las relaciones evolutivas y los factores de virulencia que subyacen a la base molecular de la enfermedad (Braunstein, Bardarov y Jacobs, 2002). Un hallazgo importante del proyecto de secuenciación del genoma de *M. bovis* (4.345.492 pb en el aislado virulento bovino AF2122 / 97) es que mostró ser una versión reducida del genoma de *M. tuberculosis* (4.411.532 pb en el aislado humano H37Rv), con más de 99,95% de identidad (Thoen y Barletta, 2006). Por otra parte, *M. bovis* no tiene ningún material genético nuevo en comparación con *M. tuberculosis*, por lo tanto, las deleciones de ADN en *M. bovis* son los principales contribuyentes a estas diferencias, aunque también se han encontrado más de 2000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Sin embargo, un análisis genómico comparativo indica que los cambios del genoma menores tienen un profundo efecto en el fenotipo. Por ejemplo, una mutación puntual en *M. bovis* es responsable de su resistencia a la pirazinamida (Thoen y Barletta, 2006). A la fecha se ha logrado identificar una serie de genes relevantes para la virulencia de *Mycobacterium* que se han agrupado en base a su función en distintos tipos: Envoltura y secreción celular, componentes de superficie celular, productos involucrados en la síntesis o del metabolismo celular, incorporación de metales y reguladores transcripcionales asociados a la patogenicidad (Smith, 2003; Maulén, 2011).

2.5.1 Antígenos de secreción celular

Este grupo se refiere a las proteínas expuestas al medio ambiente en que crece *M. tuberculosis* (dentro del micofagosoma), tales como las CFPs (*Culture Filtrate Proteins*), que se encuentran en el medio de cultivo o asociadas a células. Se conocen alrededor de doscientas proteínas de este tipo (KatG, SodA, HspX, ESAT6/CFP-10, 19 kDa, Glutamina sintasa, entre otras) (Maulén, 2011). ESAT-6 y CFP-10 han recibido mucha atención en los últimos años debido a que son antígenos altamente inmunogénicos secretados tempranamente por el

MTC, y por lo tanto pueden ser empleados para el diagnóstico de la tuberculosis en humanos y animales (Abdallah et al., 2007). Las proteínas de secreción ESAT-6 (secretion of early secretory antigenic 6 kDa) o Rv3875 y CFP-10 (culture filtrate protein 10) o Rv3874 (Vordermeier et al., 2001) son secretadas por el sistema de secreción ESX-1 (tipo VII) (Abdallah et al., 2007; Brosch et al., 2002). ESX-1 resulta crítico en la virulencia micobacteriana (Brosch et al., 2002; Shiloh y Champion, 2010) y media la exportación de factores de virulencia que desarman al macrófago permitiéndole modular la respuesta inmune innata del hospedero en las primeras etapas de la infección (Maulén, 2011).

ESX-1 se encuentra codificado en la región de diferencia 1 (RD-1) del cromosoma de *M. tuberculosis* (Abdallah et al., 2007; Brosch et al., 2002). Esta región fue eliminada de manera natural en la cepa vacunal BCG como consecuencia de los múltiples pases a que ha sido sometida durante su conservación (Abdallah et al., 2007). La delección de RD1 se dio antes de 1921, cuando la BCG fue distribuida a nivel internacional para su uso como vacuna. Por lo tanto, RD1 se encuentra ausente de todas las cepas de *M. bovis* BCG, así como de *Mycobacterium avium* y la mayoría de micobacterias ambientales, pero está presente en las especies y subespecies del complejo *M. tuberculosis*, lo que incluye a todos los aislados clínicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Bottai y Brosch, 2009). En RD1 hay diez marcos de lectura abiertos (ORF) estos ORF abarcan desde Rv3870 hasta Rv3879 (Behr et al., 1999).

Cuando ESAT-6 y CFP-10 son utilizados como antígenos de diagnóstico, tienen la capacidad de diferenciar individuos infectados con *M. tuberculosis* y *M. bovis* de los vacunados con BCG (Arend et al., 2000) o sensibilizados por otras micobacterias (Buddle et al., 2009; Vordermeier et al., 1999). El uso de estos antígenos en forma de cóctel proteico permite la identificación de un mayor número de animales infectados (Vordermeier et al., 2001). A pesar de la demostración de la alta especificidad del cóctel proteico ESAT-6/CFP-10 en animales vacunados con BCG, la sensibilidad del cóctel proteico en la identificación de animales infectados

es inferior al PPD bovino; por lo tanto es necesaria la identificación de antígenos adicionales con el fin de aumentar la sensibilidad de este cóctel (Vordermeier y Whelan, 2012). En este sentido, el análisis comparativo del transcriptoma ha sido utilizado en la exploración de la relación entre el nivel de expresión de genes y la antigenicidad, con el objetivo de identificar nuevos reactivos con potencial de diagnóstico diferencial (Vordermeier et al., 2012). En los ensayos de inmunogenicidad se seleccionaron los genes que mostraron altos niveles de homología (> 98%) entre *M. tuberculosis* y los ortólogos de *M. bovis*, pero baja identidad con *M. avium*. Estos estudios identificaron un antígeno, Rv3615c, que fue reconocido por una proporción significativa de animales infectados pero no en los animales vacunados con BCG (Sidders et al., 2008), al igual que Rv3020c (Jones et al., 2013), Rv1986, Rv3872 y Rv3878 (Cockle et al., 2002), estos péptidos solo se han detectado en bovinos infectados naturalmente por *M. bovis* y están ausentes en animales vacunados con BCG (Waters et al., 2012). Por lo que estos péptidos son candidatos en el diagnóstico diferencial (Cockle et al., 2002), aunque se requiere profundizar en su eficacia como antígenos diferenciales (Domínguez et al., 2015).

Los bacilos tuberculosos son aeróbicos estrictos, capaces de adaptarse y sobrevivir a un ambiente hipóxico, al entrar en un estado no replicante o de dormancia. Los bacilos dormantes son capaces de mantener su viabilidad durante períodos prolongados de tiempo. Además de ser resistentes a los fármacos antimicobacterianos, por lo tanto, la dormancia podría desempeñar un papel importante en la persistencia de la infección por tuberculosis a pesar de la quimioterapia prolongada (Boon & Dick, 2002). Las micobacterias dormantes logran sobrevivir en un hábitat intracelular durante años, sólo para reactivarse, crecer y causar una recaída en la enfermedad activa del huésped (Boshoff & Barry, 2005).

Es muy probable que la reactivación micobacteriana esté basada en la capacidad que tienen este tipo de bacterias de regular la expansión y remodelación del material de la pared celular, un proceso bacteriano esencial todavía poco

comprendido (Hett et al., 2010). La reactivación de las células dormantes es promovida por una familia de enzimas hidrolasas extracelulares bacterianas de peptidoglicano, específicamente transglicosilasas líticas conocidas como factores promotores de resucitación (Rpfs), capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos esenciales en el mantenimiento de la capa de peptidoglicano (Mukamolova et al., 2006). Los Rpfs son secretados por las micobacterias que se replican lentamente cerca de las bacterias latentes (Cohen-Gonsaud et al., 2005).

La proteína RpfB (Factor Promotor de resucitación B) hidroliza el enlace beta-1,4-glicosídico entre el N-acetil ácido murámico y N- acetil glucosamina (van Asselt, Thunnissen y Dijkstra, 1999), está compuesta por 362 residuos aminoácidos, conformados en un péptido señal (residuos aminoácidos 1-23) y cinco dominios: tres dominios de función desconocida 348 (DUF348) (residuos aminoácidos 26-76, 83-124 y 140-182), cuya función es desconocida; un dominio de adhesión a pared celular, denominado G5 (residuos aminoácidos 194-272); y un dominio catalítico Rpf (residuos aminoácidos 279-356) (Ravagnani et al., 2005; Ruggiero et al., 2011). Hasta ahora se ha demostrado que RpfB interactúa sinérgicamente con RipA (proteína de interacción con Rpf B), una proteína de secreción e invasión (Bhuwan et al., 2016.)

RipA es una endopeptidasa que participa en la separación de las células hijas durante el crecimiento celular, tiene actividad hidrolítica contra varios sustratos de la pared celular (Hett, 2007), como el peptidoglicano hidrolasa y el dipéptido ácido d-glutamil-meso-diaminopimérico (Hett et al., 2008). En ausencia de esta enzima, la bacteria es incapaz de dividirse y presenta un fenotipo anormal (formación de cadenas). RipA está compuesta por 472 residuos aminoácidos, divididos en cuatro diferentes regiones: posee un péptido señal (residuos aminoácidos 1-39); dos dominios con función desconocida, PB07342 (residuos aminoácidos 40-250) y PB015164 (residuos aminoácidos 251-354); y un dominio endopeptidasa, NlpC/P60 (residuos aminoácidos 355-472) (Ruggiero et al., 2010).

Tanto RpfB y RipA localizan el septosoma de la bacteria en división (Hett et al., 2007) y por lo tanto pueden desempeñar un papel en las últimas etapas de la división celular de micobacterias, posiblemente durante el rebrote a partir de un estado de estrés (Hett et al., 2008). La actividad de este complejo RpfB-RipA resulta en un aumento de la hidrólisis de la pared celular, lo que sugiere que la regulación del proceso hidrolisis, se da mediante interacciones proteína-proteína. Sin embargo, aún se desconoce cómo se da la regulación de la interacción entre estas enzimas potencialmente letales y como se da la coordinación de la hidrólisis con la síntesis de pared celular, (Hett et al., 2010).

Aunque los genes necesarios durante la división celular bacteriana, no se consideran formalmente como factores de virulencia, son claramente necesarios en el crecimiento bacteriano y por lo tanto para la patogénesis de las bacterias. La distinción entre genes homeostáticos y de virulencia es imprecisa cuando genes no esenciales que intervienen en la división celular vegetativa, se vuelven esenciales bajo condiciones estresantes específicas dentro del huésped. Tal ejemplo se ve con los factores promotores de resucitación (Rpf) codificados por varios tipos de bacterias, entre las que se encuentran las micobacterias. Estas proteínas se denominan así por su capacidad de resucitar bacterias dormantes no replicantes (Hett et al., 2008).

2.5.2 Factores de virulencia de superficie celular

A pesar de que tradicionalmente los principales factores de virulencia de muchas bacterias son proteínas codificadas por genes contenidos en el cromosoma bacteriano, plásmidos o bacteriófagos, los lípidos de pared celular de micobacterias son considerados como atributos patogénicos sumamente importantes (Gorocica et al., 2005). Acerca del grupo de factores de virulencia de superficie celular se sabe, que son exclusivos de la pared celular de micobacterias patógenas, y que es una estructura compleja y única, que contiene proteínas, lípidos y carbohidratos (Erp, Mas, FadD26, FadD28, MmpL7, FbpA, MmaA4, PcaA, OmpA, HbhA, LAM, entre otros) (Smith, 2003).

El factor de cordón, es el micósido más importante que *M. tuberculosis* produce, recibe este nombre porque hace que el microorganismo se desarrolle en forma de agregados laterales semejantes a cordones. Se ha demostrado que las micobacterias que carecen del factor de cordón no son patógenas. Se sospecha que este factor inhibe la fusión de los lisosomas de los macrófagos con los fagosomas, fenómeno que se considera clave en la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos (De la Parte-Pérez et al., 2001).

2.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La expresión de proteínas recombinantes se ha realizado tanto en células procariotas como en células eucariotas, las primeras son las más conocidas y estudiadas. Dentro de los sistemas procariotas, uno de los modelos de expresión más utilizados ha sido *Escherichia coli*, cuya fisiología ha sido ampliamente estudiada. *E. coli* permite alcanzar densidades celulares elevadas con un medio de cultivo económico, por esta razón existe una gran cantidad de herramientas moleculares y protocolos para la producción a gran escala de proteínas heterólogas, así como una gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes disponibles (Rosano y Ceccarelli, 2014). Sin embargo, *E. coli* presenta ciertos inconvenientes en la síntesis de proteínas recombinantes: debido a que no lleva a cabo procesamientos post-traduccionales propios de células eucariotas, como es el caso de la glicosilación o fosforilación, lo cual afecta a la estructura, estabilidad, solubilidad y actividad biológica de la proteína producida; carece de chaperonas (proteínas de plegamiento) adecuadas que permitan un plegamiento correcto de las proteínas recombinantes, además no forma puentes disulfuro en el citoplasma, salvo en ciertas cepas mutantes (de Marco, 2009).

Uno de los problemas más comunes en la expresión de proteínas heterólogas en un sistema bacteriano como *E. coli*, es la formación de agregados moleculares intracelulares denominados cuerpos de inclusión, constituidos principalmente por la proteína de interés en un estado insoluble o desnaturalizada, con plegamientos

intermedios y no nativos. La agregación es un fenómeno que aparece cuando las bacterias se enfrentan a estrés celular, como el ocasionado por un alto nivel en la producción de la proteína recombinante, la formación de cuerpos de inclusión frecuentemente se da en el citoplasma celular y eventualmente puede existir formación de cuerpos de inclusión en el periplasma (Villaverde y Carrio, 2003). Los cuerpos de inclusión pueden observarse por microscopía de fase como partículas intracelulares oscuras. El tamaño de los cuerpos de inclusión varía entre 0,2-0,6 μ m (General Electric Healthcare, 2007).

A la fecha, se han desarrollado diversas estrategias para permitir la formación de la estructura nativa de la proteína, esto incluye el uso de diferentes promotores y cepas bacterianas (Jonasson et al., 2002), la co-expresión de chaperonas (Bessette et al., 1999), el uso de cepas deficientes en tiorredoxina que mantiene un potencial redox favorable (Proba, Ge y Pluckthun, 1995), la reducción de la velocidad de síntesis de la proteína (Villaverde et al., 2003), la disminución de la temperatura durante el cultivo (Terpe, 2003), así como el uso de polipéptidos altamente solubles en la producción de proteínas de fusión (Murby, Uhlen y Stahl, 1996). Los cuerpos de inclusión pueden ser solubilizados en presencia de agentes caotrópicos como hidrocloreto de guanidina o urea y tioles, como β -mercaptoetanol o glutatión, con el objeto de romper los puentes disulfuro formados y prevenir la formación de otros (Choi, Chang y Yup, 2006).

Cabe mencionar que la expresión de proteínas en cuerpos de inclusión tiene ciertas ventajas, entre ellas: estas agregaciones proteicas son acumuladas en el citoplasma con una alta concentración; pueden ser purificados y concentrados por centrifugación, lo que reduce el proceso de eliminación de proteínas contaminantes; como los cuerpos de inclusión no tienen actividad biológica, se facilita la producción de proteínas que pueden ser tóxicas para las bacterias, por último, los cuerpos de inclusión son resistentes a proteólisis (Choi, Chang y Yup, 2006). Sin embargo, una vez que la proteína ha sido desnaturalizada con algún agente caotrópico, posteriormente se requieren de procesos adicionales de re-plegamiento que no

garantizan el 100% de eficiencia y se puede requerir una gran cantidad de aditivos, así como la remoción lenta del agente desnaturizante, lo cual incrementa los costos y la complejidad de los procesos (Wingfield, Palmer y Liang, 1995).

Considerando que la identificación de proteínas de secreción de *M. bovis* que indican la infección en el hospedero bovino sería de utilidad en el diseño de nuevos métodos diagnósticos, el objetivo de este estudio fue la producción recombinante y expresión de las proteínas de secreción RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *Mycobacterium* spp., como una primera aproximación a la caracterización de moléculas candidatas para métodos de diagnóstico de la TBb.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- 3.1.1 Producir las proteínas recombinantes RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 de *M. spp.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Diseñar los oligonucleótidos para amplificar los genes que codifican a las proteínas extracelulares y de secreción RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10.
- 3.2.2 Clonar los genes que codifican a las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 en el vector de expresión.
- 3.2.3 Expresar y purificar las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10.

IV. METODOLOGÍA

4.1 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los genes que codifican a las proteínas de secreción RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis*. Previamente se diseñaron oligonucleótidos con las secuencias requeridas para la clonación en los vectores de expresión D-TOPO. Al diseñar los oligonucleótidos se utilizaron las secuencias de esos genes que se encuentran en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados se muestran en el cuadro 1. La especificidad de los oligonucleótidos fue verificada mediante un análisis BLAST en el servidor NCBI BLAST (Nucleotide blast). Los oligonucleótidos diseñados se sintetizaron comercialmente por IDT (Integrated DNA Technologies).

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos diseñados

Nombre		Secuencia	Producto de PCR
RpfB₁₁₅₋₃₆₂	Sentido	5'-CACCACGGCGCCGGCCGCGGCTTCTCG-3'	741 pb
	Anti-sentido	5'-GCGCGCACCCGCTCGTG CAG-3'	
RipA	Sentido	5'-CACCGATCCACAGACGGACACCATCGC-3'	1,303 pb
	Anti-sentido	5'-GTA CT CGATGTATCGGACCACATACGGGGTCA-3'	
ESAT-6	Sentido	5'-CACCACAGAGCAGCAGTGG AATTT CG -3'	286 pb
	Anti-sentido	5'-TGCGAACATCCCAGTGACGTTGCCT-3'	
CFP-10	Sentido	5'-CACCGCAGAGATGAAGACCGATGC-3'	301 pb
	Anti-sentido	5'-GAAGCCCATTTGCGAGGACA-3'	

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *M. tuberculosis* Y PCR

El ADN genómico para realizar la amplificación de las secuencias de interés se extrajo a partir cultivos de *M. tuberculosis* obtenidos del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, mediante el protocolo de extracción de ADN con CTAB (Murray-Thompson, 1980). La pureza y concentración del ADN se cuantificó por espectrofotometría en el equipo Genova Nano (Jenway™).

Las reacciones de la amplificación por PCR de los genes *rpfB*, *ripA*, *cfp-10* y *esat-6*, incluyeron los oligonucleótidos sentido y antisentido a una concentración de 200 nM, 12.5 µl de AccuPrime™ SuperMix II (Thermo Fisher Scientific®), de 1 a 200 ng de ADN genómico de *M. tuberculosis* y el agua necesaria para obtener una reacción con un volumen total de 20 µl. De las reacciones de PCR se obtuvieron los siguientes productos: el gen que codifica la proteína RpfB con una longitud de 1,021 pb, el gen de la proteína RipA con una longitud de 741 pb, de ESAT-6 con una longitud de 286 pb y de CFP-10 con una longitud de 301 pb. Con la finalidad de verificar la amplificación, estos productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), se empleó el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas. Los productos se purificaron a partir del gel con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

4.3 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión de acuerdo a las instrucciones del fabricante, los correspondientes a *ripA* y *esat-6* se clonaron en el vector pBAD202/D-TOPO® y los correspondientes a *rpfB* y *cfp-10* en el vector pET102/D-TOPO®. Con estas construcciones se realizó la transformación por

choque térmico de células *E. coli* One Shot® TOP10 químicamente competentes (Thermo Fisher Scientific®). La transformación se realizó con 3 µl de la reacción de clonación en un vial con 200 µl de células competentes. Después de incubar esta reacción en hielo durante 30 minutos, se sometió durante 30 segundos a un choque de calor de 42 °C; los tubos se transfirieron inmediatamente a hielo. Posteriormente se añadieron 250 µl de medio caldo superóptimo (S.O.C); los tubos se incubaron durante una hora a 37 °C con agitación (200 rpm). Finalmente las bacterias se inocularon en placas con medio solido Luria - Bertani (LB) con antibiótico (kanamicina [50 µg/ml] en el caso de las transformantes con vector pBAD202 y ampicilina [100 µg/ml] para las transformantes con el vector pET102) e incubadas a 37 °C toda la noche. La presencia de los insertos fue verificada mediante una PCR a partir de una colonia. Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc.), se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™).

Una vez confirmada la presencia de los insertos, se seleccionó una transformante positiva, a la cual se le extrajo el ADN plasmídico. Las colonias seleccionadas se cultivaron en medio líquido LB con su respectivo antibiótico (kanamicina [50 µg/ml] en el caso de las transformantes con el vector pBAD202 y ampicilina [100 µg/ml] para las transformantes con el vector pET102) a 37 °C toda la noche. Los cultivos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 minutos, con la finalidad de obtener la pastilla celular. Posteriormente se realizó la purificación y aislamiento del ADN plasmídico con el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen). El ADN plasmídico purificado fue analizado mediante restricción enzimática (PstI-HF®, New England Biolabs). El producto de la digestión enzimática fue resuelto en un gel de agarosa al 1%. Con el objetivo de confirmar que los genes se encontraban en el marco de lectura correcto, las construcciones se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. En el caso de las construcciones pET/*rpfB* y pET/*cfp-10*, tras comprobar la presencia del inserto de interés, se transformaron células BL21 (DE3) con el plásmido recombinante. La metodología seguida en la transformación de esta cepa fue la

misma que se empleó en la transformación de la cepa TOP10 Transforming One Shot[®] (Thermo Fisher Scientific[®]). Posteriormente las células se sembraron en placas de agar LB con carbenicilina (100 µg/ml).

4.4 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

4.4.1 Evaluación de inductor

Las bacterias recombinantes se sembraron en medio líquido LB con su respectivo antibiótico, kanamicina (50 µg/ml) en el caso de las bacterias con el plásmido pBAD/*ripA* y pBAD/*esat-6* y para pET/*cfp-10*, se empleó carbenicilina (100 µg/ml). Los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 1 a 2 a 600 nm. Una vez que los cultivos alcanzaron la absorbancia deseada, se pasó 1 ml del cultivo que fue incubado toda la noche a un nuevo tubo con medio líquido con antibiótico. Estos nuevos cultivos se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta que las células alcanzaron la fase media logarítmica ($DO_{600}=0.5$) (Aproximadamente 2.5 horas).

Cuando los cultivos alcanzaron la DO requerida, la expresión de las proteínas fue inducida con diferentes concentraciones del inductor. La expresión de RipA se indujo con 0.05% de L-Arabinosa, ESAT-6 con 2% de L-Arabinosa, la expresión de RpfB y CFP10 se realizó con Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 µM. Los cultivos de RipA, ESAT-6 y CFP-10 se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 4 horas, de acuerdo a las instrucciones del protocolo de expresión piloto del fabricante. El cultivo de RpfB se incubó durante 16 horas. El patrón de expresión de las proteínas fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12%, las muestras se electroforaron a 100 V durante 1.5 horas aproximadamente y se tiñeron con azul de Coomassie (QC Colloidal Coomassie, Bio-Rad). Se utilizó el marcador de proteínas Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards (Bio-Rad), un estándar de referencia que contiene proteínas de peso molecular conocido.

4.4.2 Western blot

La identidad de las proteínas fue verificada mediante Western blot con anticuerpos monoclonales Anti-His₆-Peroxidase de Roche (Cat. No. 11 965 085 001), empleados en la detección de proteínas recombinantes con etiqueta de histidinas. Las muestras se separaron en SDS-PAGE al 12%, luego se electroforaron a 100 V durante 1.5 horas aproximadamente. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, el gel y la membrana se equilibraron en amortiguador de transferencia durante 10 minutos, se humedecieron dos piezas de papel filtro con amortiguador de transferencia (Tris-Glicina-SDS [TGS], metanol 20%) frío. El montaje papel-gel-membrana-papel se colocó sobre un equipo de electrotransferencia en semi-seco (Trans-blot[®] SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad), la transferencia de las proteínas a la membrana se hizo a 20 V durante 20 minutos. La membrana se incubó a 4 °C durante toda la noche con solución de bloqueo (TBS 1X-Tween 20 al 0.05%, leche descremada 5%). La membrana se incubó con el anticuerpo anti-tag de histidina a una dilución de 1:2000 con solución TBS 1X-Tween 20 al 0.05%, leche descremada al 2% a 37 °C con agitación a 100 rpm por 1 hora. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó 5 veces con solución TBS 1X-Tween 20 al 0.05%. Las membranas se revelaron por colorimetría con el kit CN/DAB Sustrate (Thermo Scientific[®]).

4.4.3 Fraccionamiento del extracto celular

Después de verificar la expresión de las proteínas, se separaron las fracciones solubles e insolubles. Con el fin de extraer las proteínas, los cultivos se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y por cada gramo de pellet bacteriano se añadieron 5 ml de reactivo B-PER[®] Complete Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific[®]) con una tableta de inhibidor de proteasas cOmplete[™], Mini, EDTA-free (Roche Life Science) por cada 10 ml de solución de extracción. La mezcla se homogenizó por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente con agitación durante 15 minutos. El lisado se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 minutos para separar el sobrenadante (fracción soluble) del

sedimento (fracción insoluble). Con el objetivo de determinar si la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble o en forma de cuerpos de inclusión (fracción insoluble) las dos fracciones se analizaron en SDS-PAGE al 12%, los geles se tiñeron con QC Colloidal Coomassie (Bio-Rad)

4.4.4 Solubilización de los cuerpos de inclusión.

Con la finalidad de solubilizar los cuerpos de inclusión, la fracción insoluble se lavó en dos ocasiones con PBS 1X-Tritón X100 2% frío y centrifugada a 13,500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se realizó un último lavado con PBS 1x, las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 minutos. El sedimento se re-suspendió en buffer de unión pH 8 (NaCl 50 mM, Tris 20 mM, urea 8 M y 20% de glicerol) y se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 18 horas.

4.5 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La re-naturalización y purificación de las proteínas se llevó a cabo por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), se emplearon las columnas de níquel del sistema de purificación Ni-NTA (Qiagen) por que contienen una resina específicamente diseñada para purificar proteínas con etiqueta de polihistidinas. Cada columna se equilibró con 4 ml de buffer de unión pH 8 (NaCl 50 mM, Tris 20 mM, urea 8 M y 20% de glicerol). Se añadieron 2 ml de la proteína a purificar y después se realizó un lavado con una solución de lavado pH 8 (NaCl 500 mM, Tris 20 mM, urea 8 M y 20% de glicerol). Posteriormente se realizó la re-naturalización de las proteínas por medio del plegamiento de las mismas por el método de gradiente lineal con diferentes soluciones de lavado con concentraciones decrecientes de urea (6 M, 5 M, 4 M, 2 M, 1 M y sin urea). Después se realizó un lavado final con una solución de lavado pH 8 (NaCl 1 M, Tris 20 mM y 20% de glicerol). Finalmente, la proteína se eluyó con 1 ml de la solución de elución pH 8 (NaCl 500 mM, Tris 20 mM, imidazol 500 mM y 20% de glicerol).

Las proteínas eluidas se dializaron en membranas Spectra/Por® (MWCO 3500, DAIGGER, Broadwick St. diálisis USA) contra la solución de unión pH 8 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 50 mM e imidazol 10 mM). Las proteínas dializadas se purificaron nuevamente con las columnas de Níquel del Sistema de Purificación Ni-NTA (Qiagen). Cada columna se equilibró con 4 ml de buffer de unión pH 8 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 50 mM e imidazol 10 mM). Se añadieron 2 ml de la proteína a purificar y posteriormente se realizaron 5 lavados con el buffer de lavado pH 8 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM). Finalmente la proteína se eluyó con 1 ml de la solución de elución pH 8 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 50 mM e imidazol 500 mM).

Las fracciones obtenidas de la purificación se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%, los geles se tiñeron con QC Colloidal Coomassie (Bio-Rad). Con el objetivo de determinar la concentración de las proteínas eluidas, estas se cuantificaron con el kit comercial Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Finalmente se almacenaron a -70°C .

V. RESULTADOS

Las secuencias nucleotídicas que codifican a las proteínas RpfB₁₁₅₋₃₆₂ (741 pb), RipA (1,303 pb), ESAT-6 (286 pb) y CFP-10 (301 pb) se amplificaron mediante PCR. La visualización de las secuencias amplificadas se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 3). Los amplicones se clonaron por separado en el vector de expresión. En el caso de *ripA* y *esat-6*, se empleó PBAD202[®]/D-TOPO, y pET102[®]/D-TOPO para *rpfB* y *cfp-10*; con el producto de cada clonación se realizó la transformación por choque térmico de células *E. coli* One Shot[®] TOP10 químicamente competentes.

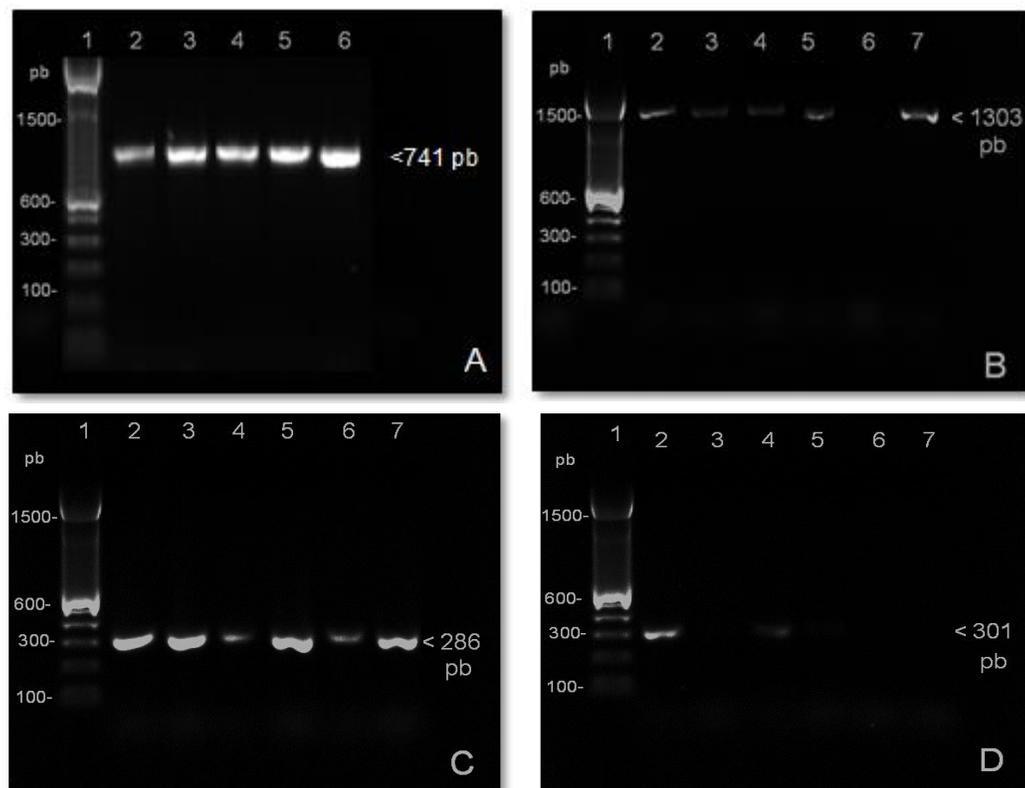


Figura 3. Electroforesis de los productos de la PCR en gradiente de temperatura. A) *rpfB*, B) *ripA*, C) *esat-6* y D) *cfp-10*. Carril 1, marcador de talla molecular; los carriles 2-7 corresponden a los productos de la amplificación a distintas temperaturas de alineamiento (58 °C, 60 °C, 62 °C, 65 °C, 67 °C y 69 °C respectivamente).

En el caso de las construcciones pET/rpfB y pET/cfp-10, tras comprobar la presencia del inserto de interés, se transformaron células BL21 (DE3) con el plásmido recombinante. En el ensayo de expresión de pBAD/ripA y pBAD/esat-6 se empleó una concentración de L-Arabinosa del 0.2%, y en el caso de pET/rpfB y pET/cfp-10 se utilizó IPTG 1 mM. En la figura 4, se muestran el SDS-PAGE y el Western blot de estos ensayos. En el caso de RpfB se observa una banda sobre-expresada de aproximadamente 44 kDa, para RipA, ESAT-6 y CFP-10 se observan bandas de aproximadamente 62.5 kDa, 27 kDa y 24.2 kDa, respectivamente. En contraste, en ninguno de los controles utilizados se observa sobre-expresión de las proteínas.

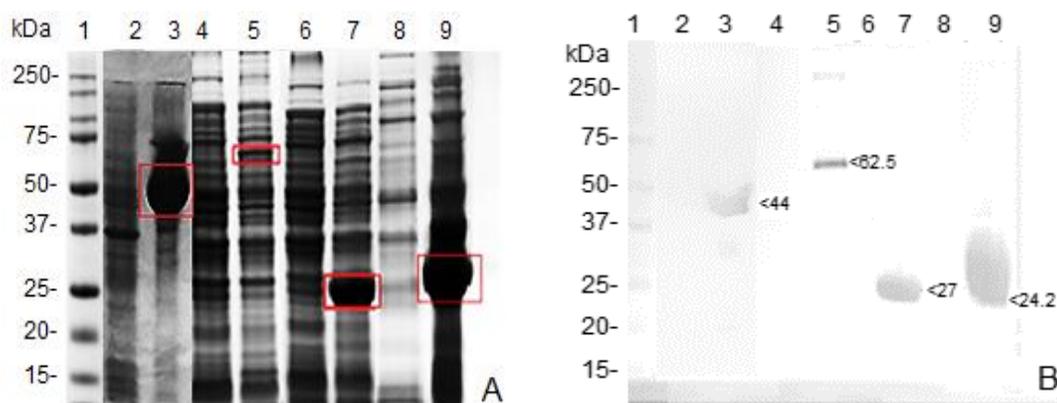


Figura 4. A) SDS-PAGE y B) Western blot de los extractos totales de los cultivos antes y después de inducir la expresión de RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10. Carril 1, marcador Precision Plus Protein™, Dual Color Standards (Bio-Rad); 2 y 3 cultivos antes y después de la inducción de RipA (62.5 kDa); 4 y 5 cultivos antes y después de la inducción de ESAT-6 (27 KDa); 6 y 7 cultivos antes y después de la inducción de CFP-10 (24.2 KDa).

Con el objetivo de lograr la máxima expresión de cada proteína se realizaron varios experimentos en los que se determinó la concentración del inductor, el tiempo de inducción y la temperatura óptimos a emplear. En la figura 5 se muestra el SDS-PAGE de la evaluación de cinco concentraciones de L- Arabinosa (0.2%, 0.02%, 0.002%, 0.0002% y 0.00002%) que se utilizaron en la inducción de la expresión de RipA y ESAT-6, donde se observa que la expresión de la proteína es similar al usar 0.2% o 0.02% de L-Arabinosa. La inducción de la expresión se realizó durante 4 horas a 37 °C.

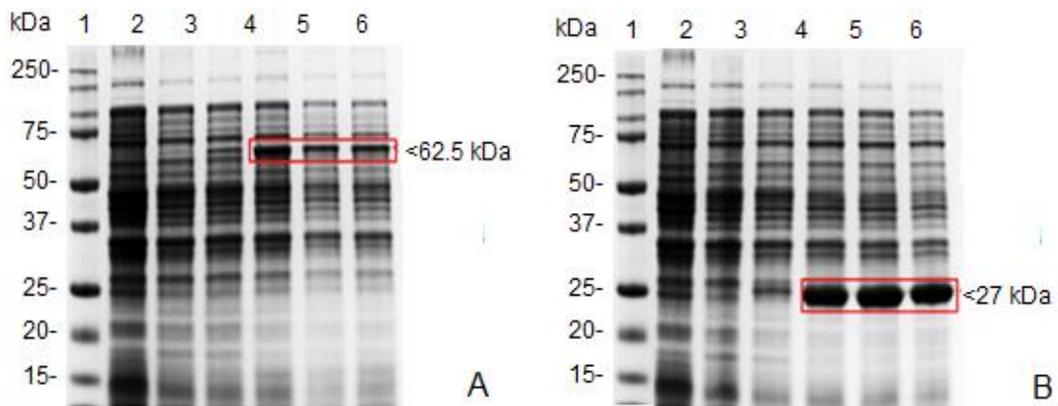


Figura 5. SDS-PAGE de la inducción de la expresión de las proteínas A) RipA y B) ESAT-6. Carril 1, marcador Precision Plus Protein™ (Bio-Rad); 2, muestras de extracto total del cultivo tomadas antes de la inducción; 3-7 corresponden a muestras de extracto total de los cultivos inducidos con distintas concentraciones de L-arabinosa (0.00002%, 0.0002%, 0.002%, 0.02% y 0.2%).

Con el fin de la optimizar la expresión de RpfB y CFP-10 se evaluaron cuatro concentraciones de IPTG (100 μ M, 250 μ M, 500 μ M y 1 mM), en la figura 6 se observa que la expresión de la proteína es similar al usar cualquiera de las concentraciones probadas.

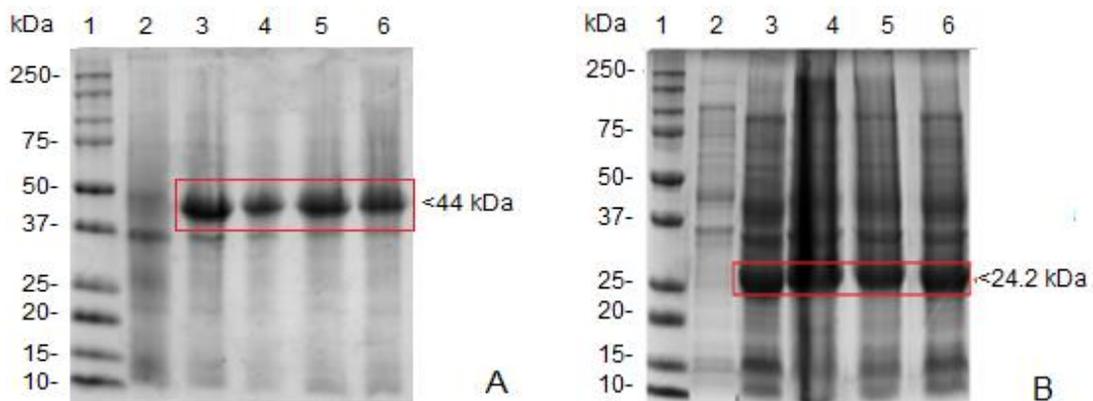


Figura 6. SDS-PAGE de la inducción de la expresión de las proteínas A) RpfB y B) CFP-10. Carril 1, marcador Precision Plus Protein™ (Bio-Rad); 2, muestras de extracto total del cultivo tomadas antes de la inducción; 3-7 corresponden a muestras de extracto total de los cultivos inducidos con distintas concentraciones de IPTG (100 μ M, 250 μ M, 500 μ M y 1 mM).

Después de verificar la expresión de las proteínas, se separaron las fracciones solubles e insolubles. Las dos fracciones se analizaron en SDS-PAGE al 12% con el objetivo de determinar si la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble o insoluble. En el caso de RpfB y ESAT-6 es posible obtener las proteínas recombinantes en forma soluble e insoluble (cuerpos de inclusión). En la expresión de RipA se evaluaron otras 3 concentraciones de L-Arabinosa (0.1%, 0.05% y 0.08%) y dos temperaturas de inducción más bajas (16 y 28 °C); no obstante, la proteína se expresó en forma de cuerpo de inclusión, al igual que CFP-10 (Figura 7).

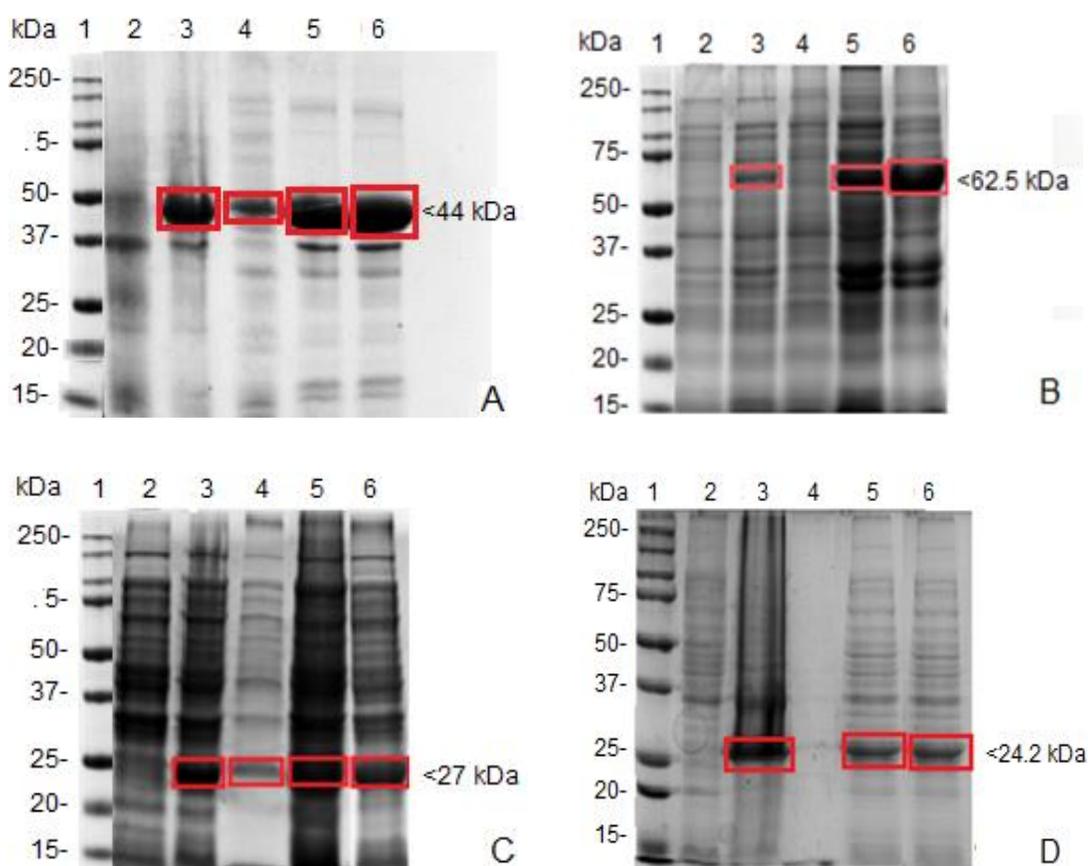


Figura 7. SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles A) RpfB, B) RipA, C) ESAT-6 y D) CFP-10. Carril 1, marcador Precision Plus Protein™ (Bio-Rad); 2, muestras de extracto total del cultivo tomadas antes de la inducción; 3, muestras de extracto total del cultivo después de la inducción; 4, fracción soluble; 5, fracción insoluble; 6, cuerpos de inclusión solubilizados con urea.

Con estos resultados se indujo la expresión de las proteínas en cultivos de 1 L. La expresión de RipA y ESAT-6 se indujo en un cultivo de 1 L de medio LB con 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de kanamicina, en la expresión de RipA, se utilizó una concentración final de L-Arabinosa de 0.05% y en el caso de ESAT-6 se utilizó 0.2% de L-Arabinosa. La expresión de RpfB se indujo con 100 μM de IPTG en un cultivo de 1 L de medio LB con 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carbenicilina, la expresión de CFP-10 se indujo con 100 μM de IPTG en un cultivo de 1 L de medio LB con 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de carbenicilina.

Los cuerpos de inclusión obtenidos se solubilizaron con urea 8 M (Figura 7) y posteriormente se realizó el plegamiento de las proteínas mediante el método de gradiente lineal con diferentes soluciones de lavado con concentraciones decrecientes de urea (6 M, 5 M, 4 M, 2 M, 1 M y sin urea) con columnas de Níquel del Sistema de Purificación Ni-NTA (Qiagen). Las proteínas eluidas se cuantificaron con el kit comercial Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad) y por último, se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. De la fracción soluble de RpfB se obtuvieron 3,036 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo y la fracción insoluble de la misma tuvo un rendimiento de 1,068 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo. RipA tuvo un rendimiento de 495 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo, de la fracción soluble de ESAT-6 se obtuvieron 1,692 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo y la fracción insoluble de la misma tuvo un rendimiento de 6,590 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo; en el caso de CFP-10, se obtuvo un rendimiento de 2,093 $\mu\text{g}/\text{L}$ de cultivo.

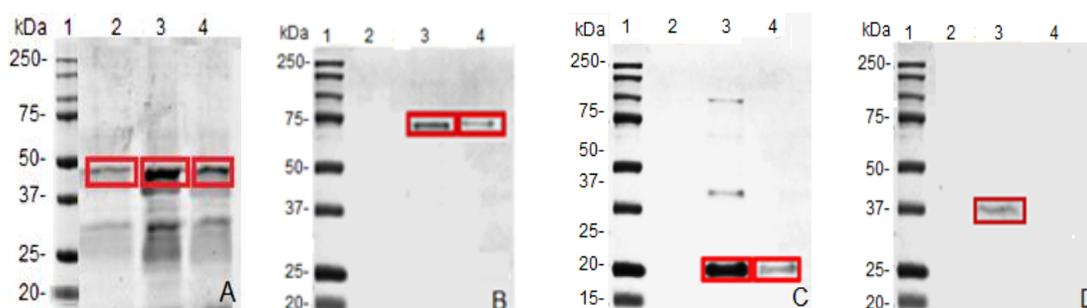
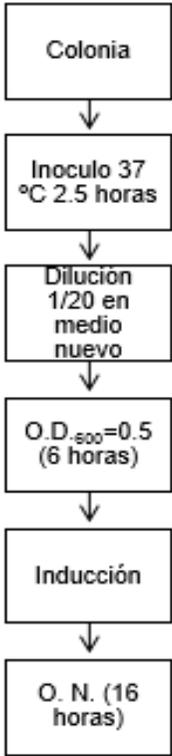
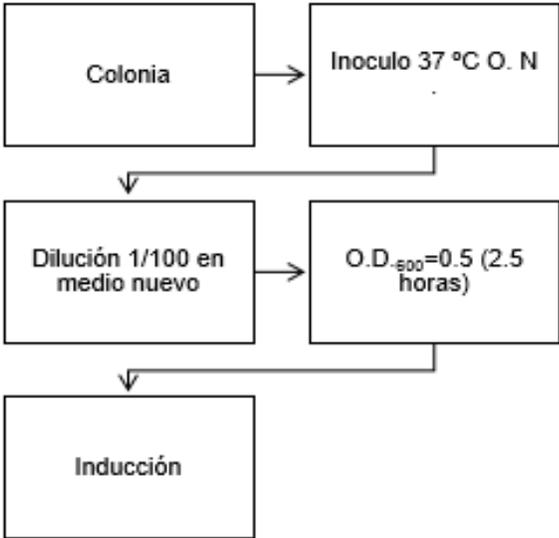


Figura 8. SDS-PAGE de la purificación de las proteínas A) RpfB, RipA, B) ESAT-6 y C) CFP10. Carril 1, marcador Precision Plus Protein™ (Bio-Rad); 2-4, eluciones de la purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados con columnas de Níquel.

En resumen, las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10 se expresaron bajo las siguientes condiciones:

Cuadro 2. Protocolo de expresión de las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10

	RpfB	RipA	ESAT-6	CFP-10
Vector	<u>pET102</u>	<u>pBAD202</u>	<u>pBAD202</u>	<u>pET102</u>
Antibiótico	<u>Carbenicilina (200 µg/ml)</u>	<u>Kanamicina (50 µg/ml)</u>	<u>Kanamicina (50 µg/ml)</u>	<u>Carbenicilina (100 µg/ml)</u>
Inductor	<u>100 µM IPTG</u>	0.05% L-arabinosa	0.02% L-arabinosa	<u>100 µM IPTG</u>
Protocolo de inducción				
Expresión de la proteína	Fracción soluble e insoluble	Fracción insoluble	Fracción soluble e insoluble	Fracción insoluble
Purificación	<u>IMAC</u>			
Rendimiento	4,104 µg/L	495 µg/L	8,822 µg/L	2,093 µg/L

VI. DISCUSIÓN

La TBb es una de las enfermedades más importantes de la industria pecuaria, además de constituir una amenaza en la salud humana (Collins, 2006). Actualmente, se han descrito algunas proteínas de secreción involucradas en la patogenicidad de *M. tuberculosis* en humanos. Existen varios estudios sobre el desarrollo de ensayos de diagnóstico en suero de humanos con algunos antígenos inmunodominantes y biomarcadores de la TB secretados por *M. tuberculosis* (Goletti, Vincenti, Carrara, Butera, Bizzoni, Bernardini et al., 2005; Weldingh, Rosenkrands, Okkels, Doherty y Andersen, 2005; Bottai y Brosch, 2009; Steingart, Dendukuri, Henry, Schiller, Nahid, Hopewell, Ramsay, Pai y Laal, 2009; Kumar, Kumar, Kumar, Shankar, Yadav, Katoch et al., 2010; Wu, Yang, Zhang, Li, Liang, Zhang et al., 2010); sin embargo, aún no se sabe si estos antígenos de secreción se pueden identificar en bovinos. El objetivo de este trabajo fue la producción recombinante de un grupo de proteínas de secreción de *M. tuberculosis* como una primera aproximación a la caracterización de moléculas candidatas para métodos de diagnóstico de la TBb. Primeramente se seleccionaron cuatro proteínas altamente inmunogénicas y que participan en la patogenia de la enfermedad: ESAT-6 y CFP-10 (fase activa) y RpfB, RipA (fase latente).

Como organismo hospedero se eligió a *E. coli*, por su bajo costo y fácil manipulación. La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* tiene múltiples ventajas debido a que su cultivo es simple, rápido, económico y altamente eficiente. Desafortunadamente, en *E. coli* la expresión de proteínas heterólogas presenta muchos desafíos. La expresión de una proteína no nativa a menudo afecta negativamente la viabilidad de la célula huésped tanto durante la etapa de transformación como durante la expresión de la proteína. Esto trae como resultado la baja o nula producción proteica, lo que puede ser considerado como el peor escenario en la expresión de proteínas recombinantes. El problema reside a menudo en un efecto nocivo que la proteína heteróloga ejerce sobre la célula (Miroux and Walker, 1996; Dumon-Seignovert, Cariot y Vuillard, 2004). Con

el fin de mejorar la viabilidad del huésped y, en consecuencia, mejorar el potencial de sobreexpresión de proteína diana, se deben emplear sistemas de expresión bien regulados.

En un primer ensayo se intentó expresar las proteínas en el vector pBAD, este vector se emplea en la expresión de proteínas potencialmente tóxicas para *E. coli*, el vector tiene doble regulación y se puede utilizar con otras cepas de *E. coli*, además de la cepa TOP10, se utiliza en clonajes rutinarios y se caracteriza por tener una alta eficiencia en la transformación, además de que conserva los insertos estables una y brinda una mayor represión. Con este sistema se logró expresar únicamente las proteínas RipA y ESAT-6. Sin embargo, se obtuvieron rendimientos muy diferentes entre ambas proteínas. El bajo de rendimiento de RipA puede deberse al tamaño de la proteína, y/o a su actividad hidrolizante, lo que afecta la viabilidad de la célula huésped.

Uno de los problemas más comunes en la expresión de proteínas heterólogas en un sistema bacteriano como *E. coli* es que la formación de agregados moleculares intracelulares denominados cuerpos de inclusión. El vector pBAD contiene una etiqueta de tiorredoxina His-Patch, que ayuda al plegamiento correcto de proteínas para la obtención de proteínas en estado soluble. La ventaja de las proteínas solubles es que se encuentran en estado nativo y que su purificación es más fácil. Sin embargo, sólo fue posible la obtención de ESAT-6 en estado soluble. Las principales ventajas de obtener una proteína en la fracción soluble son que la purificación es más fácil y que esta se obtiene en su estado nativo. En la expresión de enzimas, es indispensable obtener su expresión en estado nativo sobre todo cuando se utilizarán en ensayos funcionales.

Los cuerpos de inclusión se forman por diversas razones, generalmente cuando se obtienen altos niveles de expresión de proteínas heterólogas cuando la proteína expresada es hidrofóbica, como en el caso de RipA, que posee ciertas regiones hidrofóbicas. Entre los principales factores que afectan la solubilidad en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se encuentran: la temperatura de

inducción y la concentración de inductor. Una de las estrategias más utilizadas para permitir el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes es la disminución de la temperatura durante el cultivo (Terpe, 2003). No obstante, al disminuir la temperatura del cultivo de RipA, de 37 °C a 28 °C y 16 °C, no se solucionó el problema de insolubilidad. En el caso particular de la expresión de proteínas de *M. tuberculosis* en *E. coli*, el éxito en la expresión soluble, incluso con la mejor estrategia de expresión, rara vez ha superado el 30%. Se cree que uno de los principales motivos es la diferencia en el contenido de G+C en el genoma de *M. tuberculosis* (65.6%) y *E. coli* (50.8%), por lo que se requiere diferente maquinaria en la traducción de genes micobacterianos (Mustafa, 2001). Los cuerpos de inclusión obtenidos se solubilizaron con una solución de urea 8 M y posteriormente replegados por el método de gradiente lineal mediante el empleo de soluciones con concentraciones decrecientes de urea.

En el caso de las proteínas RpfB y CFP-10, debido a que no se logró la expresión de la proteína en el sistema pBAD202/TOP10, por lo que los genes que codifican a estas estas proteínas se clonaron en el vector pET102. Este vector se encuentra bajo el control de promotor T7 y se puede utilizar con cepas como pLysS o pLysE y BL21 C41 [DE3] o C43 [DE3] (Rosano y Ceccarelli, 2014), estas se usan frecuentemente para superar la toxicidad asociada con la sobreexpresión de proteínas recombinantes con el sistema de expresión de bacteriófago T7 RNA polimerasa (Dumon-Seignovert et al., 2004).

El problema de la toxicidad proteica puede surgir cuando la proteína recombinante realiza una función innecesaria y perjudicial en la célula huésped. Esta función interfiere con la proliferación normal y la homeostasis del microorganismo y el resultado visible es una tasa de crecimiento más lenta, una baja densidad celular final y la muerte (Doherty et al., 1993; Dong et al., 1995). Con la finalidad de solucionar el problema de toxicidad, ya sea antes o después de la inducción, puede ser necesario el uso de vectores de expresión modificados, cepas de *E. coli* modificadas y protocolos de cultivo apropiados. Como primera medida, el

crecimiento celular debe ser monitoreado antes de la inducción. Si la tasa de crecimiento de la cepa recombinante es más lenta comparada con una cepa portadora de un vector vacío, es probable que la proteína sea tóxica antes de la inducción (genes altamente tóxicos) y existen dos causas que pueden explicar esta situación: la toxicidad génica y la expresión basal de proteína tóxica, en estos casos, los genes interfieren negativamente con la fisiología normal de la célula durante la fase de crecimiento (Saïda, 2007).

La inducción basal se puede controlar adicionando glucosa (0.2%-1%) al medio (cuando se emplean vectores que contienen un promotor Lac). Otra opción podría ser preparar medios definidos con glucosa como fuente de carbono. Después del control de la expresión basal, el cultivo debe crecer adecuadamente hasta el momento de la inducción. En este punto, si la proteína es tóxica, el crecimiento celular se detendrá. En este caso, se recomienda el uso de cepas que permitan el control de la inducción, plásmidos con bajo número de copias o cepas especiales para expresión de proteínas altamente tóxicas.

La expresión de CFP-10 se evaluó el uso en tres cepas, de entre las que se seleccionó BL21 por ser la que proporcionaba una mayor expresión. Sin embargo, la expresión de CFP-10 se dio en forma insoluble, a pesar de su similitud con ESAT-6 que se obtuvo en forma soluble. Ambos son antígenos inmunodominantes de bajo peso molecular, secretados tempranamente al medio extracelular a través de un sistema especializado denominado ESX-1 y están codificadas en la región RD1. Ambas proteínas son secretadas por Mtb en bajas cantidades y forman un complejo 1:1. En el caso de RpfB, se intentó la expresión de la proteína completa sin éxito. Debido a lo anterior, se optó por seguir la estrategia de Ruggiero y colaboradores (2011), quienes determinaron la estructura cristalina de un fragmento de la proteína RpfB (residuos aminoácidos 115-362). Este fragmento incluye un dominio DUF348, el dominio G5 y el dominio catalítico. Se diseñaron nuevos oligonucleótidos sentido para expresar *rpf-B*₁₁₅₋₃₆₂. Los amplicones se clonaron en los vectores de expresión pBAD202 y pET102. Solo se logró la expresión en el vector pET102. Con el

plasmido recombinante se realizó un ensayo de expresión en diferentes cepas de BL21: BL21 (DE3), BL21 pLysS y Rosetta (DE3), donde se observó que con los genotipos DE3 y Rosetta se obtenía una mayor expresión. Debido a que RpfB es una endopeptidasa de gran tamaño, lo que podría influir en la viabilidad del organismo hospedero (*E. coli*), no se logró su expresión de forma completa. Se sugiere utilizar un sistema de expresión alternativo basado en un organismo en el que RpfB resulte menos toxica. Por ejemplo, *Streptomyces lividians* y otros actinomicetos como *M. smegmatis* es una especie de micobacteria no patógena que ha sido utilizada como organismo hospedero durante la expresión de varias proteínas de origen micobacteriano, también se ha utilizado *Corynebacterium glutamicum* y algunos miembros del género *Rhodococcus*, como *R. erythropolis*, los cuales son bacterias Gram-positivas, con alto contenido de GC y genéticamente relacionadas a *M. tuberculosis*. El uso de *M. smegmatis* ha permitido la expresión soluble de más del 60% de las proteínas expresadas previamente en *E. coli*. De esta forma, *M. smegmatis* es el sistema por elección en la expresión de proteínas de origen micobacteriano para estudios estructurales (Bashiri and Baker 2015).

Las proteínas recombinantes RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10, se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metales. De esta forma, se logró obtener una alta concentración de las proteínas RpfB (4,104 µg/L de cultivo), ESAT-6 (8,282 µg/L de cultivo) y CFP-10 (2,093 µg/L de cultivo). En el caso de RipA, el rendimiento fue mucho menor (495 µg/L de cultivo), por lo que el gen *ripA* también se clonó en el vector pET102 con el objetivo de comparar su rendimiento. Con dicha construcción se realizó la transformación diferentes cepas de *E. coli* BL21. Sin embargo, no se detectó la expresión de la proteína con este sistema, por lo que fue necesario realizar un cultivo a gran escala para obtener una mayor cantidad de la proteína. No existe una regla para la selección del sistema de expresión, si bien existen factores determinantes, como la secuencia nucleotídica, origen biológico, propiedades químicas, estabilidad y toxicidad de las proteínas que se desea expresar, aplicación y bio-proceso, la elección del sistema es básicamente por selección propia y por procesos de ensayo y error.

VII. CONCLUSIONES

Se logró producir exitosamente las proteínas RpfB, RipA, ESAT-6 y CFP-10, de origen micobacteriano en *E. coli*. Los sistemas basados en *E. coli* son económicos y de fácil manipulación. Cuando se obtienen altas cantidades de proteína, como en el caso de RpfB, ESAT-6 y CFP-10, donde se obtuvo un excelente rendimiento lo cual reduce el costo de producción. En el caso de la expresión de RipA se obtuvo un rendimiento regular, por lo que se tuvieron que realizar varios cultivos con la finalidad de obtener cantidad necesaria de esta proteína para realizar diversos ensayos que permitieran su evaluación. En caso de determinarse su utilidad, se sugiere cambiar de sistema de expresión por uno más eficiente y que facilite el plegamiento nativo y funcional de la proteína.

Las proteínas obtenidas en este estudio podrán utilizarse en la producción de anticuerpos policlonales, necesarios en la determinación de antígenos de secreción de *M. bovis* por medio de Western blot y ensayos ELISA en el suero y tejido de bovinos, lo anterior como un primer acercamiento en el diseño de un nuevo método de diagnóstico de la tuberculosis bovina.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aagaard C., M. Govaerts, L. Meng Okkels, P. Andersen, and M. Pollock. 2003. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 41(8):3719-28.
- Abdallah M., C. Gey van Pittius, A. Champion, J. Cox, J. Luirink, M. Vandenbroucke-Grauls, J. Appelmelk, and W. Bitter. 2007. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(11):883-91.
- Acha, P., and B. Szyfres. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición. Publicación científica 580(I) Bacteriosis y Micosis, Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud. 266-283.
- Alcaide, F., J. Esteban, J. González, and J. Palacios. 2005. Micobacterias. En *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Micobacterias* [9a]. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Álvarez, N., R. Borrero, F. Reyes, F. Camacho, N. Mohd, M. E. Sarmiento, and A. Acosta, 2009. Mecanismos de evasión y persistencia de *Mycobacterium tuberculosis* durante el estado de latencia y posibles estrategias para el control de la infección latente. *Vaccimonitor*, 18(3):18-25.
- Arend S. M., A. Geluk, K. E. van Meijgaarden, J. T. van Dissel, M. Theisen, P. Andersen, and T. H. Ottenhoff. 2000. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect. Immun.*, 68(6):3314-3321.
- Arias M. 2011. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. *Arch. Bronconeumol.*, 47:521-530.
- Baeshen, M. N., A. M. Al-Hejin, R. S. Bora, M. M. Ahmed, H. A. Ramadan, K. S. Saini, N. A. Baeshen, and E. M. Redwan. 2015. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7):953-62.

- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:767-811.
- Baraboglia, E. R. 2009. Enfermedades Infecciosas Micobacteriosis Atípicas (Atypical Mycobacteriosis). *REDVET. Rev. elect. Vet.*, 10(10).
- Bashiri, G., and E. N. Baker. 2015. Production of recombinant proteins in *Mycobacterium smegmatis* for structural and functional studies. 1:1-10.
- Behr, A., M. Wilson, H. Gill, H. Salamon, G. Schoolnik, S. Rane, and P. Small. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 284:1520-1523.
- Bessette, H., F. Aslund, J. Beckwith, and G. Georgiou. 1999. Efficient Folding of Proteins with Multiple Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:3703-13708.
- Bezoz J., C. Casal, B. Romero, B. Schroeder, R. Hardegger, J. Raeber, L. López, P. Rueda, and L. Domínguez. 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*, 97:44-52.
- Bezoz, G. J., C. Casal, I. García, and A. Mateos. 2013. La respuesta inmunitaria frente a la tuberculosis en rumiantes domésticos. *Albéitar*, 152.
- Bhuwan M., Arora N., Sharma A., Khubaib M., Pandey S., Chaudhuri T. K., et al. 2016. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor RipA with MoxR1, a chaperone, is required for transport through TAT secretion system. *mBio*, 7(2): e02259-15.
- Blanco, F. C., M. V. Bianco, V. Meikle, S. Garbaccio, L. Vagnoni, A. A. Cataldi, and F. Bigi. 2011. Respuesta inmune en terneros experimentalmente infectados con diferentes dosis de *Mycobacterium bovis*. *RIA.*, 37(2):189-192.
- Blood, D. I. 2000. Enfermedades Causadas por bacterias. En *Medicina Veterinaria*. Editorial Interamericana. 6:691-701.

- Boon, C., & Dick, T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG Response Regulator Essential for Hypoxic Dormancy. *J. Bacteriol.*, 184(24), 6760–6767.
- Boshoff, H. I. M., and Barry, C. E. 2005. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(1), 70–80.
- Bottai D., and R. Brosch. 2009. Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. *Mol. Microbiol.*, 73(3):325-8.
- Braunstein, M., S. S. Bardarov, and W. R. Jacobs. 2002. Genetic methods for deciphering virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Meth. Enzymol.*, 358:67-99.
- Brennan, P. J. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 83(1-3):91-97.
- Briken, V., S. A. Porcelli, G. S. Besra, L. and Kremer. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.*, 53(2):391-403.
- Brosch, R., S. V. Gordon, M. Marmiesse, P. Brodin, C. Buchrieser, K. Eiglmeier, and S. T. Cole. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(6):3684-3689.
- Brosch R., S. V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, K. Inwald, P. Golby, N. García, G. Hewinson, A. Behr, A. Quail, C. Churcher, G. Barrell, J. Parkhill, and T. Cole. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(13):5596-601
- Buddle M., G. Livingstone, and W. de Lisle. 2009. Advances in ante-mortem diagnosis of tuberculosis in cattle. *N. Z. Vet. J.*, 57(4):173-80.
- Casal C., J. Bezos, A. Díez-Guerrier, J. Álvarez, B. Romero, L. de Juan L, S. Rodriguez-Campos, M. Vordermeier, A. Whelan, G. Hewinson, A. Mateos, L. Domínguez, and A. Aranaz. 2012. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Prev. Vet. Med.*, 105(1-2):149-54. 2012).

- Castaño, D., and M. Rojas. 2010. Alteraciones en el reclutamiento y activación de proteínas Rab durante la infección micobacteriana. *Biomédica*, 30(2):283-308.
- Chatterjee, D. 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1(4):579-588.
- Chaves, D., A. Sandoval, L. Rodríguez, J. C. García, S. Restrepo, and M. M. Zambrano. 2010. Análisis comparativo de seis genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica*, 30(1):23-31.
- Chávez, G. L., M. C. Arenas, I. Sada-Ovalle, and R. Lascurain. 2009. Principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Mycobacterium tuberculosis*. *Gac. Méd. Méx.*, 145(4):323-330.
- Chemlal, K., and F. Portaels. 2003. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16(2):77-83.
- Choi, J., K. Chang, and S. Yup. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.*, 61:876-885.
- Chua, J., I. Vergne, S. Master, and V. Deretic. 2004. A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7(1):71-77.
- Cockle, J., V. Gordon, A. Lalvani, M. Buddle, G. Hewinson, and M. Vordermeier. 2002. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect. Immun.*, 70(12):6996-7003.
- Cockle, J., V. Gordon, G. Hewinson, and M. Vordermeier. 2006. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13(10):1119-24.
- Cohen-Gonsaud, M., P. Barthe, C. Bagnéris, B. Henderson, J. Ward, C. Roumestand, and N. H. Keep. 2005. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12:270-273.

- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, and K. Taylor. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685):537-544.
- Collins, C. H., M. D. Yates, and J. M. Grange. 1981. A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in South-East England, 1977-1979. *Tubercle*, 62(2):113-116.
- Collins, J. D. 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.*, 112:369-381.
- Contreras, J. A. 2000. Enfermedades de los Bovinos. En Enfermedades causadas por bacterias, *Tuberculosis*. Barquisimeto: Editorial Bogue. 2:560-584.
- DEFRA, 2014. Department for Environment, Food and Rural Affairs The strategy for achieving officially bovine tuberculosis free status for England. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/300447/pb14088-bovine-tb-strategy-140328.pdf
- de la Parte-Pérez, M., M. P. Hurtado, and M. Rivera. 2001. Tuberculosis en el Nuevo Milenio. *Rev. Fac. Med.*, 24(2):104-119.
- de Lisle, G. W., C. G. Mackintosh, and R. G. Bengis. 2001. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. - Off. Int. Epizoot.*, 20(1):86-111.
- de Marco, A. 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 14(8):26
- de Vallière, S., G. Abate, A. Blazevic, R. M. Heuertz, and D. F. Hoft. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.*, 73(10):6711-6720.
- Domínguez A., R. Pérez, I. González, R. Toirac, Y. Riquenes, Y. Rodríguez, and I. Acosta. 2015. *Mycobacterium bovis*: realidades y retos para la industria biofarmacéutica veterinaria. *Bionatura*, 1(1):34-38
- Dorronsoró, I., and L. Torroba. 2007. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.*, 30(2):67-84.

- Dumon-Seignovert, L., G. Cariot, and L. Vuillard. 2004. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein. Expr. Purif.*, 37(1):203-6.
- Dunn R., B. Kaneene, L. Grooms, R. Bolin, A. Bolin, and S. Bruning- Fann. 2005. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferongamma assay for tuberculosis in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 226:429-435.
- EFSA, 2012. Scientific opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA J.*, 10:2975.
- Enarson, D. 2006. Introduction. En *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans* (Second Edition, pp. 1-5). Iowa, U.S.A: Blackwell Publishing.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, División de Producción y Sanidad Animal. 2008. EMPRES Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. 38.
- Fenton, M. J., and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect. Immun.*, 64(3):683-690.
- Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, and C. M. Fraser. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.*, 184(19):5479-5490.
- Flesselles, B., N. N. Anand, J. Remani, S. M. Loosmore, and M. H. Klein. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett.*, 177(2):237-42.
- Flores-Villalva S., F. Suárez-Güemes, C. Espitia, O. Whelan, M. Vordermeier, and A. Gutiérrez-Pabello. 2012. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin. Vaccine. Immunol.*, 19(5):797-803.
- García, J., Z. Santana, L. Zumalacárregui, M. Quintana, D. González, G. Furrázola, and O. Cruz. 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccci Monitor*, 22(2):30-9.

- García, M. 2010. Tuberculosis caprina: diagnóstico. *Pequeños Rumiantes, Publicación de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, 11(3):25-33.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, and R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(13):7877-7882.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2007. Purifying Challenging Proteins. Principles and Methods. Uppsala, Sweden.
- Godoy, M. J., L. Orozco, C. Hernández, O. DaMata, J. De Waard, and S. González Rico. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 28(2):96-104.
- Goletti, D., D. Vincenti, S. Carrara, O. Butera, F. Bizzoni, G. Bernardini, M. Amicosante, and E. Girardi. 2005. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: Comparison of a Gamma Interferon Whole-Blood Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and an Enzyme-Linked Immunospot Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12:1311-1316.
- Gonzalo-Asensio, J., S. Mostowy, J. Harders-Westerveen, K. Huygen, R. Hernández-Pando, J. Thole, and C. Martín. 2008. PhoP: A Missing Piece in the Intricate Puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* Virulence. *PLOS ONE*, 3(10):e3496.
- Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M. del C., Y. Garfias, I. Sada, and R. Lascurain. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, 18(2):142-153.
- Gronenborn B. 1976. Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 148:243-50.
- Hale, Y. M., G. E. Pfyffer, and M. Salfinger. 2001. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(6):834-846.

- Hansen, J. M., S. A. Golchin, F. J. Veyrier, P. Domenech, I. G. Boneca, A. K. Azad, and M. A. Behr. 2014. N-Glycolylated Peptidoglycan Contributes to the Immunogenicity but Not Pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.*, 209(7):1045-1054.
- Hansted, E., B. Sitkauskienė, R. Kevalas, A. Tattersall, and T. Day. 2007. Research for practice: a new in vitro test for identification of tuberculosis infection. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 43(7):519-522.
- Harmsen, D., J. Rothgänger, C. Singer, J. Albert, M. and Frosch. 1999. Intuitive hypertext-based molecular identification of micro-organisms. *Lancet (London, England)*, 353(9149):291.
- Herrera-León, L., R. Pozuelo-Díaz, T. Molina, A. Valverde, P. Saiz, and M. S. Jiménez. 2009. Differentiation of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular techniques. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.*, 27(9):496-502.
- Hett. 2007. Essential Cell Division Enzymes of Mycobacteria: Implications on Resuscitation from Dormancy. Harvard University.
- Hett, E. C., M. C. Chao, L. L. Deng, and E. J. Rubin. 2008. A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog.*, 4(2).
- Hett, E. C., M. C. Chao, A. J. Steyn, S. M. Fortune, L. L. Deng, and E. J. Rubin. 2007. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 66(3):658-668.
- Hett, E. C., M. C. Chao, and E. J. Rubin. 2010. Interaction and Modulation of Two Antagonistic Cell Wall Enzymes of Mycobacteria. *PLoS. Pathog.*, 6(7), e1001020.
- Hewinson R. G., H. M. Vordermeier, N. H. Smith, and V. G. Stephen. 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet. Microbiol.*, 112:127-139.
- Höner zu Bentrup, K., and D. G. Russell. 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.*, 9(12), 597-605.

- Itoh, S., Y. Kazumi, C. Abe, and M. Takahashi. 2003. Heterogeneity of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences of *Mycobacterium gordonae* clinical isolates identified with a DNA probe kit and by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.*, 41(4):1656-1663.
- Jarlier, V., and H. Nikaido. 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.*, 123(1-2):11-18.
- Jiménez-Pajares, M. S., L. Herrera, A. Valverde, P. Saiz, and J. A. Sáez-Nieto. 2005. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Mycobacterium kansasii* aisladas en España (2000-2003). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 23(5):254-258.
- Jonasson, P., S. Liljeqvist, A. Nygren, and S. Stahl. 2002. Genetic Design for Facilitated Production and Recovery of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 35:91-105.
- Jones J., L. Khatri, C. Garcia-Pelayo, A. Kaveh, S. Bachy, J. Hogarth, E. Wooff, P. Golby, and M. Vordermeier. 2013. Development of an unbiased antigen-mining approach to identify novel vaccine antigens and diagnostic reagents for bovine tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 20(11):1675-82.
- Kaneene, J. B. 2006. Epidemiology of *Mycobacterium bovis*. En *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans* (Second Edition, 34-48). Iowa, U.S.A: Blackwell Publishing.
- Karolemeas K., R. de la Rúa-Domenech, R. Cooper, V. Goodchild, S. Clifton-Hadley, J. Conlan, P. Mitchell, G. Hewinson G, A. Donnelly, L. Wood, and J. McKinley. 2012. Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS One.*, 7(8):e43217.
- Katoch, V. M. 2004. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J. Med. Res.*, 120(4):290-304.
- Kumar, G., P. Kumar, P. Kumar, H. Shankar, V. S. Yadav, V. M. Katoch, B. Bajaj, R. Gupta, U. Sengupta, and B. Joshi. 2010. Serodiagnostic Efficacy of Mycobacterium tuberculosis 30/32- kDa Mycolyl Transferase Complex,

- ESAT-6, and CFP-10 in Patients with Active Tuberculosis. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 58:57-65.
- Leão, S. C., A. Martín, G. I. Mejía, J. C. Palomino, J. R. Robledo, M. A. Telles, S. da, and F. Portaels. 2004. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*.
- Liébana, E., A. Aranaz, F. E. Aldwell, J. McNair, S. D. Neill, A. J. Smyth, and J. M. Pollock. 2000. Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunol.*, 99(1):23-29.
- Liu Q., D. Dosanjh, H. Varia, K. Ewer, P. Cockle, G. Pasvol, and A. Lalvani. 2004. Evaluation of T-Cell Responses to Novel RD1- and RD2-Encoded *Mycobacterium tuberculosis* Gene Products for Specific Detection of Human Tuberculosis Infection. *Infect. Immun.*, 72(59):2574-2581.
- LoBue, P. 2006. Public Health Significance of *M. bovis*. En *Mycobacterium bovis Infection in Animals and Humans* (Second Edition, pp. 6-12). Iowa, U.S.A.: Blackwell Publishing.
- LoBue P., W. Betancourt, L. Cowan, L. Seli, C. Peter, and K. S. Moser. 2004. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 8(9):1142-1146.
- López, M., O. Díaz, M. Vallecillo, S. Esquivel, and P. Gutiérrez. 2006. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Rev. Latin. Microbiol.*, 48(2):173-178.
- Malaghini M., V. Thomaz-Soccol, C. M. Probst, M. A. Krieger, H. Preti, A. Kritski, and R. Soccol. 2011. Recombinant antigen production for assays of intradermoreaction for diagnosis and surveillance of tuberculosis. *J. Biotechnol.*, 156(1):56-8.
- Marri, P. R., J. P. Bannantine, and G. B. Golding. 2006. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30(6):906-925.
- Maulén, N. P. 2011. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev. Méd. Chil.*, 139(12):1605-1610.

- Meher, A. K., N. Ch. Bal, K. V. R. Chary, and A. Arora. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS J.*, 273:1445-1462.
- Miroux, B., J. E. Walker. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.*, 19:260(3):289-98.
- Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(12):958-969.
- Mukamolova, G. V., A. G. Murzin, E. G. Salina, G. R. Demina, D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, and M. Young. 2006. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol. Microbiol.*, 59(1):84–98.
- Müller, B., S. Dürr, S. Alonso, J. Hattendorf, C. J. M. Laisse, S. D. C. Parsons, and J. Zinsstag. 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced Tuberculosis in Humans. *Em. Infect. Dis.*, 19(6):899-908.
- Murby, M., M. Uhlen, and S. Stahl. 1996. Upstream Strategies to Minimize Proteolytic Degradation Upon Recombinant Production in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 7:129-136.
- Mustafa, A. S. 2001. Biotechnology in the development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2(2):157-73.
- Nikaido, H., and V. Jarlier. 1991. Permeability of the mycobacterial cell wall. *Res. Microbiol.*, 142(4):437-443.
- Nikitushkin, V. D., G. R. Demina, M. O. Shleeva, S. V. Guryanova, A. Ruggiero, R. Berisio, and A. S. Kaprelyants. 2015. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria. *FEBS J.*, 282(13):2500-11.
- OIE. 2011. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrialmanual/access-online/> (Chapter 2.4.7. Bovine tuberculosis).
- OIE, O. M. de S. A. 2012. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2012.

- Pai, R. K., M. E. Pennini, A. A. R. Tobian, D. H. Canaday, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2004. Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect. Immun.*, 72(11):6603-6614.
- Pfyffer, G. E., B. A. Brown-Elliott, and R. J. J. Wallace. 2003. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedure. Manual of Clinical Microbiology. 8th Edition ed. Washington D.C.: *Am. Soc. Microbiol. Press.*, 532-559.
- Postma P. W., J. W. Lengeler. 1985. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 49:232-269.
- Proba, K., M. Ge, and A. Pluckthun. 1995. Functional Antibody Singlechain Fragments from the Cytoplasm of *Escherichia coli*: Influence of Thioredoxin Reductase (TrxB). *Gene*, 159:203-207.
- Prodinger, W. M., A. Brandstätter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M. L. Boschioli, and I. Moser. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 43(10):4984-4992.
- Raja, A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 120(4):213-232.
- Ramírez, R. A., R. B. Cocotle, P. A. Méndez, and B. J. Arenas. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev. Med. U. V.*, 2(2):36-40.
- Ravagnani, Adriana, C. L. Finan, and M. Young. 2005. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. *BMC Genom.*, 6:39.
- Raynaud, C., K. G. Papavinasasundaram, R. A. Speight, B. Springer, P. Sander, E. C. Böttger, and P. Draper. 2002. The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 46(1):191-201.
- Richter, E., M. Weizenegger, S. Rüscher-Gerdes, and S. Niemann. 2003. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41(6):2672-2675.

- Rivera, D. F., and D. G. Camargo. 2015. Genes de *Mycobacterium tuberculosis* involucrados en la patogenicidad y resistencia a antibióticos durante la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar. *Revista médicas UIS*, 28(1).
- Rodríguez, G. 2006. Mycobacterias. En *Temas de bacteriología y virología médica* (2a ed.). Oficina del Libro FEFMUR. Universidad de la República, Facultad de Medicina.
- Rosano, G., and F. Ceccarelli. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.*, 5:172.
- Rua-Domenech R., T. Goodchild, M. Vordermeier, G. Hewinson, H. Christiansen, and S. Clifton-Hadley. 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.*, 81(2):190-210.
- Ruggiero A. F., B. Tizzano, E. Pedone, C. Pedone , M. Wilmanns, and R. Berisio. 2009. Crystal structure of the resuscitation-promoting factor (DeltaDUF) RpfB from *M. tuberculosis*. *J. Mol. Biol.*, 9;385(1):153-62.
- Ruggiero, A., F. Squeglia, L. Pirone, S. Correale, and R. Berisio. 2011. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a major fragment of the resuscitation-promoting factor RpfB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 67(1):164-8.
- Ruggiero, A., D. Marasco, F. Squeglia, S. Soldini, E. Pedone, C. Pedone, and R. Berisio. 2010. Structure and Functional Regulation of RipA, a Mycobacterial Enzyme Essential for Daughter Cell Separation. *Struct.*, 8;18(9):1184-90.
- Russell, D. G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(1):39-47.
- Ryndak, M., S. Wang, and I. Smith. 2008. PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Trends. Microbiol.*, 16(11):528-534.
- SAGARPA. 2011. Informe de Evaluación de Avances logrados entre 2006 y 2010. Campaña contra la Tuberculosis Bovina.
- Schiller I., B. Oesch, M. Vordermeier, V. Palmer, N. Harris, A. Orloski, M. Buddle, C. Thacker, P. Lyashchenko, and R. Waters. 2010. Bovine tuberculosis: a review

- of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.*, 57(4):205-20.
- Schönfeld, J. K. 1982. Human-to-human spread of infection by *M. bovis*. *Tubercle*, 63(2):143-144.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2017. Situación actual de la Tuberculosis Bovina.
- Ryan K. J., and C. G. Ray. Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition. 2010. McGraw-Hill Medical.
- Shiloh, M. U., and P. A. D.Champion. 2010. To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Curr. Opin. Microbiol.*, 13(1):86-92.
- Sidders B., C. Pirson, J. Hogarth, G. Hewinson, G. Stoker, M. Vordermeier, and K. Ewer. 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect. Immun.*, 76(9):3932-9.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(3):463-496.
- Somoskövi, Á., J. E. Hotaling, M. Fitzgerald, V. Jonas, D. Stasik, L. M. Parsons, and M. Salfinger. 2000. False-Positive Results for *Mycobacterium celatum* with the AccuProbe *Mycobacterium tuberculosis* Complex Assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38(7):2743-2745.
- Spickler, A. R., J. A. Roth, J. Galyon, J. Lofstedt, and M. V. Lenardon. 2011. *Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales*. CFSPH Iowa State University. Recuperado el 23 de marzo de 2016, a partir de https://books.google.com.mx/books?id=s1R6wsyeT4IC&printsec=copyright&hl=es&source=gbs_pub_info_r#v=onepage&q&f=false
- Springer, B., L. Stockman, K. Teschner, G. D. Roberts, and E. C. Böttger. 1996. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 34(2):296-303.
- Steingart, K. R., N. Dendukuri, M. Henry, I. Schiller, P. Nahid, P. C. Hopewell, A. Ramsay, M. Pai, and S. Laal. 2009. Performance of Purified Antigens for

- Serodiagnosis of Pulmonary Tuberculosis: a Meta-Analysis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 16:260-276.
- Terpe, K. 2003. Overview of Tag Protein Fusions: From Molecular and Biochemical Fundamentals to Commercial Systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:523-533.
- Thoen, C. O., H. Hchzemeyer, and M. E. Himes. 1995. Laboratory diagnosis of bovine tuberculosis. In Thoen O. C., Steele J. E., editors. *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans. Iowa: Iowa State University Press., 63-72.
- Thoen, C. O., and R. G. Barletta. 2004. Mycobacterium. En *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (69-76). Blackwell Publishing. Recuperado a partir de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470344903.ch6/summary>
- Torres-Gonzalez, P., O. Soberanis-Ramos, A. Martinez-Gamboa, B. Chavez-Mazari, M. T. Barrios-Herrera, M. Torres-Rojas, and M. Bobadilla-del-Valle. 2013. Prevalence of Latent and Active Tuberculosis among Dairy Farm Workers Exposed to Cattle Infected by *Mycobacterium bovis*. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, 7(4):e2177.
- Vaillaud, J. C. 1966. Un exemple de contamination interhumaine de la tuberculose pulmonaire a bacilli bovin. *Poumon Coeur*, 22:1167-1169.
- Valdés, F., and A. Cid. 2004). Micobacterias atípicas. *Actas Dermosifiliogr.*, 95(6):331-357.
- Valdivieso, P., and T. Paola. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas (MNT) o atípicas por medio de la técnica de diagnóstico molecular polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme analisis (PRA) and restriction enzyme analisis (PRA), analisis de patrones de restricción. Facultad de ingeniería en Biotenología. *ESPE. Sede Sangolquí*. Recuperado a partir de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/687>
- Van Crevel, R., T. H. Ottenhoff, and J. W. Van der Meer. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2):294-309.

- van Asselt, E. J., Thunnissen, A. M., and Dijkstra, B. W. 1999. High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J. Mol. Biol.*, 291(4):877-898.
- Vergne, I., R. A. Fratti, P. J. Hill, J. Chua, J. Belisle, and V. Deretic. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* Phagosome Maturation Arrest: Mycobacterial Phosphatidylinositol Analog Phosphatidylinositol Mannoside Stimulates Early Endosomal Fusion. *Mol. Biol. Cell.*, 15(2):751-760.
- Villaverde, A., and M. Carrio. 2003. Protein Aggregation in Recombinant Bacteria: Biological Role of Inclusion Bodies. *Biotechnol. Lett.*, 25:1385- 1395.
- Vordermeier H. M., C. Cockle, A. Whelan, S. Rhodes, N. Palmer, D. Bakker, and G. Hewinson. 1999. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6:675-682.
- Vordermeier H. M., A. Whelan, J. Cockle, L. Farrant, N. Palmer, and G. Hewinson. 2001. Use of Synthetic Peptides Derived from the Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Differential Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8(3):571-578.
- Vordermeier H. M., J. Jones, M. Buddle, and G. Hewinson. 2016. Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, S0165-2427(16):30013-7.
- Vordermeier H. M., and A. O. Whelan. 2012. ELISPOT assays to enumerate bovine IFN- γ -secreting cells for the development of novel vaccines against bovine tuberculosis. *Methods Mol. Biol.*, 792:219-27.
- Wang, B. L., Y. Xu, Ch. Wu, Y. Xu, and H. Wang. 2005. Cloning, expression, and refolding of a secretory protein ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein. Expr. Purif.*, 39:184-188.
- Wanner, B. L., R. Kodaira, and F. C. Neidhardt. 1978. Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J. Bacteriol.*, 136:947-954.

- Waters R., V. Palmer, M. Buddle, and M. Vordermeier. 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine*, 30(16):2611-22.
- Weldingh, K., I. Rosenkrands, L. M. Okkels, T. M. Doherty, and P. Andersen. 2005. Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens. *J. Clinical Microbiol.* 43:57-65.
- Whelan A., D. Clifford, B. Upadhyay, E. Breadon, J. McNair, G. Hewinson, and M. Vordermeier. Development of a skin test for bovine tuberculosis for differentiating infected from vaccinated animals. *J. Clin. Microbiol.*, 48(9):3176-81.
- WHO, World Health O. 2015. Lepra: Datos y cifras. Recuperado el 23 de marzo de 2016, a partir de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/es/>
- Wigle, W. D., M. J. Ashley, E. M. Killough, and M. Cosens. 1972. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. The epidemiologic features of 31 active cases occurring between 1964 and 1970. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 106(4):528-534.
- Wingfield, T., I. Palmer, and S. Liang. 1995. Folding and Purification of Insoluble (Inclusion Body) Proteins from *Escherichia coli*. En Current Protocols in Protein Science. J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, and P. T. Wingfield. *John Wiley & Sons, New York*, 6.51-6.530.
- Wu, X., Y. Yang, J. Zhang, B. Li, Y. Liang, Ch. Zhang, M. Doing, H. Cheng, and J. He. 2010. Humoral Immune Responses against the Mycobacterium tuberculosis 38-Kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 Antigens in Tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:372-375.
- Yarian, C., M. Marszalek, E. Sochacka, A. Malkiewicz, R. Guenther, A. Miskiewicz, and P. F. Agris. 2000. Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA^{Lys}UUU species. *Biochem.*, 7;39(44):13390-5.

