

ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS EN *Leishmania braziliensis*:  
PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO (IgYs),  
ANTITRANSPORTADOR DEL NAD<sup>+</sup> LbTNTA

Rosa Inés Castro Méndez

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN  
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUIMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BASICAS EN BIOQUIMICA LIBBIQ  
BOGOTÁ D.C  
2017

ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS EN *Leishmania braziliensis*:  
PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO (IgYs),  
ANTITRANSPORTADOR DEL NAD<sup>+</sup> LbTNTA

Rosa Inés Castro Méndez

Una Tesis Presentada Para Obtener El Título De  
Licenciado en química

Directora Externa

MARIA HELENA RAMIREZ, *MSc*

*Universidad Nacional de Colombia*

Directora Interna

ADIS AYALA FAJARDO, *MSc*.

*Universidad Distrital Francisco José de Caldas*

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN  
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN QUIMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BASICAS EN BIOQUIMICA LIBBIQ  
BOGOTÁ D.C  
2017

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

**Jurado**

---

**Director**

**Diciembre de 2017**

---

## INDICE

Resumen del proyecto .....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
2 ANTECEDENTES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3 JUSTIFICACIÓN.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4 OBJETIVOS.....	5
4.1 General.....	5
4.2 Específicos.....	5
5 MARCO TEÓRICO.....	6
5.1 Parasitismo.....	6
5.1.1 Leishmania braziliensis.....	6
5.2. Transportadores de NAD <sup>+</sup> /NADP <sup>+</sup> .....	7
5.2.1 Nicotinamida adenina dinucleótido NAD <sup>+</sup> .....	7
5.2.2 Biosíntesis del NAD <sup>+</sup> .....	7
5.3 Proteínas transmembranales.....	9
5.3.1 Transporte pasivo.....	9
5.3.2 Transporte activo.....	10
5.4 Cepas de expresión.....	11
5.5 Vector pBAD202/TOPO.....	12
5.5.1 Características del vector.....	12
5.5.2 Regulación de expresión por arabinosa.....	13
5.5.3 Tiorredoxina.....	13
5.6 Inmunoglobulinas.....	14
5.6.1 Anticuerpos.....	14
5.6.2 Características bioquímicas e inmunológicas de los anticuerpos IgY's.....	15
5.6.3 IgY en la yema de huevo.....	16
5.6.4 Antígeno.....	17
5.6.5 Interacción antígeno-anticuerpo.....	17
6 METODOLOGÍA.....	18
6.1 Obtención del antígeno mediante estandarización de la expresión y purificación de la proteína recombinante en E. coli.....	18
6.1.1 Obtención de clones de expresión de las cepas en E. coli a evaluar.....	18

6.1.2	Evaluación del tiempo de inducción. ....	18
6.1.	Evaluación de la concentración del inductor en la expresión.....	18
6.1.4	Purificación de la proteína recombinante.....	19
6.1.5	Cuantificación de la proteína. ....	19
6.2	Producción del anticuerpo en el modelo aviar IgYs (gallina) a partir de la proteína recombinante.....	20
6.2.1	Inoculación del anticuerpo.....	20
6.2.2	Purificación del anticuerpo.....	20
6.3	Evaluación de los anticuerpos obtenidos del modelo aviar IgYs (gallina), mediante ensayos de Western blot y ELISA, empleando la proteína recombinante.....	20
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
7.1	Obtención de la proteína recombinante Trx-LbTNTA (antígeno). ....	21
7.2	Producción de los anticuerpos anti-Trx-LbTNTA.....	25
7.3	Evaluación de los IgY's.....	28
8.	CONCLUSIONES. ....	30
9.	BIBLIOGRAFIA.....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de la <i>Leishmania braziliensis</i> .....	6
Figura 2. Nicotinamida y adenina dinucleótido NAD <sup>+</sup> y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP <sup>+</sup> . .....	7
Figura 3. Vía de novó y vía de reciclaje del NAD <sup>+</sup> .....	8
Figura 4. Tipos de transporte a través de la membrana plasmática.....	9
Figura 5. Vector pBAD202/TOPO.....	13
Figura 6. Estructura de un anticuerpo. ....	14
Figura 7. Clase de antígenos. ....	15
Figura 8. Comparación de la estructura molecular del conejo IgG y de la gallina IgY. ....	16
Figura 9. Expresión y purificación de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en células BL21DE3 .....	22
Figura 10. Cuantificación por el Método de Bradford y Método densiometrico de la proteína Trx-LbTNTA.....	23
Figura 11. Evaluación de la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en las cepas de expresión E. coli.: Lemo21, Shuffle y BL21DE3. ....	24
Figura 12. Evaluación del tiempo de inducción de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en células BL21DE3 .....	24
Figura 13. Evaluación de la concentración de inductor L-arabinosa a temperaturas de 25 y 37°C en células BL21DE3 para la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA.....	25
Figura 14. Cuantificación de las IgY's de las gallinas inmunizadas.....	26
Figura 15. Purificación de los anticuerpos IgY's empleando PEG 6000.....	27
Figura 16. Evaluación de las IgY's anti-Trx-LbTNTA por ELISA. ....	28
Figura 17. Evaluación de las IgY's anti-Trx-LbTNTA por western blot.....	29

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de inmunización de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales contra la Trx-LbTNTA.....	19
--	----

**ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS EN *Leishmanibraziliensis*:  
PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANTICUERPO (IgYs), ANTI-  
TRANSPORTADOR DEL NAD<sup>+</sup> (Trx-LbTNTA)**

**RESUMEN**

La leishmaniasis es una enfermedad producida por la *Leishmania*, parásito protozoario intracelular transmitido por el mosquito hembra, que infecta tanto a humanos como animales, esta enfermedad se manifiesta de manera cutánea, mucocutánea y visceral. Esta enfermedad se encuentra en zonas tropicales y subtropicales como es el caso de Colombia que encabeza la lista de países con 9 especies de este parásito [39] de las 20 identificadas, siendo la *Leishmaniasis braziliensis* (afección cutánea) la más frecuente con 98% de incidencia entre 20.000 a 30.000 de los casos reportados mientras la forma mucosa y visceral se da en un 2% [38]. La acción contra esta enfermedad se ha dado a través de fármacos que generan diversos efectos secundarios adversos al individuo [29], generando el interés de estudio para encontrar posibles blancos terapéuticos que puedan identificar y tratar la enfermedad. En el grupo, Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ) de la Universidad Nacional de Colombia, se han desarrollado investigaciones acerca del estudio biológico del parásito, caracterizándolo de manera molecular y bioquímica, identificando la clonación de la NMNAT de la *Leishmania* como enzima que interviene en la síntesis del NAD y estableciendo proteínas candidatas a transportar este di-nucleótido.

La utilización de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales genera una mayor ventaja que el mismo proceso en mamíferos a la hora de obtener de 50-100mg de antígeno por yema de huevo, además de evitar el desangrado de los animales y de su mayor especificidad. En este estudio se inmunizaron dos cepas de gallinas Lohman brown y Vancouver brown por vía intramuscular para la obtención de anticuerpos IgY's específicos para la proteína transportadora Trx-LbTNTA (antígeno). La proteína recombinante se presenta en forma de agregados en sistemas heterólogos de expresión *E. coli* (*Lemo21*, *Shuffle* y *BL21DE3*) por ellos se estandarizó las condiciones para obtener una mayor expresión y purificación del antígeno, hallando que la cepa BL21DE3 con un 0.02% de L-arabinosa como inductor a 37°C por 4 horas de inducción presenta una alta expresión de esta. Se obtuvo 10mg de la proteína recombinante por L de medio Lb (bactotripton 1% p/v, cloruro de sodio 1% p/v y extracto de levadura 0.5% p/v a pH 7). Los anticuerpos obtenidos de la yema de ambas cepas de gallina inmunizadas con el antígeno y BSA (control) se purificaron con secuencias progresivas de PEG 6000 y se evaluaron mediante ELISA y western blot empleando la Trx-LbTNTA. Se logró purificar por yema de huevo 15mg de IgY's específicos contra la proteína transportadora de *Leishmania braziliensis*.



## 1. INTRODUCCIÓN

La *Leishmaniasis* es una enfermedad infecciosa transmitida por la picadura de un mosquito hembra de la familia *Psychodidae*, causada por el parásito protozoario intracelular *Leishmania*. La enfermedad presenta tres sintomatologías diferentes: cutánea que afecta la piel; mucosa que afecta las membranas mucosas de la nariz, faringe, boca, laringe, y tráquea; y la visceral que afecta todo el cuerpo en especial en la inflamación del bazo e hígado. Esta enfermedad se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, como es el caso de Colombia que encabeza la lista de países con más especies de este parásito [39], siendo la *Leishmaniasis* cutánea la más frecuente con 98% de incidencia de los casos reportados mientras la forma mucosa se desarrolla en países como Brasil, Perú y Bolivia, y la visceral en Brasil, India, Nepal, Sudan y Etiopía [38].

En la actualidad existen más de 20 especies encontradas que pueden afectar al ser humano, dentro de las cuales 9 especies se hallan en Colombia: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiense*, *L. guyanensis*, *L. infantum chagasi*, *L. equatoriensis* y *L. lainsoni*, que se reproducen y crecen por la diversidad ambiental y climática que se da en el país.

La acción contra esta enfermedad se ha dado a través de fármacos que generan diversos efectos secundarios adversos al individuo [29]. Considerando lo anterior, es necesario identificar posibles nuevos blancos farmacológicos en el parásito que permitan un tratamiento de la enfermedad más eficiente. En el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ) de la Universidad Nacional de Colombia se han realizado estudios enfocados a la caracterización molecular y bioquímica del metabolismo del di nucleótido de adenina y nicotinamida NAD en *Leishmania*, concentrando su interés en la biosíntesis del NAD e identificando a la 5-metilnucleotransferasa/nicotinamida/nicotinato mono nucleótido adenilil transferasa (NMNAT) [30], enzima en la cual convergen las dos rutas de biosíntesis del NAD, la vía *novó* y la vía del *reciclaje*. El NAD es esencial en diversos procesos celulares como en el metabolismo energético, estrés oxidativo, regulación de procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. En el parásito intracelular *Leishmania* se ha identificado solo una NMNAT en contraposición con otros organismos como *saccharomyces* células humanas en donde se presentan 2 y 3 isoenzimas respectivamente, lo que ha conllevado a pensar que los nutrientes y las macromoléculas, incluidas el NAD/NADH que necesitan para su supervivencia sean adquiridas del hospedero, permitiendo plantear la existencia de transportadores del nucleótido en la membrana del parásito. En el LIBBIQ se ha realizado la primera aproximación de la existencia de estos transportadores combinando estrategias bioinformáticas y experimentales, y activamente se estudian tres candidatos de transportadores del NAD denominados Trx-LbTNTA, 6HisLbTNTB y 6HisLbTNTC [31].

Debido a lo anterior, se buscó con este trabajo dar continuidad al estudio de las proteínas transportadoras del NAD en *Leishmania braziliensis*, mediante el diseño y producción de una herramienta inmunológica para estudiar la Trx-LbTNTA produciendo y caracterizando un anticuerpo policlonal a partir de la inoculación de la proteína recombinante en un modelo aviar. Los anticuerpos policlonales son de sumo interés en las estancias investigativas para la determinación de localización, interacción, cuantificación y seguimientos de la proteína de interés. La producción en el modelo aviar de anticuerpos se caracteriza por ser un proceso eficiente y de alto rendimiento por la obtención, entre 70 a 100mg de IgY, dependiente del tamaño del huevo.

## 2. ANTECEDENTES

La importancia del NAD<sup>+</sup>/NADP como transportadores de electrones en los compartimentos celulares, han permitido que esta coenzima participe en diversas funciones de la célula como la síntesis de lípidos, hidratos de carbono, aminoácidos, además como sustrato en reacciones de modificación postraduccional y señalización celular. La síntesis del NAD involucra dos rutas metabólicas: la ruta de *novó* y de *reciclaje* las cuales convergen en la Nicotinamida Mono nucleótido Adenililtransferasa (NMNAT). Contreras y colaboradores en el año 2015 encontraron una única NMNAT en *Leishmania braziliensis* la cual cuenta con un amino terminal específico para el género que se relaciona con su actividad enzimática, señalando esta enzima como un posible blanco farmacológico, no solo por la existencia de secuencias específicas para esta en este parásito sino también por la identificación de una única isoenzima [34]. La simplificación de la síntesis del NAD en *Leishmania* con una única NMNAT en relación con otros organismos de vida libre o parásitos extracelulares podría revelar la importancia de sistemas de transporte. Ante esto se ha venido desarrollando un estudio sobre transportadores del NAD en el parásito. En el 2016 Morales y colaboradores [31], realizaron análisis computacional de 3 candidatos a transportadores del NAD (Trx-LbTNTA 1.089pb, 6xHisLbTNTB 1.014pb y 6xHisLbTNTC 987pb) [31], a partir del cual se obtuvieron clones que permiten la expresión a proteínas recombinantes con los cuales se realizara la caracterización y estudios funcionales de estas.

Considerando lo anterior, el clon pBAD202/ Trx-LbTNTA el cual codifica para uno de los posibles transportadores (52.8kDa) será el punto de partida para la producción del anticuerpo con el fin de tener un instrumento que permita la identificación y localización del transportador.

Existen diversos modelos para la producción de anticuerpo entre ellos el modelo animal como el conejo, el ratón, el caballo, las gallinas, entre otros y el modelo vegetal con la producción de anticuerpos. Cada uno de estos modelos presenta ventajas y desventajas que se deben considerar para su aplicación. El modelo aviar presenta alta eficiencia en cuanto al rendimiento o producción de anticuerpos, ya que no solo se obtiene a partir de la sangre de la gallina sino también de los huevos colectados, reduciendo el maltrato durante las sangrías. En el LIBBIQ se han empleado diferentes metodologías para la producción de las IgY, usando antígenos solubles o a partir de cuerpos de inclusión, como es el caso de la Nicotinamida/ Nicotinato Mononucleotido Adeniltransferasas (His-GiMNAT) de *Giardia* intestinales expresada en *Escherichia coli* [35].

### 3. JUSTIFICACIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad que se presenta de tres formas: visceral, cutánea y mucocutánea. Colombia encabeza la lista de países, siendo la *Leishmaniasis* cutánea la más frecuente y de menos frecuencia la visceral. En la actualidad no existe un tratamiento efectivo contra esta enfermedad, pero si fármacos que generan efectos adversos a la salud del paciente [29], lo que señala la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas a través del estudio biológico del parásito. Algunas investigaciones han explorado el metabolismo del NAD en busca de blancos terapéuticos de enfermedades producidas por bacterias, ya que constituye un punto central en el metabolismo celular, considerando además que las proteínas involucradas en estas rutas presentan diferencias significativas con las proteínas del hospedero.

El NAD se relaciona con diversos procesos fisiológicos y bioquímicos, participando principalmente en el metabolismo energético, señalización celular y defensa ante el estrés oxidativo. En los parásitos intracelulares como es el caso de la *Leishmania* el sistema redox otorga una adaptación a los ambientes hostiles durante su ciclo biológico [33], sin contar que también participa en el proceso de diferenciación, proliferación y muerte celular [29].

En el grupo, LIBBIQ se estudia el metabolismo del NAD en busca de identificar nuevos blancos terapéuticos en protozoos. Mediante la identificación y caracterización de las enzimas involucradas de esta ruta para reconocer las diferencias con respecto a las enzimas del hospedero. Para tal fin el proyecto planteado “producción y caracterización de un anticuerpo (IgYs), anti-LbTNTA”, permitirá diseñar una herramienta inmunológica para el estudio de un transportador de este, el cual no presenta homología con proteínas humanas

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Producir y evaluar de una herramienta inmunológica para el estudio de un transportador de NAD<sup>+</sup> en *Leishmania braziliensis*

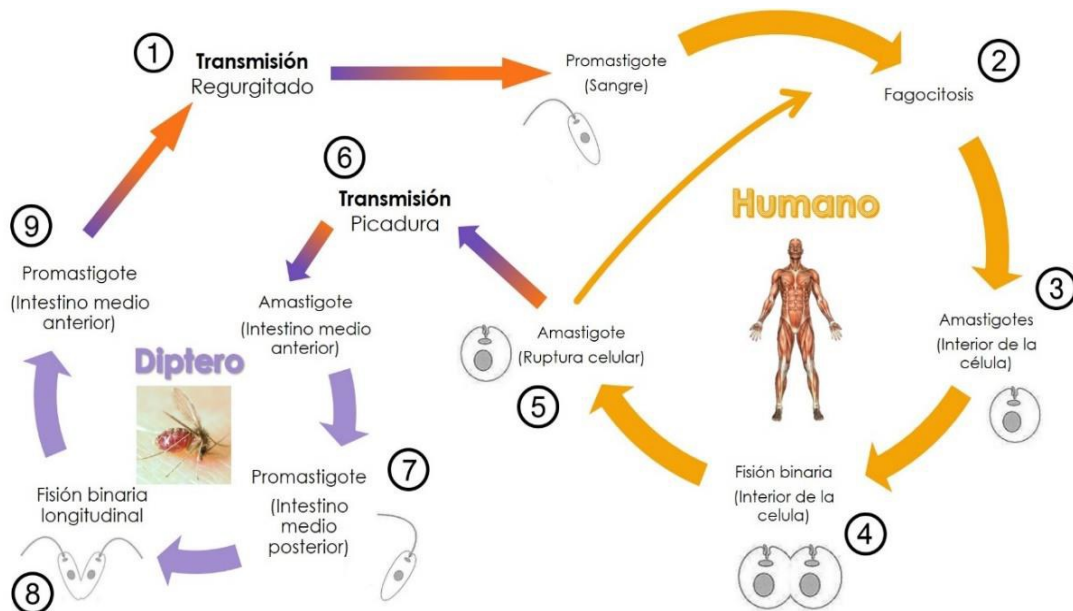
### 4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Obtener del antígeno mediante estandarización de la expresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*.
- 4.2.2 Producir el anticuerpo en el modelo aviar IgYs (gallina) a partir de la proteína recombinante
- 4.2.3 Evaluar los anticuerpos obtenidos del modelo aviar IgYs (gallina), mediante ensayos de western blot y ELISA, empleando la proteína recombinante.

## 5. MARCO TEÓRICO

**5.1 Parasitismo.** El parasitismo es una asociación heterotípica, negativa, temporal o permanente, externa o interna, entre una especie con un beneficio unilateral, de carácter fisiológico. El parásito normalmente pequeño, menos organizado y el hospedadero más grande y más organizado, generan su medio metabólico, nutriéndose y estableciendo contacto e intercambio macromolecular, con lo cual de forma potencial ocasiona acciones patógenas o modificaciones del equilibrio homeostático del hospedador y de la respuesta adaptativa de su sistema inmunitario[1]. Hay diversos tipos de parasitosis: obligatorio, facultativo, permanente, temporal, así como sobre huéspedes que pueden ser exclusivos o no exclusivos, intermediarios y de una gran variedad [3].

**5.1.1 *Leishmania braziliensis*.** Los parásitos del género *Leishmania* son protozoarios que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae* de la clase *Mastigophora*, orden *Kinetoplastida*. Poseen hospedadores vertebrados e invertebrados, pero difieren de ellos porque en su ciclo evolutivo aparecen formas amastigotas y promastigotas [5]. La *Leishmania* contempla más de 30 especies, de las cuales 20 son patógenas y se divide en 3 subgéneros, de acuerdo al sitio de desarrollo del parásito en el insecto transmisor: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) y *Leishmania* (*Sauroleishmania*), este último de lagartos, de acuerdo a estudios de filogenia molecular [6]. La difícil clasificación de las múltiples especies y subespecies de *Leishmania* se realiza en función de su: 1) Biología: desarrollo en el flebótomo, crecimiento en medios de cultivo, desarrollo en los hospederos vertebrados; 2) Bioquímica: patrones isoenzimáticos, secuenciación de múltiples loci (multilocusenzymotyping) - actual "estándar de oro"; 3) Inmunología: análisis parasitario con anticuerpos monoclonales; 4) Filogenia molecular, entre otros[7].

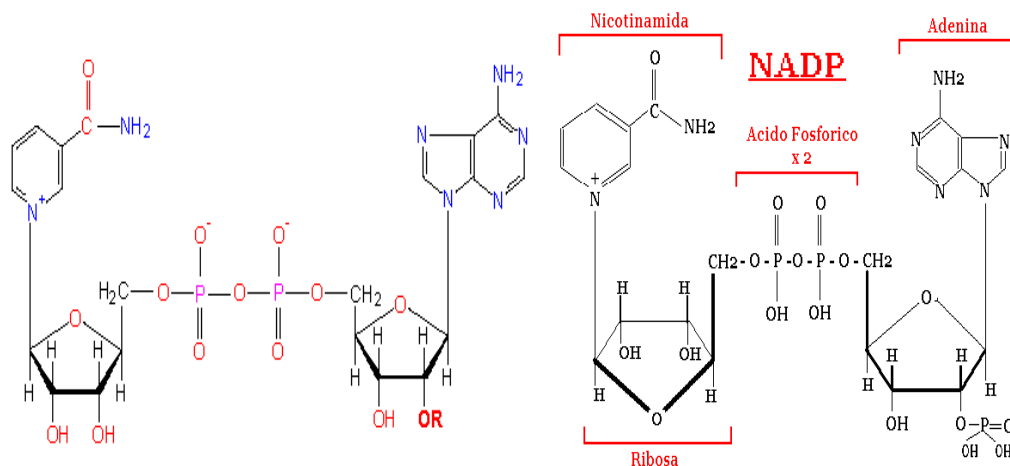


**Figura 1. Ciclo de vida de la *Leishmania braziliensis***

El insecto hembra se alimenta de sangre infectada con el parásito *Leishmania braziliensis* y al picar a un individuo vertebrado sano, el estadio promastigotes hallado en el tracto gastrointestinal del mosquito penetra las capas de la piel por las porosidades e ingresa al torrente sanguíneo, el parásito es fagocitado por los macrófagos, una vez en el interior de este, el parásito se transforma a su estadio de amastigote y se reproduce por fisión binaria lisando la célula y dando paso a la liberación de los parásitos al medio extracelular [5].

## 5.2 Transportadores NAD<sup>+</sup> / NADP<sup>+</sup>

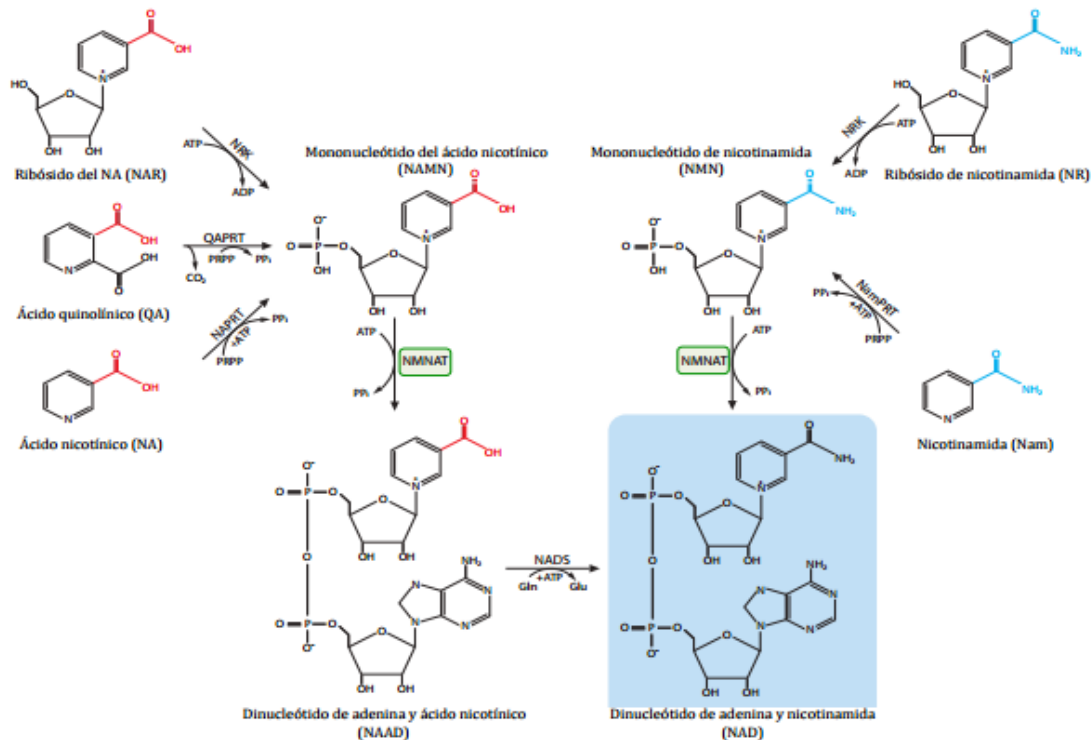
5.2.1 **Nicotinamida adenina dinucleótido NAD<sup>+</sup>.** Es una coenzima que se encuentra en todas las células vivas y tiene una fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub> con un peso molecular de 663.425 y con un punto de fusión de 160°C. El compuesto es un dinucleótido que consta de dos nucleótidos unidos a través de sus grupos fosfatos en el carbono 5'. Los nucleótidos consisten de anillos de ribosa, uno unido a la adenina en su carbono 1 y el otro con la nicotinamida en la misma posición [10]. Debido a que provienen de la niacina se puede encontrar de dos maneras en las células como NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> (formas oxidadas), cuyas formas reducidas son el NADH y NADPH (Figura 2) que son transportadores electrónicos fundamentales en la célula y tienen funciones esenciales como co-sustratos de más de 200 enzimas que participan en el metabolismo de hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos. De manera muy general las formas reducidas facilitan el transporte de hidrógeno mediante transferencia de electrones, que utilizan el ión hidruro (H<sup>+</sup>) como transportador, aunque tienen funciones muy diferentes en el metabolismo. Las reacciones dependientes del NADH participan en la respiración intracelular y sistema de transporte electrónico. Mientras que el NADPH es importante para las vías biosintéticas (por ejemplo: ácidos grasos, esteroides) [8].



**Figura 2. Nicotinamida y adenina dinucleotido NAD<sup>+</sup> y la Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato NADP<sup>+</sup>.**

El dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma abreviada NAD<sup>+</sup> en su forma oxidada y NADH en su forma reducida, está compuesto por dos nucleótidos, unidos a través de grupos fosfatos: uno de ellos es una base de adenina y el otro, una nicotinamida y la Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato NADP<sup>+</sup> tiene un grupo fosfato en el carbono 2 [9].

5.2.2 **Biosíntesis del NAD<sup>+</sup>.** Se sintetiza en dos rutas metabólicas: la primera en la ruta de *novó* a partir de los aminoácidos y la segunda denominada ruta de rescate mediante el reciclaje de componentes preformados como la nicotinamida, el ácido nicotínico o el nicotinato ribosido [10].



**Figura 3. Vía de novo y vía de reciclaje del NAD+.**

El NAD se puede sintetizar a partir de 5 precursores: QA, NAR, NA, NR y Nam. Las enzimas que participan allí son las NamPRT y NAPRT que catalizan la conversión de Nam y NA en los mononucleótidos NMN y NAMN. La transformación del QA se da por acción de la enzima QAPRT, que a su vez también conduce a la síntesis de NAMN. La enzima NRK produce NMN y NAMN mediante la fosforilación de NR y NAR. El paso común de la vía *denovo* y la vía de *reciclaje* es catalizada por la enzima NMNAT. El NAD+ se convierte en NAD. El grupo amida en la estructura del Nam se señala en color azul mientras el grupo carboxilo del NA se señala en color rojo. La síntesis de NAAD a partir de NA se conoce como ruta Preiss-Handler. La síntesis de NAD a partir de QA corresponde a la vía de novo [11]

Por la vía *novola* mayoría los organismos sintetizan NAD+ a partir de componentes simples, y al mismo tiempo el conjunto de reacciones específicas varía entre estos, pero lo común que tienen es la generación de ácido quinolínico (QA) a partir de un aminoácido, ya sea triptófano (Trp) en los animales y el ácido aspártico (Asp) en algunas bacterias y plantas. El ácido quinolínico se convierte en ácido nicotínico mononucleótido (NaMN) a través de la transferencia de un grupo fosforibosa. La Nicotinamida Mononucleótido Adenililtransferasa (NMNAT) cataliza la condensación de un grupo adenilato del ATP presente para formar el ácido nicotínico adenina dinucleótido (NaAD). Posteriormente se transfiere el grupo amino al ácido nicotínico del NaAD desde la glutamina dando a la formación de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD+). La NAD+ kinasa sintetiza una parte del NAD+ al producir a NADP+ en la posición 2 del azúcar ribosa, adicionando un grupo fosfato.

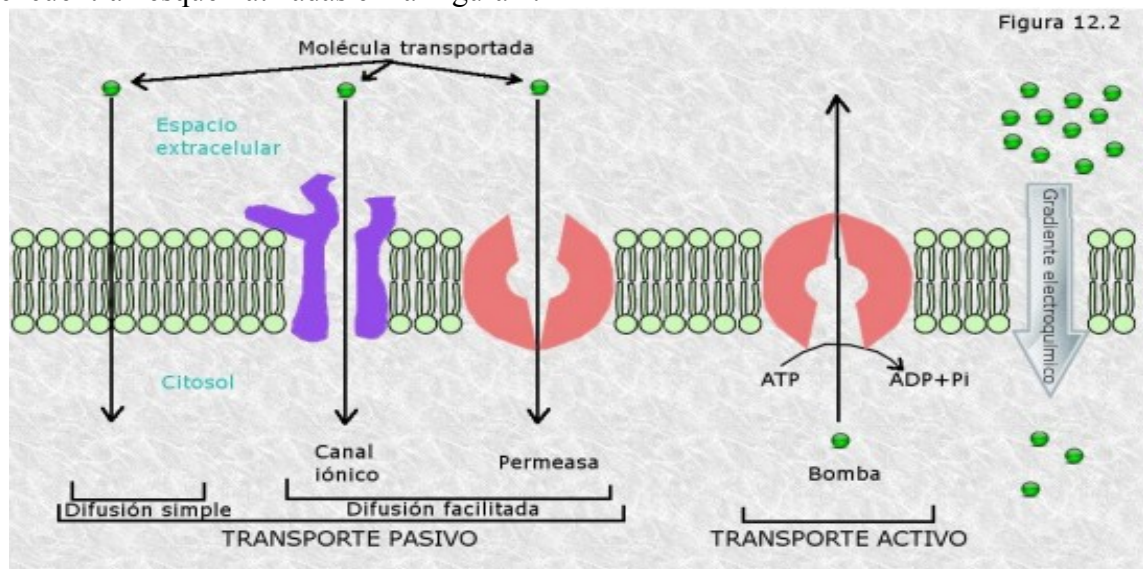
Por otro lado, la vía del reciclaje se denomina así porque en las células se reciclan compuestos preformados que contienen Nicotinamida (Nam) o que contienen el anillo de Nicotinamida como el nicotinato ribosido (NaR) y el ácido nicotínico (Na). Estos precursores son reciclados a NADP+ a través de reacciones de adenilación y fosforibosilación. Los precursores son tomados de la dieta, donde la mezcla de ácido nicotínico y Nicotinamida se conoce como vitamina B3 o niacina. En la célula también son producidos estos compuestos cuando se libera el grupo Nicotinamida a partir del NAD+ en las reacciones de transferencias de ADP-ribosa. Las enzimas que participan en la ruta de

rescate parecen estar centradas en el núcleo de la célula, lo que explica el alto nivel de reacciones que consumen NAD<sup>+</sup> en este orgánulo, también se tiene que tener en cuenta que las células también lo pueden tomar de su entorno extracelular. La ruta de rescate utilizadas por los microorganismos difiere de los mamíferos ya que existen algunos patógenos como la levadura *Candida glabrata* y la bacteria *Haemophilus influenzae* que son auxótrofos de NAD<sup>+</sup>, es decir que no pueden sintetizar el NAD<sup>+</sup> y dependen de esta ruta, obteniendo estas coenzimas de su anfitrión [10].

### 5.3 Proteínas transmembranales

La membrana plasmática es la frontera física de las células, por lo que todas las sustancias que entran o salen deben atravesarla. El interior como el exterior de la célula difiere en su composición química, por lo que la membrana controla las moléculas que la atraviesan manteniendo los niveles de concentración adecuados.

El principal factor determinante de la permeabilidad de la membrana plasmática es la bicapa lipídica que constituye una fase continua. El interior de la bicapa presenta un carácter apolar constituido por colas hidrocarbonadas de los lípidos de las membranas. Toda molécula que haya de ser transportada a través de la membrana deberá de un modo u otro atravesar esta zona. Se distinguen dos modalidades principales de transporte a través de las membranas: el transporte pasivo y el transporte activo. Estas dos modalidades y sus variantes se encuentran esquematizadas en la Figura 4.



**Figura 4. Tipos de transporte a través de la membrana plasmática.**

Se presentan los tipos de transporte: el transporte pasivo que no requiere de energía para atravesar las moléculas, iones; el transporte activo que va contra corriente requiere de energía para poder salir o entrar moléculas [2].

5.3.1 **Transporte pasivo.**- En esta modalidad de transporte las sustancias atraviesan la membrana plasmática a favor de gradiente de concentración, es decir, desde el lado de la membrana en el que la sustancia se halla a concentración más elevada hacia el lado en el que dicha concentración es más reducida. Cuando se trata de iones o sustancias cargadas, además del gradiente de concentración, interviene el gradiente eléctrico a través de la membrana (potencial de membrana), que vendrá dado por la cantidad y el signo (+ o -) de las cargas eléctricas a ambos lados de la misma. En este caso, el transporte tendrá lugar a favor de gradiente electroquímico (suma vectorial de los gradientes eléctricos y de concentración).



El transporte pasivo es un proceso espontáneo, transcurre de acuerdo con las leyes de la difusión, por lo tanto, no implica ningún consumo de energía. En función de la naturaleza polar o apolar de los diferentes tipos de sustancias que atraviesan la membrana mediante transporte pasivo, éste puede tener lugar por difusión simple o por difusión facilitada. - **Difusión simple.**- Las sustancias orgánicas de naturaleza apolar difunden fácilmente a través de la bicapa lipídica a favor de gradiente de concentración; para ellas, el entorno apolar definido por las colas hidrocarbonadas de los lípidos de membrana no supone ninguna barrera infranqueable. Los gases de importancia biológica, tales como el O<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>, gracias a su escasa o nula polaridad y a su pequeño tamaño, también difunden con facilidad a través de la bicapa lipídica. El agua, gracias a su pequeño tamaño molecular, también atraviesa la membrana por difusión simple a través de la bicapa lipídica a pesar de ser una sustancia polar; también lo hacen otras sustancias polares de pequeño tamaño tales como el etanol o la urea. La dirección del flujo de agua a través de la membrana viene determinada por la tendencia de la célula a alcanzar el equilibrio osmótico con su entorno. - **Difusión facilitada.**- La bicapa lipídica de la membrana plasmática resulta impermeable para todas las sustancias polares o iónicas de tamaño molecular intermedio, tales como aminoácidos, monosacáridos o nucleótidos. Este tipo de sustancias constituye el grueso del tráfico molecular a través de la membrana, por lo que debe existir algún mecanismo que les permita franquearla; este mecanismo es la difusión facilitada. La difusión facilitada requiere de la concurrencia de unas proteínas de membrana específicas denominadas proteínas transportadoras o permeasas. En las membranas celulares existen centenares de permeasas diferentes cada una de las cuales es específica para una sustancia determinada. Además de las permeasas existen en la membrana otras proteínas transportadoras, denominadas canales iónicos, que permiten el paso de iones monoatómicos de tamaño y carga determinados. Estos canales iónicos pueden abrirse o cerrarse como respuesta bien a su interacción con un ligando específico (canales regulados por ligando) o bien a un cambio en el potencial de membrana (canales regulados por voltaje) [2].

- 5.3.2 **Transporte activo.** Las sustancias atraviesan la membrana plasmática en contra de un gradiente de concentración, o bien, si se trata de sustancias con carga eléctrica, en contra de un gradiente electroquímico. En este caso, la dirección del transporte es contraria a la que predicen las leyes termodinámicas, es decir, se opone a la tendencia natural a que se alcancen por difusión idénticas concentraciones a ambos lados de la membrana. Por ello, el transporte activo no es un proceso espontáneo, sino que requiere energía metabólica que debe ser aportada por la hidrólisis del ATP (molécula que las células utilizan universalmente para almacenar y transportar energía química). El transporte activo también necesita de la concurrencia de unas proteínas transportadoras específicas que se suelen denominar bombas. Estas proteínas transportadoras funcionan de manera análoga a como lo hacen las permeasas, pero, adicionalmente, tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis del ATP, de la cual obtienen la energía química necesaria para realizar el transporte en contra de gradiente electroquímico. Por transporte activo pueden atravesar la membrana

plasmática los mismos tipos de sustancias que lo hacen por difusión facilitada, es decir, moléculas o iones que debido a su polaridad o a su tamaño no pueden atravesar la bicapa lipídica por difusión simple. Sin embargo, el transporte activo, a diferencia de la difusión facilitada, sí puede acumular solutos en el interior de la célula a concentraciones superiores a las que estos presentan en el medio extracelular, es decir, sí puede generar un gradiente electroquímico a través de la membrana, aunque para ello sea necesario un cierto consumo de energía metabólica. Entre los sistemas de transporte activo destaca, por estar presente en un gran número de células, la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ . La mayoría de las células animales mantienen en su interior una elevada concentración de  $\text{K}^+$  y una baja concentración de  $\text{Na}^+$  con respecto al medio extracelular. Estas diferencias de concentración entre la célula y su medio se generan mediante la actividad de una proteína transportadora situada en la membrana plasmática, la bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , que bombea simultáneamente tres iones  $\text{Na}^+$  hacia el exterior y dos iones  $\text{K}^+$  hacia el interior con la hidrólisis acoplada de ATP. Además de dar lugar a los respectivos gradientes de concentración de los iones sodio y potasio, la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  genera, al bombear más cargas positivas hacia el exterior que hacia el interior, una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana, haciendo que el interior de la célula sea negativo con respecto al exterior. Esta diferencia de potencial, denominada potencial de membrana, confiere a las células animales una excitabilidad eléctrica que resulta esencial para la transmisión del impulso nervioso. Existe una variante del transporte activo, denominada transporte activo secundario, en la que la energía necesaria para bombear un soluto contra gradiente de concentración no proviene directamente de la hidrólisis del ATP, sino que es proporcionada por un gradiente electroquímico establecido previamente. Este gradiente electroquímico se forma mediante transporte activo de iones que sí depende de la hidrólisis del ATP. Una vez formado, el regreso a favor de gradiente ("cuesta abajo") de los iones previamente bombeados proporciona a la proteína transportadora la energía necesaria para bombear el soluto en contra de su propio gradiente [2].

Por otra parte, los procesos de transporte a través de la membrana plasmática no sólo están relacionados con las funciones de nutrición celular, sino con otras funciones más especializadas que realizan algunos tipos celulares. Los procesos de transporte a través de estas membranas, análogos a los que se han descrito para la membrana plasmática, son los responsables de regular el tráfico intracelular de sustancias entre diferentes compartimentos, permitiendo así el que éstos puedan mantener su individualidad química y funcional [2].

#### 5.4 Cepas de expresión

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines diagnósticos, terapéuticos o vacunales, por procedimientos relativamente baratos, ya que ha sido muy bien caracterizada desde el punto de vista genético y fisiológico [4]. Es un bacilo corto gramnegativo que se localiza en las heces fecales; habita en el conducto intestinal normal del hombre y de los

animales y en algunos casos puede ocasionar enfermedades como: hepatitis, septicemia, cistitis y otras.

Entre las ventajas que este microorganismo brinda como hospedero están: mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos; fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento a diferencia de las células de organismos superiores; existencia de gran variedad de vectores de expresión estables, y ser un microorganismo aprobado por las entidades reguladoras para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos[4a]

Es conocido que las proteasas producidas en el microorganismo pueden destruir las proteínas recombinantes obtenidas. Su empleo para producir proteínas útiles en la industria alimentaria no está permitido, segrega toxinas, por lo que se considera un patógeno moderado; es incapaz de realizar muchas de las modificaciones postraduccionales que son comunes en proteínas de origen eucariota; no es un eficiente secretor de proteínas al medio de cultivo, es una fuente potencial de pirógenos y su habilidad para promover la formación correcta de numerosos puentes disulfuro es

En las últimas décadas se han desarrollado cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para solucionar algunas de sus desventajas. Entre ellas se encuentran varias cepas mutantes de los genes *lonA* y *ompT*, para disminuir la degradación proteolítica de los productos recombinantes; también se han obtenido cepas deficientes, o bien de la tioredoxina reductasa (*trxB*), o de la glutatión reductasa (*gor*), o de ambas a la vez, por lo cual en ellas se favorece la correcta formación de puentes disulfuro en el citoplasma. En otras cepas desarrolladas pueden obtenerse proteínas complejas, con modificaciones postraduccionales propias de células eucariotas, como es el caso de las que portan el gen de la tirosina kinasa para producir proteínas fosforiladas por la tirosina [4].

La cepa Lemo21 permite la expresión de proteínas de membrana y proteínas eventualmente tóxicas; la cepa Shuffle promueve la corrección de proteínas mal plegadas, que no requieren de enlaces disulfuros, reduce la formación incorrecta de puentes disulfuros en la proteína recombinante disminuyendo la producción de cuerpos de inclusión y BL21DE3 es deficiente en proteasas manteniendo una mayor expresión de la proteína recombinante [4-4a].

## 5.5 Vector pBADad202/TOPO.

El vector pBAD202 / D-TOPO® contiene el líder de tioredoxina His-Patch (HP) para mayor eficacia de traducción y solubilidad de proteínas de fusión recombinantes. La expresión en *E. coli* es impulsada por el promotor araBAD (PBAD). El gen AraC producto codificado en el vector pBAD202 / D-TOPO® regula positivamente este promotor, figura 5.

### 5.5.1 Características del vector:

- 5.5.1.1 promotor araBAD (PBAD) para la regulación estricta, dependiente de la dosis de heterólogo la expresión génica.
- 5.5.1.2 Tioredoxina His-Patch N-terminal para una mayor eficacia de traducción y solubilidad de proteínas heterólogos.
- 5.5.1.3 Sitio direccional de clonación TOPO® para la clonación direccional rápida y eficiente de un producto de PCR de extremos romos.
- 5.5.1.4 Etiqueta de fusión C-terminal para detección y purificación de fusión recombinante proteínas.
- 5.5.1.5 Gen de resistencia a la kanamicina para selección en *E. coli*.

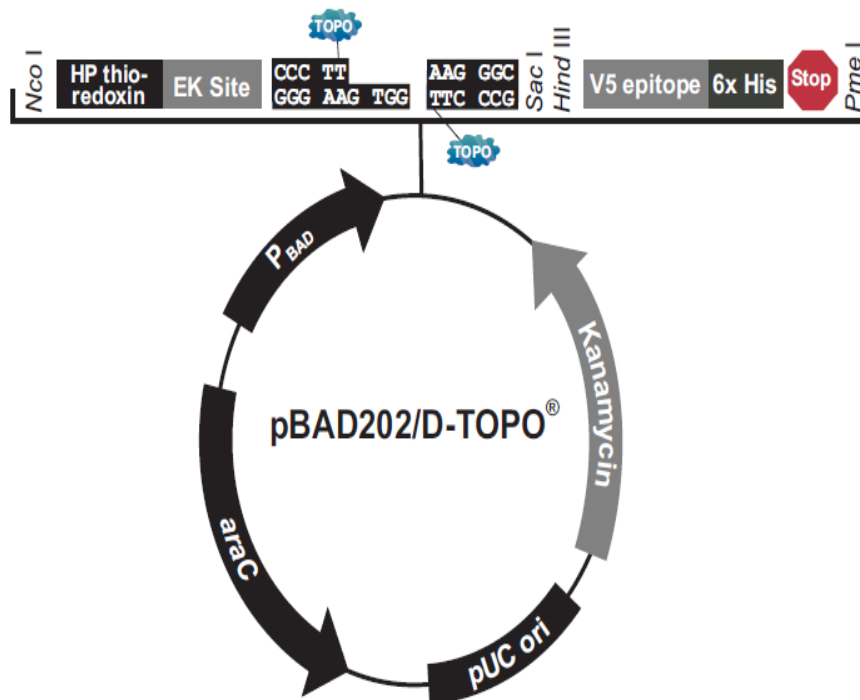
**5.5.1.6** el gen *araC* que codifica una proteína reguladora para la regulación estricta del pBADpromotororigen pUC para mantenimiento en *E. coli*. Aunque el vector pBAD202 / D-TOPO® contiene un origen de pUC, actúan como una copia bajanúmero de plásmidos, lo que resulta en rendimientos más bajos de los vectores

### 5.5.2 Regulación deExpresión por Arabinosa

En presencia de arabinosa, se induce la expresión de pBAD mientras que solo muy bajos niveles de transcripción se observan desde pBAD en ausencia de arabinosa. Los niveles no inducidos son reprimidos aún más por crecimiento en presencia de glucosa (0.1% a 0.2%). La glucosa reduce los niveles de 3', 5'-AMP cíclico, disminuyendo la expresión de la pBAD reprimida por catabólico promotor [61]. Al variar la concentración de arabinosa, proteína los niveles de expresión se pueden optimizar para garantizar la máxima expresión de proteína. Además, la estricta regulación de pBAD por AraC es útil para la expresión de genes potencialmente tóxicos o esenciales [62].

### 5.5.3 Tiorredoxina

La proteína de tiorredoxina de 11.7 kDa se encuentra en levaduras, plantas y mamíferos, comobien como en las bacterias Originalmente se aisló de *E. coli* como donador de hidrógeno pararibonucleasa reductasa. Cuando se sobreexpresa en *E. coli*, la tiorredoxina puede acumularseaproximadamente el 40% de la proteína celular total y aún permanece soluble. Cuandoutilizado como socio de fusión, la tiorredoxina puede aumentar la eficacia de la traducción y, enalgunos casos, solubilidad de proteínas eucariotas expresadas en *E. coli*. [60]



**Figura 5. Vector pBAD202/TOPO**

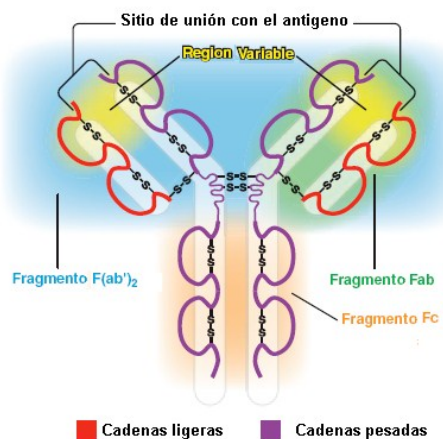
Contiene una secuencia de His-Tiorredoxina en el N-terminal que puede mejorar la solubilidad de la proteína y un tag de histidinas en el C-terminal como identificante. Posee un promotor de pBAD que se induce en presencia de L-arabinosa.

## 5.6 Inmunología

### 5.6.1 Anticuerpos.

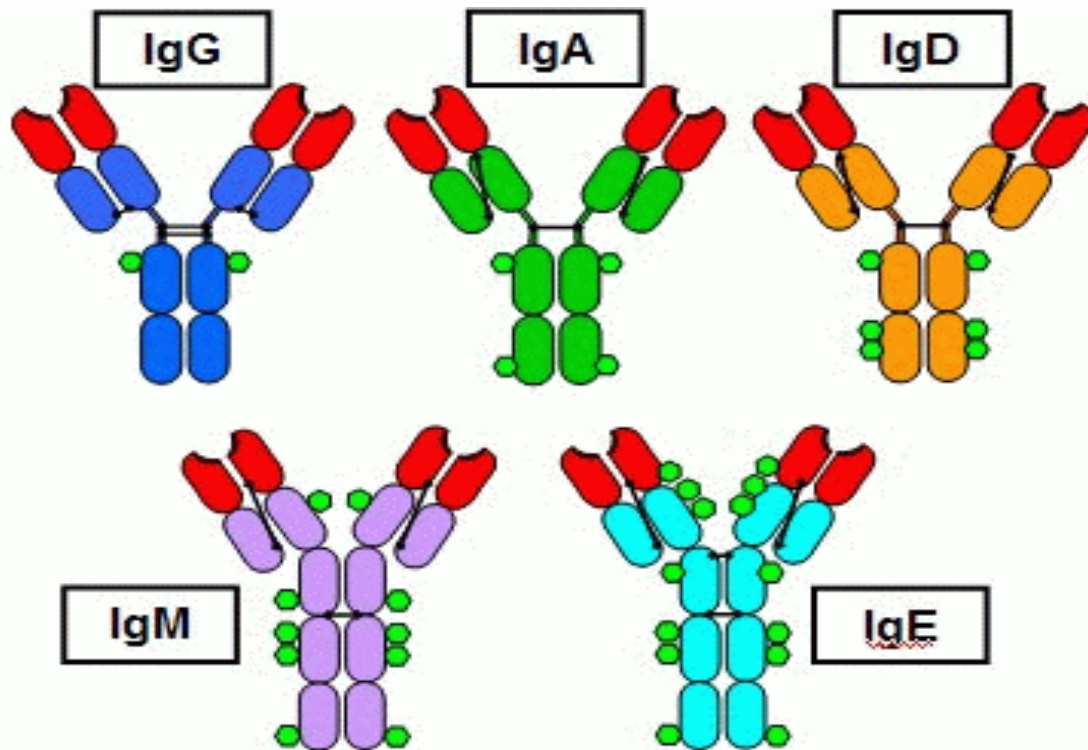
Los anticuerpos son aquellas inmunoglobulinas (Ig) capaces de combinarse específicamente con el antígeno que ha causado su producción en los animales susceptibles. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. La existencia de los anticuerpos como una o más unidades de Y, compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada Y contiene dos copias idénticas de cadena pesada (HC, Heavy Chain) y dos copias idénticas entre sí de una cadenaligera (LC, Light chain), denominadas así por sus pesos moleculares relativos que son aproximadamente 50kDa para la cadena pesada y de 25kDa la de cadena ligera. La unión que se da entre las cadenas es mediante enlaces disulfuros intercatenarios. La separación de estas cadenas se puede generar por la reducción de los enlaces S-S y acidificación (Figura 4) [12].

Las cadenas de las Ig se componen de dos regiones variables (V) amino terminales y de regiones constantes (C) de carboxi-terminales. La región V de una cadena H ( $V_H$ ) se asocia con la región V de la cadena L ( $V_L$ ) para formar el punto de unión con el antígeno “por lo que en una molécula de la Ig se pueden dar dos sitios de unión Ag<sup>2</sup>”. Los dominios de la región C de las cadenas pesadas interactúan con otras moléculas y células efectoras del sistema inmune, por lo que el reconocimiento antigénico y las funciones efectoras de las moléculas del anticuerpo están separadas espacialmente en la región V y la región C, respectivamente [13]. Si a un anticuerpo lo sometemos a la acción de una enzima llamada papaína o otra llamada pepsina, la molécula de anticuerpo se divide en los fragmentos Fc y Fab. Las cuatro cadenas de las Ig se unen en forma de Y con una región central entre los fragmentos Fab y Fc denominada bisagra. Este le permite el movimiento lateral y rotacional de los dos dominios que se unen al antígeno. Una cadena ligera asociada con la región amino-terminal de una cadena pesada forma un dominio de unión al antígeno Fab (Fragmento de unión al antígeno, es la zona más variable y se une a cada determinante antigénico compatible [14]. Mientras que las regiones carboxi-terminal de las dos cadenas pesadas se doblan juntas para formar el dominio Fc [12]. Fragmento cristizable y es la región constante por donde el anticuerpo puede unirse a la célula con un receptor específico [14]), que carece de capacidad para fijar el antígeno.



**Figura 6. Estructura de un anticuerpo**

Las cadenas pesadas como las ligeras tienen una serie de unos 110 aminoácidos de longitud que se pliegan independientemente en un motivo globular común denominado dominio de las Ig. Estos dominios suelen mantenerse cerrados mediante los puentes S-S [15].



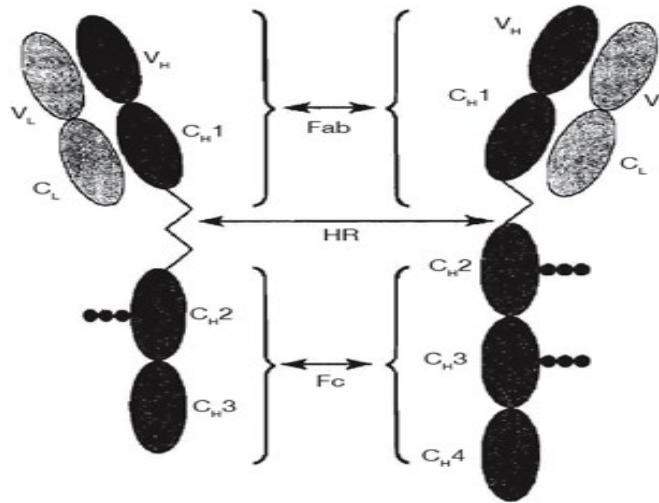
**Figura 7. Clases de anticuerpos[16].**

Los anticuerpos se pueden dividir en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE (Figura 3), basado en el número de unidades Y y en el tipo de cadena pesada. Sus cadenas pesadas son conocidas como gamma, mu, alpha, delta y épsilon ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ). Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo se pueden clasificar de tipo kappa ( $\kappa$ ) o lambda ( $\lambda$ ), basadas en pequeñas diferencias estructurales poli peptídicas; sin embargo, las cadenas pesadas determinan la subclase de cada anticuerpo. Las subclases del anticuerpo difieren en el número de puentes disulfuros y la longitud de la región bisagra. [12]

### 5.6.2 Características bioquímicas e inmunológicas de los anticuerpos IgY.

Los anticuerpos aviares IgY como los anticuerpos IgG de origen mamífero son funcionalmente equivalentes, difieren respecto a ciertas propiedades fisicoquímicas e inmunológicas. La cadena pesada de la IgY tiene un peso molecular de 65kDa mientras que la masa molecular de la cadena pesada de la cadena pesada de la IgG es de 50kDa; de la misma manera, la cadena ligera de IgY pesa 18kDa y de las IgG es de 22-23kDa [17]. El peso de la molécula completa de la inmunoglobulina aviar es de aproximadamente de 167.25kDa determinada por espectrofotometría de masas [18] y su mayor peso es resultado de un dominio constante adicional en su cadena pesada y un par extra de cadenas de carbohidratos. La región bisagra de IgY es menos flexible que la de la IgG y se ha sugerido que la molécula es de naturaleza más hidrofóbica[19].

Por otro lado, la estructura general de la molécula de IgY consiste en dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, que están unidas por puente disulfuro. La cadena ligera de IgY consiste en una variable (VL), y un dominio constante (CL), como IgG de mamífero. Sin embargo, el enlace disulfuro intracadena entre la región VL y la región CL de la cadena L, que estabiliza la estructura de la cadena L de IgG de mamífero, está ausente en la cadena L de IgY y por lo tanto las fuerzas intramoleculares de IgY son más débiles que las de IgG de mamífero [20]



**Figura 8. Comparación de la estructura molecular del conejo IgG y de la gallina IgY [20].**

En la cadena pesada de IgG, los dominios CH1 y CH2 están separados por una región bisagra, lo que da una flexibilidad considerable al fragmento Fab (la porción que contiene la actividad de unión al antígeno). Por el contrario, la cadena pesada de IgY no tiene una región bisagra, pero hay regiones próximas a los límites de los dominios [20] o “switch” regiones con flexibilidad limitada en el C<sub>v</sub>1-C<sub>v</sub>2 y el C<sub>v</sub>3-C<sub>v</sub>4 que contienen residuos de prolina y glicina. Estas regiones tienen el potencial de conferir flexibilidad limitada a la molécula

Las comparaciones de secuencias de dominio C en IgG e IgY han mostrado que los dominios CH2 y CH3 de IgG son los equivalentes de los dominios CH3 y CH4 de IgY, respectivamente. El equivalente de dominio CH2 de IgY está ausente en la cadena pesada de IgG. El contenido de la estructura de la hoja β en los dominios C de IgY es menor que el de la IgG de mamífero; por lo tanto, la conformación de los dominios de IgY está más desordenada en comparación con la IgG de mamífero. Por otro lado, la parte Fc de IgY es el sitio de la mayoría de las funciones efectoras biológicas y contiene dos cadenas laterales de carbohidratos, en contraste con sólo una en la IgG [20]. Los anticuerpos IgY presentan otras características:

- No tienen unión con receptores Fc tanto en bacterias (proteínas A y G) como en células de mamíferos, lo que propone nuevas investigaciones de diseño para las purificaciones.
- Ausencias de reacciones cruzadas con factores reumatoideos, dichos factores son inmunoglobulinas que pueden unirse a inmunoglobulinas de otros mamíferos lo que podría dar falsos positivos al reaccionar con el conjugado en una prueba de ELISA.
- No activación del sistema de complemento, esta es una de las ventajas más importantes de utilizar anticuerpos aviares [21].

Las Propiedades físico-químicas de IgY son bastantes diferentes a la de los mamíferos IgG. El punto isoeléctrico de IgY presenta un intervalo de 5.7 a 7.6 menor que el de la IgG que tiene un intervalo de 6.1 y 8.5.) El fragmento Fc (es el resto más hidrófobo de la molécula de anticuerpo) de la IgY es más grande que el de la IgG, presentando una mayor hidrofobicidad la IgY que la IgG [19].

### 5.6.3 IgY en la yema de huevo.

Los anticuerpos se transfieren de la gallina al pollo a través de la etapa latente del huevo, jugando un papel primordial en la función inmunológica para el polluelo que es relativamente inmuno-competente para resistir algunas enfermedades infecciosas. La IgY sérica (suero) se transfiere de manera selectiva al sistema circulatorio de la gallina a través del oolemma hacia el ovocito maduro en el folículo ovárico [22]. La transferencia se da por medio de un receptor específico en la superficie de la

membrana, que permite el transporte selectivo de todas las IgY presentes en la sangre materna [23-24]. Se han identificado varias regiones dentro del anticuerpo para su captación en la yema del huevo, Morrison demostró a través de sus estudios que la Fc y la región bisagra, pero no el Fc unido a un carbohidrato, son necesarias para este transporte, también sugiere que el dominio CH2-CH3 es reconocido por el receptor que transporta el IgY. El paso trans-ovariano de IgY tarda un promedio entre 3 a 6 días [25]. La concentración de IgY en la yema de huevo es constante a través de la maduración del oocito y en la madurez de la yema contendrá una aproximación de 10-20mg/ml[26].

La estabilidad de las IgY en el pH ha demostrado varios estudios que en diversas condiciones de pH se halló que la actividad de IgY disminuye a pH 3.5 o inferior a este, generando cambios conformacionales y daños en el dominio Fab en donde se da la unión al antígeno [27]. Estudios de estabilidad térmica donde han encontrado diversas temperaturas con diversos tiempos en el que a temperaturas superiores a 70°C y a periodos superiores de 15 minutos la actividad de unión de IgY con el antígeno disminuye. Por lo que la temperatura y el tiempo óptimo es de 60-70°C por 15 minutos.[27]

#### **5.6.4 Antígenos.**

La definición clásica de antígeno es cualquier sustancia foránea que elicitara una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos, polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden funcionar como antígenos.

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan paratopes y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epitope, un epitope no tiene una propiedad intrínseca de alguna estructura particular. Estos son usualmente uno a seis monosacáridos o 5-8 residuos de aminoácidos sobre la superficie del antígeno. El epitope al ser reconocido por el anticuerpo depende de una específica conformación tridimensional del antígeno y de las propiedades estructurales derivadas de los enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrófila e hidrofóbicas. Un buen antígeno debe presentar las siguientes características: Áreas de estabilidad estructural dentro de la molécula, un peso molecular mínimo de 8000 a 10000Da, habilidad de ser procesado por el sistema inmune, regiones inmunológicas accesibles al mecanismo formado por el anticuerpo y elementos estructurales que sean suficientemente diferentes al huésped.

#### **5.6.5 Interacción antígeno-anticuerpo.**

Los antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes y si es dependiente de los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y fuerzas de Van Der Waals [12]. Los ensayos inmunes: dan el resultado de la interacción antígeno-anticuerpo. El término afinidad se utiliza para describir la fuerza de la unión entre el sitio de unión del anticuerpo y el sitio de su unión al antígeno, el epitope. Hay un valor matemático referido a esta unión denominada constante de asociación que es el valor que mide la fuerza de unión. Los antígenos son multivalentes y los anticuerpos también, esta multivalencia tiende a aumentar la afinidad funcional [28].



## 6. METODOLOGÍA

Con el propósito de desarrollar los objetivos planteados se propone la siguiente estrategia metodológica, desarrollando cada uno de los objetivos específicos como se muestra a continuación. La metodología se basó en su mayoría en el libro Molecular Cloning, segunda edición [57].

**6.1 Obtención del antígeno mediante estandarización de la expresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*.** Para optimizar la expresión de la proteína recombinante se evaluarán diferentes condiciones del proceso, entre estas: cepas de expresión, concentración de inductor y tiempo de inducción.

**6.1.1 Obtención de clones de expresión de las cepas en *E. coli* a evaluar.** Las cepas de *E. coli* evaluadas fueron: Lemo21 (New England Biolabs), Shuffle (New England Biolabs) y BL21DE3 (Invitrogen). La cepa Lemo21 permite la expresión de proteínas de membrana y proteínas eventualmente tóxicas; la cepa Shuffle reduce la formación incorrecta de puentes disulfuros en la proteína recombinante disminuyendo la producción de cuerpos de inclusión y BL21DE3 es deficiente en proteasas manteniendo una mayor sobreexpresión de la proteína recombinante. Estas cepas se manipularon de acuerdo a las instrucciones del proveedor en lo referente a medios de cultivo, antibióticos y medios de crío preservación. Para la obtención de los clones de expresión se empleó el vector pBADLbTNTA obtenido en un trabajo anterior, empleando la metodología de choque térmico [35] la cual se describe a continuación. Se tomó 50 µL de las células competentes y se le adicionó 3 µL del vector, se incubó por 30 minutos sobre hielo, posteriormente se realizó el choque a 42°C durante 35 segundos, se incubó por 5 minutos sobre hielo, tras lo cual se adicionó 250 µL de medio Lb (bactotripton 1% p/v, cloruro de sodio 1% p/v y extracto de levadura 0.5% p/v a pH 7) sin antibiótico a 37°C por 30 minutos con agitación. Finalmente, las células se plaquearon en caja petri con medio sólido Lb-agar en presencia de los antibióticos correspondientes durante 12 horas a 37°C. Las colonias positivas se emplearon para los ensayos de expresión y se crío-preservaron a -80°C [57].

**6.1.2 Evaluación del tiempo de inducción.** Se empleó la concentración de 0.02% de L-arabinosa y se evaluó los diferentes tiempos de inducción (2, 4, 6 y 14 h).

**6.1.3 Evaluación de la concentración del inductor en la expresión.** El vector pBADLbTNTA es inducible por la adición de la L-arabinosa inductor artificial del operón *arabinosa*. Las concentraciones utilizadas fueron 0.01%, 0.02% y 0.04% p/v en un tiempo de 4 horas ya previamente establecido, para evaluar el efecto del inductor. Se tomó una colonia aislada de cada cepa y se inoculó en 5 mL de medio Lb líquido (bactotripton 1% p/v, cloruro de sodio 1% p/v y extracto de levadura 0.5% p/v a pH 7) con su correspondiente antibiótico, se incubó toda la noche con agitación, posteriormente se realizó una dilución 1/50 en un volumen de 50 mL, se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.4-0.6, se agregaron volúmenes de 25, 50 y 100 µL de una concentración de 20% de L-arabinosa autoclavada para una concentración final 0.01%, 0.02% y 0.04% p/v respectivamente, monitoreándolos a los tiempos expuestos en el inicio a 37°C en agitación constante. Transcurrido el tiempo de toda la noche se realizó de nuevo la  $DO$  a 600 nm para normalizar el número de células a colectar. Las células se centrifugaron a 1200 g/10 minutos, el pellet se resuspendió en buffer de carga 1x (Tris 0.083 M, SDS 1.74% p/v, glicerol 5% v/v, azul de bromofenol 0.002% p/v y β-mercaptoetanol 5.5%) y se calentaron por 10 minutos a baño de maría. Las muestras se monitorearon en geles de SDS-PAGE al 12% aplicando una diferencia de potencial de 100 voltios en buffer de corrida Tris-glicina

(Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 0.1% p/v) y revelando el gel el azul de Coomassie R250 0.05% p/v, isopropanol 25% v/v y ácido acético 11.2% v/v por 1 hora, posteriormente se dejó en solución decoloradora toda la noche[57].

**6.1.4 Purificación de la proteína recombinante.** Una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión de la Trx-LbTNTA (tiempo, concentración y cepa) se procedió a realizar la purificación de la proteína recombinante, para ello se hizo un pre inoculo a 37°C en 50 mL toda la noche a partir de un estriado de células transformadas previamente en Lb-agar-antibiótico. Posteriormente 980mL del medio Lb serán mezclados con el pre inoculo incubando a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.6, después se adicionó 0.02% concentración final de L-arabinosa y se incubó durante el tiempo previamente establecido (**1.4**). Las células colectadas se centrifugarón a 11200 gravedades y se resuspendieron en buffer de (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, Imidazol 100 mM, glicerol al 10% y Tritón X-10 0.5% v/v a pH 7.78), seguidamente se adicionó lisozima de 10mg/mL (concentración final de 1mg/mL) con el inhibidor de proteasas en una dilución de 1/400 (Sigma P8340: AEBSF 1mM, E64 14 µM, Pepstatin A 15 µM, Bestatin 40 µM, Leupeptin 20 µM y Aprotinin 0.8 µM) por 40 minutos, seguidamente el extracto se sometió a sonicación por 30 minutos y centrifugó a 11200 gravedades/20 minutos, obteniéndose la fracción insoluble y soluble. Dependiendo de la solubilidad determinada de la proteína recombinante es posible emplear varios sistemas de purificación, en este caso la proteína recombinante es una proteína transmembranal por ello se esperó encontrarla mayoritariamente en la fracción insoluble, además considerando que el objeto de este proyecto es producir anticuerpos, se cree pertinente emplear la fracción insoluble, donde frecuentemente se encuentran agregados de proteínas recombinantes más conocidos como cuerpos de inclusión como punto de partida para la purificación de la proteína que será empleada como antígeno.

La fracción insoluble obtenida de la lisis se homogenizó en buffer desnaturizante (100mM Tris-HCl pH7, 5mM EDTA, 5mM DTT, 2M Urea, 2% v/v Tritón x100) a 4°C/20 minutos. Posteriormente se centrifugó a 11200 gravedades/30 minutos. Los lavados se repitieron varias veces más. Se hace un cuarto lavado con el buffer (100mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 5mM DTT) y se centrifugó a las mismas condiciones de los primeros lavados. El pellet se resuspendió en buffer de extracción (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 5mM DTT, 8M guanidina-HCl) y se centrifugó a 15000 gravedades/1 hora/4°C. Se dializó el sobrenadante en el buffer de diálisis (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5). Una vez purificada la proteína recombinante se procedió a hacer la electroforesis SDS-PAGE preparativo bajo condiciones desnaturizante, para obtener la proteína con una mayor pureza. La banda que contiene la proteína recombinante se identificó en referencia al marcador preteñido 1kDa (Opti-protein XL Marker) y se cortó. Posteriormente esta banda se maceró 10 veces en una jeringa de 5mL y se eluyó en 6 mL buffer de electroforesis 5X (Tris 25mM, glicina 192mM y SDS 0.1% p/v). Se transfirió a una membrana de diálisis, la cual se electroeluyó a 100 voltios por 45 minutos, cambiando tres veces el buffer de electroforesis 1X. Se centrifugó a 2900 gravedades por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se lavó con buffer de electroforesis 5x el pellet dando vortex por 2 minutos y de nuevo se centrifugó, recuperando el sobrenadante y se eliminó el pellet (gel macerado)[57].

**6.1.5 Cuantificación de la proteína.** Una vez obtenida la proteína recombinante se cuantificó por el método Bradford a una longitud de onda de 495nm.

**6.2 Producción del anticuerpo en el modelo aviar IgYs (gallina) a partir de la proteína recombinante.** Una vez purificada y cuantificada la proteína recombinante Trx-LbTNTA, mediante la electroforesis SDS-PAGE preparativa se empleó como antígeno para la generación de anticuerpos policlonales, se procedió a inocular las gallinas Lohmann brown de 46 y Vancouver brown 94 semanas.

**6.2.1 Inoculación del anticuerpo.** El proceso de inoculación de la gallina se realizó vía intramuscular utilizando 2 individuos de cada semana para el tratamiento (Tratamiento 1: Control, Tratamiento 2: Proteína recombinante). Las inoculaciones se realizaron cada 8 días hasta completar un total de 4 inoculaciones, la primera se realizó con una mezcla homogénea relación 1:1 de antígeno con adyuvante completo y las tres posteriores con adyuvante incompleto. La gallina control se inmunizó con una mezcla homogénea de 1:1 de PBS con el adyuvante (completo, incompleto). Ver tabla 1.

**Tabla 1. Esquema de inmunización de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales contra la Trx-LbTNTA**

	1 <sup>ra</sup> Inoculación	2 <sup>da</sup> Inoculación	3 <sup>ra</sup> Inoculación	4 <sup>ta</sup> Inoculación
Gallinas de 46 y 94 semanas				
<b>Días</b>	0	15	21	28
<b>Adyuvante</b>	Completo	Incompleto	Incompleto	Incompleto
<b>Antígeno µg</b>	150	150	150	150
<b>Vol. Total µl</b>	300	300	300	300
Gallina control				
<b>Vol. Total µl</b>	300	300	300	300

**6.2.2 Purificación del anticuerpo.** Se recolectó los huevos desde el día cero hasta 15 días posteriores a la última inoculación con el fin de extraer y purificar los anticuerpos. Para la purificación de los anticuerpos se siguió el protocolo de Pauli y colaboradores [38]. Se separó la yema de la clara del huevo y se transfirió a un papel filtro con el fin de eliminar residuos de clara. Se rompió la membrana y se vertió su contenido en un tubo falcón de 50mL previamente autoclavada. Luego se adicionó 2x el volumen de la yema de buffer PBS 1x (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.5), y PEG (poli etilenglicol) 6000 al 3,5 %. Se homogenizó y centrifugó a 11200g/20 minutos/ 4°C. Se tomó la fase acuosa y se filtró, se adicionó PEG a una concentración final de 8,5%. Se repitió el procedimiento anterior. Se tomó el pellet y se resuspendió en 10mL de PBS 1x con PEG al 12%, se repitió las condiciones de centrifugación. Al obtener el pellet se resuspendió en 800µl de PBS 1x con agitador de vidrio y vortex. Se dializó toda la noche en 1.6L de NaCl al 0.01% con agitación a 4°C. Pasado el tiempo se cambió la solución de NaCl por PBS 1x y se dejó por dos horas más a 4°C. Se cuantificó los anticuerpos mediante espectrofotometría a 280nm (diluciones 1:100 en PBS 1x). Se almacenaron las muestras a -20°C [25].

**6.3 Evaluación de los anticuerpos obtenidos del modelo aviar IgYs (gallina), mediante ensayos de Western blot y ELISA, empleando la proteína recombinante.**

Una vez obtenidos los anticuerpos se procedió a evaluar el reconocimiento de la proteína recombinante por parte de los IgY policlonales obtenidos, utilizando el protocolo de **ELISA indirecto**, el cual empleará como antígeno la proteína recombinante purificada a partir de los cuerpos de inclusión a una concentración 10µg/mL, evaluando diferentes diluciones de los anticuerpos [36]. **Western blot:** se evaluará la capacidad de detección por parte de los

anticuerpos a diferentes concentraciones de antígeno (125, 60, 30, 15 y 7ng) manteniendo la misma dilución de anticuerpo en TBS-T (Buffer Salino Tris, Tween-20 al 0.1% V/V). Esto se realizará mediante el empleo de electroforesis SDS-PAGE en gel discontinuo y la posterior electrotransferencia de la proteína a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) o nitrocelulosa, para su revelado con fosfatasa alcalina o peroxidasa [37].

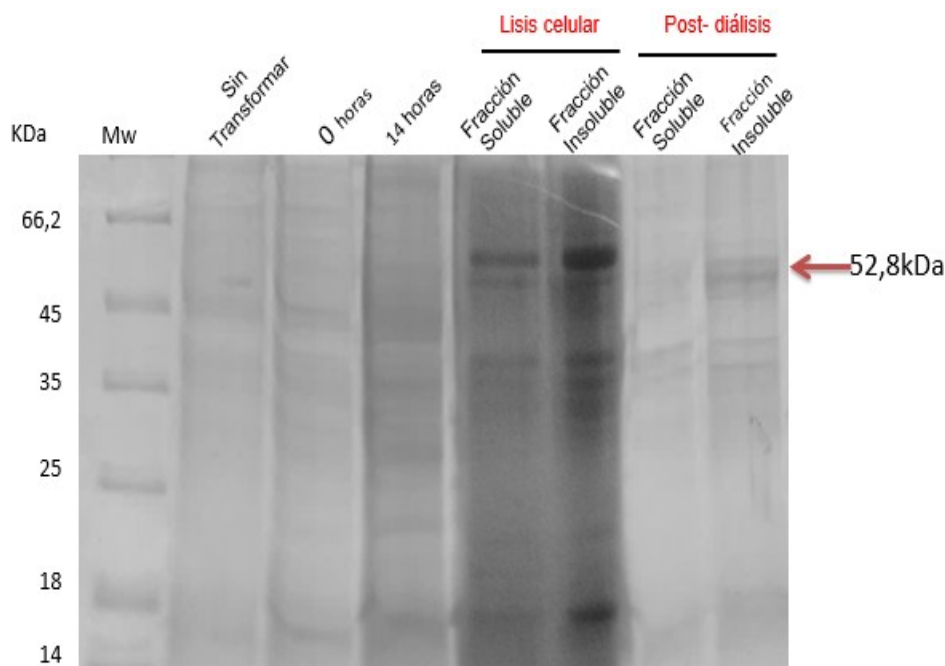
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

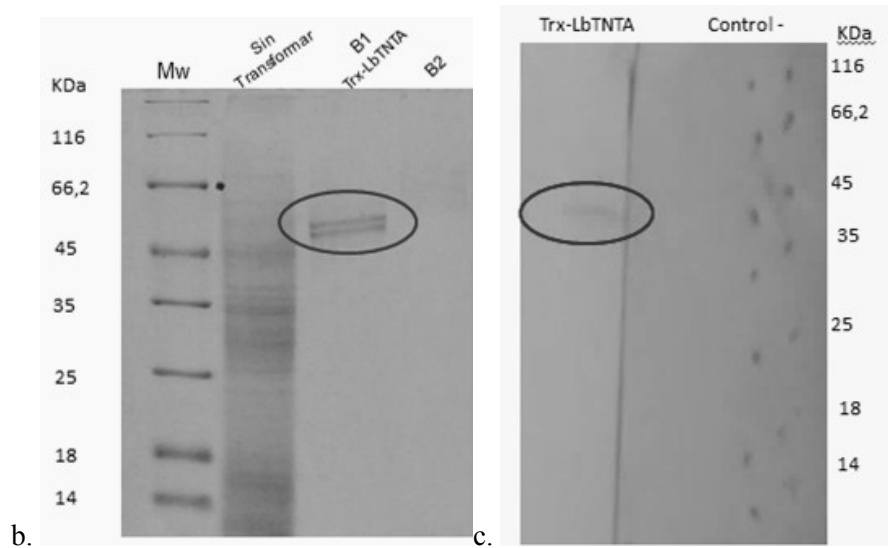
Los resultados se exponen en tres fragmentos de acuerdo a los objetivos previamente descritos en el documento.

Las bacterias son las más utilizadas para la síntesis de proteínas recombinantes, especialmente las *Escherichia coli*, debido a que son de fácil manejo a la hora de cultivar o de ser modificadas genéticamente, además de ser trabajadoras rápidas y de un alto rendimiento en comparación con otros microorganismos como las levaduras [48]. En el trabajo previo de Morales, D. (2016) se construyó el plásmido de expresión pBAD202-LbTNTA, el cual es regulado por la L-arabinosa. Este vector contiene la secuencia codificadora para la proteína recombinante Trx-LbTNTA (52.8kDa) secuencia candidato para el transportador de NAD en *Leishmania Braziliensis*. Esta proteína presenta en el extremo N-terminal como proteína fusión His-Tiorredoxina (Trx) con un peso de 11.7kDa [31]. La Trx-LbTNTA se expresa en la fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) como cuerpos de inclusión generando una desventaja a la hora de obtener y purificar una gran cantidad de proteína recombinante apropiada para la producción de anticuerpos IgY's.

### 7.1 Obtención de la proteína recombinante Trx-LbTNTA (antígeno)

Con el objeto de disponer del antígeno para llevar a cabo la producción de los anticuerpos se realizó la expresión de la Trx-LbTNTA en el sistema heterólogo de *E. coli* (figura 6a) como se describió previamente en la metodología (numeral 1.5). Seguido de la purificación a partir de los cuerpos de inclusión (figura 6b y 6c).





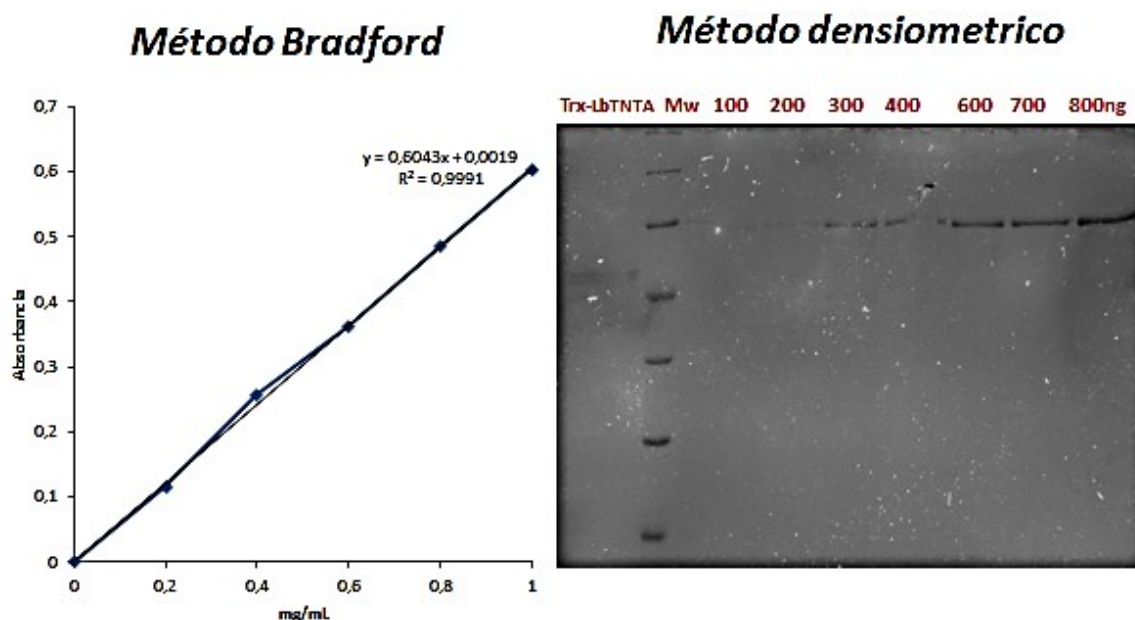
**Figura 9. Expresión y purificación de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en células BL21DE3.**

**a.** SDS-PAGE 12%, Extractos de células BL21DE3 con y sin transformar, teñido en azul de Coomassie. **b.** SDS-PAGE 12%, teñido en azul de Coomassie; B1: Trx-LbTNTA purificada por SDS-PAGE preparativo, B2: control negativo. **c.** Western blot, control negativo: BSA 1, Trx-LbTNTA membrana de nitrocelulosa, Anticuerpo 1:  $\alpha$ -Trx-mouse (Fd: 1/10000 en TBS-T) y anticuerpo 2  $\alpha$ -mouse-biotina (Fd:1/10000 en TBS-T), revelado por fosfatasa alcalina, Mw: marcador de peso (14.4 a 116kDa)

Como muestra la figura 6a, se observó que en los extractos totales a las cero horas de inducción no hay expresión de la proteína recombinante, mientras que a las 14 horas de inducción se ve la expresión (52.8kDa). El análisis de las fracciones celulares muestra una mayor concentración de la Trx-LbTNTA en la insoluble, lo cual era de esperar debido a que es una proteína transmembranal con cerca de un 75% de aminoácidos hidrofóbicos. A partir de los cuerpos de inclusión se realizó la purificación inicialmente mediante lavados de estos agregados con agentes caotrópicos como se señaló en la metodología (numeral 1.5) lo cual llevo a la solubilización parcial de la proteína recombinante y a la purificación parcial de la misma, figura 6a extractos post-diálisis. A partir de la purificación parcial de la proteína recombinante se procedió a optimizar la purificación del antígeno empleando SDS-PAGE preparativo, la banda esperada a los 52.8kDa fue cortada del gel y la Trx-LbTNTA fue obtenida mediante electroelución, figura 6b en B1 aparece la proteína purificada cuyo peso coincide con el esperado. La aparición de dos bandas se debe a uno artefacto que se presenta en la corrida en el SDS-PAGE, por la interacción y cantidad del SDS con aminoácidos hidrofóbicos que son abundantes en proteínas transmembranales reduciendo su unión y afectando su migración en el gel [59]. Con el objeto de verificar la identidad de la proteína recombinante se realizó el western blot utilizando como anticuerpo primario anti-Trx-mouse que reconoce específicamente el tag de His-tiorredoxina pegado en el N-terminal de está, figura 6c.

Al obtener la proteína purificada, se procedió a la cuantificación por el método de Bradford (Figura 7a) debido a las ventajas que otorga tales como bajo costo, rapidez, alta sensibilidad en la formación del complejo proteína-colorante (1-5 $\mu$ g) y mínima presencia interferencias [46]. La proteína recombinante Trx-LbTNTA presento una concentración de 1.020mg/mL de, con un rendimiento de 10mg por litro de medio Lb (bactotripton 1% p/v, cloruro de sodio 1% p/v y extracto de levadura 0.5% p/v a pH 7) inducido con L-arabinosa al 0.02%. Adicionalmente se cuantifico por método densitométrico empleando BSA como estándar

figura 7b la cual confirmo aproximadamente la cantidad de proteína recombinante obtenida.

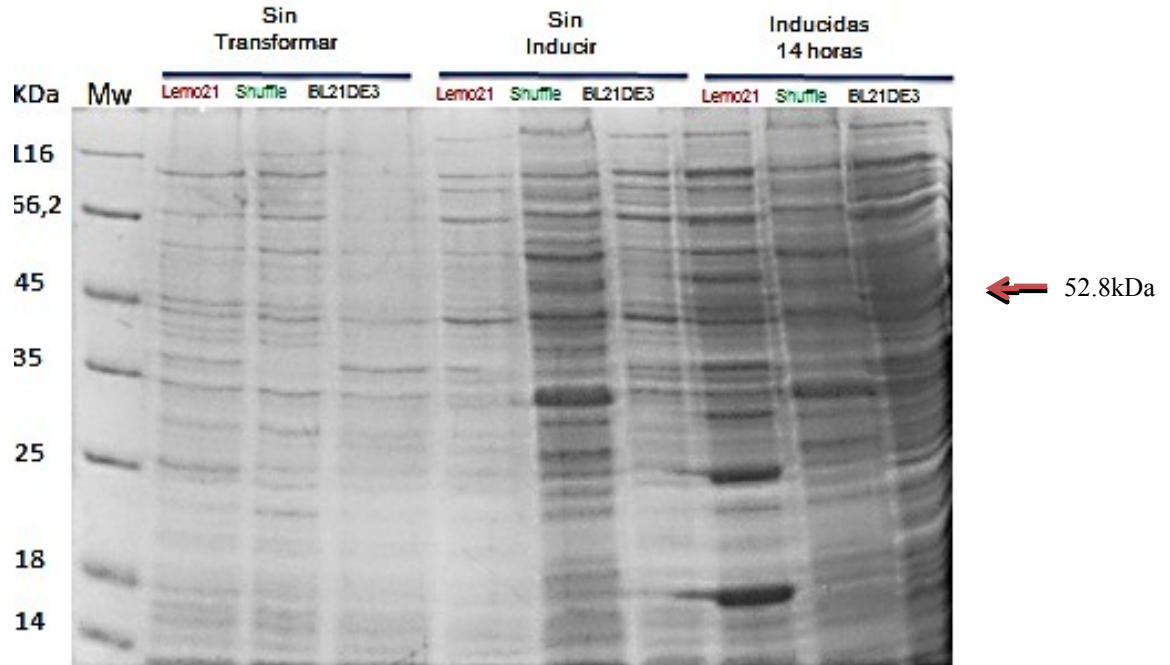


**Figura 10. Cuantificación por el Método de Bradford y Método densiometrico de la proteína Trx-LbTNTA**  
**a.** Patrones de BSA en NaCl (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL. Medido en JENWAY 7315 Spectrophotometer a una longitud de onda 595nm.**b.** SDS-PAGE 12%. Patrones de BSA en buffer de carga (100, 200, 300, 400, 600, 700, 800ng). Teñido azul Coomassie. Mw: marcador de peso molecular (14.6 a 116kDa).

Es bien sabido que las proteínas de membrana cumplen funciones críticas para el mantenimiento y funciones de la célula, aunque algunas de estas son abundantes en determinados tejidos, las de mayor interés como las de comunicación intracelular y concentraciones de transmembranas de iones y metabolitos están presentes en bajos niveles por lo que su expresión en sistemas heterólogos no es sencilla y su cantidad de obtención es baja[54]con un aceptable rendimiento aproximadamente del 1% expuesto por varios autores (referido como el porcentaje en peso de proteína obtenida en la fracción de membrana respecto al peso total de la proteína en el homogeneizado crudo) [55]. Al comparar el rendimiento de la proteína transportadora Trx-LbTNTA obtenida en este trabajo el cual fue de 0.625%, es satisfactorio considerando el reto que presenta la purificación de proteínas transmembranales.

Adicionalmente con el propósito de obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA, se realizó una selección de cepas de *E. coli*(Shuffle, Lemo21y BL21DE3)cada una de ellas otorgando ventajas. La cepa Lemo21 permite la expresión de proteínas de membrana y proteínas eventualmente toxicas; la cepa Shuffle promueve la corrección de proteínas mal plegadas, que no requieren de enlaces disulfuros, reduce la formación incorrecta de puentes disulfuros en la proteína recombinante disminuyendo la producción de cuerpos de inclusión y BL21DE3 es deficiente en proteasas manteniendo una mayor expresión de la proteína recombinante.

Para la evaluación de la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en las tres cepas de expresión *E. coli* se tomaron extractos de las células sin transformar, transformadas con la proteína recombinante Trx-LbTNTA no inducidas e inducidas con L-arabinosa al 0.02% por 14 horas, figura 8.

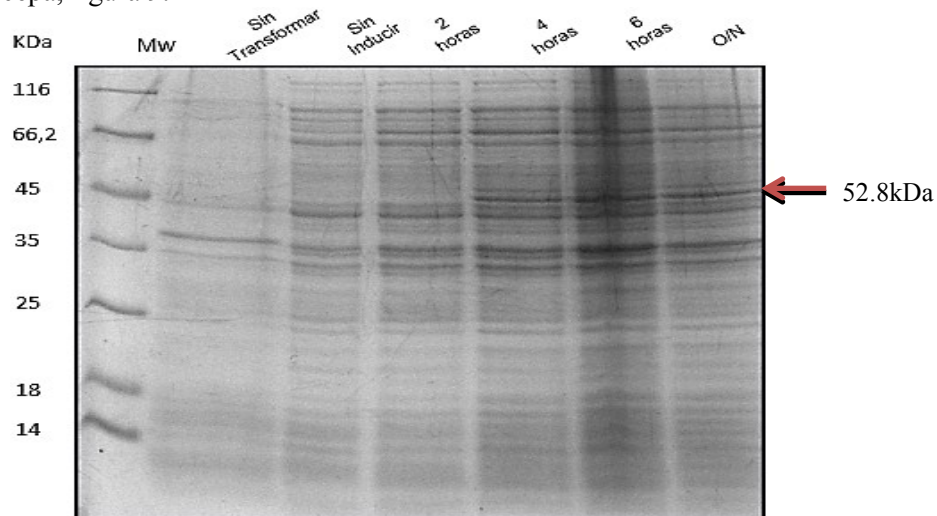


**Figura 11. Evaluación de la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en las cepas de expresión *E. coli*: Lemo21, Shuffle y BL21DE3.**

SDS-PAGE 12%, tinción azul de Coomassie, Proteínas totales, inducción 14 horas con L-arabinosa al 0.02%, Mw: marcador de peso (14.4 a 116 kDa). La flecha corresponde a la proteína expresa.

Se logró la expresión de la Trx-LbTNTA en las tres cepas evaluadas, como evidencia la aparición de una banda de 52.8kDa. Siendo más evidente en Lemo21 y BL21DE3, respecto a Shuffle. En los extractos de células no inducidas no se observa dicha expresión.

Al determinar que la cepa de BL21DE3 dio una mayor expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en la inducción, se procedió a evaluar el tiempo de inducción con esta cepa, figura 9.

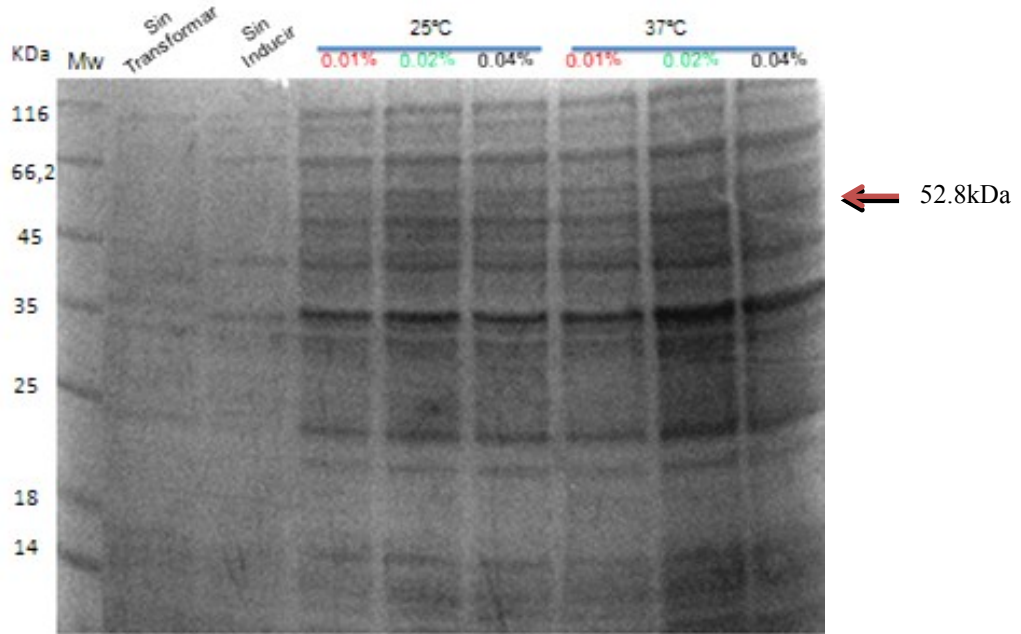


**Figura 12. Evaluación del tiempo de inducción de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en células BL21DE3.**

SDS-PAGE 12%, tinción azul de Coomassie, Sin transformar células BL21DE3; Proteínas totales de células BL21DE3 sin inducir e inducidas 2 horas, 4 horas, 6 horas y 14 horas (O/N) Mw: marcador (14.4 a 116kDa).

El tiempo de inducción empleado fue de 2, 4, 6 y 14 horas (O/N). Se tomó fracciones de 500µL a partir de cada tiempo, observando que a partir de las 4 horas la expresión de la proteína recombinante no varió considerablemente (Figura 9), determinando que el tiempo de inducción óptimo se halla entre las 4 y 6 horas.

Una vez seleccionada la cepa BL21DE3 para expresar la Trx-LbTNTA y estandarizado el tiempo de inducción en 4 horas, se procedió a evaluar la concentración del inductor y la temperatura de inducción. Empleando 0.01, 0.02 y 0.04% (p/v) de L-arabinosa 25 y 37°C respectivamente.



**Figura 13. Evaluación de la concentración de inductor L-arabinosa a temperaturas de 25 y 37°C en células BL21DE3 para la expresión de la proteína recombinante Trx-LbTNTA.**

SDS-PAGE 12%, tinción azul de Coomassie, Sin transformar células BL21DE3; Proteínas totales de células BL21DE3 sin inducir e inducidas 0.01, 0.02 y 0.04 % de L-arabinosa a 4 horas. Mw: marcador (14.4 a 116kDa).

La figura 10 muestra que no existen variaciones considerables en la expresión de la proteína recombinante respecto a la temperatura y a la concentración del inductor. La expresión óptima de la Trx-LbTNTA se establece a 37°C empleando 0.02% de L-arabinosa durante 4 horas.

## 7.2 Producción de los anticuerpos anti-Trx-LbTNTA

La obtención de anticuerpos específicos que reconozcan los epítopes del antígeno es una gran herramienta para estudiar proteínas por su capacidad de unirse a las regiones de los receptores críticos para el desempeño de una determinada función [54]. Los anticuerpos disponibles comercialmente corresponden en su mayoría IgG's obtenidos de modelos mamíferos. Las IgY's son la contraparte en el modelo aviar, las cuales presentan numerosas ventajas tales como alta especificidad, rápida producción, alta producción y bajos costos, constituyendo una buena opción de producción de anticuerpos en la industria farmacéutica.

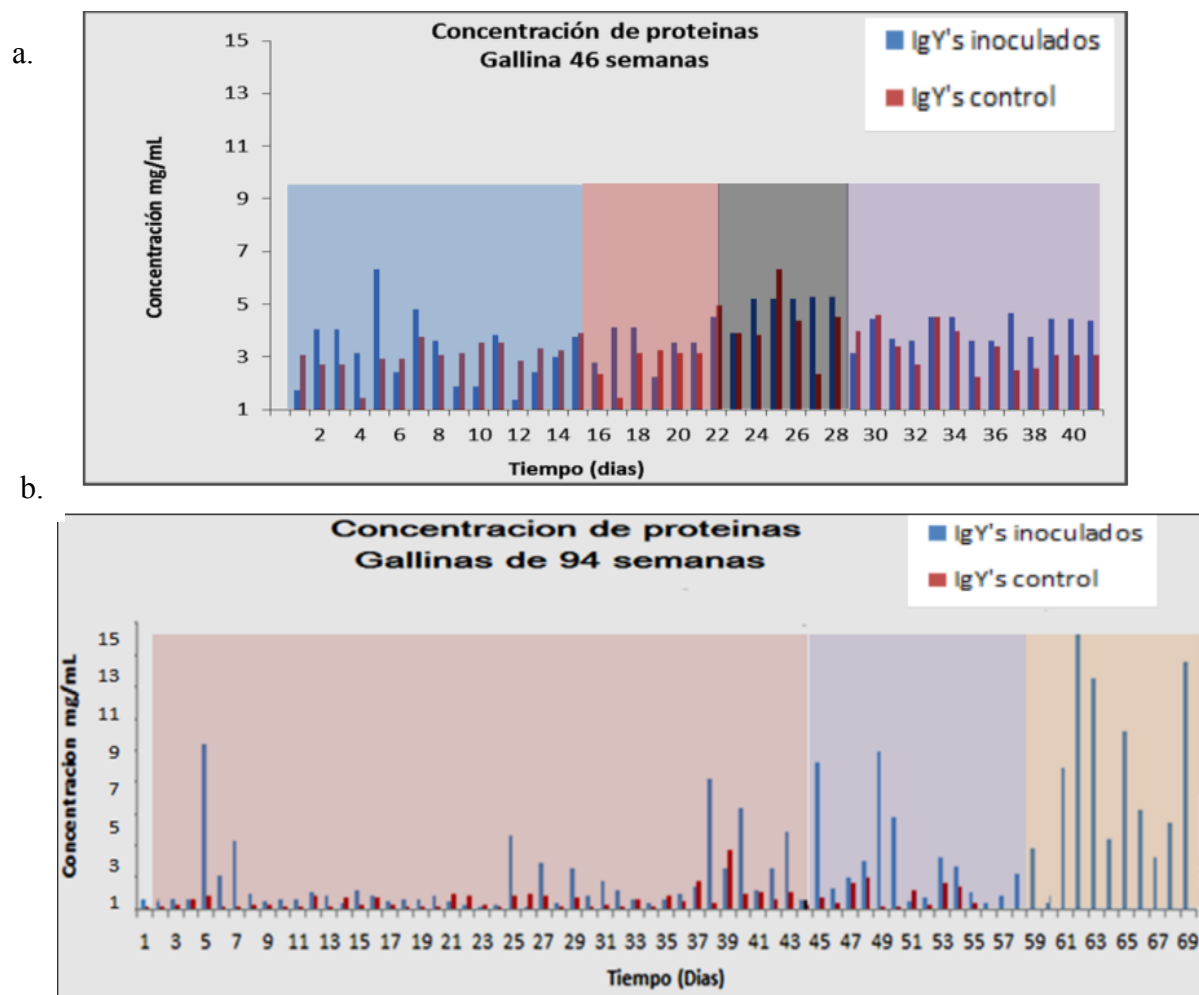
Los anticuerpos IgY's de las gallinas se transfieren a la yema proporcionando una inmunidad pasiva a los huevos. Estos anticuerpos transferidos se almacenan con la intención de proteger el embrión. Además, dan una ventaja a las IgY's al mantenerse activas por varios meses en la



yema si se inmuniza de manera constante la gallina, ya que generan células de memoria [40].

Una vez obtenido el antígeno (Trx-LbTNTA), se procedió a inocular gallinas de las cepas Lohman Brown y Vancouver Brown con el objeto de obtener las inmunoglobulinas. Se inmunizó una gallina por cepa de 46 y 94 semanas respectivamente. Para evaluar el efecto de la edad sobre la producción de las IgY's como un componente adicional en este estudio. El cronograma de inmunización se visualiza en la tabla 2 de la metodología. La inmunización empleada con las gallinas busca con el adyuvante completo y los posteriores refuerzos con adyuvante incompleto un estímulo persistente del antígeno en la producción del anticuerpo a partir de células de memoria [40].

La cinética de producción de los anticuerpos de las gallinas inmunizadas con la proteína recombinante y los respectivos controles se monitoreo mediante la purificación de los IgY's a partir de las yemas de los huevos colectados durante periodo de producción (Para la cepa Vancouver Brown tratamiento y control 70 huevos respectivamente y para la cepa de Lohman Brown tratamiento y control 41 huevos respectivamente), figura 11.



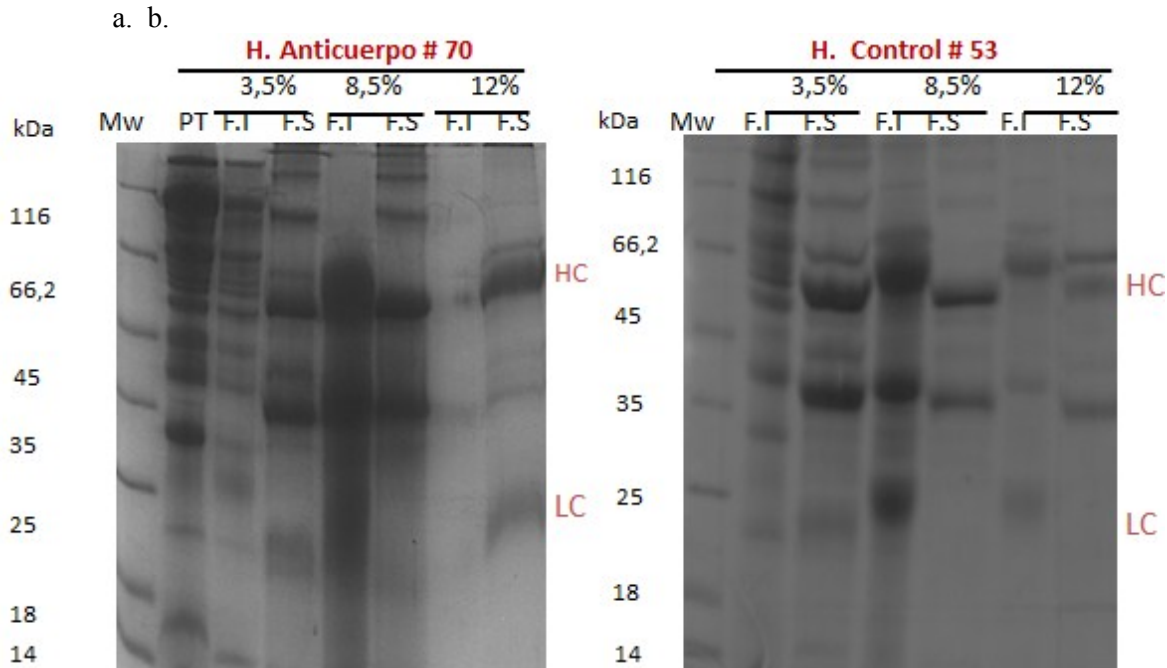
**Figura 14. Cuantificación de las IgY's de las gallinas inmunizadas.**

a. Cepa Lohman Brown y b. Cepa Vancouver Brown. Barras azules gallinas inmunizaciones con el Trx-LbTNTA, barras rojas gallinas control inmunizadas con BSA. Cambio de color de fondo indican las fechas de inmunización 1°, 2°, 3° y 4°. Medido a 280nm con un coeficiente de extinción de 1,33.

Se encontraron cantidades crecientes de IgY's después de las inmunizaciones, reflejando un aumento en la producción de anticuerpos totales al comenzar el período de cada inmunización tanto en las gallinas de 46 como de 94 semanas. Igualmente se presenta irregularidad en la producción de los anticuerpos esto causado posiblemente por: condiciones ambientales, alimentación y estrés que enfrentan estas aves. De otro lado, la producción de huevos en las gallinas se ve alterado por la edad, es decir que entre 18 a 76 semanas se da una producción del 81% (365 huevos) mientras entre 77-120 semanas se obtiene un 65.2% (181 huevos), cuya referencia permite que al comparar las dos gráficas se logra observar que existe una mayor producción de IgY's en la gallina de 94 semanas que en el de la gallina joven, indicando que las gallinas de estas semanas pueden producir anticuerpos sin importar su edad.

La extracción y purificación de los anticuerpos se puede realizar a través de varios métodos como el del sulfato de amonio [41], dilución con agua [42], solventes orgánicos como cloroformo [43], la precipitación con PEG 6000 [44] y PEG con etanol [44]. El método utilizado para la purificación de las IgY's es el de Polson con el PEG 6000 que tiene varias ventajas como una baja tendencia a desnaturar o interactuar con las proteínas, permite que esta retenga su actividad biológica nativa y que no requiere grandes cantidades para lograr una precipitación máxima de la proteína debido a que esta se ve excluida estericamente del solvente en el que se encuentra por la ocupación de la molécula del polímero, así de esta manera la solubilidad de la proteína excede a la del solvente y se da la precipitación [49].

Se realizó el monitoreo de extracción de IgY's través de la técnica de SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras, en donde los enlaces disulfuros que unen a la cadena pesada y liviana se rompen provocando su separación. (Figura 8)



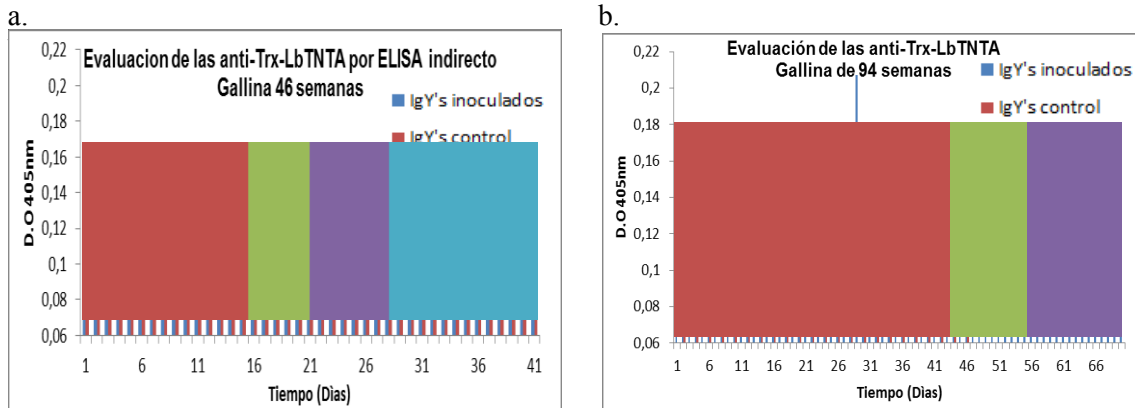
**Figura 15. Purificación de los anticuerpos IgY's empleando PEG 6000**  
 SDS-PAGE 12%; **a.** Huevo numero 70 gallina VancouverBrown inmunizada con Trx-LbTNTA y **b.** Huevo numero 53 gallina Vancouver Brown inmunizada con PBS. F.I: fracción insoluble, lipoproteínas precipitadas en PBS y PEG 6000; F.S. fracción soluble anticuerpos y proteínas solubles en PBS; tenido azul de Coomassie. Mw: marcador de peso molecular (14.8 a 116kDa). Huevo control y huevo de anticuerpos escogido al azar.

La yema de los huevos está conformada por lipoproteína y fosfovitina en forma de gránulos (F.I), mientras que en la fracción soluble (F.S) se halla las livetinas, las proteínas de bajo peso molecular y los anticuerpos[40].

En las precipitaciones con PEG 6000 tanto en el huevo control (a) como en el huevo del anticuerpo (b) se observa que en los carriles de F.S (3.5%), (8.5%) y (12%) aparecen las bandas en los tamaños 80, 60 y 38 kDa y que se van volviendo más tenues o desaparecen a medida que se va aumentando la concentración del PEG 6000, correspondientes posiblemente a la alfa-livetina, a la cadena pesada (HC) y cadena liviana (LC) respectivamente [38]. Existe una breve disputa o desacuerdo de varios autores con respecto al peso molecular de las IgY's, sin embargo la mayoría llegó al consenso en que la cadena liviana está por encima de los 25kDa y la cadena pesada sobre los 60kDa [50]. Considerando que se sembró en todos los pozos la misma cantidad de muestra y según la literatura se debería observar un aumento en la intensidad de las bandas del huevo que contiene el anticuerpo en comparación con el control, ya que se daría un aumento de las IgY, caso que no se observa posiblemente por diversas condiciones ambientales en las que se enfrenta la gallina [51].

### 7.3 Evaluación de los IgY's

La purificación de las IgY's contra la proteína recombinante Trx-LbTNTA obtenidos por precipitación con el PEG 6000, se evaluarán mediante el ensayo de ELISA en una dilución de 1/100 para identificar las IgY's (huevos) que presentan mayor absorbancia a 405nm.



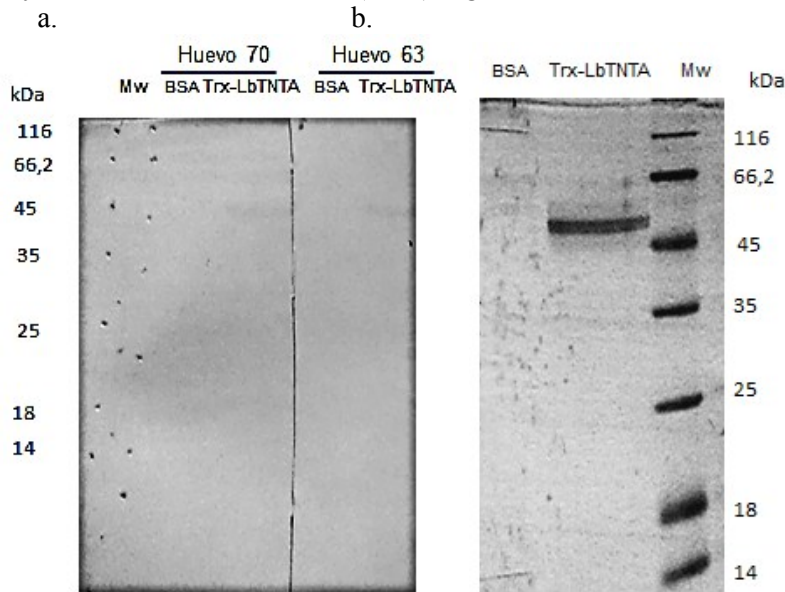
**Figura 16. Evaluación de las IgY's anti-Trx-LbTNTA por ELISA.**

a. Cepa Lohman Brown y b. Cepa Vancouver Brown. Barras azules gallinas inmunizadas con Trx-LbTNTA, barras rojas gallinas control inmunizadas con BSA. Cambio de color de fondo indican las fechas de inmunización 1°, 2°, 3° y 4°. Antígeno 10µg/mL. Anticuerpo primario: IgY's 1/100, Anticuerpo secundario: Anti-gallina-HRP 1/20.000 revelado con ABTS. Eje X: número de huevos recolectados -tiempo días; Eje Y: D.O 405nm.

En la figura 13, el ensayo de ELISA muestra los resultados obtenidos de las absorbancias de los anticuerpos IgY's de los huevos colectados inmunizados con la proteína recombinante Trx-LbTNTA y los huevos control con BSA. La cinética de la producción de los anticuerpos en el modelo aviar muestran un aumento general después de la segunda inmunización y una mayor concentración de IgY's en la tercera y cuarta inoculación, esto debido a la estimulación constante que se le ha generado a la gallina por medio de las inmunizaciones de refuerzo al ser en tiempos cortos y además por el metabolismo del ave que es influenciado por las condiciones fisiológicas y ambientales en las que se encuentra, lo que conlleva el posible aumento de producción de inmunoglobulinas [52].

La producción de IgY's en la cepa Vancouver Brown presento mayores niveles de anti-Trx-LbTNTA comparado con la cepa Lohman Brown, esto debido posiblemente a características o fenotipo específico de esta variedad que la hacen la más utilizada para la producción de anticuerpos. Frecuentemente la edad de las gallinas empleadas para producir IgY's es de 18 a 76 semanas, periodos en el cual se encuentran en el periodo regular de postura, este trabajo determino que gallinas con postura irregular de más 94 semanas son aun eficientes modelos para la producción de anticuerpos.

Finalmente con el objeto de evaluar la especificidad de las inmunoglobulinas anti-Trx-LbTNTA se realizaron ensayos de western blot, empleando la proteína recombinante Trx-LbTNTA y albumina de suero bovino (BSA), figura 14.



**Figura 17. Evaluación de las IgY's anti-Trx-LbTNTA por western blot.**

a. SDS-PAGE 12%, Trx-LbTNTA(4.56µg) y BSA (0.1 µg) b. Western blot Membrana de nitrocelulosa. Anticuerpo primario: IgY's de los huevos # 63 y 70de gallina Vancouver Brown inmunizada con Trx-LbTNTA(Fd: 1/1000 en TBS-T), Anticuerpo secundario α-IgY-biotina (Fd: 1/10000 en TBS-T) revelada por fosfatasa alcalina;Mw: marcador de peso molecular (14.4 a 116 kDa).

En la figura 14a, se observa la electroforesis que contiene la proteína recombinante parcialmente purificada y BSA como proteína controlnegativo de reconocimiento. En figura 14bse observa el reconocimiento específico de la Trx-LbTNTA previamente electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa mediante los anticuerpos IgY's purificados, no hay reconocimiento de la BSA o de las proteínas que constituyen el marcador molecular señalando la buena calidad del anticuerpo producido.

El perfeccionamiento de metodologías de purificación adecuadas, simples y de bajo costo es uno de los requisitos necesarios para la expansión de la aplicación de la IgY's. El uso de anticuerpos IgY's se da como una alternativa en la reducción de costos en la producción de anticuerpos policlonales específicos. En la industria farmacéutica por 10mg de anticuerpos IgY's tienen un rubro promedio de \$750.000 [58], dependiendo de contra quien va dirigido las IgY's. En el laboratorio de Investigaciones básicas en Bioquímica se obtuvo un promedio de 15 mg de IgY's anti-Trx-LbTNTA por yema de huevo, dejando ingresos adicionales a este.

## 8. CONCLUSIONES

Cumpliendo a cabalidad el objetivo principal se logró producir y evaluar el anticuerpo anti-Trx-LbTNTA como una herramienta inmunológica para el estudio de un transportador de NAD<sup>+</sup> en *Leishmania Braziliensis*.

Se obtuvo 10mg por L de medio Lb (de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en la cepa de BL21DE3, para el proceso de inmunización en gallinas Lohmanbrown Y Vancouver brown, obteniéndose anticuerpos IgY's policlónales anti-Trx-LbTNTA. El uso de polietilenglicol (PEG 6000) permitió la separación completa de lípidos y la precipitación de las IgY's como método eficiente que mantiene la especificidad del anticuerpo y alcanza una cantidad de 15mg por yema de huevo.

Se logró producir IgY's anti-Trx-LbTNTA utilizando el modelo aviar *gallus gallus domesticus*. La especificidad de los anticuerpos IgY anti-Trx-LbTNTA. Se evaluó mediante ELISA a una dilución de 1/100 anticuerpos capaces de reconocer el antígeno a una concentración de 10 mg/mL. Mientras con la técnica de western blot, se logró observar la especificidad de los anticuerpos IgY's.

Se estandarizó la expresión y purificación de la proteína recombinante Trx-LbTNTA en *E. coli*. Siendo la cepa de BL21DE3 la más eficiente en un tiempo de 4 horas a 37°C a 0.02% de L-arabinosa de inducción.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Martínez, R. C. (2000). Parasitología veterinaria. España: McGraw-Hill/Interamericana.
- [2]. Landowne, D. (2009). *Fisiología células*. Recuperado el 02 de 02 de 2017, de <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema12.pdf>
- [3]. López, F. (2004). Epidemiología. Enfermedades transmisibles. Mexico: Manual Moderno.
- [4]. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. *BiotechnolApplBiochem* 2002;35(2):91-105.
- [4a] José Garcia Zeila Santana, L. Z. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia. *Finlay Ediciones*, 1-2.
- [5]. José, W. T. (s.f). Leishmaniasis y sus vectores. Obtenido de <http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssalud/edocs/articulos/Leishmaniasis.pdf>
- [6]. Universidad Nacional Autónoma de México. (2011). Leishmaniosis o Leishmaniasis. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- [7]. Schniani G, K. K. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. *Parasitology*. NCBI, 405-425.
- [8]. L. Kathleen Mahan, S. E.-S. (2013). NADH Y NADPH. En S. E.-S. L. Kathleen Mahan,

KrausenDietoterapia (págs. 76-79). España: Elsevier.

[9]. AsturnaturaDB. (2004-2017). Recuperado el 22 de 02 de 2017, de <https://www.asturnatura.com/articulos/nucleotidos-acido-nucleico-adn/coenzimas-derivados-de-nucleotidos.php>

[10]. Perez, G. (s.f.). Coenzima. com. Obtenido de [http://www.coenzima.com/coenzimas\\_nad\\_y\\_nadh](http://www.coenzima.com/coenzimas_nad_y_nadh)

[11]. Dolle C, S. R. (2013). NAD biosynthesis in humans enzymes, metabolites and therapeutics aspects. *Curr Top MedChem* .

[12]. Calderon, r. (2007). *Cursos de Metodosfisicoquimicos en biotecnologia*. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

[13]. Gracia Cozar, f. A. (2014). *Inmunoglobulinas*. Recuperado el 23 de 02 de 2017, de [www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema03/etexto03.htm](http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema03/etexto03.htm)

[14]. VG, G. (2004). Evolutionary development of the immunoglobulins super family. *IzvAkadNauk Ser Biol*.

[15]. E, I. P. (2014). *Curso de inmunologia general: Inmunoglobulinas y otras molculas B*. Universidad de granada. Recuperado el 23 de 03 de 2017, de [www.ugr.es/eianez/inmuno/cap\\_05.htm](http://www.ugr.es/eianez/inmuno/cap_05.htm)

[16]. San Millan, R. B. (s.f.). *Inmunologia, Microbiologia eta ParasitologiaSaila*. Recuperado el 25 de 02 de 2017, de Tipos de anticuerpos: <http://www.ehu.eus/inmunologia/>

[17]. Schade, R. B. (1994). Avian egg yolk antibodies. The egg-laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *AltexAlternativenZuTierexp*, 75-84.

[18]. Sun, S. M. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun.Mass Spectrom*.708-712.

[19]. Davalos Pantoja, L. O. (2000). A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J. Biomater. Sci. Polym*, 657-659.

[20]. Shimizu M., N. H. (1993). Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp. BiochemPhysiol*, 106(2), 255-261.

[21]. Araújo A., L. Z.-O. (2009). Brazilian IgY Bothropsantivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon*, Vol. 55 n° 4, 739-742.

[22]. Rose M.E. &Orlans E., 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo, and young chick. *Dev. Comp. Immunol.*, 5, 15-2

[23]. Tressler R.L. & Roth T.F., 1987. IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. *J. Biol. Chem.*, 262, 15406-15412.

[24]. Morrison S.L. et al., 2001. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.*, 38, 619-625.

- [25]. Patterson R., Youngner J.S., Weigle W.O. & Dixon F.J., 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.*, 89, 272-278.
- [26]. Rose M.E., Orlans E. & Buttress N., 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, 4, 521-523.
- [27]. Shimizu M., Nagashima H., Sano K. & Hashimoto K., 1993. Comparative studies on molecular stability of immunoglobulin G from different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106(2), 255-261.
- [28]. Coto, C. (s.f.). Curso de introducción al conocimiento científico experimental. Capítulo 9. *Química Viva*, 50-57.
- [29]. Maes I, d. L. (2013). Classical versus novel treatment regimens. In: Ponte-Sucre A, Padron-Nieves M *Drug Resist. Leishmania parasites*. First. Springer-Verlag, pp301-319.
- [30]. Contreras, L. (2016). Obtención y caracterización bioquímica y funcional de la enzima recombinante nicotinamida/nicotinato mononucleotido adenilil transferasa de *Leishmania braziliensis* (LbNMNAT). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- [31]. Morales, D. R. (2016). Contribución al estudio de transportadores en tripanosomatidos. clonación por lo menos de un gen codificante para proteínas transportadoras de NAD<sup>+</sup>. Bogotá, Colombia.
- [32]. PAHO. (s.f.). *Leishmaniasis Epidemiological Report of the Americas*. Recuperado el 21 de 04 de 2017, de [http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9417%3A2014-informacion-general-leishmaniasis&catid=1220%3A neglected-diseases-general&Itemid=40250&lang=es](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417%3A2014-informacion-general-leishmaniasis&catid=1220%3A neglected-diseases-general&Itemid=40250&lang=es)
- [33]. Romão PRT, T. J. (s.f.). Glutathione and the redox control system trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian, Med Biol Res*.
- [34]. L. Contreras, R. N. (2015). Identification and functional evaluation of *Leishmania braziliensis* Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferase. *Protein Expression and Purification*, 26-33.
- [35]. Moreno, P., Diaz, G., & Ramirez, M. (2013). Producción y purificación de anticuerpos aviares (igys) a partir de cuerpos de. *Revista Colombiana de Química*. Universidad Nacional de Colombia, 3-18.
- [35]. Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York. Printed in the United States of America, 30-31
- [36]. Gallagher, S., Winston, S. E., Fuller, S. A. and Hurrell, J. G. (2004). Immunoblotting and Immunodetection. *Current Protocols in Neuroscience*. 29:5.19:5.19.1–5.19.24
- [37]. Nutman T. (2001) Measurement of polyclonal immunoglobulin synthesis using ELISA. *Current Protocols in Immunology*. 00: II:7.12:7.12.1–7.12.6

- [38]. Diana Pauly, Pablo A. Chacana, Esteban G. Calzado, BjörnBrembs, RüdigerSchade (2011). IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. Center for Biological Security, Robert Koch-Institute, CICVyA - INTA Castelar, Instituto de Virología, Center of Molecular Immunology, Ciudad de la Habana, Cuba, Department of Biology, Chemistry, Pharmacy, Institute of Biology-Neurobiology, Free University of Berlin, Institut of Pharmacology, Charité-University Medicine of Berlin. 12-13
- [39]. Ramirez, J. (2016). Colombia, el país con más parásitos de Leishmania. Grupo de Investigaciones Microbiológicas-UR (GIMUR) Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad del Rosario
- [40]. Justo, G. C. (2000). Anticuerpos de yema IgY como herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. CENIC CienciasBiologicas, 2.
- [41]. Jensenius, J. C. & Koch, C. (1997). Antibodies packaged in eggs. *Immunochemistry, A practical approach*. Cap 5. IRL Press. Oxford University Press. Oxford. pp, 89-107.
- [42]. Akita, E. M. & Nakai, S. (1993). Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *Journal of Immunological Methods* 160, 207-214.
- [43]. Ntakarutimana, V., Demedts, P., Van Sande, M. & Scharpé, S. (1992). A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. *Journal of Immunological Methods* 153, 133- 140.
- [44]. Polson, A. & Von Wechmar, M. B. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolk of immunized hens. *Immunology Communications* 9, 475– 493.
- [45]. Virgia Melo Ruiz, O. C. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Mexico: Reverte S.A
- [46]. *Metodo brandford*. (22 de 10 de 20017). Obtenido de [www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/bradford.doc](http://www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/bradford.doc)
- [47]. Barroso, P., H. M. (2005). Obtencion y purificacion de IgY dirigida contra la lectina de Salvia bogotensis. *Biomedica*, 3-8.
- [48]. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. *BiotechnolApplBiochem* 2002;35(2):91-105.
- [49]. R., O. M. (25 de 10 de 2017). DesireeOM Artículo de Investigación: Precipitación de Proteínas por PEG. Obtenido de <https://sites.google.com/site/evalestruago14/home/perfiles-y-portafolios/desireeom/desireeom-articulo-de-investigacion-precipitacion-de-proteinas-por-peg>.
- [50]. Warr W, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *ImmunologyToday*. 1995; 16 (8): 392-398
- [51]. Actis, A. B.; Simbrón, A.; Brunotto, M.; Gómez de Ferraris, M. E. 2006. Concentración de proteínas totales en saliva de jóvenes consumidores sociales de alcohol. *Acta Odontológica Venezolana*, 44: 171-175.



- [52]. Fang, L. AntibodyPurificationfromInmunoblotting. 2012. Disponible: <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=133>. [Consultado el 18 de abril de 2013].
- [53]. Schwarzkopf, C. T. (1996). Effectivity of different methods for the extration and purification of IgY. *Biogenes*, 37-38.
- [54]. S.L, A. B. (28 de 11 de 2017). *Proteínas de membrana: retos en la expresión y producción de anticuerpos*. Obtenido de <http://www.abynstek.com/proteinas-de-membrana/>
- [55]. Carvajal, A. M. (2011). Procedimiento de obtención y usos de vesículas de membrana de un organismo marino para su utilización industrial . *Patente*, 3
- [56].Khanacademic. (29 de 11 de 2017). *Operon lac*. Obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-regulation/gene-regulation-in-bacteria/a/the-lac-operon>
- [57]. Sambrook, J. F. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. En J. F. Sambrook. Estados Unidos de America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [58]. Ing, G. i. (2014). *Standing out in the field of IgY Immunotechnology*. Recuperado el 2 de 11 de 2017, de <http://gallusimmunotech.com/normal-chicken-igy>
- [59]. Rath A1, G. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *NCBI*, 2.
- [60]. Invitrogen. (2010). pBAD Directional TOPO®. Five-minute, directional TOPO® cloning of blunt-end. 7-9.
- [61].Miyada, C. G., Stoltzfus, L., and Wilcox, G. (1984). Regulation of the araC Gene of Escherichia coli: Catabolite Repression, Autoregulation, and Effect on araBAD Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4120-4124.
- [62]. Carson, M. J., Barondess, J. J., and Beckwith, J. (1991). The FtsQ Protein of Escherichia coli: Membrane Topology, Abundance, and Cell Division Phenotypes Due to Overproduction and Insertion Mutations. *J. Bacteriol.* 173, 2187-2195.