

2005 B – 2010 A

399330937



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



1521021251

**CLONACIÓN DE LOS GENES PE-11, PE-34 Y PE-PGRS-11 DE
Mycobacterium bovis PARA UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA
TUBERCULOSIS BOVINA.**

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE TESIS QUE PARA
OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

BEATRIZ ANAID ESPARZA BECERRA

Las Agujas, Zapopan, Jal. Marzo de 2012



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología
COORD-BIO-114/2011

C. BEATRIZ ANAID ESPARZA RECERRA
PRESENTE

Manifiesto a usted que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES sobre, TESIS con el título: "CLONACION DE LOS GENES PE-11, PE-34 Y PE-PGRS-11 DE *Mycobacterium bovis* PARA UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA TUBERCULOSIS BOVINA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Jeannette Barba León y como asesora a Dr. Mario Alberto Flores Valdez.

Si, más por el momento, comparecamos para enviarle un cordial saludo.

ACENTUAMENTE
"BIEN Y TRABAJA"

Las Aguas, Nayarit, Zapopan, Jal., 24 de junio de 2011

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARÍA DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad tesis e informes, opción tesis con el título: "Clonación de los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS-11 de *Mycobacterium bovis* para una vacuna recombinante contra tuberculosis bovina" que realizó el/la pasante Beatriz Anaíd Esparza Becerra con número de código 399330937 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 29 de febrero de 2012.

Firma

Dra. Jeannette Barba León
Directora del trabajo

Firma

Dr. Mario Alberto Flores Valdez
Asesor(es)

Nombre completo de los Secretos(as) agrados por el Comité de Titulación	Firma de autor(es)	Fecha de aprobación
Dr. Daniel Ortuno Sahagún		1/3/2012
Dra. Luz Patricia Castro Félix		1/03/2012
Dra. Anne Marguerite Hélène Santerre		1/03/2012
Supl. Dr. Ramón Reynoso Orozco		1/03/2012

104 B3
14
3/25

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Jeannette Barba y al Dr. Mario Flores les agradezco enormemente el haberme aceptado en este proyecto y otorgarme su confianza y apoyo guiándome con gran paciencia en el desarrollo de esta tesis.

A mis hermanos (Hugo, Arturo y Adrian) por su apoyo.

A mis sinodales, Dr. Daniel Ortuño, Dra. Patricia Castro, Dra. Anne Santerre y Dr. Ramón Reynoso por ayudarme a enriquecer este trabajo.

A Claudia, Perla y todos mis compañeros del CIATEJ (Saira, Karely, Felipe, Michel) por toda su ayuda.

DEDICATORIA

A mi mamá, que siempre ha estado pendiente de nosotros y ha tenido que luchar todos los días para lograr que hoy yo pueda llegar hasta aquí, a mi papá que desde el cielo me cuida y vive siempre en mis pensamientos y a Gil por toda la ayuda y apoyo que me ha brindado. Gracias a ustedes hoy logro alcanzar esta meta.

Resumen

Mycobacterium bovis es el bacilo causal de la tuberculosis en el ganado. Aunque el huésped primario es el bovino, puede infectar además a otros mamíferos, incluyendo al ser humano. La TB causa una baja producción de leche y carne, lo que aunado al sacrificio de animales positivos en la prueba de tuberculina, ha provocado una serie de pérdidas económicas que afectan a la ganadería mundial.

La vacunación con BCG "bacille Calmette-Guérin" no ha proporcionado una eficaz protección contra esta enfermedad en el ganado, además de interferir en los resultados de las pruebas de detección con los ensayos tradicionales de tuberculina, motivo por el cual se busca elaborar vacunas que tengan una mayor eficacia y no interfieran con dichas pruebas. Al ser las vacunas de DNA una opción viable, se tomaron en cuenta para realizar el presente trabajo, en el cual, mediante la técnica de PCR, se amplificaron los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS-11 que se ligaron al plásmido pVAX1 y se transformaron en células electrocompetentes para su clonación. Tras la secuenciación de los fragmentos de PE-11 y PE-34 clonados, se confirmó que los plásmidos recombinantes de PE-11 mostraron identidad del 100% con respecto al gen de *M. bovis*.

Las vacunas de DNA recombinante constituyen un estímulo potente para la generación de respuestas celulares que hasta la fecha sólo se ha obtenido con aquellas basadas en microorganismos atenuados.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	5
2.1 Mycobacterium.....	5
2.2 Epidemiología.....	8
2.3 Familias PE (prolina-ácido glutámico) y PPE (prolina-prolina ácido glutámico)	12
2.4 Vacunas de DNA.....	14
3. Planteamiento del problema.....	19
4. Justificación.....	21
5. Objetivo general.....	22
5.1 Objetivos particulares.....	22
6. Materiales y métodos.....	23
6.1 Amplificación de los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS11.....	23
6.2 Electroforesis y purificación de las amplificaciones.....	25

6.3 Digestión y ligación.....	25
6.4 Transformación.....	26
6.5 Recuperación de transformantes.....	27
7. Resultados y discusión.....	28
8. Conclusión.....	36
9. Bibliografía.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema de la fagocitosis de <i>Mycobacterium</i>	4
2. Pared celular de las Micobacterias.....	7
3. Situación actual de erradicación y control de Tb en México.....	10
4. Clasificación por regiones dada por la USDA.....	11
5. Representación gráfica y sitio de clonación múltiple del plásmido pVAX1.....	16
6. Amplificación de PE-11 y PE-34.....	28
7. Amplificación de PE_PGRS-11.....	29
8. Digestión de las construcciones PE-11/pVAX1 y PE-34/pVAX1.....	31
9. Alineamiento de las secuencias clonadas de PE-11.....	32
10. Alineamiento de la secuencia clonada de PE-34.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.....	23
2. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados en la PCR.....	24
3. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la digestión.....	26
4. Cantidad y concentraciones usadas para la ligación de los genes al vector.....	30

ABREVIATURAS

BAAR: Bacilo alcohol resistente

BCG: Bacille Calmette-Guérin

DC: Células dendríticas

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Acido desoxirribonucleico

LB: Luria bertani

M. bovis: *Mycobacterium bovis*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Prolina-ácido glutámico.

PPD: Derivado Proteínico Purificado.

PPE: Prolina-prolina- ácido glutámico.

TB: Tuberculosis

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad bacteriana, infecto-contagiosa, crónica y zoonótica causada por alguno de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*; *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. microti*, *M. canettii* y *M. africanum* (Herrera y cols., 2009).

Esta enfermedad afecta tanto a seres humanos, como a bovinos e incluso animales domésticos y puede presentarse de forma activa o mantenerse en estado de latencia durante años y activarse cuando el sistema inmune se ve deprimido (Esquivel y Gutiérrez, 2009). Cuando la enfermedad se manifiesta puede afectar predominantemente a los pulmones, sin embargo, no es exclusiva de ellos, ya que puede diseminarse hacia cualquier órgano. La infección se da por la vía aérea al inhalar microgotas suspendidas en el aire, expelidas por un individuo infectado, o al consumir carne o productos lácteos contaminados; al estar los ganaderos o trabajadores de rastros en contacto directo con los animales infectados, son una población de riesgo (Esquivel y Gutiérrez, 2009).

Las poblaciones más vulnerables a adquirir esta enfermedad son los niños, ancianos y principalmente las personas portadoras del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), cuyo número ha aumentado en las últimas décadas, lo cual ha influido en la incidencia de la TB. Ambas enfermedades pueden ser asociadas como co-epidemias, ya que el 13% de las muertes de pacientes con VIH son ocasionadas por TB (ONUSIDA, 2010). Según datos de la OMS, más de 2000 millones de personas (cerca de un tercio de la población

mundial) están infectadas por este bacilo y de éstas, una de cada 10 contraerá TB activa en algún momento de su vida (OMS, 2010; Russell y cols., 2009).

En bovinos, las principales formas de diseminación son la vía aérea y la ingesta de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, heces u orina provenientes de animales infectados (Kaneene y Pfeiffer, 2006). Otra potencial fuente de infección en los terneros es el consumo de leche cruda proveniente de vacas afectadas, debido a que se considera que entre el 1 y 2% de vacas tuberculosas eliminan *M. bovis* por la leche (Abdala, 1998).

La infección por vía pulmonar se inicia cuando se inhala el bacilo que se encuentra suspendido en el aire, el cual puede sobrevivir en el ambiente por algunas horas luego de ser expulsado por un organismo infectado (Romero y cols., 2006). Una vez instalado en los alveolos pulmonares es fagocitado por los macrófagos lo que provoca que el organismo los envuelva formando así los granulomas o tubérculos característicos de esta enfermedad. Estos granulomas en sus estados iniciales consisten en nódulos altamente vascularizados, en cuyo núcleo se encuentran los macrófagos infectados delimitados por células gigantes, y demás células mononucleares rodeadas por linfocitos. Esta respuesta del tejido pulmonar contiene la infección y frena el periodo de reproducción rápida del *Mycobacterium*. A medida que madura el granuloma se desarrolla una cápsula de tejido fibroso cuyo centro muestra áreas de necrosis caseosa (tipo de necrosis caracterizada por ausencia de arquitectura y detalle celular donde el tejido adquiere una apariencia granular de color blanco o amarillento de consistencia cremosa) que

contiene depósitos calcificados rodeados por una zona de linfocitos, células epiteloides, fibroblastos y células gigantes (IIICA Perú, 2010). Así mismo, existe una marcada disminución en los vasos sanguíneos que penetran a éste. En esta fase, el granuloma se puede considerar como una unidad estable en la infección. Sin embargo, en algunos granulomas existe un aumento en el número de células gigantes, las cuales pueden ser las responsables de una mayor acumulación de residuos caseosos en el centro del granuloma, lo que provoca la necrosis y el colapso del centro del tubérculo y con esto la liberación de bacilos vivos a las vías respiratorias lo que desencadena la tos productiva que genera los aerosoles infecciosos Fig. 1.

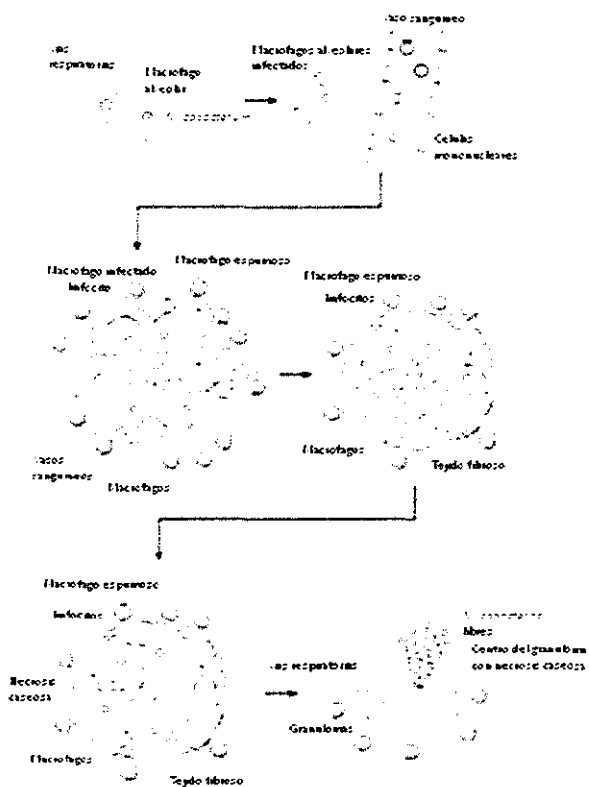


Fig. 1. Esquema de la fagocitosis de *Mycobacterium* por los macrófagos. Modificado de Russel et al, 2009.

Los síntomas principales de la TB pulmonar y entérica son: tos, disnea, anorexia, fiebre, linfadenopatía, dolor abdominal, ascitis, náuseas y diarreas persistentes o alternancia de diarrea con estreñimiento (Huamán, 2002).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Mycobacterium*

Las micobacterias son bacilos, aerobios, inmóviles, sin flagelos, no formadores de esporas; pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* y la clase *Actinomycetes*. Se pueden dividir en tres grupos principales que son: complejo tuberculosis (Herrera y cols., 2009), complejo lepra (*M. leprae*) y micobacterias atípicas o no tuberculosas (Editorial CEP, 2010; Alcaide y cols., 2010). Su crecimiento puede ser filamentosos, con ligera alteración, que llega a fragmentar en bacilos o elementos cocoides. Estos microbios tienen un contenido de Guanina + Citocina del 65% aproximadamente y presentan una pared celular peculiar, con componentes únicos tales como los ácidos micólicos (Acosta y cols., 2009). La cápsula es la capa externa de las micobacterias y le brinda protección contra factores externos a la vez que tiene interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Los principales componentes de la cápsula son el ácido micólico y los glucolípidos, estos últimos en conjunto con algunas proteínas, son los responsables de las características antigénicas de la bacteria, además contiene lípidos como el "cord factor" (trealosa 6,6'-dimicolato) (Alcaide y cols., 2010). La pared se encuentra localizada debajo de la cápsula y brinda soporte mecánico y protección, posee de 50- 60% de lípidos, lo que le confiere el carácter hidrofóbico a la bacteria, está constituida por peptidoglucano y arabinogalactanos, los cuales se encuentran unidos a los ácidos micólicos (fig. 2). La membrana plasmática proporciona protección osmótica y permite el transporte de iones y

moléculas, los derivados de los fosfolípidos se encuentran altamente glucosilados, formando moléculas de lipoarabinomanana (LAM), que están relacionadas con la patogénesis de la tuberculosis (Gorocica y cols., 2005).

Debido al alto contenido de lípidos en la pared celular, esta bacteria no se tiñe mediante la tinción de Gram, por lo que su coloración se realiza comúnmente con el método de Ziehl-Neelsen, en el que se utiliza la carbolfucsina, colorante que penetra en la célula y se fija a los compuestos lipídicos, que una vez teñidos resisten a la decoloración ácido-alcohólica, por lo que se les denomina bacilos ácido- alcohol resistentes (BAAR) (Rodríguez y cols., 2005). Aunque *Mycobacterium* ha sido clasificada como bacteria Gram positiva, su posición filogenética es controversial debido a que su pared celular contiene características de bacterias tanto de Gram positivo como de Gram negativo. En un estudio realizado por Fu y Fu-Liu (2002) se compararon los genes ortólogos de dieciséis microbios y se mostró que la distancia ancestral de *Mycobacterium* es más cercana a los Gram negativos que a los Gram positivos.

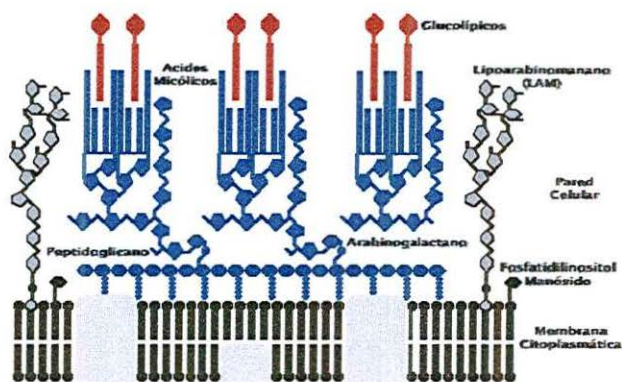


Fig. 2. Pared celular de una Micobacteria. Se observa una membrana citoplasmática, por encima se encuentra el peptidoglucano el cual contiene N-glucosilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina. Este péptido se une al arabinogalactano al que a su vez se anclan los ácidos micólicos en su extremo distal. Los glucolípidos están unidos a los ácidos micólicos y se encuentran en la periferia de la pared. Imagen obtenida de:

<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/general.php?Mostrar=baar>

El crecimiento de las micobacterias en cultivos *in vitro* varía entre especies, el tiempo puede ir entre 1 a 3 o más semanas de incubación para formar colonias aisladas en medio sólido, necesitan carbono y nitrógeno así como sales minerales, y la presencia de CO_2 para estimular su crecimiento. Sin embargo, a diferencia del resto de las micobacterias, *M. leprae* solo es capaz de crecer en cultivos celulares o animales de experimentación (Alcaide y col., 2010).

M. bovis es resistente a la desecación y a la congelación, por lo que puede sobrevivir durante largos periodos en el ambiente sobre objetos inanimados. No obstante, es susceptible a los rayos ultravioleta, al calor y a algunos productos, como el óxido de etileno, formaldehído, etanol al 70%, glutaraldehído al 2%, ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado (Alcaide y cols., 2010).

2.2 Epidemiología

La TB bovina es una zoonosis de distribución mundial, su epidemiología resulta compleja ya que se trata de una bacteria de lento crecimiento que puede permanecer en forma latente y afectar tanto a humanos como a los animales domésticos y silvestres, los cuales fungen como reservorio (Estrada y cols., 2004).

La evaluación ante-mortem es un componente crítico en los programas de control de TB en el ganado alrededor del mundo. Uno de los métodos diagnósticos prácticos más utilizados es la evaluación mediante la prueba intradérmica (Kaneene y Pfeiffer, 2006) con derivado proteínico purificado (PPD) o tuberculina, la cual es la prueba de rutina para el diagnóstico en campo. Esta prueba se aplica en el pliegue caudal cuando se requiere mayor sensibilidad (en caso de alta prevalencia) o se utiliza la doble comparativa en el cuello cuando se requiere mayor especificidad (zonas con baja prevalencia) (Estrada y cols., 2004).

Algunos países, como es el caso de Cuba, han erradicado o se encuentran en proceso de erradicación de la TB. Estados Unidos, Canadá y Europa Occidental han logrado reducir la prevalencia al 1%, Centro América (a excepción de Nicaragua y el Caribe) tiene un porcentaje de menos del 1% y América del Sur tiene prevalencias superiores al 1% al ser sus cuencas lecheras las más afectadas (Abdala, 1998).

En México el inventario nacional bovino es de alrededor de 30 millones de cabezas, del cual el 93% se dedica a producción de doble propósito (carne y leche) y el 7% a la producción de leche (Senasica, 2011). En 1995 se publicó la Norma Oficial Mexicana "Campaña Nacional contra Tuberculosis Bovina", la cual establece los procedimientos, actividades, técnicas y criterios a seguir para controlar y erradicar la TB bovina en el país. Con el fin de lograr dichos objetivos esta campaña establece que los animales positivos a la prueba de tuberculina deben ser sacrificados y decomisados o aislados en instalaciones especiales para albergar animales reactivos hasta su posterior sacrificio (NOM 031, 1995). La aplicación de esta campaña ha contribuido a la disminución de la prevalencia de TB, el 82% del territorio nacional presenta una prevalencia menor al 0.5% (Senasica, 2011). En la actualidad; se encuentran en fase de erradicación los estados de; Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán. Por su parte Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas, cuentan con una prevalencia menor al 2%, el resto del país se encuentra en fase de control, con una prevalencia mayor al 2%, (Fig. 3).



Fig. 3. Situación actual de erradicación y control de Tb bovina en México.

En color amarillo se representan las regiones que se encuentran en fase de erradicación con una prevalencia <0.50%. El color rojo se encuentran las regiones en fase de control con una prevalencia promedio al 2.05% (excepto cuencas lecheras con un 16.5%). Imagen tomada de SENASICA: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>, ultimo acceso: 23/01/12

Para fines de exportación de ganado en pie (ganado vivo) hacia los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) emite criterios de clasificación con base a la prevalencia. La categoría acreditado modificado avanzado (no requiere pruebas de tuberculina) e implica una prevalencia menor al 0.01%, en México únicamente el estado de Sonora cuenta con este tipo de acreditación. Acreditado modificado (requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar), se refiere a una prevalencia menor al 0.1%, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Yucatán, el sur de Sonora y algunas regiones

de los estados de Baja California, Jalisco, Zacatecas, Nayarit, Nuevo León, Puebla y Veracruz son los estados que cuentan con este tipo de autorización. Acreditado preparatorio (requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar), significa una prevalencia menor al 0.5%; los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Michoacán, Tabasco y Colima cuentan con este tipo de acreditación; y No acreditado (Movilización para exportación solo para sacrificio inmediato), implica una prevalencia mayor al 0.5% (Russell y cols., 2009). (Fig. 4).



Fig. 4, Criterios de clasificación por regiones dada por la USDA. En color amarillo se encuentra la región "Acreditado modificado avanzado", en color verde "Acreditado modificado", en color azul "Acreditado preparatorio" y en color rojo las regiones "No acreditadas".

Imagen tomada de SENASICA: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>, ultimo acceso:23/01/12

En México, la participación del *M. bovis* en la TB humana en algunas regiones se ha estimado en 7% aproximadamente, en las zonas fronterizas con los Estados Unidos la proporción puede llegar hasta el 40%. A manera de prevención de esta enfermedad se lleva a cabo la aplicación de la vacuna BCG, la cual es una cepa atenuada de *M. bovis* que se aplica tanto en humanos como en bovinos (Tundup y cols., 2008).

2.3 Familias PE (prolina-ácido glutámico) y PPE (prolina-prolina-ácido glutámico)

La familia PE se caracteriza por la presencia de prolina (P) y ácido glutámico (E) en las posiciones 8 y 9 con un dominio conservado N-terminal de aproximadamente 110 aminoácidos. Por su parte, la familia PPE se deriva del motivo prolina-prolina-acido glutámico en las posiciones 7-9, y contiene un dominio conservado N-terminal de 180 aminoácidos. El dominio C-terminal de ambas familias se encuentra altamente conservado y tiene una variación de tamaño, secuencia y número de copias, lo que permite dividir las subfamilias (Gey vanPittius y cols., 2006).

La familia PE consta de la subfamilia: PE de 34 miembros, la cual consiste en proteínas con el dominio C-terminal de baja homología y de la subfamilia PE_PGRS (*GC-rich-repetitive sequence*) de 65 miembros, esta subfamilia se caracteriza por contener proteínas de múltiples repeticiones en tándem de (Gly-Gly-Ala) o (Gly-Gly-Asn) en el dominio C-terminal (Chaitra y cols., 2005). En cuanto a la familia PPE, ésta puede dividirse en cuatro subfamilias: SVP de 24

miembros, las proteínas de esta subfamilia se caracterizan por los motivos Gly-X-X-Ser-Val-Pro-X-X-Trp entre las posiciones 300 y 350 en la secuencia de amino ácidos, la subfamilia MPTR (Major polymorphic tandem repeat, por sus siglas en inglés) de 23 miembros, que contiene múltiples repeticiones del motivo Asn-X-Gly-Asn-X-Gly en el C- terminal que codifica para la secuencia repetida GCCGGTG separada por cinco espaciadores, La subfamilia PPW de 10 miembros, contiene una región conservada de 44 amino ácidos en C- terminal y la subfamilia PPE de 12 miembros, consiste en proteínas con bajo porcentaje de homología en C-terminal (Gey vanPittius y cols., 2006).

Las familias PE y PPE son exclusivas de las micobacterias y son particularmente abundantes en las cepas patógenas. No se conoce totalmente la función de las proteínas codificadas por estas familias (Sampson, 2010), sin embargo se piensa que están relacionadas con la patogénesis de la bacteria y la variación antigénica (Gey vanPittius y cols., 2006).

Se ha descrito que *M. bovis* comparte una similitud genómica del 99.95% con *M. tuberculosis*, sin embargo el tamaño de su genoma se ha reducido debido a diversas deleciones (Acosta y cols., 2009), se presenta un mayor grado de variación entre estas dos cepas en los genes que codifican la pared celular y algunas proteínas secretadas, además existe una amplia variación en los genes que codifican para las proteínas de las familias PE_PGRS y PPE. La evidencia sugiere que algunas de estas proteínas son expuestas en la superficie y

desempeñan un papel en la adhesión y modulación inmune (Garnier y cols., 2003). Un estudio previo realizado por Rehren y cols. (2007) reporta que dieciocho genes (11%) de las familias PE/PPE mostraron tener una alta expresión en *M. tuberculosis* mientras que en *M. bovis* tres genes (3.2%) pertenecientes a estas familias mostraron una mayor expresión (Rehren y cols., 2007). Algunos de los genes que han tenido mayores niveles de expresión en *M. bovis* en comparación con *M. tuberculosis* son PE-55, PE-35 y PPE-68 todas ellas proteínas secretadas en la superficie o involucradas en la virulencia de la bacteria (Golby y cols., 2007). Dichas familias son importantes desde el punto de vista inmunológico, se ha demostrado que las proteínas de estas familias son antígenos reconocidos por los linfocitos B y T así como también promueven la producción de INF γ (Chaitra y cols., 2005; Hanif y cols., 2010), además de que influyen en la virulencia de la micobacteria al evadir la respuesta inmune del hospedero.

2.4 Vacunas de DNA

Las vacunas de DNA están constituidas por un vector de expresión en el cual se inserta el gen de interés bajo el control de un promotor eucariote, éste permite la transcripción y traducción de dicho gen en la célula, dando lugar a la proteína que actuará como antígeno. De manera funcional, el vector plasmídico empleado para vacunas de DNA está compuesto por un origen de replicación procariote, que permite la amplificación y propagación del plásmido en bacterias; un gen de resistencia a antibióticos (generalmente kanamicina o ampicilina), como marcador de selección de las células bacterianas que portan el plásmido; un promotor

eucariótico fuerte, que garantice altos niveles de transcripción del gen de interés en la célula eucariota (generalmente promotores virales como el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano); un sitio múltiple de clonación, inmediatamente después del promotor para insertar la secuencia de interés; una secuencia de terminación de la transcripción y una secuencia estabilizadora del RNA mensajero transcrito, dada por una cola de poliadenina derivada del virus simio 40 (SV40) o del gen que codifica para la hormona de crecimiento bovina (Díaz y Barrera, 2006) y las secuencias CpG, inmunoestimuladoras que funcionan como un adyuvante interno en la misma vacuna (Reyes y Pinto, 2002)(Fig. 5).

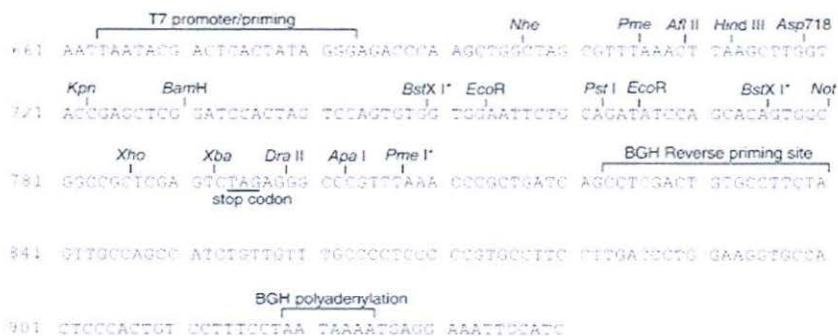
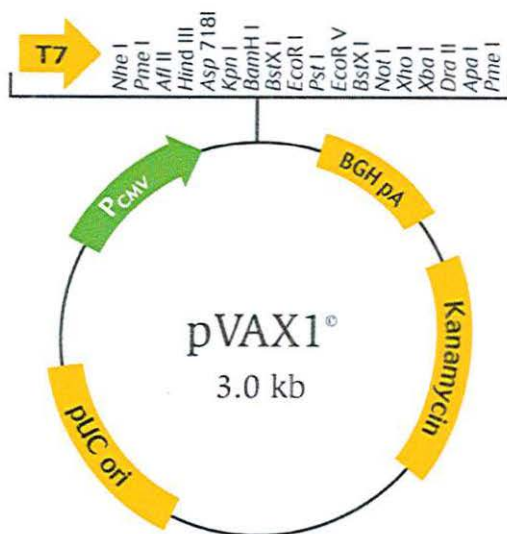


Fig 5. Representación gráfica y sitio de clonación múltiple del plasmido pVAX1 utilizado en este estudio.

Obtenido de: www.invitrogen.com

Las vacunas de DNA contemplan varios métodos de inmunización, que incluyen la inyección directa (intramuscular, intradérmica o intravenosa), la electroporación, balística mediante una pistola de genes (GeneGun) y los vectores virales. Utilizando el método de la inyección directa de plásmidos de DNA se dispone de la introducción del DNA plasmídico de forma fácil y accesible, sin requerir de equipo especializado o complejo, como la electroporación y la balística. En la inoculación intramuscular se puede utilizar solución salina fisiológica (Madrigal, 2006) o alguna clase de adyuvante como el hidróxido de aluminio (Beltrán y cols., 2010); una vez inoculados en el organismo, los motivos CpG (motivos encontrados comúnmente en bacterias y protozoos) (Reyes y Pinto, 2002) que se encuentran en el vector, son reconocidos por los receptores tipo Toll 9 (TRL9 por sus siglas en inglés) de las células dendríticas (DC), y de esta manera los organismos son fagocitados por las DC en donde se transcribe el DNA y se expresa el antígeno, desencadenando así la respuesta inmune, tanto innata como adquirida. Un estudio realizado por Beltrán y cols. (2010), muestra evidencia, por *Western blotting* en geles 2D, de la expresión de 12 proteínas correspondientes a antígenos de *M. bovis*, en sueros extraídos de ratones inmunizados con vacunas de DNA recombinantes, que contenían hidróxido de aluminio como adyuvante.

Desde hace algunos años las vacunas de DNA se han probado en los bovinos, en los cuales se ha utilizado una combinación de genes que codifican para los antígenos 85B, MPT64 y MPT83, los cuales muestran una mejora inmunológica al producir una respuesta de interferón gama ($\text{INF}\gamma$) mayor a la inducida por la

inoculación de BCG, además de reducir la aparición de lesiones en los pulmones y en los ganglios linfáticos (Cai y cols., 2005).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mycobacterium bovis es el agente causal de tuberculosis en una amplia gama de especies animales y el ser humano. Este patógeno en el año 2003 ocasionó una pérdida a la agricultura mundial de 3 mil millones de dólares (Garnier y cols., 2003). La persistencia e incremento en la incidencia de TB es un problema de salud animal en el mundo; debido a que el ganado bovino afectado disminuye su producción de leche en un 17%, reduce su ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta en un 15% y la fertilidad en un 6%, lo que merma el óptimo desarrollo y rentabilidad de la explotación ganadera (García y cols., 2005). En nuestro país, los animales positivos a la prueba de la tuberculina deben ser sacrificados y decomisados (NOM 031, 1995) lo que provoca importantes pérdidas económicas. Según informes del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en México se han tenido pérdidas que alcanzan los 40 millones de dólares anuales sólo por el sacrificio del ganado enfermo. Esta medida, puede causar que muchos ganaderos no apliquen las pruebas de diagnóstico a los animales de su propiedad, por lo cual es factible hipotetizar que se comercialicen productos o subproductos contaminados por *Mycobacterium*. Si bien la pasteurización de la leche disminuye el riesgo de adquirir la enfermedad, en el país sólo el 50% de la leche producida se somete a este proceso y el resto se consume o transforma en derivados lácteos no pasteurizados, lo que implica un alto riesgo para la salud pública (Perez y cols., 2008; Senasica, 2011).

La vacunación con BCG en el ganado bovino ha reportado una eficacia protectora variable en el campo, dicha variabilidad puede tener diversas explicaciones tales como el uso de diferentes cepas de BCG, la sensibilización previa de los animales con micobacterias ambientales, la exposición de animales a *M. bovis* en leche antes de la vacunación, la infección con helmintos, parásitos o la administración de altas dosis de BCG, lo cual induce una inapropiada respuesta inmune (Buddle, 2010). Por otro lado, la aplicación de esta vacuna podría interferir con las pruebas de la tuberculina (Estrada y cols., 2004) dando falsos-positivos, por tratarse de un examen no específico, lo que provoca el decomiso de animales sanos (Acosta, 2009; De Ward, 2005).

4 JUSTIFICACIÓN

La persistencia e incremento en la incidencia de TB es un problema de salud animal en el mundo entero, debido a la baja eficacia de la vacunación con BCG. Por ello, es necesaria la generación de nuevas vacunas más eficaces para contrarrestar este mal, como lo son las vacunas de DNA recombinante, ya que además de promover una buena respuesta inmune, la estabilidad de los vectores plasmídicos a diferentes temperaturas, permite disminuir costos en el proceso de elaboración, transporte y administración debido a que no se requiere una cadena fría para mantener la estabilidad de la vacuna.

Las familias PE/PPE son importantes desde el punto de vista inmunológico al estar involucradas en la virulencia de las micobacterias, motivo por el cual son consideradas para el desarrollo de nuevas vacunas de DNA recombinante que ofrezcan protección contra TB.

5. OBJETIVO GENERAL

Clonar los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS11 de *Mycobacterium bovis* como parte de una vacuna poli-antigénica de DNA recombinante.

5.1 Objetivos particulares

- 1.- Amplificar los genes que codifican para las proteínas PE-11, PE- 34 y PE-PGRS11 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 2.- Generar los plásmidos recombinantes que contengan los genes que codifican para las proteínas PE-11, PE-34 y PE- PGRS-11.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Amplificación de los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS-11

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar los genes PE-11, PE-34 y PE-PGRS-11 a partir del DNA genómico de *M. bovis* AN5, amablemente donado por el Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera, investigador del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño de Estado de Jalisco (CIATEJ). La tabla 1 muestra los oligonucleótidos diseñados para este trabajo los cuales fueron obtenidos con el programa *Amplify 3x* para Mac, para su elaboración se consideró la longitud y la tm (temperatura media) así como los sitios de corte de las enzimas *HindIII* y *XbaI* para lograr su clonación de manera direccional.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Tamaño	Secuencia	Sitio de corte
PE11 (forward)	367pb	5'-GGAAGCTTATGCAGGCATGCTTTTG-3'	<i>HindIII</i>
PE11 (reverse)	367pb	5'-TGAGCTCTAGAGGAAAAATTGTGAAATCC-3'	<i>XbaI</i>
PE34 (forward)	395pb	5'-GCAAGCTTGGGAGGGAGACATGCAG-3'	<i>HindIII</i>
PE34 (reverse)	395pb	5'-CGTCTAGACTATCAGCTAATTCGGCGCGC-3'	<i>XbaI</i>
PE-PGRS 11 (forward)	1827pb	5' ACAAGCTTGGGGAAACGATGTCATTG 3'	<i>HindIII</i>
PE-PGRS 11(reverse)	1827pb	5' GGTCTAGACTCGCAGCGGCTC 3'	<i>XbaI</i>

Nota: La flecha roja indica el sitio de corte de *HindIII* mientras que la flecha azul indica el sitio de corte de *XbaI*

Tabla 2. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados en la PCR.

Reactivo	Cantidad (μ l)	Concentración
DNA	2	--
Oligos	1	0.25
Buffer	5	1x
Enzima	1	1U
DNTP's	1	200 μ M

Nota: estas cantidades sea ajustaron con agua milli-Q para una reacción de 50 μ l.

Para la amplificación de PE11 y PE34 se utilizó la enzima *Pfu-DNA Polymerase*, a su vez para la amplificación de PE-PGRS-11 se utilizó la enzima *Phusion Hot start* (Finnyzimes), ambas reacciones con los reactivos que se muestran en la tabla 2, la amplificación se realizó en un termociclador (2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: PE-11 desnaturalización inicial 94°C 5 min seguido de la desnaturalización a 94°C 40 s, alineación 60°C 40 s, elongación 72°C 40 s por 8 ciclos seguido de, elongación 94°C 40 s, alineación 65°C 40 s, elongación 72°C 40 s por 22 ciclos. La reacción de PE-34 y PE-PGRS 11 constó de tres fases; desnaturalización 98°C 1 min, alineación 58°C 1 min, elongación 72°C 2 min por 7 ciclos. Desnaturalización 98°C 1 min, alineación 64°C

1 min, elongación 72°C 2 min por 8 ciclos. Desnaturalización 98°C 1 min, alineación 66°C 1 min, elongación 72°C 2 min por 15 ciclos.

6.2 Electroforesis y purificación de las amplificaciones.

Los productos amplificados de PE-11, PE-34 se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% el cual se tiñó con 2 µl *Sybr safe* para preparar 30 ml de agarosa, se utilizó el marcador *2 log DNA ladder* (New England Biolabs), y se observó en un analizador de imágenes (Biorad), se determinó el tamaño de los fragmentos amplificados, 367 pb para PE11 y 395 pb para PE-34. El amplificado de PE-PGRS-11 se cargó en su totalidad en un gel de agarosa bajo las mismas condiciones anteriores, tras la separación, se cortó la banda que contenía el fragmento esperado de 1827pb. Posteriormente, se purificó dicha banda utilizando *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen), por otra parte los productos obtenidos de la amplificación de PE11 y PE34 así como el plásmido pVAX1 se purificaron con *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN), las purificaciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3 Digestión y ligación.

Una vez purificados los 3 productos de PCR y el plásmido, se realizó una digestión con las endonucleasas de restricción XbaI y HindIII (New England Biolabs) durante 2h a 37°C (ver tabla 3), las enzimas se inactivaron en baño de agua a 65°C por 20 min, el plásmido se sometió a una desfosforilación con la enzima *Rapid alkaline phosphatase* (Roche) durante 30 min a 37°C seguido de la inactivación en baño

de agua a 75°C por 2 min. Enseguida, la concentración de los amplificadores y la del plásmido se cuantificó en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop) y se procedió a realizar las ligaciones PE-11/pVAX, PE-34/pVAX y PE-PGRS-11/pVAX utilizando la enzima T4 DNA ligase, dichas ligaciones se almacenaron a temperatura ambiente durante toda la noche.

Tabla 3. Cantidad y concentración de los reactivos utilizados para la digestión

Reactivo	Cantidad μ l	Concentración
DNA	10	–
Buffer	2	1x
HindIII	1	1 U
XbaI	1	1 U
Agua milli-Q	6	–

6.4 Transformación.

Las bacterias electrocompetentes de *Escherichia coli* One shot Top 10 electrocomp cells (Invitrogen) se transformaron con las ligaciones mediante choque eléctrico a una resistencia de 200 ohms, capacitancia 25 μ F y voltaje 2.5 KV. Las bacterias se recuperaron en un tubo con 1mL de caldo Luria- Bertani (LB) en una incubadora con agitación a 37°C/ 250 rpm durante 1 h. Se transfirió cada

caldo a microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 12000 rpm/1 min, se eliminaron 800 μ l de caldo, las pastillas formadas se suspendieron en el caldo restante y se distribuyó la suspensión celular en placas de agar LB más kanamicina 50 μ g/mL se utilizaron perlas de vidrio, posteriormente se incubaron a 37°C durante 16-18 h.

6.5 Recuperación de transformantes.

Cada una de las colonias obtenidas se transfirió a tubos con 5 mL de caldo LB más kanamicina 50 μ g/mL y se incubaron en agitación 37°C/ 250 rpm durante 16-18 h, se tomó una alícuota de cada uno de los caldos por separado y se purificó el plásmido transformado con el kit comercial *QIAprep Spin miniprep kit* (QIAGEN). Al plásmido purificado se le realizó una nueva digestión con las enzimas de restricción XbaI y HindIII a 37°C/2 h y los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con *Sybr safe* (Invitrogen). El gel se observó en un analizador de imágenes y se identificó el plásmido y los fragmentos de DNA liberados según su tamaño comparado con el marcador *2 log ladder*: pVAX 3kb, PE-11 367pb y PE-34 395pb. Las colonias que contenían los plásmidos cuyos fragmentos coincidieron con el tamaño correspondiente al fragmento clonado se purificaron con el kit *QIAprep Spin miniprep* (QIAGEN) para ser almacenados en glicerol al 25% a -70°C. Posteriormente se enviaron a secuenciar los plásmidos recombinantes obtenidos de PE-11 y PE-34 y una muestra de sus respectivos oligonucleótidos para confirmar la identidad de estos fragmentos al Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad, del CINVESTAV Irapuato.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por PCR se amplificaron los genes PE-11 y PE-34 marcador y se comprobó que su tamaño correspondía al de los productos esperados 367pb y 395 pb, respectivamente (fig.6), por lo que se procedió a su purificación y digestión.

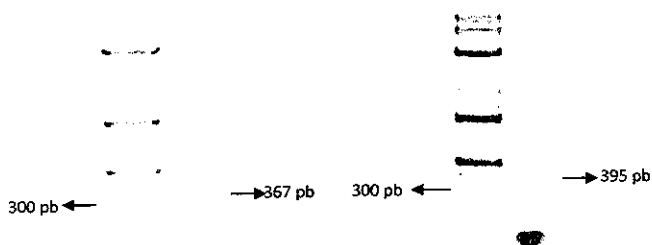


Fig. 6. Amplificación de PE-11 y PE-34. En la imagen de la derecha se puede observar en el primer carril el marcador 2 Log DNA ladder seguido de la amplificación de PE-11 con un tamaño de 367 pb. En la imagen de la izquierda se observa el primer carril con el marcador 2 Log DNA ladder seguido de la amplificación de PE-34 con un tamaño de 395 pb.

El producto amplificado de PE-PGRS-11 al ser analizado mostró múltiples bandas como se muestra en la fig. 7, por lo que se decidió aislar la banda del producto de PCR del tamaño esperado (1827 pb) para su posterior purificación y digestión.

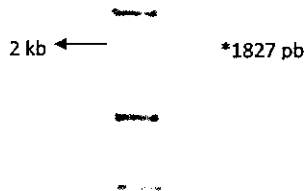


Fig. 7. Amplificación de PE-PGRS-11. En esta imagen se observa en el primer carril el marcador 2 Log ladder seguido de los productos de PCR donde se destaca la banda de interés PE-PGRS-11 con un tamaño de 1827 pb.

La concentración de los productos amplificados purificados y digeridos fue de: 17.3 ng/μl para PE-11, 28 ng/μl para PE-34 y 9.4 ng/μl para PE-PGRS-11. La concentración del plásmido digerido fue de 46.1 ng/μl, con esta información y al conocer la relación de pVAX1 sobre los productos amplificados (ver tabla 4) se realizó la ligación de los fragmentos con el plásmido, la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche.

Tabla 4. Cantidad y concentraciones usadas para la ligación de los genes al vector

Fragmentos	Relación	Cantidad μ l	Concentración
pVAX1/ PE-11	8.1: 1	pVAX1 5.5	46.1 ng/ μ l
		PE-11 3	17.3 ng/ μ l
pVAX1/ PE-34	7.5: 1	pVAX1 6.5	46.1 ng/ μ l
		PE-34 2	28 ng/ μ l
pVAX1/ PE-PGRS-11	1.6: 1	pVAX1 1.5	46.1 ng/ μ l
		PE-PGRS-11 7	

En todas las reacciones se agregó 1 μ l de buffer y .5 μ l de enzima ligasa.

Las transformaciones se realizaron mediante un choque eléctrico con una duración de 4.58 ms para PE-11, 4.62 para PE-34 ms y 4.78 ms para PE-PGRS-11, después del choque eléctrico las bacterias se recuperaron en medio líquido sin antibiótico y se transfirieron en placas de agar LB con kanamicina para su crecimiento. Trascurrido el periodo de incubación, la placa con las transformantes de PE11/ pVAX1 mostraron el crecimiento de cuatro colonias y la perteneciente a PE34/ pVAX1 de tres colonias, la placa con las transformantes pertenecientes a PE-PGRS-11/pVAX1 no mostró crecimiento.

De las colonias obtenidas de ambas placas se tomaron alícuotas de 1 mL a partir de los cuales se purificó el plásmido transformado para posteriormente realizar

una doble digestión con XbaI y HindIII, con el fin de separar a los fragmentos PE11 (367 pb) y PE34 (395 pb) del plásmido pVAX1 (3 kb) tal y como se muestra en la Fig. 8.

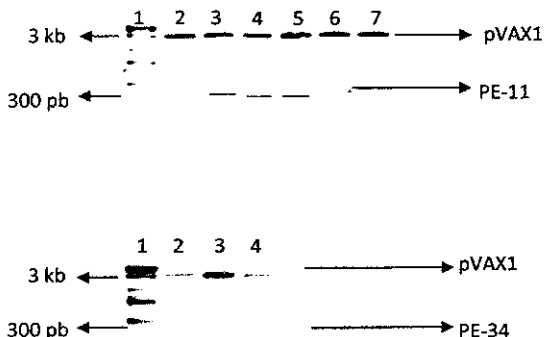


Fig. 8. Digestión de las construcciones PE-11/pVAX1 y PE-34/pVAX1 con las endonucleasas HindII y XbaI. En el gel superior se puede observar en el carril 1 el marcador 2 Log DNA ladder, en los carriles 3, 4 y 5 se ve la separación del plásmido y el fragmento de PE11. En el gel inferior se observa nuevamente en el carril 1 el marcador 2 Log DNA ladder y en el carril 4 la separación del plásmido y el fragmento PE-34.

A los tubos con los caldos que contienen las construcciones se les asignó la una leyenda para su identificación (PE11c2, PE11c3, PE11c4 y PE 34c6), se purificó en su totalidad para extraer el plásmido y se guardó en glicerol al 25%. El resultado de la secuenciación dió a conocer que las tres clonas obtenidas de PE11 tienen una identidad del 100% con el gen respectivo de *M. bovis* como se muestra en el alineamiento ClustalW2 (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) (Fig 9).

```

c2 -----ATTCGATTGGGGAAACGGCCGCCAACCTCCACGAG
c3 -----GATTCGATTGGGGAAACGGCCGCCAACCTCCACGGAG
c4 -----ATTCGATTGGGGAAACGGCCGCCAACCTCCACGGAG
PE11 GTGTCTTTGTGACCACACGGCCCGGATTCGATTGGGGAAACGGCCGCCAACCTCCACGAG
*****

c2 ATCGGGGTGACGATGAGCGCCCATGATGACCGGGTCAAGCCGCTGATCACCAATGTGGAA
c3 ATCGGGGTGACGATGAGCGCCCATGATGACCGGGTCAAGCCGCTGATCACCAATGTGGAA
c4 ATCGGGGTGACGATGAGCGCCCATGATGACCGGGTCAAGCCGCTGATCACCAATGTGGAA
PE11 ATCGGGGTGACGATGAGCGCCCATGATGACCGGGTCAAGCCGCTGATCACCAATGTGGAA
*****

c2 TCCCCCGCCACGATCTTGTGTCCATCGTGACGTGATGCTGTTTTCCATGCCAGGGCGAG
c3 TCCCCCGCCACGATCTTGTGTCCATCGTGACGTGATGCTGTTTTCCATGCCAGGGCGAG
c4 TCCCCCGCCACGATCTTGTGTCCATCGTGACGTGATGCTGTTTTCCATGCCAGGGCGAG
PE11 TCCCCCGCCACGATCTTGTGTCCATCGTGACGTGATGCTGTTTTCCATGCCAGGGCGAG
*****

c2 CTGTACAAGGCGATCGCGCGCCAGGCCCATGTGATGCCAGGATCATTGTGCCAAACACTT
c3 CTGTACAAGGCGATCGCGCGCCAGGCCCATGTGATGCCAGGATCATTGTGCCAAACACTT
c4 CTGTACAAGGCGATCGCGCGCCAGGCCCATGTGATGCCAGGATCATTGTGCCAAACACTT
PE11 CTGTACAAGGCGATCGCGCGCCAGGCCCATGTGATGCCAGGATCATTGTGCCAAACACTT
*****

c2 CAGACCAGCAAGACTTCGTATTGGCTCACCGAATTAGCCAAACCGCGGGGCACTCCACC
c3 CAGACCAGCAAGACTTCGTATTGGCTCACCGAATTAGCCAAACCGCGGGGCACTCCACC
c4 CAGACCAGCAAGACTTCGTATTGGCTCACCGAATTAGCCAAACCGCGGGGCACTCCACC
PE11 CAGACCAGCAAGACTTCGTATTGGCTCACCGAATTAGCCAAACCGCGGGGCACTCCACC
*****

c2 TAGACAGCGGTTGAGCGACAATGGATTTCACAATTTTCCCTCTAGAGGGCCCGTTTAAAC
c3 TAGACAGCGGTTGAGCGACAATGGATTTCACAATTTTCCCTCTAGAGGGCCCGTTTAAAC
c4 TAGACAGCGGTTGAGCGACAATGGATTTCACAATTTTCCCTCTAGAGGGCCCGTTTAAAC
PE11 TAG-----
***

```

Fig 9. Alineamiento de las secuencias clonadas de la proteína PE-11 utilizando el programa Clustal W2. La presencia de asteriscos señala la identidad entre las secuencias comparadas para cada nucleótido.

Por otra parte, la secuenciación de la clona de PE-34 no mostró identidad con respecto a la del gen de *M. bovis* como se puede observar en el alineamiento (Fig. 10), esto pudo deberse a que la secuencia amplificada no era la esperada ya que no se realizó un proceso previo para conocer la identidad de los fragmentos obtenidos por PCR, lo que nos hace suponer que la amplificación clonada se trataba de una secuencia de tamaño similar al gen deseado pero de identidad

diferente por inespecificidad de la PCR. El proceso de ligación y transformación de este gen se realizó repetidas ocasiones durante 3 meses sin obtener clones que coincidieran con el tamaño esperado.

```

PE34
clona      -----ATGCAGTCCATGTCATTCGATCCGG-CCG
          TCCCGGGCATCATCACATCGAGGATCACCGCGTCCGGCCGGTTCCTCCCGGGCCCGATCCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      TTGCCGACATCGGATCG--CAGGTGCTCAGCAACGCATTCCRAGGGCTACAGGCCGGTGC
          GCGCCTGTGCCCGGTGGTTCGCGGTGTAGACTTCAAAGCCCTGGAACTTGAGGCTCAC-C
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      GGTGGCG--TGGGTCTGGCTGAGCTCGCTATTGCCCGCCGGGSC-----CGAGGAG
          GACAGCAGTTCAACGATGTTGGCCTCATCATCGACCAGGAGACACGAGCCTCCGGTGTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      GTGTCCGGCGTGGCGGTAAAGGCGTTACAGACGGCCGCCACCGGGCTGCTGGCGCTGAAT
          GTATTTTCGCCTGGGGTTCCCGCCCTCACGAGATCAACC-CCTTTCGGCATTGGTTGAAC
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      -CAAGCGCCGCAGGAAGAGC-TGAGAAAGGCCGGCGAGGTGTTTACCGGATC--GCCCG
          GTTACCTTCACAGTCAATGTGTAATTCCTGAAAGCTTAAGTTTAAACGCTAGCCAGCTTG
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      GATGATATCGGACCCGACGCTCAGGGCCGGCCCGCTGCTTGCCTCGAAGCAATTCCCGGACC
          GGTCTCCCTATAGTGGAGTGTATTAAATTTGATAAGCCAGTAAGCAGTGGGTTCTCTPAGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PE34
clona      CGGCCAGACCCCTCGCGGGGAATAG-----
          TAGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCACCGCTACACGCCCTACCGCCATTGGGT
          * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig 10. Alineamiento de la secuencia clonada de la proteína PE-34 utilizando el programa Clustal W2.

Con respecto al gen PE-PGRS-11, para mejorar su amplificación, se realizó nuevamente la reacción de PCR, debido a que es una secuencia con múltiples repeticiones de GC, se agregaron 5 µl de DMSO ya que este compuesto facilita la separación de las cadenas de DNA ricas en GC al evitar la formación de los enlaces de hidrógeno. Además se aumentaron 1 y 2º C a la temperatura de alineamiento de la reacción de PCR. Sin embargo, dichas modificaciones no

permitieron obtener un sólo producto, por lo que se tuvo que recurrir a la purificación del fragmento de DNA a partir del gel de agarosa, lo que resultó en poca cantidad de DNA (9.4 ng/ μ l) y este se encontraba degradado. Con el objetivo de obtener mayor cantidad del producto deseado, se sustituyó la purificación en gel de agarosa por una electro-elución en el equipo 422 de Biorad, para esto se depositó la muestra en un gel de poliacrilamida al 6% y se corrió a 100 v durante 1 h en una cámara de electroforesis vertical. La concentración del DNA electro-eluido fue de 22.5 ng/ μ l. El DNA se utilizó para realizar la ligación correspondiente al pVAX1, y con éste se realizaron varias transformaciones sin lograr obtener colonias recombinantes con el gen que codifica para la proteína de interés.

La amplificación e inserción del gen PE-11 en el plásmido pVAX1 ha sido de gran importancia ya que ha permitido generar un plásmido recombinante para una vacuna que puede utilizarse en bovinos de manera experimental para evaluar su eficacia en prevenir la TB, ya que las vacunas recombinantes promueven la expresión de proteínas que actúan como antígenos para la producción de anticuerpos y/o citocinas respectivos tras la activación de una respuesta inmune al imitar la expresión genética intracelular provocada por el patógeno en condiciones naturales, no producen reacciones adversas y permiten disminuir costos en el proceso de elaboración, transporte y administración debido a que no se requiere de una cadena de refrigeración para mantener la estabilidad de la vacuna, esta estabilidad térmica es una característica importante a considerar ya que además del bajo costo de distribución, en los países en vías de desarrollo con

8 CONCLUSIÓN

Se logró la amplificación de fragmentos que correspondían al tamaño esperado de los genes PE-34 y PE-PGRS-11, sin embargo no se obtuvieron plásmidos recombinantes de estos.

Se logró la amplificación del gen codificante para la proteína PE-11 mediante la técnica de PCR, lo cual nos permitió realizar el proceso de clonación de éste, logrando obtener el plásmido recombinante correspondiente a PE-11, que fue confirmado mediante su secuenciación.

8 CONCLUSIÓN

Se logró la amplificación de fragmentos que correspondían al tamaño esperado de los genes PE-34 y PE-PGRS-11, sin embargo no se obtuvieron plásmidos recombinantes de estos.

Se logró la amplificación del gen codificante para la proteína PE-11 mediante la técnica de PCR, lo cual nos permitió realizar el proceso de clonación de éste, logrando obtener el plásmido recombinante correspondiente a PE-11, que fue confirmado mediante su secuenciación.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abdala Alejandro. (1998), "Tuberculosis bovina". Sancor, 56(604):26-30
2. Acosta R., C. Estrada, F. Milián, (2009), "Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*." Revisión. Tec Pecu Mex, 47(4):389-412.
3. Alcaide F., J. E. Moreno, J. González, J. J. Palacios. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. *Procedimientos en microbiología clínica*. (Consultado 9 de Diciembre de 2010) de:
<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.htm>
4. Beltrán P., A. Gutiérrez, A. Puebla, J. Gutiérrez, M. Flores, R. Hernández, M. Martínez, A. Álvarez, (2010), "Identification of immunodominant antigens of *Mycobacterium bovis* by expression library immunization", The veterinary journal, 190 (1): 181-183.
5. Buddle B. M. 2010, "Tuberculosis vaccine for cattle: the way forward". Expert Review of vaccines, 9: 1121-1124.
6. Cai H., X. Tian, X. D. Hu, S. X. Li, D. H. Yu, Y. X. Zhu, (2005), "Combined DNA vaccines formulated either in DDA or in saline protect cattle from *Mycobacterimbovis* infection". Vaccine, 23 (30): 3887-3895.
7. Chaitra M. G., S. Hariharaputra, N. R. Chandra, M. S. Shaila, R. Nayak, (2005) "Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential". Vaccine, 23(10): 1265-1272.

8. De Ward J. H., Manual de Ganadería doble propósito. 2005. En línea: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion5/articulo14-s5.pdf (Consultado 16 de Diciembre de 2010)

9. Díaz J. C., M. Barrera, (2006) "Las vacunas de ADN: una promisoría medicina para el paciente veterinario". Redvet, 7 (2): 1695- 7504.

10. Editorial CEP. Tema23. *Micobacterias. Medios de cultivo e identificación. Patología y tipos de tuberculosis: pruebas de laboratorio.* Consultado el 7 de Diciembre 2010, de: <http://ses.editorialcep.com/muestra/laboratorio.pdf>

11. Esquivel H., J. A. Gutiérrez (2009), "Tuberculosis bovina", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, En línea: http://www.zoonosis.unam.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=66&Itemid=95 (consultado 11 de Diciembre de 2010)

12. Estrada Chávez C., F. Díaz Otero, C. Arriaga Díaz, N. Villegas Sepúlveda, R. Pérez González, D. González Salazar, (2004) "Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina". Vet. Méx., 35 (3): 225-236.

13. Fu L. M., C.S. Fu-Liu, (2002) "Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram- positive or Gram- negative bacterial pathogens", Elsevier, 82 (2/3): 85-90.

14. García L., S. F. Milián, E. Anaya. (2005) "Situación de la Tuberculosis bovina en México, 1990- 2004. XXIX Congreso Nacional de Buiatría 2005".
En línea:
http://ammveb.net/XXIX%20CNB/memorias/car/car_medpro04.htm.
(Consultado: 06 Diciembre 2010).
15. Garnier T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, R.G. Hewinson (2003) "The complete genome sequence of *Micobacterium bovis*". PNAS, 100: 7877- 7882.
16. Gey vanPittius N., S. L. Sampson, H. Lee, Y. Kim, P. D. van Helden , R. M. Warren, (2006) "Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions", BMC Evol Biol. (95):1471-2148.
17. Golby P., K. A. Hatch, J. Bacon, R. Cooney, P. Riley, J. Alinutt, J. Hinds, J. Nuñez, P. D. Marsh, R. G. Hewinson, S. V. Gordon, (2007), "Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between the human and bovine pathogens of the *Mycobacterium tuberculosis complex*", Microbiology, 153: 3323-3336.
18. Gorocica P., M. C. Jimenez, Y. Garfias, I. Sada, 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: 142-143.

19. Hanif S. N. M., R. Al- Attiyah, A. S. Mustafa (2010), "DNA vaccine constructs expressing Mycobacterium tuberculosis specific genes induce immune responses". Scandinavian journal of immunology, 72(5): 408-415.
20. Herrera L., R. Pozuelo, T. Molina, A. Valverde, P. Sainz, M. Jiménez, (2009) "Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo Mycobacterium tuberculosis". Enfermedades Contagiosas y Microbiología Clínica, 27(9): 496-502.
21. Huamán N., (2002), "Tuberculosis intestinal y peritoneal", Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna, 15 (1).
22. IICA Perú. Seminario: Programas de control y erradicación de tuberculosis, brucelosis bovina y fiebre aftosa. Capítulo: Patología de la tuberculosis bovina y criterios para el decomiso. IICA biblioteca Venezuela. <http://books.google.com.mx/books?id=Mj0qAAAAYAAJ&pg=RA1-PA16&lpg=RA1-PA16&dq=ica+peru+programas+de+control+y+erradicacion+de+tuberculosis&source=bl&ots=C6X0qR5xrB&sig=hp6zl-bkgsB4u-bEBXuS1W6xzky&hl=es&sa=X&ei=08YdT9WBjCgs2gWyteTsCw&sqj=2&ved=0CEQQ6AEwBA#v=onepage&q&f=false> Consultado: 16 de Diciembre de 2010.
23. Kaneene J.B y D. Pfeiffer, (2006), "Epidemiology of Mycobacterium bovis", en C. O. Thoen, J. H. Steel, M. J. Gilsdorf (comps.), Mycobacterium bovis infection in animals and humans, Iowa, Blackwell publishing, pp. 34-48.
24. Madrigal M., (2006), "Serina proteasas de *Lachesis stenophrys* y *Bothrops asper*: producción de anticuerpos mediante inmunización con ADN y subclonaje", Instituto tecnológico de Costa Rica.1: 1-65.

25. NOM-031-ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana, "Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*).
<http://www.senasica.gob.mx/?doc=2189>. (última consulta 23 de enero de 2012).
26. OMS 2010. 10 datos sobre la tuberculosis. En línea:
<http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/es/> (consultado: 6 de Diciembre de 2010)
27. ONUSIDA. Tuberculosis y VIH.
<http://www.unaids.org/es/AboutUNAIDS/PolicyAndPractice/HIVTreatment/CoInfection/TB/default.asp>. (Consultado: 06 Diciembre 2010).
28. Pérez L., F. Milián, C. Arriaga, C. Romero, M. Escatín. (2008), "Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México", *Salud Pública Méx.* 50(4): 286-291.
29. Rehren G., S. Walters, P. Fontan, I. Smith, A. M. Zárraga, (2007), "Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*", *Elsevier*, 87(4): 347-359.
30. Reyes A., A. Pinto. (2002) "Vacunas de DNA" En: *Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud*. Benemerita Universidad de Puebla. 327-342.

31. Rodríguez E., M. M. Gamboa, F. Hernández, J. D. García. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. pp 475.
32. Romero A., C. Arriaga, J. Guevara, J. A. García, R. A. Torres, C. Estrada, (2006), "Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero", Vet. Méx. 37(1)137-143.
33. Russell D. G., J. Cardona., K. Mi, S. Allain y F. Altare (2009), "Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma", Nat Immunol, 10, 943-948.
34. Sampson S. (2010), "Mycobacterial PE/PPE proteins at the host- pathogen interface", Clinical and developmental Immunology. 2011: 1-11.
35. Senasica, (2011), "Plan estratégico 2008- 2012", En línea: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1395>, (consultado: 24 de Junio de 2011).
36. Tundup S., N. Pathak, M. Ramanadham, S. Mukhopadhyay, K. J. R. Murthy, N. Z. Ehtesham, S. E. Hasnain. (2008) "The Co-Operonic PE25/PPE41 protein complex of *Mycobacterium tuberculosis* elicit increased humoral and cell mediated immune response". Plosone, 3(10): e3586.