



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

**Detección de ácido pirazinoico como biomarcador de
resistencia a pirazinamida en *Mycobacterium
tuberculosis* mediante dos inmunoensayos empleando
nanopartículas magnéticas, tmRNA y RpsA**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en
Zoología

AUTOR

Emily Marisol TOSCANO GUERRA

ASESOR

Alberto LÓPEZ SOTOMAYOR

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Toscano, E. (2018). *Detección de ácido pirazinoico como biomarcador de resistencia a pirazinamida en Mycobacterium tuberculosis mediante dos inmunoensayos empleando nanopartículas magnéticas, tmRNA y RpsA*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



del

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

361.
10(e.)
106.

Siendo las 15:15 horas del 12 de enero de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** de **EMILY MARISOL TOSCANO GUERRA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 049-EPCB-2017, la titulando expuso su tesis: **"DETECCIÓN DE ÁCIDO PIRAZINOICO COMO BIOMARCADOR DE RESISTENCIA A PIRAZINAMIDA EN *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE DOS INMUNOENSAYOS EMPLEANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS, tmRNA y RpsA"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 20, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en **Zoología** a **EMILY MARISOL TOSCANO GUERRA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

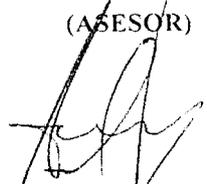
Siendo las 17:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 12 de enero de 2018.


Dra. RINA RÁMIREZ MESIAS
(PRESIDENTA)


Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(ASESOR)

Blgo. JORGE ZEBALLOS ALVA
(MIEMBRO)


Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(MIEMBRO)

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (**INNÓVATE Perú**) y al financiamiento del Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (**FINCyT**) bajo el contrato **151-PNICP-PIAP-2015** en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

DEDICATORIA

A quienes me dieron la vida y la fortaleza para seguir adelante, mis amados padres: Luz Guerra Sanabria y Julio Toscano Manrique.

Al motor de mi vida, mi hijo postizo, mi hijastro, mi adorado hermano: Junior Toscano Guerra

A quien desde el cielo me acompaña y siempre supo cuál sería mi camino: Federico Guerra Sanabria. ¡Aquí está tu científica!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, porque sin ellos no hubiese sido posible seguir mis sueños, me guiaron, me apoyaron y a pesar de las limitaciones, siempre dieron todo de sí para ayudarme. Los amo.

También debo agradecer, por supuesto, a mi familia, mi abuelita Egipcia Manrique, mis tíos Juan, Carmen, Jorge, Bethy, María y Rubén desde el cielo, a mis primos y en especial a Ramiro Guerra quien me apoyó al inicio de mi carrera.

A mi profesor y amigo, Alberto López, por sus sugerencias y asesoría en este trabajo y sobre todo por cada regaño y cada consejo que recibí de usted desde que empecé mi vida universitaria, gracias profesor.

Agradezco enormemente el apoyo y la asesoría de los Doctores Mirko Zimic y Patricia Sheen, jefes del Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular, quienes me han sabido guiar y al MSc. Ricardo Antiparra por demostrarme la confianza para llevar a cabo este trabajo.

A mi jurado: Dra. Rina Ramirez, Mg. Tito Sánchez y Blgo. Jorge Zeballos, por sus atinadas sugerencias y amable disposición para atender mis dudas y sobre todo la gentileza mostrada hacia mi persona.

A la Dra. Patricia Garrido, por creer siempre en mi trabajo, por su ayuda incondicional y sus sabios consejos.

A mis amigos, compañeros de locuras y confidentes, Briggithe Melchor, Nicolás Tarmeño y Juan Carlos Díaz, quienes siempre estuvieron presentes a pesar de la distancia.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular en la UPCH, por compartir esos días y noches de trabajo y también risas, gracias por su compañía y consejos: Daniel Ramos, Lisette Marín, Karen Paco, Yudith Cauna, Katherine Vallejos, Elisa Roncal, Roberto Alcántara, Marco Santos, Ruddy Liendo, Hector Arteaga, Jhanina Campos, Rodolfo Huerta, Stefany Quiñones y Sueline Luis.

A quien desde siempre, y ahora en la distancia, me ofreció su apoyo. Gracias

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Tuberculosis	4
2.1.1 <i>Etiología</i>	4
2.1.2 <i>Patogenia</i>	5
2.1.3 <i>Epidemiología</i>	6
2.1.3.1 <i>Situación en el mundo</i>	6
2.1.3.2 <i>Situación en el Perú</i>	8
2.1.4 <i>Tratamiento</i>	
2.1.4.1 <i>Drogas antituberculosas</i>	12
2.1.4.2 <i>Nuevas tecnologías</i>	13
2.2 Tuberculosis en animales	15
2.3 Pirazinamida	
2.3.1 <i>Mecanismo de acción</i>	16
2.3.2 <i>Mecanismos de resistencia</i>	17
2.4 Ácido Pirazinoico	18
2.5 Proceso de Trans-traducción	
2.5.1 <i>ARN Trans-mensajero</i>	19
2.5.2 <i>Proteína Ribosomal S1 de <u>Mycobacterium tuberculosis</u></i>	21
2.5.3 <i>RpsA y ácido pirazinoico</i>	22
2.6 Inmunoensayos con Nanopartículas Magnéticas	23
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Material biológico	

4.1.1	<i>Conejos</i>	26
4.1.2	<i>Células Competentes BL21 (DE3)</i>	26
4.1.3	<i>Plásmido pET28a</i>	26
4.1.4	<i>Enzimas de Restricción</i>	27
4.2	Materiales y Equipos	27
4.3	Reactivos	28
4.4	Expresión de la Proteína Ribosomal S1 (RPSA)	30
4.4.1	<i>Preparación de células competentes BL21 (DE3)</i>	30
4.4.2	<i>Verificación de Plásmidos pET28a con el inserto RpsA</i>	30
4.4.3	<i>Transformación de células competentes BL21</i>	32
4.4.4	<i>Expresión y Extracción de la proteína RpsA</i>	33
4.4.5	<i>Purificación Convencional de RpsA</i>	33
4.4.6	<i>Purificaciones Modificadas para la proteína RpsA</i>	34
4.4.7	<i>Cuantificación de la proteína RpsA</i>	35
4.5	Producción de anticuerpos Policlonales Anti-Rpsa	36
4.5.1	<i>Inmunización</i>	37
4.6	Producción de tmRNA	
4.6.1	<i>Extracción de ADN genómico de <u>Mycobacterium tuberculosis H37Rv</u></i>	38
4.6.2	<i>Amplificación del gen <i>ssrA</i></i>	38
4.6.3	<i>Transcripción in vitro del gen <i>ssrA</i></i>	39
4.7	SISTEMA I.- inmunoensayo utilizando nanoparticulas magnéticas de streptavidina (NPMs) y anticuerpos policlonales anti-RpsA	
4.7.1	<i>Estandarización de la Cantidad de tmRNA</i>	40

4.7.2	<i>Ensamblaje de sistema de detección</i>	41
4.7.3	<i>Interacción de los nanocomplejos con Ácido Pirazinoico comercial</i>	44
4.7.4	<i>Detección indirecta de POA mediante ELISA</i>	45
4.8	SISTEMA II.- Inmunoensayo utilizando nanoparticulas magnéticas de cobalto (NPMc) y anticuerpos policlonales anti-RpsA	
4.8.1	<i>Estandarización de Condiciones de unión Proteína-NPMc</i>	46
4.8.2	<i>Ensamblaje de sistema de detección</i>	48
4.8.3	<i>Interacción de los nanocomplejos con Ácido Pirazinoico comercial</i>	51
4.8.4	<i>Detección indirecta de POA mediante ELISA</i>	52
4.9	Análisis de Resultados	53
5.	RESULTADOS	54
5.1	Expresión de la Proteína Ribosomal S1 (RPSA)	54
5.2	Producción de tmRNA	65
5.3	Inmunoensayo con Sistema I	71
5.4	Inmunoensayo con Sistema II	79
6.	DISCUSIÓN	88
7.	CONCLUSIONES	96
8.	RECOMENDACIONES	97
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ABREVIATURAS

TB	Tuberculosis
PZA	Pirazinamida
POA	Ácido pirazinoico
PZasa	Pirazinamidasa
RpsA	Proteína Ribosomal S1
tmRNA	RNA de transferencia y mensajería
NPMs	Nanopartícula Magnética de Streptavidina
NPMc	Nanopertícula Magnética de Cobalto
pm	Picomoles
pb	Pares de bases
Fw	Primer Forward
Rv	Primer Reverse
pKa	Logaritmo de la constante de disociación ácida
Kd	Constante de Disociación (Afinidad)

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, la cual, a pesar de los esfuerzos por erradicarla aún permanece como una de las principales causas de muerte en el mundo, y más aún, debido al incremento de casos de multidrogoresistencia, lo cual complica su tratamiento. La pirazinamida es una de las drogas de primera línea que presenta resistencia. En este sentido, el presente trabajo tuvo por objetivo diseñar un sistema que detecte al ácido pirazinoico (POA), el cual es producto del metabolismo de la bacteria y asimismo, principio activo de la droga. Cuando una bacteria es sensible al tratamiento con pirazinamida, produce POA en los cultivos a determinado ratio, sin embargo, aquellas resistentes no producen o producen muy poco. Se logró ensamblar dos sistemas de detección, el Sistema I consistió en acoplar la proteína RpsA y su tmRNA a una nanopartícula magnética de estreptavidina a través del tmRNA biotinilado, mientras que el Sistema II, consistió en acoplar las mismas moléculas a una nanopartícula magnética de cobalto, pero a través de la cola de histidinas de la proteína RpsA. Estos sistemas fueron enfrentados de forma preliminar, a POA comercial. Como resultado se obtuvo que el primer sistema logró detectar hasta 5 picomoles del ácido, sin embargo, estos resultados no lograron ser reproducibles. El segundo sistema logró detectar hasta 750 picomoles del ácido, y se logró reproducir en dos ocasiones. Los sistemas fueron estables y demostraron estar ensamblados correctamente, sin embargo, la variabilidad en los resultados de detección de POA, aquí presentados, estarían indicando que la interacción entre el RpsA y el POA no es tan fuerte como se mencionó en estudios anteriores. El resultado de este trabajo estaría confirmando lo reportado en un último estudio publicado en *Nature*, el cual refuta la hipótesis de que el ácido pirazinoico se une a RpsA con gran afinidad.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis*, and despite efforts to eradicate it remains one of the main causes of death, due to the increase in cases of multidrug resistance, which complicates its treatment. Pyrazinamide is one of the first-line drugs that has resistance. Therefore, the goal of this work is to design a system that detects pyrazinoic acid (POA), which is a product of the metabolism of the bacteria and also, the active principle of the drug. When the bacterium is sensitive to treatment with pyrazinamide, it produces POA in culture at a certain ratio, however, those resistant do not produce or produce very little. Two detection systems were assembled, System I consisted of coupling the RpsA protein and its tmRNA to a streptavidin magnetic nanoparticle through the biotinylated tmRNA, while System II consisted of coupling the same molecules to a cobalt magnetic nanoparticle, but through the histidine tail of the RpsA protein. These systems were faced in a preliminary way, to commercial POA. As a result, it was obtained that the first system managed to detect up to 5 picomoles of the acid, however, these results were not reproducible. The second system managed to detect up to 750 picomoles of the acid, and it was able to reproduce twice. The systems were stable and showed to be assembled correctly, however, the variability in the results of POA detection would be indicating that the interaction between RpsA and POA is not as strong as was demonstrated in previous studies. These results would confirm what was found in a recent study published in *Nature*, which refutes the hypothesis that pyrazinoic acid binds to RpsA with great affinity.

1. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. En la actualidad, a pesar de los grandes avances en su control, se mantiene como una de las enfermedades más letales en el mundo. Se ha estimado que en el 2013, 9 millones de personas desarrollaron tuberculosis y 1.5 millones fallecieron por la enfermedad (World Health Organization 2014).

En el Perú esta enfermedad es considerada como uno de los problemas de salud pública de mayor trascendencia social y económica debido a que el 66% de los casos corresponde a la población económicamente activa (PEA). Cada año más de 30000 peruanos se enferman con TB y la región metropolitana es la que presenta la tasa de morbilidad de 155.9 casos por cada 100000 habitantes, siendo las más alta del país (Ministerio de Salud 2013).

Aunque los esfuerzos por erradicar la enfermedad han tenido sus frutos, la aparición de cepas multidrogoresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) están dificultando su eliminación, cuya tendencia va en aumento; tan solo en el 2013 se registraron 1281 casos para la cepa MDR y 77 casos para la cepa XDR (MINSa 2014). En ese sentido los estudios de los mecanismos de resistencia a los antibióticos de primera línea como Rifampicina, Isoniazida, Estreptomina, Pirazinamida y Etambutol son una prioridad.

En la actualidad, los métodos de determinación de resistencia en TB se han centrado en la detección de cepas resistentes a los fármacos Rifampicina (RIF) e Isoniazida (INH) a través de métodos como Xpert MTB/RIF (CDC 2013), mientras

que para detectar resistencia a otras drogas la OMS respalda hasta el momento el ensayo rápido de Microscopic Observation of Drug Susceptibility (MODS), Nitrato Reductase assay (NRA) y colorimétrico tipo REDOX como métodos cualitativos, los cuales además de ser costosos, requieren entrenamiento importante y tiempo prolongado (World Health Organization 2011).

La pirazinamida (PZA) es una droga análoga a la nicotinamida para el tratamiento de la tuberculosis, utilizada desde la década del 50 (Lacroix et al. 1989). PZA es una de las drogas de primera línea más utilizadas e importantes para el tratamiento de la terapia antituberculosa, ésta actúa como una prodroga, es decir, requiere metabolizarse para convertirse en ácido pirazinoico (POA), la droga o principio activo. Esta activación es realizada por la enzima bacteriana pirazinamidasa (PZAse) (Zhang et al. 2003).

El POA producido intracelularmente es expulsado fuera de la bacteria por mecanismos de bomba de eflujo deficientes y por difusión, es protonado favorecido por un pH ácido en el medio extracelular (Zhang y Yew 2009; Zimic et al. 2012), luego reingresa al citoplasma de la bacteria en donde se acumula provocando la inactivación de enzimas de síntesis de ácidos grasos y el sistema de traducción, (Johnson et al. 2006; Shi et al. 2011). Por lo tanto, una cepa sensible a Pirazinamida produce POA mientras que una cepa resistente no metaboliza POA o no puede expulsarla para su adecuada protonación.

Por lo general la resistencia a pirazinamida ha sido principalmente atribuida a mutaciones en el gen *pncA*, el cual codifica a la enzima PZAse (Kolyva y Karakousis 2012).

En el presente trabajo se propone diseñar dos métodos de detección y cuantificación de ácido pirazinoico empleando RpsA, tmRNA y nanopartículas magnéticas, aprovechando la propiedad de competencia entre el POA y tmRNA por el sitio de unión a RpsA. El primer sistema de detección, consistirá en acoplar la proteína RpsA en NPM de cobalto y luego el tmRNA en la proteína y el segundo sistema, acoplará el tmRNA biotinilado en NPM de estreptavidina y luego la proteína RpsA.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 TUBERCULOSIS

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se transmite a través del aire cuando una persona contagiada tose o estornuda, cuyo agente infeccioso es una micobacteria denominada *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta generalmente a los pulmones y en menor proporción otros órganos como los riñones y el cerebro (CDC 2012).

2.1.1 Etiología

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad bacteriana causada por micobacterias del género *Mycobacterium*, familia Mycobacteriaceae, suborden Corynebacterineae y orden Actinomycetales. Las principales características de las micobacterias son, la ausencia de motilidad, la morfología de los bacilos, ligeramente curvada y en forma de varilla, y la resistencia al ácido-alcohol después de la coloración con fucsina fenicada (Figura 1). Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es la especie más representativa, esta enfermedad está en realidad causada por un complejo de especies estrechamente relacionadas. Este grupo incluye *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium dassie*, y *Mycobacterium oryx*. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* tiene 99.9% de similitud a nivel de nucleótidos y secuencias de rRNA 16S idénticas y la similitud entre el genoma de *M. bovis* y *M. tuberculosis* es 99.5%, sin embargo muestran un

espectro amplio de huéspedes, que afecta desde seres humanos, bovinos, cabras hasta roedores (Garnier et al. 2003; Velayati y Farnia 2017).



Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis* teñido con la coloración Ziehl-Neelsen. Se observa su forma bacilar en forma de varillas curvadas. Fuente: Velayati y Farnia 2017

2.1.2 Patogenia

El contagio se produce inicialmente cuando una persona infectada con lesiones pulmonares abiertas, tose generando pequeñas partículas en aerosol (gotas de Flugge) que contienen uno o dos bacilos. Al evaporarse, queda el núcleo del bacilo que permanece flotando en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire pudiendo ser aspirado por otras personas (Lozano 2002).

Cuando el bacilo ingresa, llega hasta los pasajes alveolares y por lo general es fagocitado por los macrófagos presentes, sin embargo, también se puede dar el caso de que la bacteria es ingerida por los neumocitos epiteliales tipo II (Smith 2003).

2.1.3 Epidemiología

2.1.3.1 Situación en el mundo

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO 2016), la tuberculosis sigue siendo una enfermedad de problema mundial. Aunque gran parte de la carga se concentra en Asia y África (que forman parte del 58% y 28% de todos los casos, respectivamente), en 2015 se estima que hubieron 10.4 millones de nuevos casos de tuberculosis (incidentes) en todo el mundo, de los cuales 5.9 millones (56%) se encuentran entre los hombres, 3.5 millones (34%) entre las mujeres y 1.0 millones (10%) entre los niños. La incidencia de casos por 100000 habitantes se observa en la figura 2.

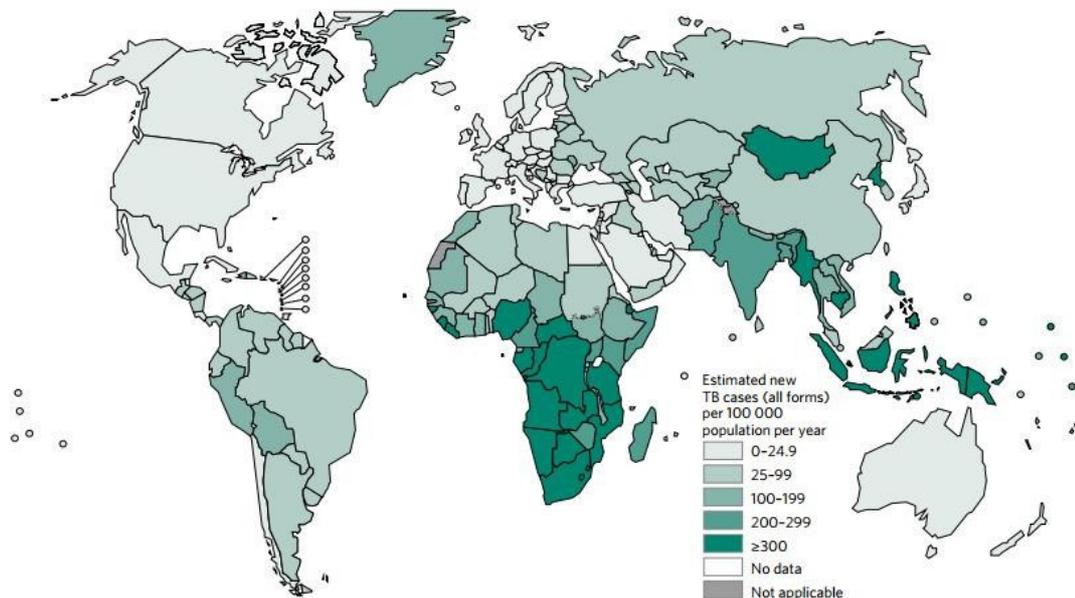


Figura 2. Tasas de incidencia de la tuberculosis. Fuente: WHO 2016

Las personas con VIH representaron 1.2 millones (11%) de todos los nuevos casos de tuberculosis. Seis países representaron el 60% de los nuevos casos: India, Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica (Figura 3).

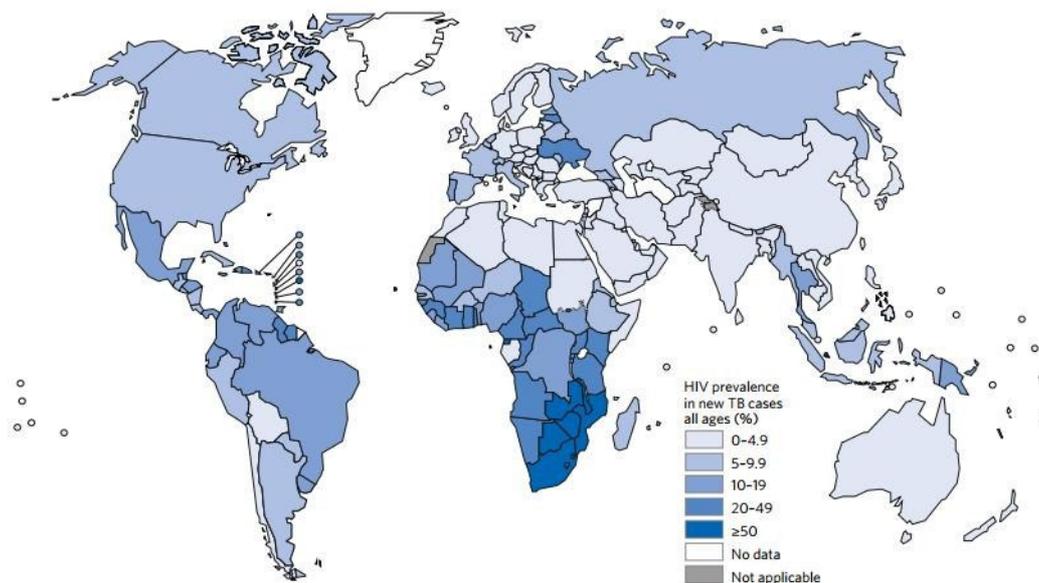


Figura 3. Prevalencia estimada de VIH en casos de TB en el 2015. Fuente: WHO 2016.

En 2015, se estimó 480 000 nuevos casos de Tuberculosis Multirresistente (MDR-TB) y 100000 personas con tuberculosis resistente a la rifampicina (TB-RR). Asimismo, 117 países de todo el mundo han reportado al menos un caso de Tuberculosis Extremadamente Resistente (TB-XDR) a fármacos a finales de 2015. La información de países con datos confiables sugiere que alrededor del 9.5% de los casos de tuberculosis MDR en todo el mundo tienen XDR-TB. La India, China y la Federación de Rusia representaron el 45% del total combinado de 580 000 casos.

Se calcula que hubo 1.4 millones de muertes por tuberculosis en 2015 y 0.4 millones de muertes adicionales por enfermedad de TB entre las personas con VIH.

Aunque el número de muertes por TB disminuyó un 22% entre 2000 y 2015, la tuberculosis sigue siendo una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo.

2.1.3.2 Situación en el Perú

Según el Ministerio de Salud (MINSA 2016), el factor socioeconómico y político, así como los factores psicosociales y biológicos son unos de los determinantes de la salud en el Perú, los cuales representan un riesgo para el desarrollo de la Tuberculosis, como se observa en la figura 4. Existe mayor incidencia de TB en aquellos distritos con mayor desventaja en el desarrollo social humano.

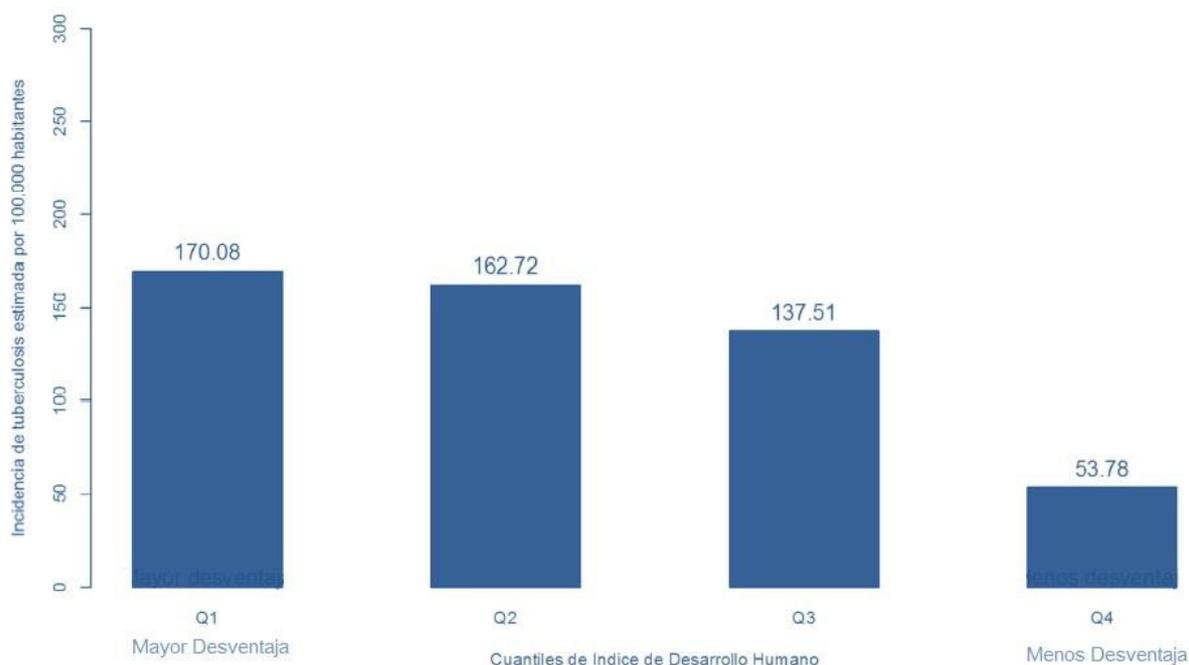


Figura 4. Desigualdades por distritos entre la tasa de incidencia de TB e Índice de Desarrollo Humano. Fuente: MINSA 2016.

En la década de los años 1980 nuestro país fue calificado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como un país con severa endemia de

tuberculosis, por tener una de las más altas tasas de prevalencia e incidencia de América y una cobertura de tratamiento baja. Sin embargo, gracias al acceso a diagnóstico y tratamiento gratuito se logró detectar por lo menos al 70% de los casos, curar al 85% de los casos de TB sensible y reducir la mortalidad significativamente, con lo que el Perú salió de la lista de los 23 países con mayor prevalencia de TB en el mundo. Sin embargo, a mediados de la década de los 90 también se detectaron los primeros casos de TB multidrogoresistente (TB MDR) en el país, llegando a ser el país con la mayor carga de TB MDR en la región de las Américas (OPS 2013).

Según la OMS, hasta el año 2015, ha estimado que la Mortalidad en el Perú debido a TB ha sido de 6.2 por cada 100000 habitantes (Figura 5).

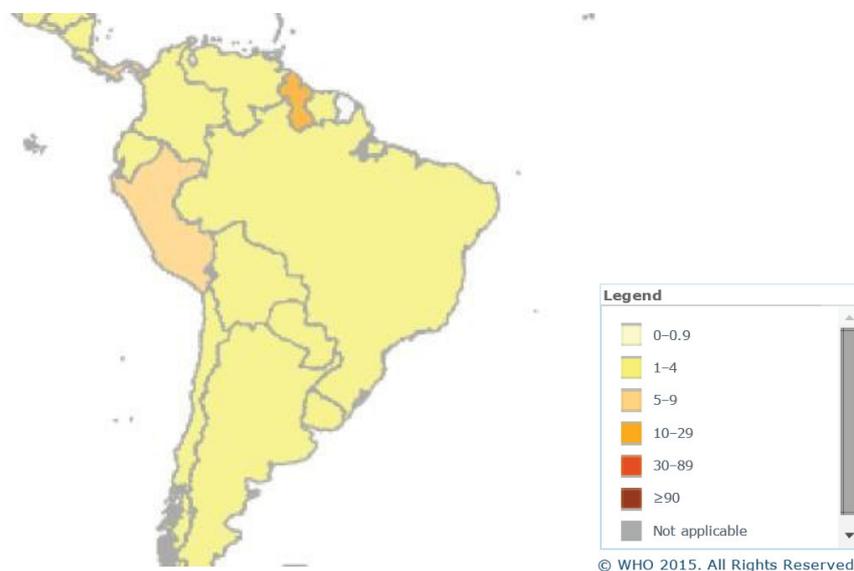


Figura 5. Mapa de Mortalidad por 100000 habitantes en Latinoamérica. Fuente: MINSA 2014

Según el MINSA, hasta el año 2014 se ha calculado que la incidencia de TB en el Perú es de 90.3 por cada 100000 habitantes, siendo los departamentos de Ica,

Lima, Loreto, Tacna, Ucayali y Madre de Dios los que presentan mayor carga (Figura 6).



Figura 6. Mapa de Incidencia de Tuberculosis en Perú en el año 2013. Fuente: MINSA 2014

La incidencia de TB no es homogénea, se ha observado que hay grandes diferencias en la carga de enfermedad por tuberculosis según la edad y género. En niños menores de 14 años, la incidencia de TB es similar en hombres y mujeres, mientras que en personas mayores de 14 años, se observa que hay mayor incidencia de TB en hombres que en mujeres, siendo el promedio de 21000 casos por 13000 casos, respectivamente (Figura 7).

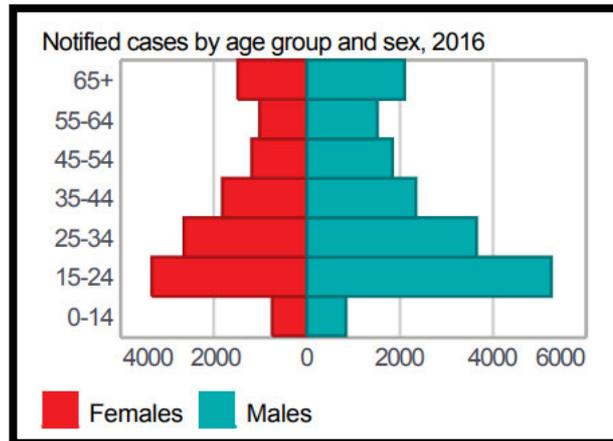


Figura 7. Mapa de Incidencia de Tuberculosis en Perú en el año 2016. Fuente: TB Country Profile. WHO 2016

La situación de la TB-MDR se mantiene en la actualidad como el principal problema para el tratamiento de esta enfermedad, y el Perú no ha sido la excepción. A partir del 2005 se ha detectado un incremento exponencial en la aparición de resistencia a fármacos, llegando a detectarse más de 1000 casos por año, a comparación de los 300 casos anuales que se presentaban antes del año 2000 (Figura 8). Asimismo, con respecto a la TB-XDR, el primer caso se detectó en el año 1999, y a partir de esa fecha se ha alcanzado más de 600 casos por año.

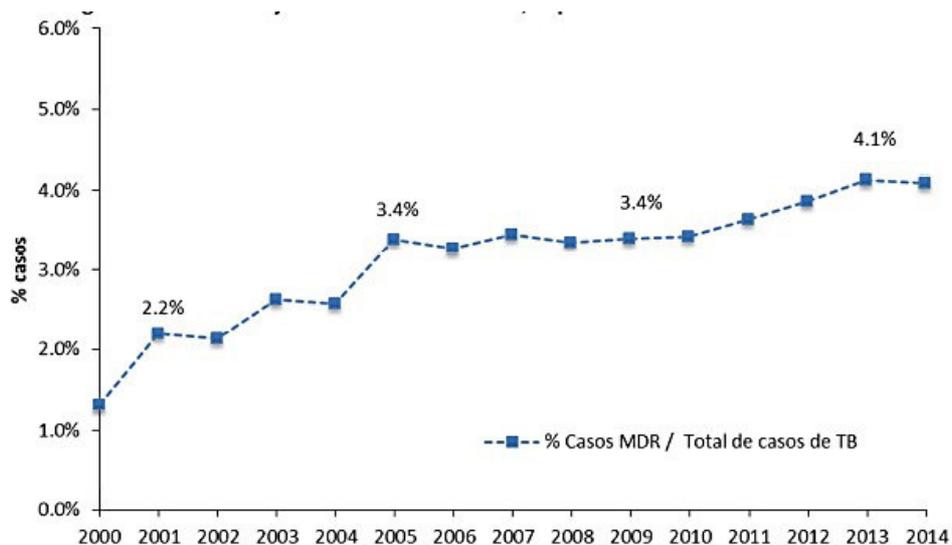


Figura 8. Porcentaje de casos de TB-MDR, reportados en el Perú entre el 2000-2014. Fuente: ESNPCT-DGSP/MINSA

2.1.4 Tratamiento

2.1.4.1 Drogas antituberculosas

Hasta la década de los 60's el tratamiento tenía una duración de entre 18-24 meses para su curación, sin embargo, gracias a la introducción de nuevos fármacos esta duración ha ido teniendo una reducción progresiva hasta los 6 meses, aunque el abandono y la sumisión han sido factores que prolongan la cura (Iseman 2002).

En la actualidad el tratamiento de esta enfermedad tiene una duración de 6-9 meses para lograr su cura cuando las cepas infecciosas son susceptibles. Los 10 fármacos utilizados comúnmente aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (CDC 2003), son los siguientes:

**Tabla 1. Fármacos antituberculosos usados actualmente en EE.UU.
Fuente: CDC, MMWR 2003.**

PRIMERA LÍNEA	SEGUNDA LÍNEA
Isoniazida	Cicloserina
Rifampicina	Etionamide
Etambutol	Levofloxacina*
Pirazinamida	Moxifloxacina*
Rifapentina	Gatifloxacina*
Rifabutin*	Ácido p-Aminosalicílico
	Estreptomina
	Kanamicina

*No aprobados por la FDA

Entre los medicamentos no aprobados por la FDA, las fluoroquinolonas se utilizan relativamente de forma común para tratar la tuberculosis en pacientes intolerantes

a algunos de los medicamentos de primera línea. La Rifabutina es útil para el tratamiento de Tuberculosis en pacientes que toman simultáneamente fármacos que presentan interacciones inaceptables con otras rifamicinas. Kanamicina, fármaco aminoglucósido se utiliza en el tratamiento de pacientes con tuberculosis causada por organismos resistentes a fármacos.

De los fármacos aprobados, isoniazida (INH), rifampina (RIF), Etambutol (EMB) y pirazinamida (PZA) se consideran antituberculosos de primera línea y constituyen el núcleo del Tratamiento. Rifabutina y Rifapentina también pueden ser considerados agentes de primera línea en situaciones específicas. La estreptomina (SM) se consideraba anteriormente un agente de primera línea y, en algunos casos, todavía se utiliza en el tratamiento inicial. Sin embargo, una prevalencia creciente de resistencia a SM en muchas partes del mundo ha disminuido su utilidad. Los medicamentos restantes se reservan para situaciones como la intolerancia a los medicamentos o la resistencia (CDC 2003).

2.1.4.2 Nuevas tecnologías

Además de los fármacos que se utilizan comúnmente, existen nuevas tecnologías que están abriendo nuevas puertas a un tratamiento eficaz de esta enfermedad. En los últimos años, se ha investigado el uso de nanotecnología para reemplazar la administración de fármacos en la forma libre por el uso de fármacos que están encapsulados con nanopartículas (Pandey y Khuller 2006), cuya eficacia de encapsulación puede llegar al 80% (Tabla 2).

Las nanopartículas están definidas como partículas coloidales de tamaño menor a 1 micrómetro (<1um). Para los fines terapéuticos, estas nanopartículas están

compuestas de materiales o polímeros biodegradables que pueden ser de origen *natural* o *sintético* y lípidos sólidos.

Los fármacos pueden incorporarse covalentemente a la superficie de la nanopartícula o pueden incorporarse en la matriz de la misma, estos transportadores están adaptados para permitir la liberación controlada, lenta y persistente de fármacos embebidos en su interior (Nasiruddin, Neyaz, y Das 2017).

Tabla 2: Eficacia Terapéutica de sistemas de liberación basados en Nanopartículas.
Fuente: Nasiruddin et al. 2017. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment.

Sistema de liberación	Uso de solventes orgánicos	Eficiencia de encapsulación de la droga	Modo de liberación	Modelo animal	Duración de liberación (days)	
					Plasma	Órgano
Sintético						
(i) PLG nanopartícula	Diclorometano	60–70%	Oral Aerosol Subcutáneo	Ratón Conejillo Ratón	6–8 6–8 32	9–11 9–11 36
(ii) Lectina funcionalizada PLG nanopartícula	Diclorometano	60–70%	Oral Aerosol	Conejillo Conejillo	6–14 6–14	15 15
Natural						
(i) Liposomas	Cloroformo, metanol	35–45% 8–12%	Intravenoso Aerosol	Conejillo Conejillo	5–7 2	7 5
(ii) nanopartícula a lípido sólido	Acetona, etanol	40–50%	Oral Aerosol	Ratón Conejillo	8 5	10 7
(iii) Nanopartícula de Alginato	No	70–80%	Oral Aerosol	Ratón/ conejillo	8–11 8–11	15 15

2.2 TUBERCULOSIS EN ANIMALES

La tuberculosis no solo afecta a humanos, sino también a animales. Muchas especies de ganado bovino, así como animales domésticos son susceptibles a la infección causada por la especie *Mycobacterium bovis*, la cual, también se ha reportado que puede infectar a humanos, aunque su frecuencia es de solo 2% (CDC 2011). Aunque *M. bovis* sólo representa este pequeño porcentaje de infección por TB en humanos, es un patógeno de gran importancia económica en animales salvajes y domésticos alrededor del mundo, especialmente en países donde hay poca información disponible (Thoen et al. 2009).

No existen datos fiables de la prevalencia de tuberculosis en animales debido a la falta de informes y vigilancia activa. Sin embargo, la tuberculosis bovina tiene una gran importancia que radica en sus efectos zoonóticos y económicos. En comparación con las principales enfermedades endémicas de animales en países en desarrollo, como la tripanosomiasis, las enfermedades transmitidas por garrapatas, la fiebre aftosa, la pleuropneumonia contagiosa bovina, la helmintosis, etc. El impacto económico general de la tuberculosis en la producción pecuaria es menos conocido y probablemente de baja prioridad para su control (Amanfu 2006).

El diagnóstico de infección por *Mycobacterium bovis* se basa principalmente en la prueba intradérmica de tuberculina comparativa, sin embargo, la sensibilidad y la especificidad son muy variables y limitadas, por lo que se confirma con cultivos, pero estos son de larga duración (van der Heijden et al. 2016). Es por ello que existen métodos alternativos como la PCR o ELISAs, aunque aún existen limitaciones en sensibilidad y especificidad (Ramos et al. 2015).

2.3 PIRAZINAMIDA

La pirazinamida (PZA) es una droga de primera línea para el tratamiento de todas las formas de tuberculosis. Se cree que el fármaco ejerce la mayor actividad contra el población de organismos latentes o semidormantes dentro de los macrófagos o en el entorno ácido de los focos caseosos o zonas necróticas (CDC 2003).

PZA es una amida derivada del ácido pirazina-2-carboxílico y análogo de la nicotinamida (Kolyva y Karakousis 2012). Fue descubierta en 1936 pero su propiedad antituberculosa no fue descubierta sino hasta 1952.

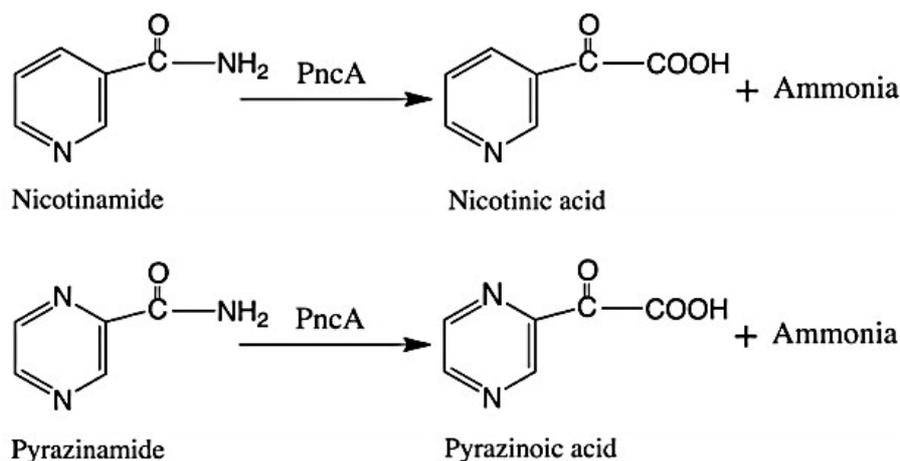


Figura 9. Conversión de Pirazinamida hacia Ácido pirazinoico por la enzima Pirazinamidasa (gen *pncA*). Fuente: Zhang et al. 2014

2.3.1 Mecanismo de acción

PZA es una prodroga cuya forma activa es el Ácido Pirazinoico (POA). El POA es el producto metabólico de la enzima Pirazinamidasa (PZasa), codificada por el gen *PncA* (Figura 9), que actúa sobre su sustrato PZA (Zhang et al. 2014). PZasa es una enzima monómera de 20,89 kDa que requiere los iones Fe^{2+} Mn^{2+} como cofactores en el sitio de coordinación de la His71, His51 y Asp49 (Zhang et al. 2008). Sin embargo, se ha encontrado en su estructura cristal, que tiene preferencia

por el Hierro (Fe^{+2}), así como una conformación en bucle donde se encuentra el residuo His57 que está directamente involucrado en la coordinación del ion Fe^{2+} (Petrella et al. 2011).

Se ha descrito que el ciclo de acción de PZA es ingresar al interior de los bacilos por difusión pasiva, convertirse en POA, y luego es expulsado a través de mecanismos de bombas de eflujo hacia el exterior de la célula. Una vez que POA está fuera de la célula, si el pH extracelular es menor a 6, una proporción de POA es protonado (HPOA) y fácilmente ingresa a través de la membrana. El HPOA transporta protones hacia el interior de la bacteria, y esto puede causar la acidificación del citoplasma inhibiendo enzimas vitales, colapsando el potencial de membrana e inhibiendo la síntesis de proteínas y ARN (Zhang et al. 2014).

En el año 2011, fue identificado un nuevo mecanismo, por el cual PZA estaría actuando y en el que la proteína RpsA sería un nuevo target de POA, produciendo en la micobacteria la inhibición de RpsA y por consiguiente la interrupción de un proceso muy importante para su supervivencia, el proceso de Trans-Traducción (Kalinda y Aldrich 2012).

2.3.2 Mecanismos de resistencia

Siendo la PZA una de las drogas pilares del tratamiento anti-tuberculosis, los mecanismos que podrían causar resistencia a su efecto, son blanco importante de estudios y de diagnóstico. Hasta la actualidad, las mutaciones en el gen *pncA* permanecen siendo la principal causa de resistencia a PZA en *M. tuberculosis* (Cheng et al. 2000). Se ha encontrado que la mayoría de mutaciones ocurren en una región a 561pb del Marco abierto de lectura (ORF) o a 82 pb de su promotor putativo (Silva y Palomino 2011). Entre las mutaciones que han causado mayor

repercusión sobre la actividad enzimática de la PZasa, se encuentran H51R, D49N, que involucran el sitio de unión al cofactor (Fe^{+2} y Zn^{+2}) o T135P, D12A, D12G y F94L, que involucran al sitio activo (Sheen et al. 2009).

Otro mecanismo de resistencia, que ha cobrado importancia recientemente, es el relacionado al déficit de flujo de POA a través de bombas de eflujo, hacia el medio extracelular. La eficiencia de las bombas de eflujo, concentración de PZA en el medio y actividad enzimática de PZasa, son los principales factores que modulan la velocidad de eflujo de POA. Zimic et al. (2012) encontraron que existe una fuerte correlación entre las cepas resistentes a PZA y el eflujo de POA en un rango de 0-5 ng de POA/minuto, mientras que las cepas susceptibles presentaban eflujo de POA en un rango entre 5-15 ng de POA/minuto. Por lo tanto el déficit de eflujo de POA hacia el exterior sería un mecanismo importante en la resistencia a PZA.

2.4 ÁCIDO PIRAZINOICO

El ácido Pirazinoico es la forma activa de la Pirazinamida. Este ácido, es un ácido débil, cuyo pKa es de 2.9 y su acción inhibitoria es ejercida óptimamente a pHs bajos, por ejemplo a pH 6, su Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) es 3.2 veces mayor que a pH 5.5 (Zhang y Mitchison 2003).

Originalmente, la acción del POA en *Mycobacterium tuberculosis*, se ha atribuido a la translocación de protones desde el medio extracelular acidificado hacia el interior de la micobacteria mediado por el POA protonado, lo cual acidifica el citoplasma de manera letal (Wade y Zhang 2004).

Pero, el conocimiento de su mecanismo de acción ha ido incrementando en los últimos años. Se ha reportado, que el POA promueve la disminución del potencial de membrana en la micobacteria e inhibe su función de transporte de membrana

(Zhang et al. 2003). Otros estudios mencionan que el POA podría inhibir la acción de la ácido graso sintetasa, pues se observa una disminución de ácido palmítico (Zimhony et al. 2007). Más recientemente, se demostró que el POA disminuye la fuerza motriz del protón y la síntesis de ATP en la cadena respiratoria (Lu et al. 2011) y que estaría implicado en la inhibición de un proceso muy importante, la Trans-traducción.

2.5 PROCESO DE TRANS-TRADUCCIÓN

La trans-traducción es un proceso clave en la supervivencia bacteriana, que se lleva a cabo en crecimiento activo pero es vital en condiciones de estrés (Moore y Sauer 2007). Este proceso es realizado por las células bacterianas para rescatar a aquellos ribosomas que se estancaron durante la traducción debido a mRNA dañado, etiquetando a las proteínas disfuncionales para su degradación, deshacerse del mRNA y así liberar al ribosoma para un nuevo ciclo (Personne y Parish 2014; Shpanchenko et al. 2010).

2.5.1 ARN Trans-mensajero

El ARN trans-mensajero (tmRNA), es un ARN de naturaleza dual, ya que funciona como ARN mensajero y ARN de transferencia, que es codificado por el gen *ssrA* (Nezhad et al. 2015), que se encarga de realizar la vigilancia y el rescate de los ribosomas estancados. La molécula de tmRNA tiene de 260 a 430 nucleótidos de longitud, dependiendo de las especies bacterianas y contiene tanto un dominio similar a tRNA (TLD) que puede cargarse con alanina en su extremo 3' CCA y un tramo interno de ARN que contiene un marco abierto de lectura corto (ORF) (Valle et al. 2003), como se observa en la figura 10.

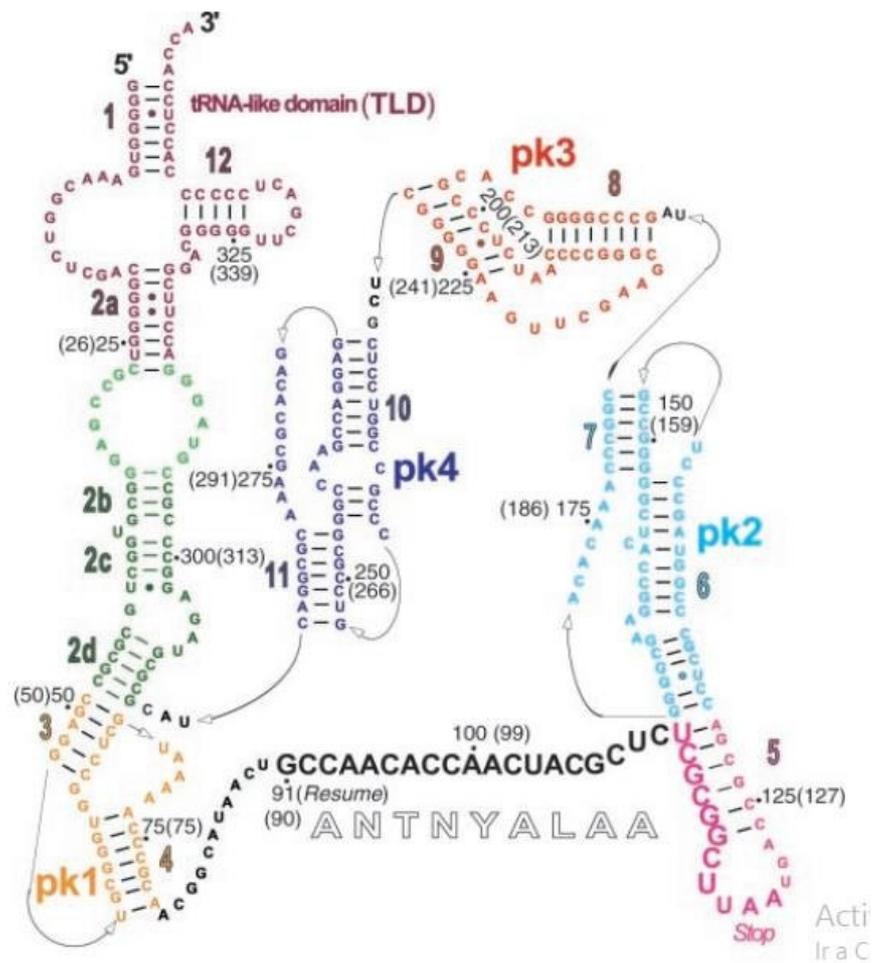


Figura 10. Estructura de un tmRNA (*Thermus thermophilus*). Fuente: Valle et al. 2003. Visualizing tmRNA Entry into a Stalled Ribosome.

El mecanismo por el cual el tmRNA actúa en el control de calidad de la síntesis proteica (Figura 11) consiste en que un tmRNA ingresa al sitio A de un ribosoma estancado, acepta el polipéptido naciente y codifica un péptido señal y de fin de la traducción (codón stop) que será añadida al péptido como un marcador de degradación en el extremo C-terminal (Nezhad et al. 2015).

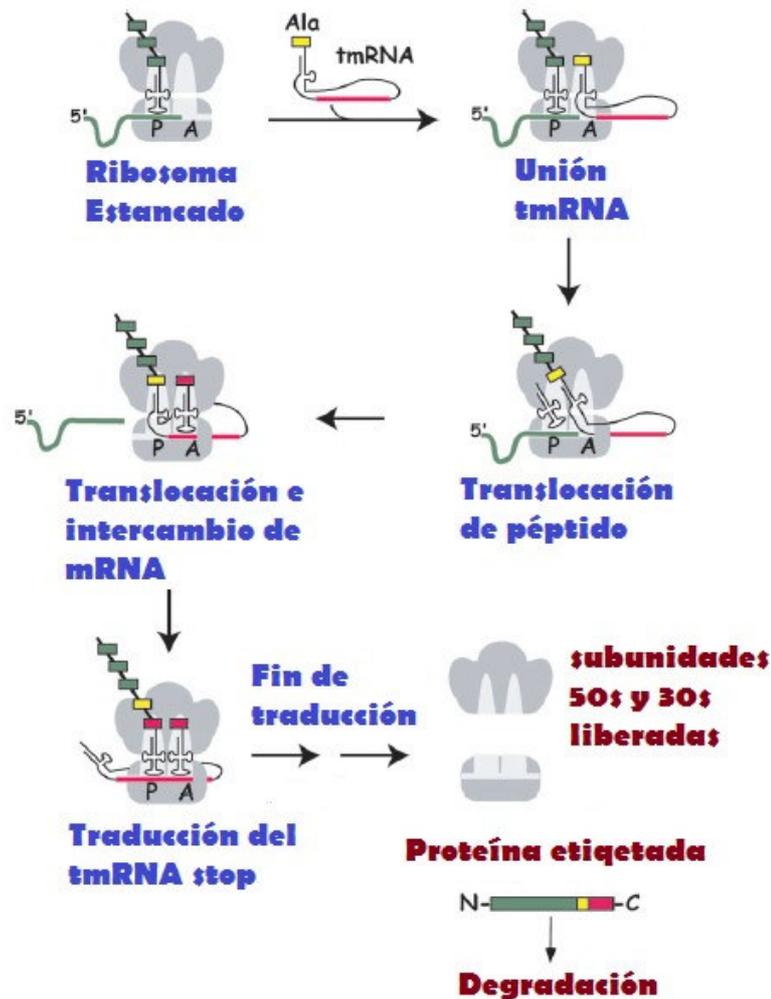


Figura 11. Mecanismo de Trans-Traducción. Moore y Sauer. 2007. *The tmRNA System for Translational Surveillance and Ribosome Rescue*.

2.5.2 Proteína Ribosomal S1 de *Mycobacterium tuberculosis*

La proteína ribosomal S1 (RpsA) es la proteína 30S más grande del ribosoma y juega un papel importante en la traducción y la trans-traducción al permitir la unión de RNA mensajero y tmRNA a su dominio conservado.

El proceso de trans-traducción llevado a cabo por el tmRNA es un proceso complejo que requiere la acción de varios componentes, formando un sistema de proteínas y una molécula de ARN. Mediante un estudio de Microscopía Crioelectrónica, se pudo establecer que este sistema está formado por el complejo: •tmRNA•EF-Tu•GDP•SmpB• (EF-Tu: factor de elongación Tu), en donde la proteína SmpB

(Small Protein B) cumple un importante rol al ser indispensable para el sistema de marcado de péptidos (alanilación del tmRNA) y la unión del mRNA al sitio A (Valle et al. 2003).

Se analizó la interacción del dominio C-terminal de RpsA (RpsA^{CTD}) con tres fragmentos de ARN poli (A), sMLD y pre-sMLD. El análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) reveló que los sitios de unión de ARN a RpsA^{CTD} se localizan principalmente en las cadenas β 2, β 3 y β 5 y el bucle L3 adyacente del dominio S1. Los experimentos de fluorescencia determinaron que la unión de RpsA a ARNs está en el intervalo de afinidad micromolar (Fan et al. 2017).

Se ha demostrado que la proteína RpsA facilita la trans-traducción de una manera diferente a las funciones de una proteína ribosomal cualquiera durante la traducción canónica. Esta proteína S1 permanece interaccionando con tmRNA mientras este transita en el ribosoma, a través de grandes regiones del tmRNA, incluyendo la MLR y pseudoknots pk2 y pk3 (Wower et al. 2012).

2.5.3 RpsA y Ácido Pirazinoico

En *Mycobacterium tuberculosis*, el extremo Carboxilo terminal (C-terminal) de RpsA se conoce como el target de Pirazinamida y específicamente del ácido pirazinoico. POA se une a RpsA e inhibe la interacción entre RpsA y tmRNA durante la trans-traducción. Un análisis estructural reveló que el POA se une a RpsA a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, mediadas principalmente por los residuos Lys303, Phe307, Phe310 y Arg357 que son esenciales para la unión de tmRNA. Si existiesen cambios conformacionales inducidos por una mutación o variación de secuencia en el C-terminal de RpsA, se impediría la unión del POA y ello podría generar resistencia a PZA (Yang et al. 2015).

2.6 INMUNOENSAYOS CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son aquellas partículas o materiales que muestran alguna respuesta a un campo magnético aplicado con al menos una dimensión entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm) y normalmente contienen de varios cientos a 10^5 átomos (Issa et al. 2013). En los últimos años, investigadores han fabricado nanoestructuras multifuncionales basadas en NPM (Figura 12), lográndose establecer básicamente dos tipos de aplicaciones, aquellas basadas en (i) la funcionalización molecular, que implica la unión de las nanopartículas magnéticas a anticuerpos, proteínas y tintes, entre otras, y las basadas en (ii) la integración de MNPs con otras nanopartículas funcionales, tales como puntos cuánticos (Quantum Dots) o Nanopartículas metálicas (Bedanta et al. 2013).

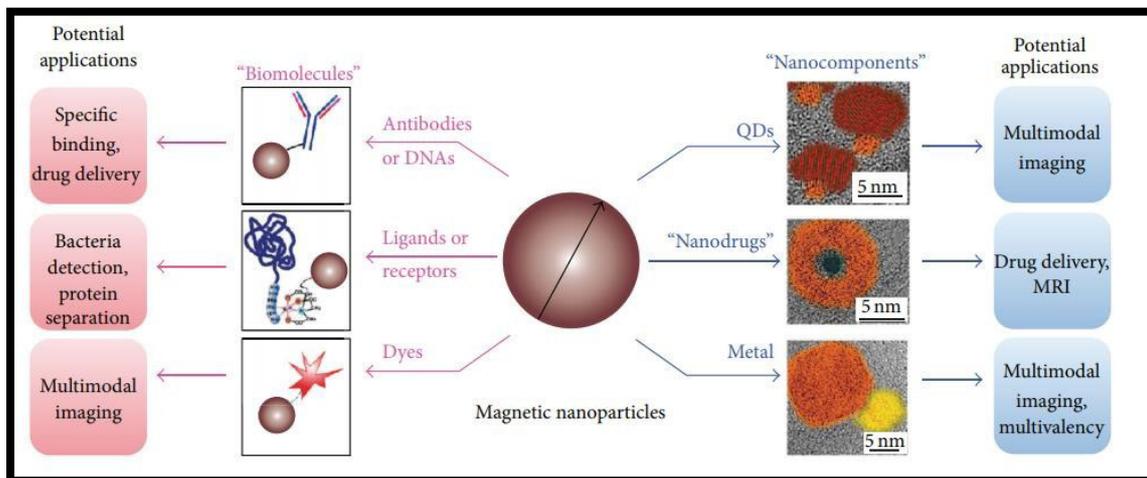


Figura 12. Aplicaciones potenciales de nanopartículas magnéticas multifuncionales en biología. Fuente: Bedanta et al. 2013 Magnetic Nanoparticles: A Subject for Both Fundamental Research and Applications

Dentro de las aplicaciones en funcionalización molecular, tenemos a aquellas que son utilizadas en inmunoensayos. Un inmunoensayo es una prueba bioquímica que cuantifica la concentración de una molécula en una solución mediante el uso de un

anticuerpo que detecta una molécula llamada "analito" (Cox et al. 2004). Varios inmunoensayos se utilizan acoplados a nanopartículas magnéticas, utilizando anticuerpos ligados a la superficie de la NPM, lo cual permite una mayor superficie de contacto entre los anticuerpos y el analito, lográndose hasta un límite de detección de 400-500 femtomol/L (Ranzoni et al. 2012), además tienen una gran ventaja debido a sus características de permanecer en suspensión en una solución y luego ser redireccionada hacia un punto, mediante un campo magnético, favoreciendo una alta especificidad y sensibilidad (Yang et al. 2014).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar dos inmunoensayos para la detección de ácido pirazinoico como biomarcador de resistencia a Pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* empleando nanopartículas magnéticas, tmRNA y RpsA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la mínima cantidad de Ácido pirazinoico (POA) comercial empleando la competencia entre POA y tmRNA por la proteína RpsA en un inmunoensayo tipo ELISA con nanopartículas magnéticas de estreptavidina.
2. Cuantificar la mínima cantidad de POA comercial empleando la competencia entre POA y tmRNA por la proteína RpsA en un inmunoensayo tipo ELISA con nanopartículas magnéticas de cobalto.

HIPOTESIS

El uso de nanopartículas magnéticas acopladas a moléculas especializadas como RpsA y tmRNA permitirá diseñar dos ensayos que detecten ácido pirazinoico (POA).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 Conejos

Los anticuerpos policlonales anti-RpsA se obtuvieron a partir de dos conejos de la raza Nueva Zelanda, hembras de entre 3 y 3.5 kg de peso.

4.1.2 Células Competentes BL21 (DE3): (Novagen, USA)

Para la expresión de la proteína RpsA, se usó el sistema bacteriano de *Escherichia coli* BL21. Estas son células de *E. coli* químicamente competentes adecuadas para la transformación y expresión de proteínas. Esta cepa expresa la ARN polimerasa T7. Tienen una capacidad de transformación de: $1-5 \times 10^7$ UFC/ μ g de ADN de pUC19

4.1.3 Plásmido pET28a

Para la producción de RpsA recombinante se usó el plásmido pET28a de 5369pb que contenía el inserto del gen RpsA con una cola de Histidinas (HisTag) en el amino terminal y con un promotor T7 en el extremo carboxilo; los sitios de restricción usados fueron BamH I y XHO I. Estos plásmidos fueron clonados previamente y están almacenados a -70 °C. en una biblioteca de plásmidos.

El sistema pET es un sistema muy potente para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes diana se clonan y se expresan bajo el control de la transcripción del bacteriófago T7.

Los vectores pET-28a-c (+) llevan una configuración His-Tag N-terminal/trombina/T7 • Tag más una secuencia Tag His-terminal opcional C-terminal.

4.1.4 Enzimas de restricción

Se utilizaron dos enzimas de restricción: BamH I y Xho I de BioLabs Inc. CutSmart de alta fidelidad. La enzima BamH I tiene la secuencia target GGATCC y Xho I detecta CTCGAG.

4.2 MATERIALES Y EQUIPOS

- Agitador magnético
- Rotor
- Incubadora con agitación (Incubator Shaker Series 25-Scientific Co.)
- Balanza analítica
- Baño maría
- Placas 96 pocillos
- Cámara de electroforesis horizontal
- Cámara de electroforesis vertical
- Cámara de flujo laminar
- Transiluminador
- Microcentrifugas
- Ultracentrifugas
- Parafilm
- Congelador -20
- Congelador -70
- Jeringas 5ml
- Trompos de filtración de 0.45µm
- Pinzas, tijeras, espátulas
- Espectrofotómetro (Genesys 10S UV-vis de ThermoFisher Scientific)
- Autoclave
- Juego de Micropipetas (10-1000 µL)
- Tips para Micropipetas
- Magneto
- Pipetas serológicas 5mL
- Tubos PCR (100 µL)
- Tubos Eppendorf 1.5mL

- Placas Petri 100x15mm
- Potenciómetro
- Probetas de 10, 100 y 500mL
- Frascos tapa rosca, 50, 250, 500 y 1000mL
- Beakers 50, 250, 500mL
- Termómetro
- Refrigerador de 4°C
- Tubos Falcon de 15 y 50mL
- Matraces de 100 y 500mL
- Incubador para cultivo
- Guantes de Látex y Nitrilo talla S
- Gradillas para tubos
- Racks para tubos de 1.5mL
- Racks para tubos PCR
- Termociclador
- Purificador por Cromatografía a baja presión (BioRad BioLogic LP)
- Agitador para placas
- Lector de Microplacas

4.3 REACTIVOS

- Reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 450 ml)
- Medio LB caldo. BD Difco 500g (Invitrogen, USA)
- Kanamicina (Sigma Aldrich)
- Cloruro de Calcio (Sigma, USA)
- Glicerol (Sigma, USA)
- Trizma
- EDTA
- Ribonucleasa A
- Hidróxido de Sodio
- Sodium Dodecil Sulfato (SDS)
- Fenol:Cloroformo:Alcohol isomílico (25:24:1)

- Acetato de Sodio
- Ácido acético
- Agua Ultra pura Milli Q.
- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de Sigma-Aldrich
- Etanol
- Fosfato de sodio
- Fosfato de Potasio
- Kit Biotinylation 3'End (Thermo Fisher)
- Kit TrancryptAid High Yield (Thermo Fisher)
- GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher)

4.4 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S1 (RpsA)

4.4.1 Preparación de células competentes BL21 (DE3)

Para realizar la expresión de una proteína es necesario preparar el sistema bacteriano para su transformación con el plásmido de interés; esto es, hacerlas competentes. Para este trabajo se usó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*.

Una colonia de esta cepa, fue sembrada en una placa con LB (Luria Bertani)-agar sin antibiótico y paralelamente, otra colonia, en una placa con kanamicina (40 µg/mL) para asegurar la ausencia de algún plásmido que confiera resistencia.

Una vez crecida las colonias, una de ellas fue transferida a 2 mL de medio LB, e incubada a 37 °C con agitación durante toda la noche (16 h). Un mililitro (1 mL) del cultivo fue inoculado en 50 mL de medio LB sin antibiótico y mantenido en incubación a 37 °C con agitación hasta que su densidad óptica esté entre 0.35 y 0.45 a 600 nm. El contenido se transfirió a un tubo nuevo, se incubó en hielo durante 10 minutos y fue centrifugado a 6000rpm y a 4 °C por 10 minutos. Sobre el pellet recuperado se agregan 20 mL de CaCl₂ 0.1 M; la mezcla homogenizada fue incubada en hielo por 15 minutos y nuevamente centrifugada a 6000rpm y a 4°C durante 10 minutos. El pellet se resuspendió y homogenizó con 1 mL de CaCl₂ 0.1 M y glicerol frío 15%. Las células competentes se alicuotaron en fracciones de 50 µL y se almacenaron a -70 °C.

4.4.2 Verificación de plásmidos pET28a con el inserto RpsA

Antes de realizar la transformación de las células BL21 con el plásmido, se realizó una verificación para ver el estado e integridad del mismo. Para ello, se sembró un inóculo de células que almacenaban el plásmido, en un tubo con 5 mL de medio líquido LB con kanamicina (10 µg/mL), asimismo, en otro tubo se agregó 5 mL del

mismo medio pero sin células como control de contaminación. Se incubó a 37 °C *overnight*. Al día siguiente se centrifugó el cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL a 13000rpm por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. El pellet con las células se sometió a Lisis Alcalina para extraer los plásmidos. A continuación, el pellet es resuspendido con 150 µL de Solución de Lisis I fría (25 Mm Tris-HCl y 10 Mm EDTA pH 8.0) con RNasa A (100 µg/mL), seguidamente, se agregó 300 µL de Solución de Lisis II (0.2N NaOH 1%SDS) y se mezcló por inversión hasta homogenizar y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Terminada la incubación se agregó 225 µL de Solución de Lisis III fría (5 M de Acetato de Sodio, Ácido acético) y se incubó en hielo por 5 minutos. Luego se centrifugó por 5 minutos a 13000rpm, el sobrenadante se trasladó a otro tubo y el precipitado se descartó. Al sobrenadante se le añadió Fenol:Cloroformo:Alcohol isomílico (25:24:1) en un volumen similar al del sobrenadante y se mezcló por inversión, se centrifugó nuevamente a 12000rpm por 2 minutos. Se formó dos fases de las cuales se rescató la fase acuosa menos densa y se trasladó a un nuevo tubo, a este nuevo tubo se agregó Coloformo:Alcohol isomílico (24:1) en un volumen igual, se mezcló y centrifugó y se volvió a retirar la fase acuosa en otro tubo. Este sobrendante contiene el DNA plasmídico por lo que se le agregó Etanol absoluto para precipitar el DNA, luego de una incubación de 10 minutos a -20 °C, se centrifugó a 13000rpm por 5 minutos. El pellet obtenido es el Plásmido, se lava con etanol al 70% y se vuelve a centrifugar, por último, el pellet obtenido se resuspendió en 50 µL buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5).

Con los plásmidos extraídos se procedió a realizar digestión enzimática con las enzimas de Restricción BamH I y Xho I, tabla 3:

Tabla 3. Componente de la reacción de digestión por Enzimas de Restricción

Componente	Volumen (μL)
BamH I	1
Xho I	1
DNA (1 μg)	10
10X Buffer NE	5
H2O nuclease free	33
Total	50
Se incubó la reacción por 2 horas 37 °C	

Para verificar la condición del plásmido y del inserto se corrió una Electroforesis en gel de Agarosa al 1%. Las muestras se prepararon agregando 2 μL de un buffer de carga (6X) a 10 μL de la digestión enzimática para obtener 12 μL de muestra y se cargó 6 μL por cada pozo.

4.4.3 Transformación de células competentes BL21 (DE3)

Tres tubos con células competentes fueron descongelados durante 10 minutos en hielo y se les agregó entre 40 a 100 ng de plásmido pET28a con el inserto RpsA previamente verificado. Para tener un control de calidad del proceso, un control de transformación negativo y positivo fueron incluidos. El negativo tuvo 2 μL de agua Milli-Q y el positivo 2 μL (50 ng/mL) de pET28a sin inserto. Las células fueron incubadas en hielo durante 30 minutos, luego a 42 °C durante 50 segundos y nuevamente en hielo por 2 minutos (transformación por choque térmico). 500 μL de medio LB estéril se añadieron a las células, y se incubaron por 1 hora a 37 °C con agitación fuerte. Alícuotas de 50 μL se sembraron en placas LB-agar con kanamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fueron incubadas toda la noche a 37 °C.

4.4.4 Expresión y extracción de la proteína RpsA

Las células *E. coli* BL21 (DE3) ya transformadas con el vector pET28a en placas de agar LB se cultivaron en 50 mL de caldo LB con kanamicina y se incubó *overnight*. Al día siguiente, 20 mL del cultivo se añadieron a 500 mL de caldo LB (cultivo a mayor escala) y se incubó a 37 °C en agitación hasta llegar al O.D 0.6-0.7 (600 nm). De este cultivo se tomó una alícuota (A1) y se almacenó a 4°C. Seguidamente se agregó Isopropyl β -D-thiogalactósido (IPTG) en una concentración final de 0.5 mM y se incubó por 2 horas a 37 °C. Terminada la inducción se tomó una segunda alícuota (A2) y se almacenó también a 4 °C. Las células fueron precipitadas por centrifugación a 6000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 10 mL de Binding buffer (Imidazol 20 mM, NaCl 0.5 M y Buffer Fosfato 20 mM pH 7.4).

Para la extracción de la proteína soluble, las células fueron lisadas mediante ciclos repetidos de choque térmico seguido de un proceso de sonicación usando un Sonicador S3000 (Misonix, Farmingdale, NY). Seguidamente el sonicado se centrifugó a 12500 rpm por 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se almacenó hasta su purificación y se toma una tercera alícuota (A3). El pellet se resuspendió en el mismo buffer y se guardó una cuarta alícuota (A4) antes de ser descartado.

Con las cuatro alícuotas separadas, se realizó una Electroforesis denaturante en Poliacrilamida al 12%.

4.4.5 Purificación convencional de RpsA

Inicialmente, para la purificación se utilizó un protocolo estándar en el que el sobrenadante obtenido de la sonicación es cargado en una columna de

Cromatografía de afinidad por metales (IMAC Níquel) a Histidinas con capacidad de 5 mL (Pharmacia, Piscataway, NJ), luego se realiza un proceso de lavados con buffer fosfato pH 7.4 con 20 mM, 40 mM y 60 mM de Imidazol. Las proteínas unidas a la columna son eluidas con un buffer fosfato pH 7.4 de 300 mM de Imidazol. Las alícuotas de las fracciones obtenidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12 % (SDS-PAGE). Los tubos con las fracciones que contienen la proteína RpsA fueron mezcladas. La proteína purificada fue lavada y concentrada por sistema de ultrafiltración (Amicon Ultracel Millipore, Billerica, MA), el lavado fue realizado con los mismos buffers de purificación en orden descendente de concentración de Imidazol hasta llegar a 20 mM del mismo. La concentración se realizó con Buffer Fosfato salino 1X (20mM Na₂HPO₄, 500mM NaCl), para lo cual se utilizó una membrana de celulosa con un tamaño de poro de 10 KDa en el sistema de ultrafiltración a 4°C.

4.4.6 Purificaciones Modificadas para la proteína RpsA

A. Purificación denaturante con úrea

Debido a problemas de contaminación que se encuentran detallados en la sección de resultados, se optó por realizar otras metodologías para limpiar la proteína.

La primera opción fue realizar una denaturación de la proteína durante la sonicación. Para ello, el pellet de células, producto de la expresión, se resuspendió en un Buffer de denaturación (Urea 8 M, Fosfato de sodio 50 mM, Cloruro de sodio 500 mM, DTT 1 mM, Imidazol 25 mM, pH 7.4). Esta suspensión se llevó a sonicación con los mismos ciclos descritos en la metodología anterior. Luego el lisado fue centrifugado dos veces a 1200 rpm por 20 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido se filtró con un filtro de 0.45 µm de diámetro

de poro y este lisado denaturado se purificó por Cromatografía de afinidad por metales (IMAC Níquel), utilizando lavados en gradiente descendente con Buffers Denaturantes a concentraciones de 6 M, 4 M, 2 M y 1 M de úrea, hasta llegar a 0 M de úrea, para permitir la renaturación de la proteína. Para eluir la proteína ya renaturada, se utilizó un Buffer de Elución: 50mM de fosfato de sodio, 500 mM de NaCl, 1 mM DTT y 500 mM de Imidazol.

B. Purificación con predigestión con Ribonucleasas

La segunda metodología para limpiar la proteína fue utilizando Ribonucleasa. Para ello, el pellet de células fue resuspendido en el buffer binding usado en la purificación convencional (Imidazol 20 mM, NaCl 0.5 M y Buffer Fosfato 20 mM pH 7.4), seguidamente se procedió a realizar el shock térmico y la sonicación. Una vez sonificado, se centrifugó dos veces a 1200 rpm por 20 minutos para retirar los restos celulares. Este extracto proteico se filtró también con el sistema de 45nm de poro y se agregó RNAasa A a una concentración final de 100 µg/mL y se dejó incubando a 4 °C *overnight*. Al día siguiente, el extracto fue purificado con el mismo sistema IMAC Níquel con lavados con buffer fosfato pH 7.4 con 20 mM, 40 mM y 60 mM de Imidazol y luego eluidas con 300 mM de Imidazol.

4.4.7 Cuantificación de la proteína RpsA

Para calcular la concentración de la proteína se utilizó el método de Bradford (Bio-Rad U.S), este es un método colorimétrico que utiliza el Azul de coomassie brillante G250 en solución ácida, el cual presenta dos formas: azul y naranja. La proteína se une a la forma azul, siendo los aminoácidos con residuos básicos y aromáticos los más afines, en especial la Arginina. Este método es muy sensible y puede llegar a

cuantificar entre 1-500 $\mu\text{g/mL}$, su absorbancia máxima se da a 595 nm cuando se ha unido a la proteína.

Para cuantificar la proteína obtenida por purificación, se realizó una curva de calibración, utilizando como proteína estándar a la Albúmina de suero bovino (BSA) cuya concentración en el stock fue 10 mg/mL. La curva estándar de BSA se realizó con las concentraciones según la tabla 4 y por triplicado.

Tabla 4. Concentraciones de BSA utilizadas en la cuantificación de proteína.

BSA ($\mu\text{g/mL}$)
5
10
20
40
80
100

La muestra proteica se diluyó 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, de cada una de las diluciones se colocó 20 μL en pozos de una placa de 96 pocillos, luego se añadió 200 μL del colorante Bradford (previamente diluido 1:5), se dejó incubando por 5 minutos y llevó al lector de placas para su lectura a 595 nm.

4.5 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-RPSA

Los anticuerpos policlonales anti-RpsA fueron obtenidos a través de la inmunización de conejos con la proteína recombinante RpsA. Los anticuerpos fueron utilizados para la detección directa de RpsA. En este caso, la ausencia de

reacción en el ELISA contra el complejo NPM-tmRNA/RpsA nos permitirá estimar el nivel de POA presente. Una reacción ELISA intensa indicará que las moléculas de NPM:tmRNA están acopladas a RpsA, es decir que había poca cantidad de POA presente, lo cual sería evidencia de resistencia a PZA.

4.5.1 Inmunización

Los anticuerpos policlonales anti-RpsA fueron obtenidos a partir de dos conejos de la raza Nueva Zelanda, hembras de entre 3 y 3.5 kg de peso. Para la inmunización se utilizó 2 mg de la proteína RpsA purificada. Esta dosis fue administrada vía subcutánea con el fin de producir anticuerpos anti-RpsA. En la primera inmunización se utilizó el adyuvante completo de Freund, luego, dos refuerzos fueron realizados a los 15 y 30 días después de la primera inmunización empleando el adyuvante incompleto de Freund. El antígeno RpsA fue mezclado con los adyuvantes respectivos en una proporción 50:50. Los conejos permanecieron en una instalación confortable con agua y comida *ad libitum* hasta 60 días después de la inmunización. Se llevó un registro de los animales y fueron observados diariamente para reconocer dolor y/o estrés. Las muestras de sangre se recolectaron el día pre inmunización y luego los días 7, 15, 45 y 60 días post inmunización; estas muestras se obtuvieron a partir de la vena auricular con el sistema vacutainer y fueron mantenidas a 4 °C hasta que fueron centrifugadas a 600g x 15 minutos, luego almacenadas a -20 °C.

4.6 PRODUCCIÓN DE tmRNA

4.6.1 Extracción de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Para la extracción de DNA se utilizó el método con Proteinasa K (PK) y CTAB, A continuación, se tomó una asada completa del cultivo en placa con medio 7H10 agar y se traspasó a un tubo de 1.5 mL conteniendo 500 µL de buffer Tris-EDTA y se inactivó por 20 minutos a 80 °C, seguidamente, se agregó 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubó a 37 °C en agitación *overnight* (16h).

Luego, para la digestión se agregó 75 µL de SDS 10%, 20 µL de PK y se incubó a 65 °C por 3 horas vortexeando cada 20 minutos. Se retiró y añadió 100 µL de NaCl y 100 µL de CTAB/NaCl calentado a 65 °C, y luego se incubó 10 min a 65 °C.

Para la extracción se añadió 750 µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico, y luego se centrifugó por 5 minutos a 10,000rpm. El sobrenadante se trasladó a otro tubo. Para lavar se agregó 750 µL de Cloroformo:Alcohol isoamílico y se volvió a centrifugar 5 minutos a 10000rpm. El nuevo sobrenadante se trasladó a otro tubo y se agregó 1 mL de etanol absoluto frío, finalmente se observó un precipitado (DNA). Seguidamente, se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto. Se lavó el precipitado con etanol al 70%, y se volvió a centrifugar. Por último se resuspendió el pellet en 100 µL de Buffer TE.

4.6.2 Amplificación del gen *ssrA*

Para la amplificación se realizó la Reacción en cadena de la Polimerasa de gen *ssrA* (620 pb), para lo cual se utilizaron los primers descritos por Shi et al. (2011), los cuales deben contener en un extremo el promotor T7 (Rojo) de la ARN

polimerasa T7, lo cual permitirá el reconocimiento de la ARN polimerasa durante la transcripción posterior.

- Forward:

5' TAATACGACTCACTATAGGATCTGACCGGGAAGTTAATGGC 3'

- Reverse:

5' GATCAGATCCGGACGATCGGCATCG 3'

Se usó un Master PCR Mix con una DNA polimerasa Hot Start (Tabla 5), y las condiciones de ciclos térmicos fueron estandarizados en el proceso, siguiendo un protocolo de tres pasos, donde la denaturación y annealing se llevaron a cabo a diferente temperatura (Tabla 6).

Tabla 5. Componentes de la PCR convencional realizada para amplificar el gen *ssrA*

Reactivos	Concentración	Volumen
Agua libre de Nucleasas		35
High-Fidelity PCR Master Mix		50
Primer T7 Fw	10 μ M	5
Primer Rv	10 μ M	5
DNA genómico	20 ng/ μ L	5

Tabla 6. Condiciones del ciclaje en la PCR convencional

	Ciclos	Tiempo (seg)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Denaturación inicial	1	10	98
Denaturación	30	1	98
Annealing	30	5	70
Extensión	30	15	72
		60	72
Extensión final	1	Hold	4

Una vez obtenido los amplicones, fueron corridos en un gel de agarosa al 1% a 75V durante 90 minutos, y luego teñidos con bromuro de etidio.

4.6.3 Transcripción *in vitro* del gen *ssrA*

El tmRNA fue sintetizado mediante transcripción *in vitro* a partir del amplicón *ssrA*, generado previamente. Para ello se utilizó el TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante. Los componentes (Tabla 7) de la reacción fueron incubados a 37 °C durante 2 horas. Para verificar que los tmRNA se sintetizaron correctamente, se corrieron los productos en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE a 75V durante 80 minutos.

Tabla 7. Componentes en la reacción de transcripción *in vitro* del tmRNA

Componente	Cantidad
Agua DEPC	1 µL
Nucleótidos (Mix ATPs, CTPs, TTPs, UTPs)	8 µL
Buffer de transcripción 5 X	4 µL
DNA molde	5 µL = 1 µg
RNApol T7	2 µL
Volumen total	20 µL

Seguidamente, un lote del tmRNA producido fue biotinilado en su extremo 3' con un Kit de Biotinilación (Pierce Magnetic RNA-protein pull down Kit). Este lote de tmRNA biotinilado fue usado para el ensamblaje con nanopartículas magnéticas (NPM) que están revestidas con estreptavidina en su superficie. El lote de tmRNA que no fue biotinilado, fue usado en el segundo inmunoensayo tipo ELISA.

4.7 SISTEMA I.- INMUNOENSAYO UTILIZANDO NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE STREPTAVIDINA (NPMs) Y ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-RPSA

Para este primer inmunoensayo, se realizó el ensamblaje de un sistema que consistió en NPM+RNA+Proteína (Nanocomplejo), el cual fue enfrentado a POA comercial, para observar si existía interacción entre ellos y de esa manera detectar al POA. Este POA, según estudios anteriores, debería competir con el RNA de *M. tuberculosis* por el sitio de unión al RpsA. Si esta interacción o competencia sucede, la proteína se desensamblaría del sistema y ello se detectaría en un ELISA, con un O.D menor al control sin POA, lo que estaría indicando que la proteína RpsA fue separada del sistema y se eliminó en los lavados. Por otro lado, una reacción positiva indicaría la ausencia de POA, es decir que RpsA permanece acoplado al complejo NPM:tmRNA.

4.7.1 Estandarización de la Cantidad de tmRNA por volumen de NPM

El primer proceso para iniciar el ensamblaje del sistema, es fijar el tmRNA biotinilado a las nanopartículas magnéticas de estreptavidina (NPMs), para ello se realizó una curva de saturación de tmRNA en picomoles (pm) para conocer la cantidad óptima que se une a las NPMs (Tabla 8).

Tabla 8. Componentes de los insumos para la curva de saturación de tmRNA en NPMs

NPMs (μL)	TmRNAbio(500ng/μL) (μL)	tmRNAbio (picomoles)	Volumen de reacción (μL)
5	1	2.5	50
5	2	5	50
5	3	7.5	50
5	4	10	50

Se decidió trabajar inicialmente con 5 μ L como se sugiere en el Kit de NPMs. Paralelamente, en otro tubo, se mezclaron 100 μ L de buffer de RNA captura 1X (pH 7.5) con el doble de cada una de las cantidades de tmRNA escogidas para la estandarización y se homogenizaron por pipeteo.

Terminado el lavado de la NPM, se retiró el tubo del soporte magnético y se resuspendieron las NPM sólo con 50 μ L del buffer de RNA captura 1X (pH 7.5) homogenizado anteriormente con el tmRNA.

Se dejaron incubando en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los 50 μ L sobrantes se guardaron para su posterior medición (L1).

Una vez finalizada la incubación, se colocó el tubo en el soporte magnético y se colectó el sobrenadante en otro tubo para su medición (L2). Las NPM se resuspendieron en 20 μ L de Buffer tris 20 mM pH 7.5 y se guardaron hasta realizar la segunda interacción.

Para verificar que el tmRNA se ha unido a las nanopartículas magnéticas, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en Buffer TBE con las alícuotas L1 y L2.

4.7.2 Ensamblaje de sistema de detección (NPM-RNA-PROTEÍNA)

Para iniciar el inmunoensayo con anticuerpos AntiRpsA es necesario primero haber producido los insumos tales como la Proteína RpsA y tmRNA de *M. tuberculosis* así como las Nanopartículas magnéticas (NPM) revestidas con estreptavidina y haber estandarizado las proporciones adecuadas de NPMs y tmRNA.

Para esta metodología se planteó realizar un ensamblaje de la siguiente manera (NPM-RNA-PROTEÍNA):

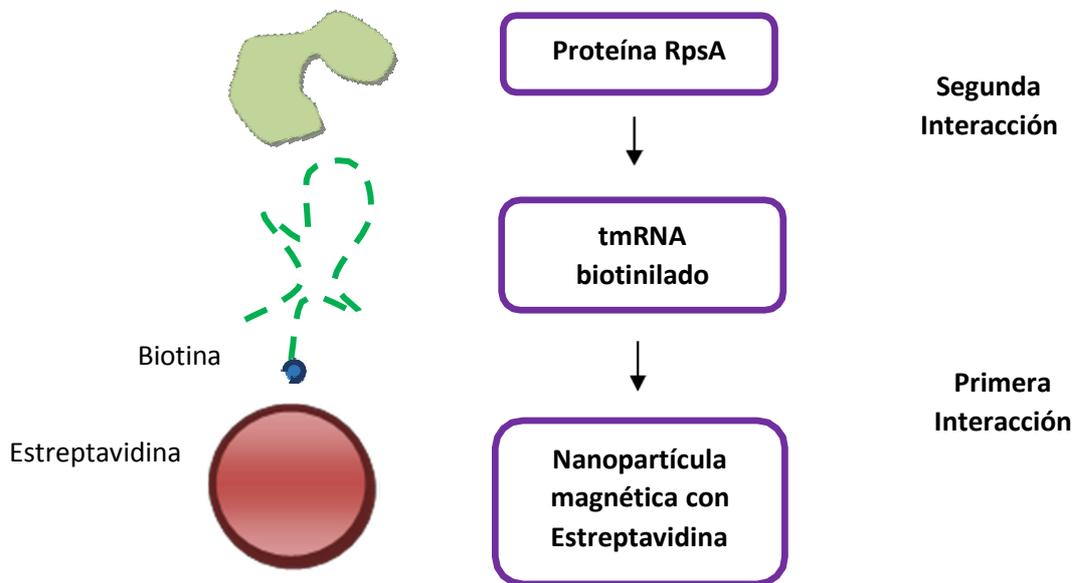


Figura 13. Esquema del ensamblaje del sistema de detección I

En primera instancia se realizó la interacción tmRNA-NPM a través de la unión Biotina-Estreptavidina.

Para ello se transfirieron 5 μ L de NPM (Pierce Magnetic RNA-protein pull down®) a un tubo eppendorf 1.5 mL y se colocó en un soporte magnético para atraer las partículas hacia la pared del tubo (Figura 14), se retira el sobrenadante y se

descarta. Seguidamente se lavan las nanopartículas con 20 μL de Buffer Tris 20mM (pH 7.5) tres veces.



Figura 14. Nanopartículas dirigidas hacia un extremo por el campo magnético.

Paralelamente, en otro tubo, se mezclaron 100 μL de buffer de RNA captura 1X (pH 7.5) con el doble de la cantidad de picomoles de tmRNA escogidos de la estandarización (15 pm=120 ng) y se homogenizaron por pipeteo.

Terminado el lavado de la NPM, se retiró el tubo del soporte magnético y se resuspendieron las NPM en 50 μL de buffer de RNA captura 1X (pH 7.5) conteniendo la cantidad estandarizada en picomoles de tmRNA. Se ensamblaron 5 tubos de la siguiente manera (Tabla 9):

Tabla 9. Controles utilizados para el primer ensamblaje del Sistema I

	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	tmRNA	PROTEÍNA RPSA
CONTROL NEGATIVO	X	-	
CONTROL POSITIVO	X	X	
REPETICIÓN 1	X	X	
REPETICIÓN 2	X	X	
REPETICIÓN 3	X	X	

Se dejó incubando en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Los 50 μ L sobrantes se guardaron para su posterior medición.

Una vez finalizada la incubación, se colocó el tubo en el soporte magnético y se colectó el sobrenadante en otro tubo para su medición. Las NPM se resuspendieron en 20 μ L de Buffer tris 20 mM pH 7.5 y se guardaron hasta realizar la segunda interacción.

Para verificar que el tmRNA se ha unido a las nanopartículas magnéticas, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en Buffer TBE.

Una vez obtenida la unión NPM-tmRNA, se realizó la segunda interacción RpsA-tmRNA. Para ello se agregó 7.5 μ m de RpsA (460 ng) en 100 μ L de Buffer de Unión RNA-PROTEIN 1X (Tris-HCl pH 7.5, MgCl₂, 5% Glicerol, 1% Tween) y se homogenizó por inversión. Asimismo, el tubo conteniendo el complejo NPM-tmRNA, se colocó en el magneto, se retiró el buffer de mantenimiento (Tris) y se resuspendió las NPM en 100 μ L del buffer conteniendo la proteína RpsA y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Al terminar la incubación, el tubo se colocó nuevamente en el magneto y se retiró el sobrenadante. Los Nanocomplejos (NPM+tmRNA+RpsA) fueron resuspendidos en 20 μ L de Tris pH 7.5.

Antes de realizar los ensayos con POA, con este stock se realizó un ensayo ELISA para verificar que el sistema esté ensamblado.

4.7.3 Interacción de los nanocomplejos con Ácido Pirazinoico comercial (competencia)

Se prepararon 4 tubos de 20 μ L conteniendo el sistema de nanocomplejos ensamblados, que serían los stocks previos a la incubación con POA.

Asimismo, se preparó 4 tubos con 4 concentraciones diferentes de POA en 200 μ L de buffer Tris pH 7.5, por triplicado (Tabla 10). Para realizar la interacción, se añadió 2 μ L del stock de nanocomplejos a los 4 tubos, por triplicado, conteniendo el POA.

Tabla 10. Cantidades de POA usadas para ensayo de competencia

Cantidad de POA (picomoles)	Concentración POA ng/ μ L	Nanocomplejos μ L	Volumen RX	Repeticiones
7.5	4.65	2	200	3
15	9.30			
75	46.50			
650000	800 μ g/mL			

La incubación para la competencia se realizó 1 hora a 25 °C en agitación lenta. Terminada la incubación, los tubos fueron colocados en el soporte magnético y se descartó el sobrenadante. Los nanocomplejos se vuelven a resuspender en 5 μ L de buffer Tris pH 7.5.

4.7.4 Detección indirecta de POA mediante ELISA

Para este inmunoensayo de detección, se realizó el bloqueo de una placa de 96 pocillos Corning de afinidad media. Se bloqueó con BSA 3% en PBS + Tween20 (0.05%), durante 1 hora a 37 °C.

Seguidamente se prepararon los anticuerpos primarios y secundarios:

Tabla 11. Anticuerpos policlonales utilizados en el ELISA-Beads

ANTICUERPOS	DILUCIÓN	BUFFER
ANTI RPSA	1:10000	PBS+T
ANTI IGG	1:7500	

Luego de bloqueada la placa, se agregan 100 µL de anticuerpos Anti RpsA en cada pozo.

Se tomaron en cuenta los siguientes controles:

Control Negativo: Pozo con Nanopartículas Magnéticas sin proteína ni RNA.

Blanco: Pozo con anticuerpo IgG.

Control positivo: Pozo con Nanopartículas magnéticas RNA y proteína.

Muestras: Pozo con NPM, RNA y proteína, tratada con POA.

	Repetición1	Repetición2	Repetición3
control negativo blanco			
7.5 pm			
15 pm			
75 pm			
650 mil pm			
control positivo			

La primera incubación con anticuerpo primario (Anti RpsA) se realizó en un shaker para placas a 37 °C durante una hora. Seguidamente se coloca la placa en el magneto horizontal para Placa, se descarta el sobrenadante con pipeta y se lava con PBS-tween 20 (0.05%) tres veces. Luego se agrega el segundo anticuerpo (Anti igG) y se incuba de la misma manera arriba mencionada. Luego se descarta el sobrenadante y se lava. Por último, se revela la reacción con OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) disuelto en Buffer Fosfato-Citrato con Perborato de Sodio, se incuba 5 minutos y se detiene la reacción con HCl a 0.5 M y la placa se lleva a un lector de Microplacas a 490 nm.

4.8 SISTEMA II.- INMUNOENSAYO UTILIZANDO NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE COBALTO (NPMc) Y ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-RPSA

Para este inmunoensayo, se realizó el ensamblaje del sistema que consistió en NPM+Proteína+RNA (Nanocomplejo), el cual también fue enfrentado a POA comercial, como se indicó para el anterior sistema. En este caso, si esta interacción o competencia sucede, el RNA se desensamblaría del sistema y ello se detectaría en un ELISA, con un O.D mayor al control sin POA, lo que estaría indicando que la proteína RpsA está descubierta y es detectada por los anticuerpos. Por otro lado, una reacción negativa indicaría la ausencia de POA, es decir que RpsA permanece acoplado al tmRNA.

4.8.1 Estandarización de Condiciones de unión Proteína-NPMc

Inicialmente se realizó la estandarización de las condiciones ideales para lograr la máxima unión proteína-NPMc.

Se trabajó inicialmente con una cantidad promedio de 20 µg de RpsA de acuerdo al inserto del Kit de NPM, este inserto recomienda trabajar con un volumen de NPM entre 10-15 µL, por lo tanto, se decidió realizar ensayos con 5 µL, 15 µL y 25 µL, con 20 µg de RpsA cada uno, para encontrar la mejor proporción entre NPM y Proteína (Tabla 12).

Tabla 12. Cantidad de RpsA por volumen de NPMc, usado en la reacción de unión a Nanopartícula.

RpsA µg	NPMc Volumen (µL)	Buffer de Unión (Binding/Wash Buffer) Volumen	Incubación
20	5	200	30 minutos Temp. Ambiente
	15	500	
	25	700	

Luego de encontrar el volumen de NPMc que haya proporcionado la mayor cantidad de proteína unida, se procedió a ensayar con dos cantidades de proteína distinta y con el volumen de NPMc previamente escogido. Con el volumen y la cantidad de Proteína escogida, se procedió finalmente a fijar las condiciones de temperatura y tiempo de incubación, adecuadas (Tabla 13).

Tabla 13. Condiciones para estandarizar la unión de RpsA a nanopartículas.

Tiempo de Incubación (min)	Temperatura de Incubación (°C)
10	4
	21
	37
30	4
	21
	37

Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se procedió a realizar una curva de saturación para ver cuál es la máxima cantidad de proteína que se puede unir.

A continuación, se añadió en otros tubos 2.5 µg, 5 µg, 7.5 µg y 10 µg de la proteína RpsA y se enrasó con 200 µL (50 µg/mL) de Binding/wash buffer pH 8.0. Luego, se retiró una alícuota de la concentración inicial (50 µg/mL) y se guardó para cuantificar la proteína inicial mediante el método de Bradford (Pi). Seguidamente, se colocó los tubos con las nanopartículas en un magneto y se retiró el buffer de lavado. Luego se resuspendió las nanopartículas con los 200 µL de buffer conteniendo la proteína. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, en agitación. Terminada la incubación se colocó en el magneto, y se retiró el sobrenadante que luego se almacenó para cuantificar cuánto de proteína no se unió, por Bradford (Pf). Seguidamente se resuspendió las nanopartículas en Buffer Binding/wash 1X pH 8 y se realizó un lavado, para luego regresar al magneto y retirar el sobrenadante para cuantificar (Pw). Por último, se resuspendió en 50 µL de Pull-Down Buffer 1X pH 7.5.

Para cuantificar la cantidad de proteína fijada a las nanopartículas se utilizó la siguiente fórmula:

$$RpsAt = \frac{(Pi - (Pf + Pw))1000}{Vrx}$$

RpsAt = RpsA Total

Pi = Proteína inicial

Pf = Proteína final

Pw = Proteína lavado

Vrx = volumen de la reacción

4.8.2 Ensamblaje de sistema de detección (NPM-PROTEÍNA-RNA):

Para esta metodología se planteó realizar un ensamblaje de la siguiente manera (NPM-PROTEÍNA-RNA):

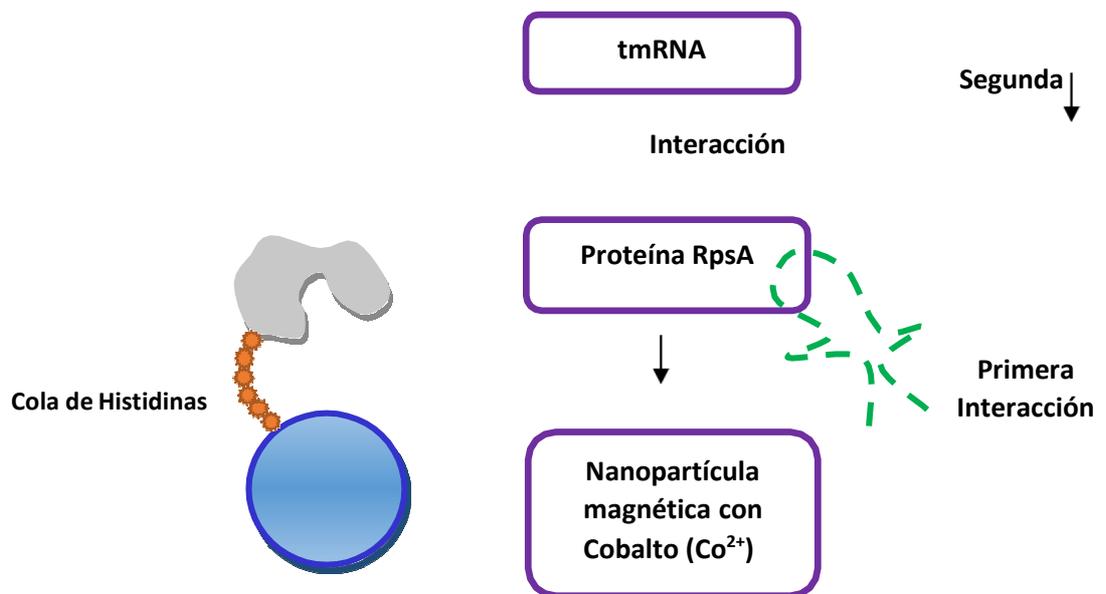


Figura 15. Esquema del ensamblaje del sistema de detección II.

A continuación, se resuspendieron las nanopartículas de cobalto (Dynabeads® His-Tag Isolation & Pulldown) vortexeando vigorosamente. Se traspasó 5 μL de nanopartículas a 4 tubos eppendorf, luego se colocaron en un magneto y se retiró el sobrenadante. Seguidamente se retira los tubos del magneto y se resuspende las nanopartículas con 100 μL de Binding/wash 1X buffer pH 8.0 para lavar y estabilizar las nanopartículas. (Se repitió el procedimiento).

Una vez conocida la cantidad máxima y óptima que se une a las NPMc, se procedió a preparar 5 tubos conteniendo los 5 μL de NPMc con la cantidad óptima de la proteína RpsA, de la siguiente manera:

Tabla 14. Controles utilizados para el primer ensamblaje del Sistema II.

	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	PROTEÍNA RPSA	TMRNA
CONTROL NEGATIVO	X		
CONTROL POSITIVO	X	X	
REPETICIÓN 1	X	X	
REPETICIÓN 2	X	X	
REPETICIÓN 3	X	X	

Una vez obtenido el complejo NPM-RpsA (Stock), se realiza la segunda interacción RpsA-tmRNA. Para ello se separan tantos microlitros del complejo como se requiera para completar 15 pm de RpsA y se trasladan a 3 tubos eppendorf (3 repeticiones), asimismo se traslada el mismo volumen del stock del control negativo y positivo hacia otros dos eppendorf. Luego se prepararon 200 µL de Binding RNA-PROTEIN 1X pH 7.5 con 30 pm de RNA. Se colocaron los eppendorf en el magneto, se retiró el sobrenadante y se agregaron solo 100 µL el buffer con el RNA, es decir solo 15 picomoles de RNA, y luego se incubó 1 hora a RT en agitación. Los otros 100 µL restantes se almacenaron para su posterior cuantificación (Li).

Terminada la incubación, se regresó al magneto, se retiró el sobrenadante y guardó para cuantificar (Lf).

$$tmRNA_n = (Li - Lf) \cdot Vrx$$

$tmRNA_n = tmRNA \text{ neto}$

$Li = \text{Lectura inicial}$

$Lf = \text{Lectura final}$

$Vrx = \text{Volumen de la reacción}$

Finalmente los nanocomplejos se resuspenden en 20 μL de de buffer Pull-Down 1X pH 7.5.

Tabla 15. Controles utilizados en el primer y segundo ensamblaje del sistema de detección.

	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	PROTEÍNA RPSA	TMRNA	volumen final (μL)
CONTROL NEGATIVO	X			20 (15picomoles de complejo RNA y RpsA)
CONTROL POSITIVO	X	X		
REPETICIÓN 1	X	X	X	
REPETICIÓN 2	X	X	X	
REPETICIÓN 3	X	X	X	

4.8.3 Interacción de los nanocomplejos con Ácido Pirazinoico comercial

De los tubos con los nanocomplejos (Repeticiones) se separaron 10 μL (7.5 picomoles de nanocomplejos) en un eppendorf cada uno, se colocaron dichos tubos en un magneto y se retiró el buffer de resuspensión. A estos tubos se le añadió 750 picomoles de Ácido pirazinoico cada uno, es decir, 100X los picomoles de RpsA y tmRNA en el sistema, de la siguiente manera:

- a. 10 μL del tubo se incubó en buffer Binding RNA-Protein PH 6.5-7.5 sin glicerol con 100X POA
- b. 10 μL del tubo se incubó en el mismo buffer sin POA.

El tiempo de incubación es 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente se colocan los tubos en un magneto y se retira el sobrenadante, el sistema con los nanocomplejos se resuspenden en 20 μL de Buffer Tris pH 7.5.

4.8.4 Detección indirecta de POA mediante ELISA

Para este ensayo se realizó el bloqueo de una placa de 96 pocillos Corning de unión media.

Se bloqueó con BSA 3% en PBS + Tween20 (0.05%), durante 1 hora a 37 °C, seguidamente se preparan los anticuerpos primarios y secundarios:

ANTICUERPOS	DILUCIÓN	BUFFER
ANTI RPSA	1:10000	PBS+T
ANTI IGG	1:7500	

Luego de bloqueada la placa, se agregan 100 µL de anticuerpos Anti RpsA en cada pozo.

Se tendrán en cuenta los siguientes controles:

Control Negativo: Pozo con Nanopartículas Magnéticas sin proteína ni RNA.

Blanco: Pozo con anticuerpo IgG.

Control positivo: Pozo con Nanopartículas magnéticas y proteína.

Muestras: Pozo con nanocomplejos (NPM, RNA y proteína), tratada con POA y sin POA

La primera incubación con anticuerpo primario (Anti RpsA) se realiza en un shaker para placas a 37 °C durante una hora. Seguidamente se coloca la placa en un magneto especial para Placa y se descarta el sobrenadante con pipeta y se lava con PBS-tween 20 (0.05%) tres veces. Luego se agrega el segundo anticuerpo (Anti igG) y se incuba de la misma manera arriba mencionada. Luego se descarta el sobrenadante y se lava. Por último, se revela la reacción con OPD (o-

phenylenediamine dihydrochloride) disuelto en Buffer Fosfato-Citrato con Perborato, se incubó 5 minutos y se detiene la reacción con HCl a 0.5 M y la placa se lleva a un lector de Microplacas a 490 nm.

4.9 Análisis de Resultados

Las desviaciones estándar y los coeficientes de variación se calcularon entre repeticiones por triplicado por cada método evaluado. Se realizó el análisis de T student para evaluar las diferencias significativas entre tratamientos y controles.

5. RESULTADOS

5.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S1 (RPSA)

5.1.1 Preparación de células competentes BL21 (DE3)

Las células BL21 que se encontraban criopreservadas a -70 °C, fueron reactivadas en medio LB y a 37 °C y luego fueron sembradas en una placa sin antibiótico y en otra placa con antibiótico kanamicina (Figura 16).

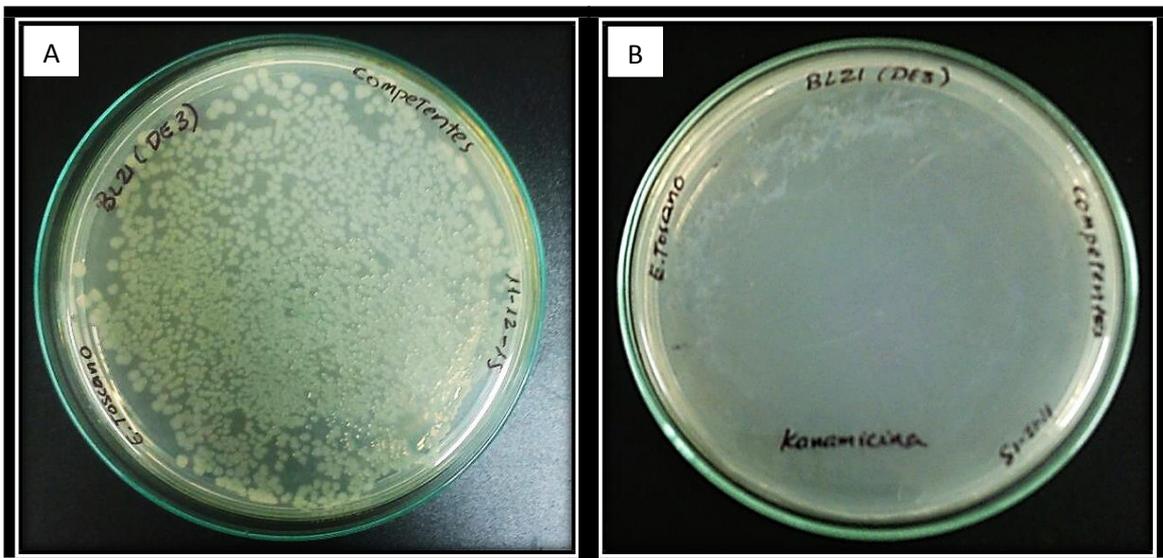


Figura 16. Comparación del crecimiento de la cepa BL21 de *E. coli* en medios sin antibiótico (A) y con antibiótico kanamicina (B).

Como se observa en la figura, las células solo crecieron en la placa que no contenía Kanamicina, ya que estas células no presentan ningún plásmido con un cassette de resistencia a dicho antibiótico ni tampoco han adquirido resistencia naturalmente por lo tanto estas células son viables para realizar el siguiente paso de transformación con el plásmido pET28a.

5.1.2 Verificación de plásmidos pET28a con el inserto RpsA

Antes de realizar la transformación se verificó el estado de los plásmidos, se realizó una extracción alcalina del ADN plasmídico, para ello se reactivó las células Novablue de *E. coli*, donde estaban almacenados los plásmidos (Figura 17A)

El cultivo de NovaBlue fue centrifugado y el pellet con las mismas fue tratado por Lisis alcalina para extraer los plásmidos y luego se realizó la digestión enzimática para verificar el estado del inserto y de los plásmidos, lo cual fue visualizado a través de una electroforesis en Gel de Agarosa al 1% (Figura 17B).

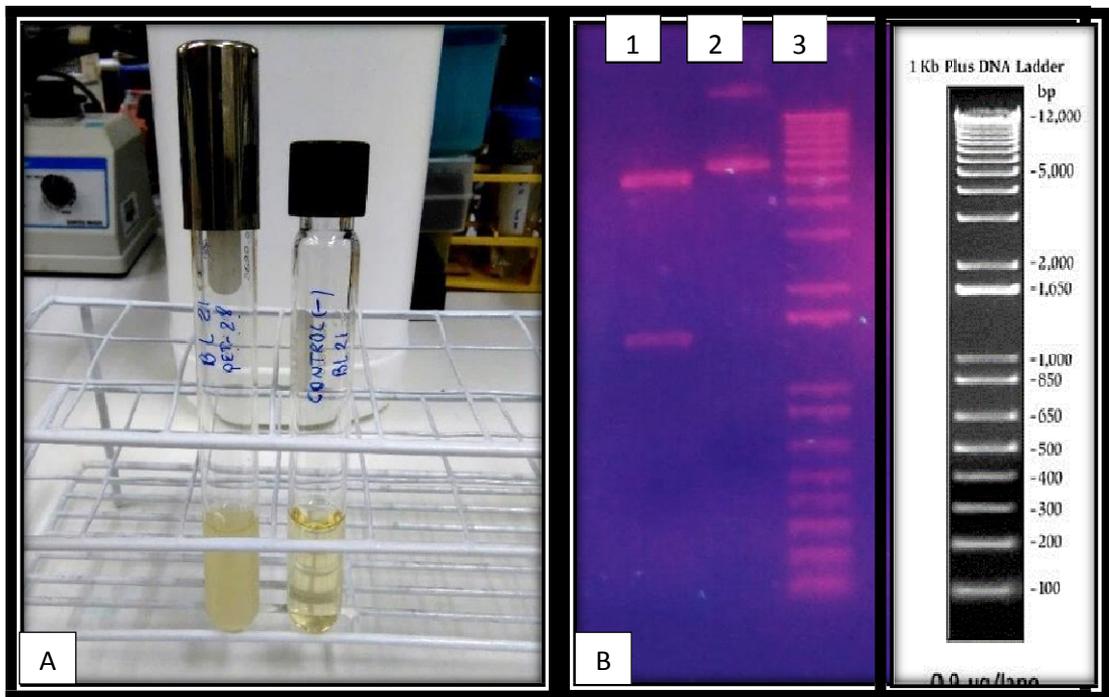


Figura 17. A) Reactivación de cepa BL21 que contiene plásmidos pET28a con el inserto RpsA. B) Electroforesis en Gel de Agarosa 1% de los productos de la digestión enzimática con BamH I y Xho I: Carril 1, Plásmido Pet28a con el gen RpsA digerido. Carril 2, Plásmido Pet28a sin digerir. Carril 3, Marcador de DNA.

Se observa en el carril 1 que el inserto (Gen RpsA) se encuentra en el tamaño correspondiente a 1446 pb, mientras que el plásmido lineal pET28a se encuentra al nivel de la banda de 5000 pb, coincidiendo con el tamaño original de 5369 pb. En

el carril 2, el plásmido pET28a conteniendo el inserto corresponde a la suma del inserto y el plásmido, es decir, 6815 pb.

5.1.3 Transformación de células competentes BL21 (DE3)

Luego del proceso de transformación de las BL21 con el plásmido pET28a las células fueron sembradas en medios agar LB con Kanamicina para seleccionar solo aquellas que hayan incorporado el plásmido y por lo tanto sean resistentes a este antibiótico (Figura 18).

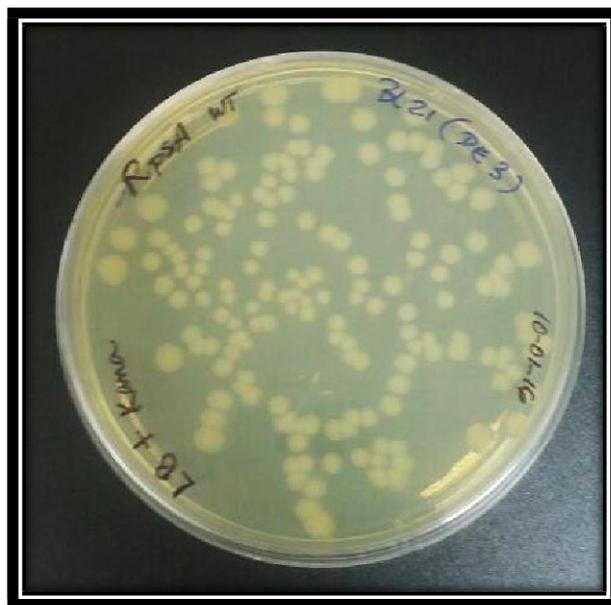


Figura 18. Colonias de BL21 que incorporaron el plásmido con el inserto RpsA y resistencia a Kanamicina.

5.1.4 Expresión y extracción de la proteína RpsA

Durante el proceso de expresión se tomaron alícuotas y se realizó un SDS-PGE 12% (Figura 19) para verificar que se haya expresado la proteína. Se observa en la figura que la muestra sin inducir no presenta ninguna banda con mayor expresión,

mientras que en la muestra control inducido una banda se ha sobreexpresado y se encuentra en el tamaño correspondiente a 62.1 KDa según el marcador de proteínas, así como en la muestra de la fracción soluble luego del sonicado. Asimismo, en la muestra del pellet (fracción No Soluble) no se observa banda correspondiente al tamaño de la proteína.

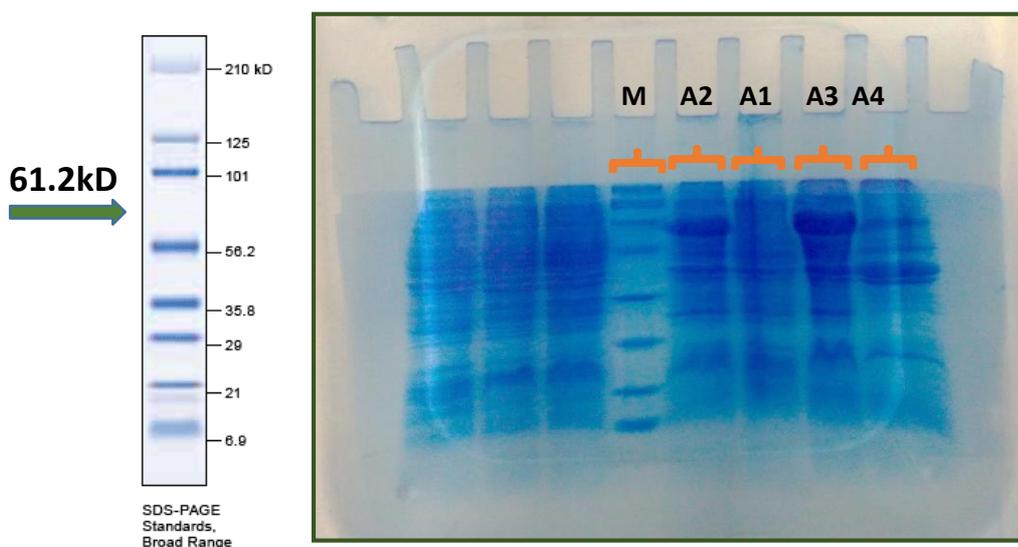


Figura 19. SDS-PAGE 12% de las alícuotas obtenidas en el proceso de expresión proteica. M: Marcador de peso molecular. A1: control no inducido. A2: Control Inducido. A3: Fracción soluble conteniendo a RpsA. A4: Fracción insoluble, no hay RpsA.

5.1.5 Purificación convencional de la proteína RpsA

El extracto purificado se colectó en 52 tubos, de los cuales solo 15 fueron escogidos para correr un SDS-PAGE 12%, los cuales tenían la mayor probabilidad de contener la proteína. El gel de poliacrilamida (Figura 20) muestra que los tubos 40, 41, 45 y 51 contienen la proteína de interés en bajas concentraciones, pero el tubo 49 es el que contiene la mayor concentración.

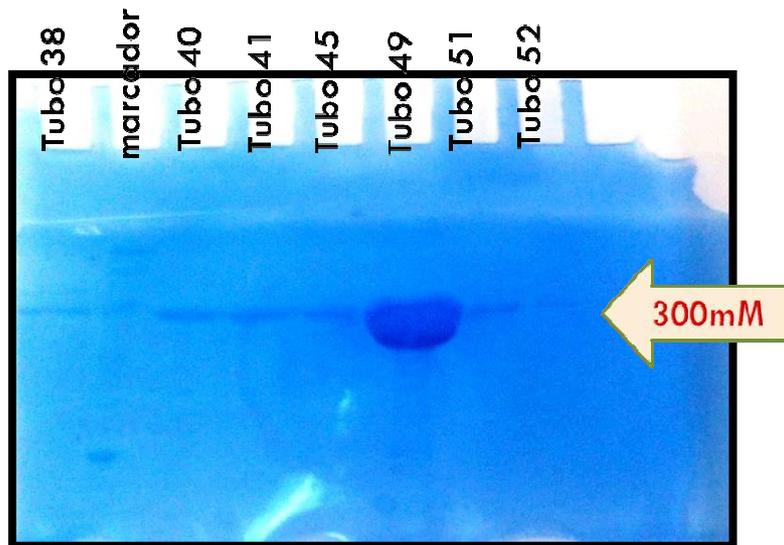


Figura 20. SDS-PAGE 12% conteniendo la proteína RpsA. La flecha indica la concentración de Imidazol a la cual la mayoría de la proteína eluyó de la columna.

Los tubos conteniendo la proteína fueron colocados en el sistema de ultrafiltración para eliminar el Imidazol y concentrar la proteína en Buffer fosfato pH 8.0, a un volumen final de 5 mL.

5.1.5.1 Cuantificación de RpsA

La cuantificación por el método de Bradford dio como resultado una curva estándar, cuya ecuación lineal resultó ser $Y = 0.004X + 0.413$ y un coeficiente de determinación (R^2) = 0.996 (Figura 21), muy cercano a 1, lo cual indica que la curva es altamente predictoria, por lo que podemos decir que las variables Absorbancia y Concentración están altamente asociadas y por ende podemos predecir la absorbancia para las muestras problemas.

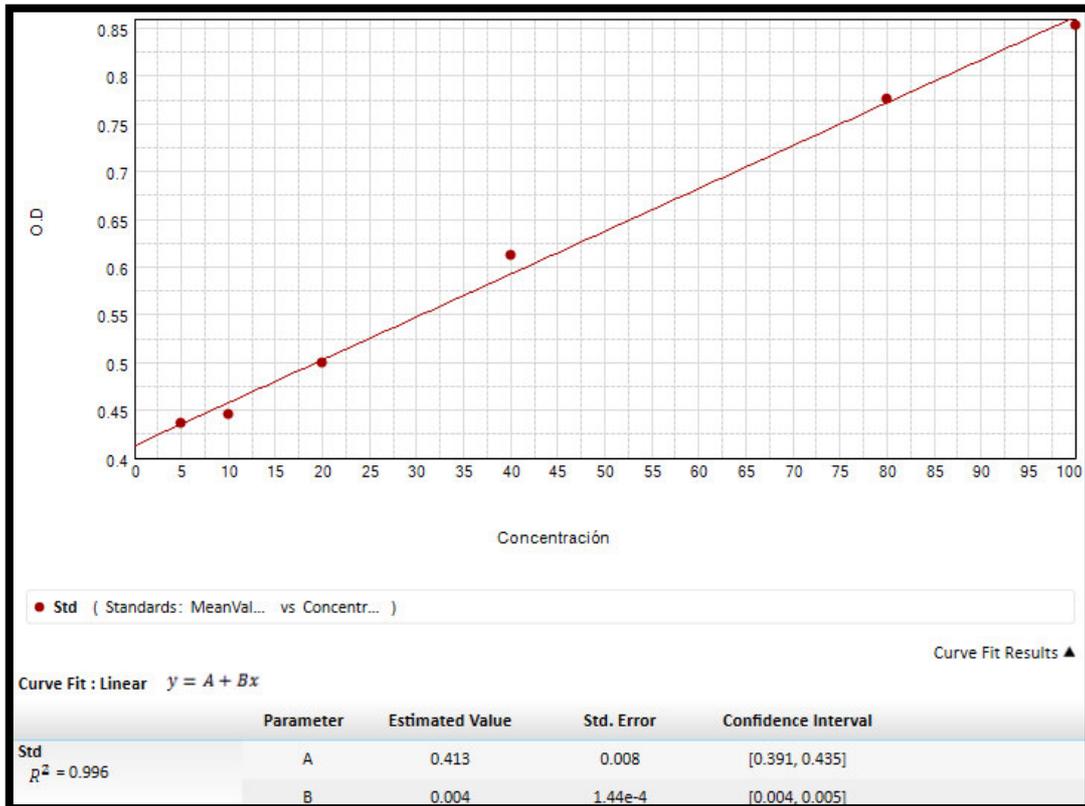


Figura 21. Curva estándar de BSA para cuantificar la proteína RpsA

Las muestras se colocaron por duplicado a 4 distintas diluciones (Tabla 16) y la media de las concentraciones obtenida, fue 5.96 mg/mL por tubo. En total se obtuvieron 5 tubos.

Tabla 16. Diluciones por duplicado de una muestra purificada de RpsA y su cuantificación por Bradford.

Sample	Wells	Value	R	Result	MeanResult	SD	CV	Dilution	AdjResult
01	B4	0.596		40.633	39.753	1.245	3.1	200.0	7950.668
	B5	0.588		38.873					
02	C4	0.708		65.632	63.136	3.529	5.6	100.0	6313.645
	C5	0.685		60.641					
03	D4	0.863		100.233	99.364	1.229	1.2	50.0	4968.206
	D5	0.855		98.495					
04	E4	1.266	R	189.911	184.252	8.003	4.3	25.0	4606.296
	E5	1.215	R	178.593					

R - Outside standard range

Mean Adjusted Result: 5959.70

Este tipo de cuantificación nos da una adecuada concentración de proteína, sin embargo, no conocemos el grado de pureza de la muestra, por ello se realizó tres lecturas de la muestra obtenida en un espectrofotómetro de microvolumen UV-

Visible NanoDrop 2000/2000c, utilizando el modo para proteína. El resultado de las mediciones se observa en la figura 22. La proteína rpsA muestra un pico de absorbancia máxima a la longitud de onda de 260nm la cual se prolonga hasta los 280nm y además el ratio 260/280 es mayor a 1 (1.43), todo esto indica contaminación por ácidos nucleicos ya que una proteína pura debería tener su máxima absorbancia a 280nm y un ratio menor a 1.

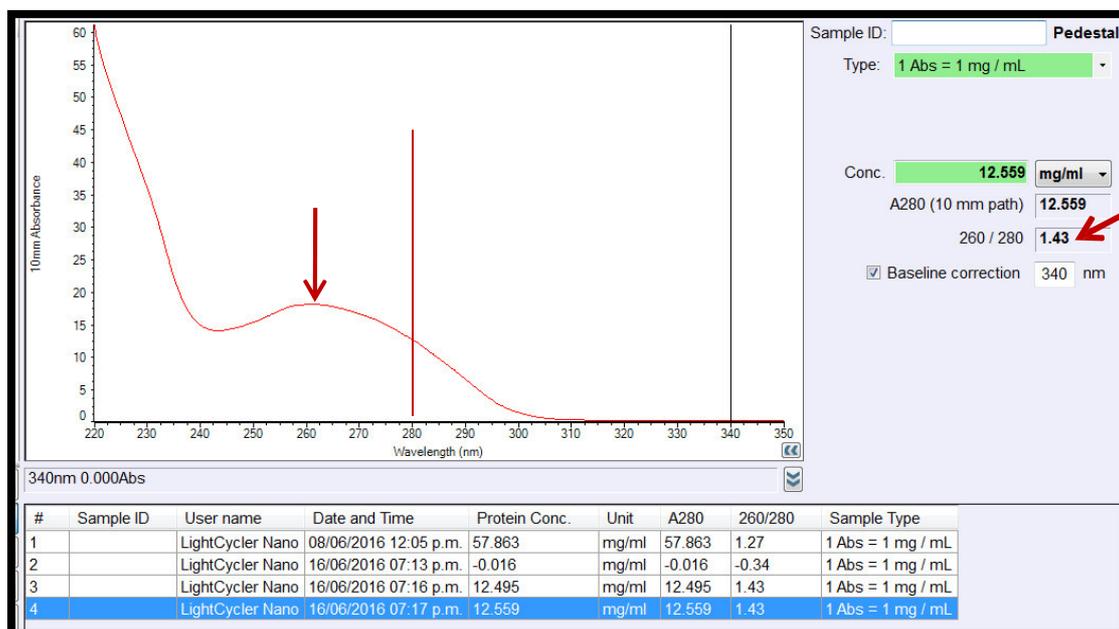


Figura 22. Espectro de absorción de la proteína RpsA. Se observa que la máxima absorción se da a 260 y el ratio 260/280, es mayor a 1, indicando que podría estar contaminada con ácidos nucleicos.

Al notar esta contaminación, se decidió realizar un Native-PAGE 5% el cual fue teñido con bromuro de etidio y paralelamente se corrió un gel gemelo en la misma cámara de electroforesis, al mismo voltaje pero el cual fue teñido con azul de coomasie (Figura 23). Las proteínas sin ácidos nucleicos adheridos, no se tiñen con bromuro de etidio, sin embargo, en el carril 1 se observa que la proteína purificada sin ningún tratamiento, fluoresce, indicando la presencia de DNA o RNA. A una alícuota de la muestra purificada se le añadió DNasas y a otra alícuota, RNasas,

para conocer con qué tipo de ácido nucleico está contaminada la muestra (Figura 23A). El gel control, que fue teñido con azul de coomasie para proteína nos indica si la fluorescencia observada corresponde a la misma posición de la proteína (Figura 23B).

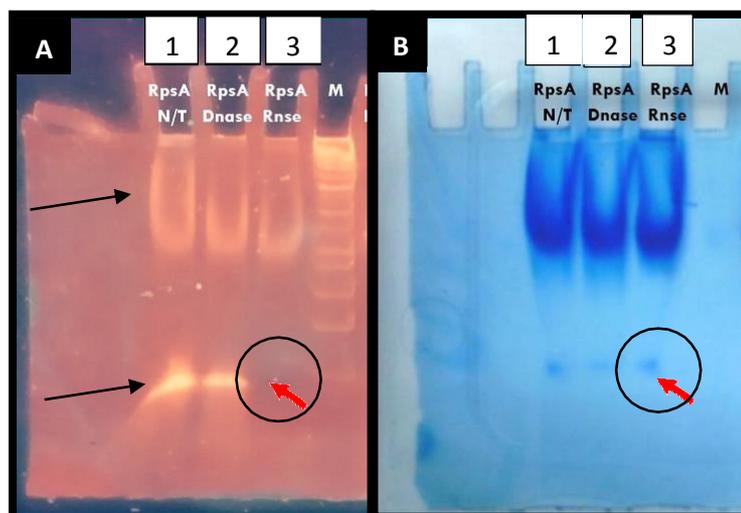


Figura 23. Electroforesis en Native-PAGE 5% de RpsA. A) Gel teñido con Bromuro de etidio. Carril 1: RpsA sin tratar. Carril 2: RpsA con DNAsa. Carril 3: RpsA tratada con RNasa. Las flechas negras indican presencia de DNA o RNA. La flecha roja indica ausencia de RNA. B) Gel teñido con Azul de coomasie, cuyas posiciones de las muestras son las mismas que en el primer gel. La flecha roja indica la presencia de proteína en esa posición, pero ausencia de RNA en el primer gel.

En la muestra con DNasa se observa que no hay variación en la presencia de ácidos nucleicos (carril 2), indicando que no hay DNA en la muestra. Sin embargo en el carril 3, se observa que la banda con ácido nucleico desaparece al ser tratada con RNasa, por lo que se puede concluir que la proteína RpsA se encuentra contaminada o unida a RNAs (Carril 3). Se pensó en la posibilidad de trabajar añadiéndole RNasas a la muestra directamente, sin embargo, estas enzimas podrían interferir no solo en la concentración final de la muestra sino en la interacción con tmRNA y POA cuando se realice el ensamblaje. Por lo tanto se decidió realizar la decontaminación antes de la purificación.

5.1.6 Purificaciones modificadas de la proteína RpsA

Para realizar la limpieza de la proteína RpsA se utilizaron dos tipos de purificaciones, para ello se volvió a expresar la proteína en el sistema bacteriano, siguiendo la metodología ya mencionada. Se verificó que la proteína se haya expresado correctamente (Figura 24).

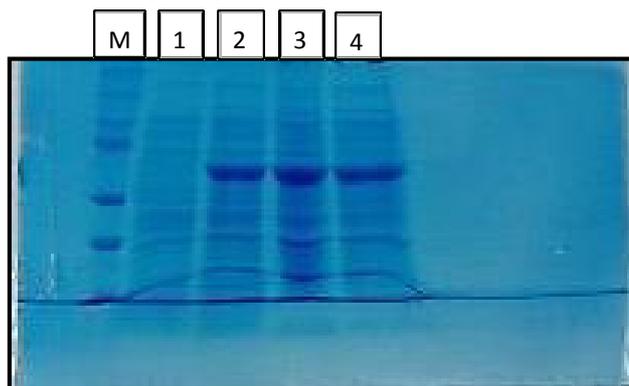


Figura 24. Gel SDS-PAGE 12% de la expresión de RpsA. M: marcador de peso molecular de proteína. Carril 1: Control sin inducir expresión. Carril 2: Control luego de la inducción. Carril 3: Fracción soluble para purificación con Úrea. Carril 4: Fracción soluble para purificación con RNasa.

5.1.6.1 Purificación denaturante con Urea 8M y Purificación predigestión con Ribonucleasa

Los productos de la purificación para cada tipo de método se corrieron en un gel SDS-PAGE 12% (Figura 25) y se observa que la purificación denaturante con úrea no fue muy efectiva pues eluyeron otras proteínas, quizás debido a la denaturación, otras proteínas pudieron interactuar con la matriz de la columna cromatográfica y luego eluyeron junto con la proteína de interés. Adicionalmente, no se puede asegurar que la renaturación o plegamiento de la proteína en la columna haya sido 100% igual a la proteína nativa.

En el caso de la purificación con predigestión con Ribonucleasa, se observa que la purificación fue más efectiva, ya que las bandas de otras proteínas son muy tenues.

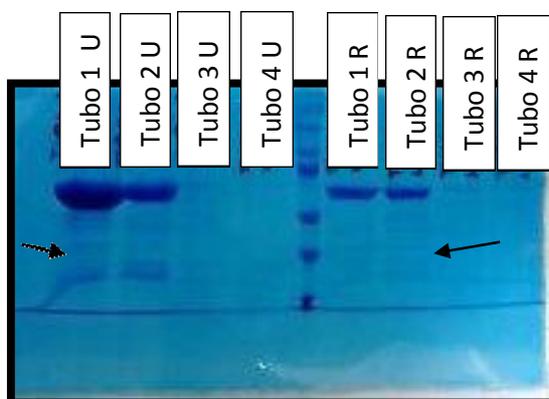


Figura 25. SDS-PAGE 12% conteniendo la proteína RpsA purificada con dos métodos. **U:** Purificación con úrea. Restos de otras proteínas (Flecha negra). **R:** Purificación con Ribonucleasa. Se observa menos contaminación con otras proteínas (Flecha)

A continuación, luego de verificar el estado de purificación, se procedió a verificar el estado de contaminación con ácidos nucleicos, utilizando un Native-PAGE 5%, tal y como se describió anteriormente (Figura 26).

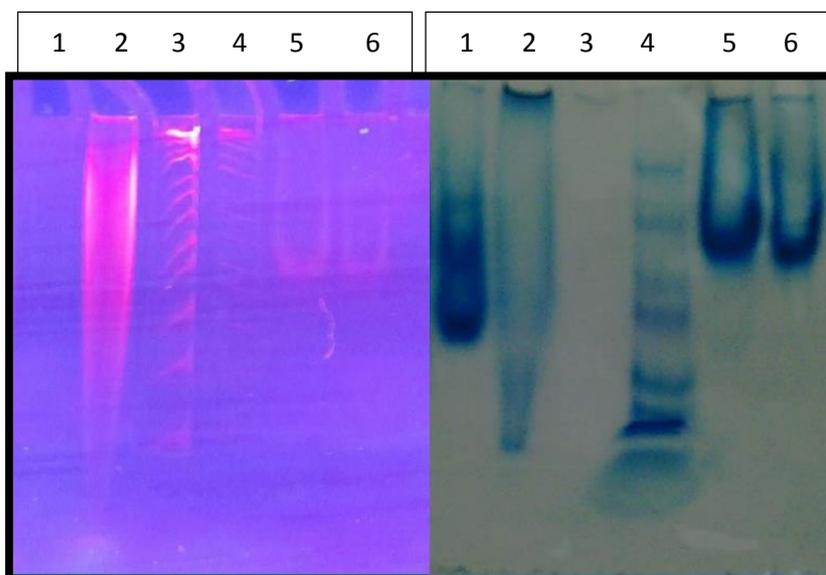


Figura 26. NATIVE-PAGE 5% de RpsA con purificaciones modificadas. Carril 1: Control negativo BSA. Carril 2: Control positivo RpsA sin decontaminar. Carril 3: Marcador Riboruler. Carril 4: Marcador de proteínas. Carril 5: RpsA purificada con Ribonucleasa. Carril 6: RpsA purificada con úrea.

En este gel se corrieron dos controles, en el primer carril se colocó una muestra de la proteína comercial BSA (SIGMA) como control negativo de contaminación con RNA, luego en el segundo carril, se corrió la proteína RpsA del primer lote contaminado, como control positivo de contaminación con RNA. Se usaron dos marcadores (carril 3 y 4), el RiboRuler (Marcador de peso de RNA) y el Broad Range (Marcador de peso de proteínas). En los carriles 5 y 6 se colocaron las muestras tratadas con las dos metodologías de Purificación, sin úrea, y con RNasa y con Buffer con úrea (denaturante). Se observa que el control negativo (BSA) no fluoresce al teñirlo con bromuro de etidio, sin embargo, la RpsA contaminada muestra gran cantidad de fluorescencia debido a la presencia de RNA. Las muestras tratadas demostraron una disminución considerable de RNA, traducida en poca fluorescencia.

Debido a que no se cuenta con equipo de Dicroísmo circular para asegurar que la proporción entre hojas beta y alfas hélices de la proteína nativa corresponda con la proteína refoldada durante la renaturación, se decidió escoger la metodología con el tratamiento con Ribonucleasas.

La muestra purificada se evaluó mediante el espectrofotómetro de NanoDrop (Figura 27) para ver su estado de pureza. El pico de absorbancia se encuentra en 280nm de longitud de onda y el ratio 260/280 es menor a 1, indicando que la proteína está limpia, entonces se decidió producir más cantidad de proteína a mayor escala (Figura 28).

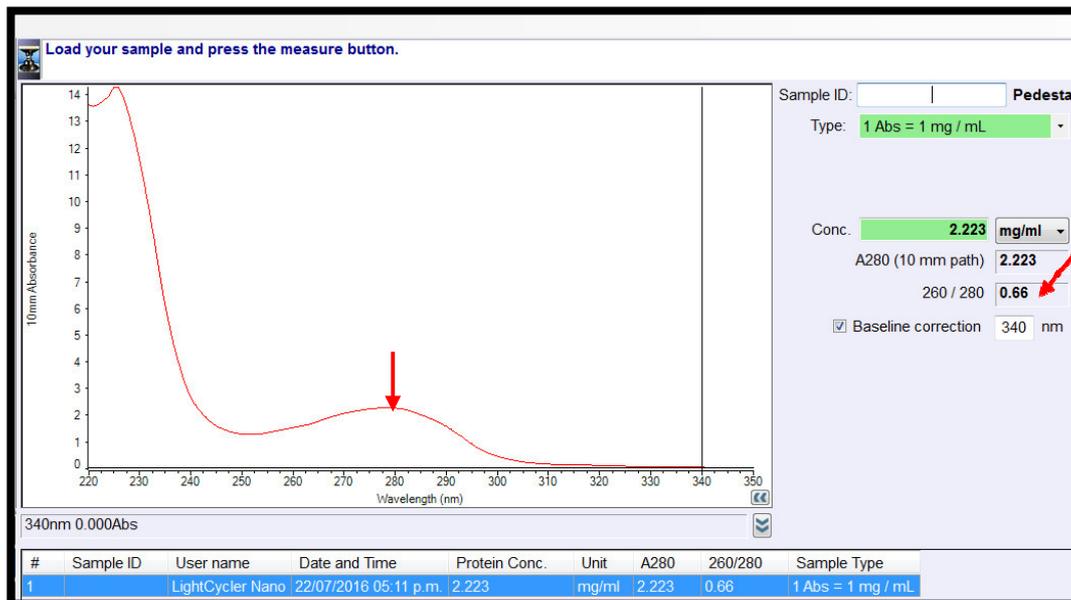


Figura 27. Espectro de absorbancia de la proteína RpsA al ser purificada con Ribonucleasa. La absorbancia máxima se encuentra a 280 y el ratio 260/280 es menor a 1 (Flechas rojas).

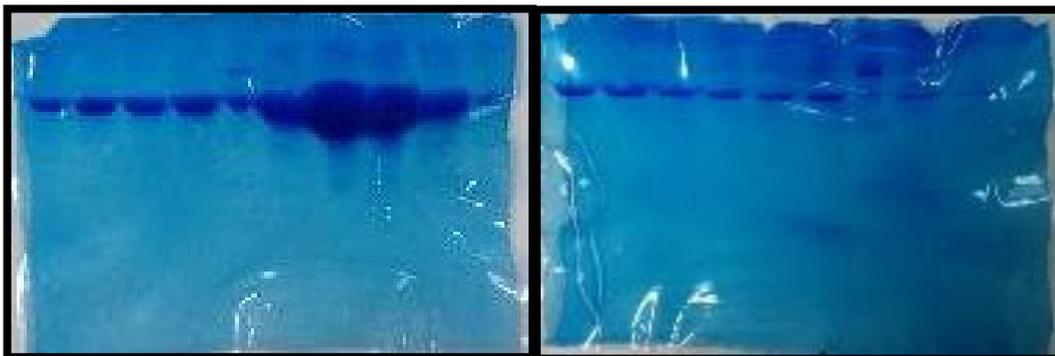


Figura 28. Purificación a gran escala con Ribonucleasa.

5.2 PRODUCCIÓN DE tmRNA

5.2.1 Extracción de ADN genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Se obtuvieron 14 tubos con alícuotas de 50 μ L de DNA genómico resuspendidos en Buffer TE pH 8.0. Se visualizó en un gel de Agarosa a 0.8% junto con un marcador de concentración (DNA Lambda λ) para cuantificar el DNA extraído (Figura 29).

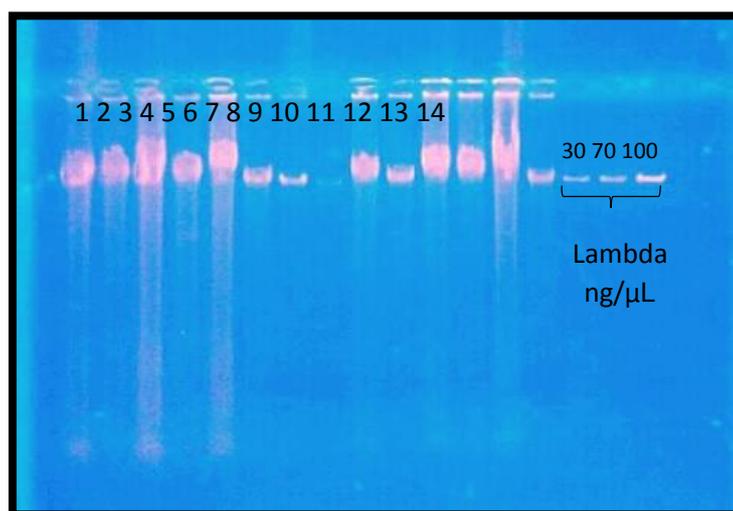


Figura 29. Electroforesis en agarosa al 0.8% para cuantificar 14 muestras de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Se usó como marcador de concentración a DNA lambda.

Las concentraciones se extrapolaron a partir del marcador de concentración de DNA lambda, las cuales se observan en la tabla 17.

Tabla 17. Concentración de las 14 muestras de DNA genómico de TB.

Tubo	Concentración ng/μL	Volumen
1	800	100
2	800	100
3	1000	100
4	800	100
5	1000	100
6	200	100
7	100	100
8	20	100
9	500	100
10	300	100
11	800	100
12	800	100
13	1000	100
14	200	100

5.2.2 Amplificación del gen SSRA

Para realizar la PCR se utilizó como molde uno de los tubos conteniendo el DNA genómico. Debido a que la concentración de DNA fue muy alta en la mayoría de los tubos, se escogió el tubo 14 con 200 ng/μL que contenía DNA altamente íntegro. A partir de este tubo, se realizó una dilución 1:10 para obtener 20 ng/μL.

Con esta dilución se trabajó la mezcla para la PCR, de acuerdo a las condiciones mencionadas previamente y se realizó la electroforesis cuyo resultado se observa en la Figura 30. Los amplicones se encuentran íntegros, sin contaminación y en el tamaño correspondiente a los 620 pb. tal como se esperaba.

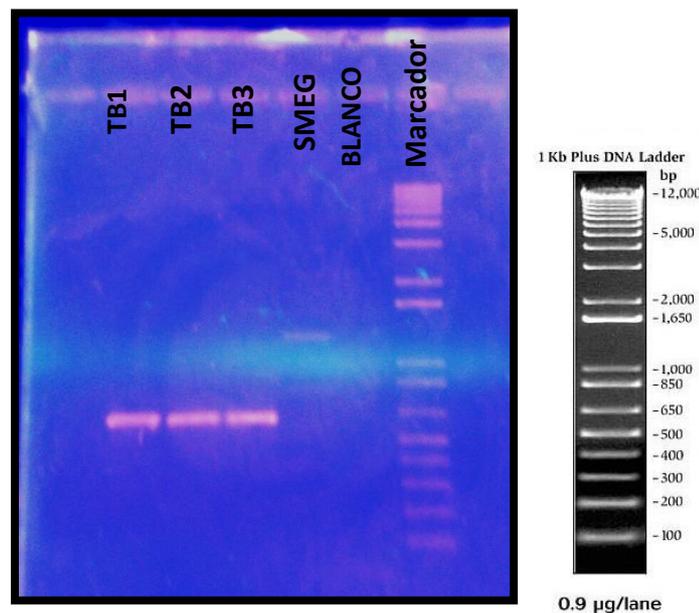


Figura 30. Electroforesis en gel de Agarosa a 1% del gen *ssrA* amplificado. TB 1-3: Tres muestras del gen *ssrA*. Smeg: Control negativo, PCR con ADN de *M. smegmatis*. Blanco: PCR con agua destilada.

Luego de haber verificado la amplificación del segmento, estos amplicones fueron purificados mediante columnas de sílica con un volumen final de resuspensión de 50 μL en Buffer EB. La cuantificación de los productos se realizó mediante Nanodrop® (Figura 31).

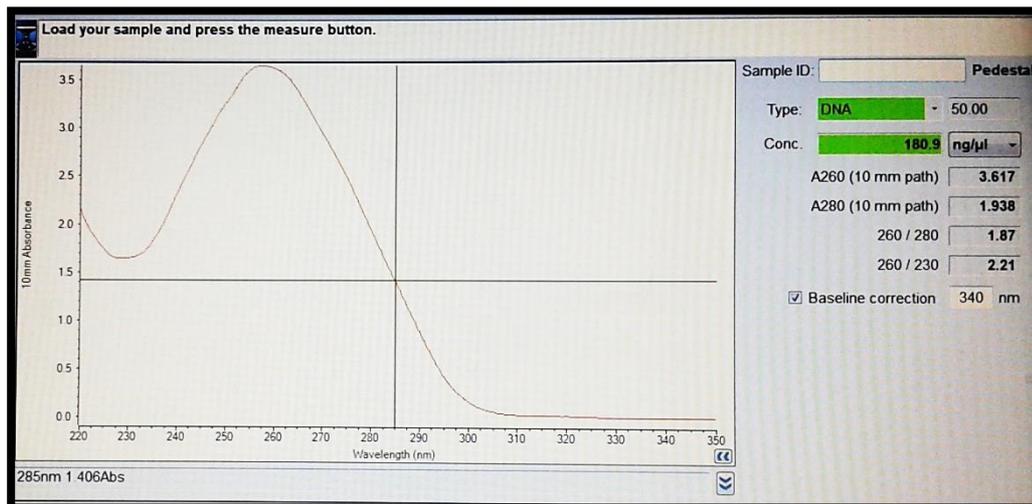


Figura 31. Espectro de absorbancia del gen *ssrA* purificado. La máxima absorbancia se observa a 260nm, y el ratio 260/282 es ~1.8, indicando buena calidad del DNA.

Como se observa, el resultado de la cuantificación resultó ser 180.9 ng/μL con un ratio 260/230 superior a 2.0, indicando que la muestra se encuentra libre de contaminación y que la adecuada purificación de los amplicones.

5.2.3 Transcripción *in vitro* de tmRNA

La transcripción *in vitro* realizada siguiendo las condiciones previamente mencionadas, fue verificada con una electroforesis usando como marcador *Riboruler RNA ladder*. El resultado de la corrida se observa en la Figura 32.

Se observa que el RNA sintetizado sin diluir se encuentra en una gran concentración, traducida en la intensidad de la fluorescencia; además, se observa que hay especies de tres tamaños distintos, lo que indica la formación de dímeros. Por otro lado, al diluir la muestra, se observa que los transcritos se desdimerizan y todos se encuentran en el tamaño correspondiente a las 602 pb.

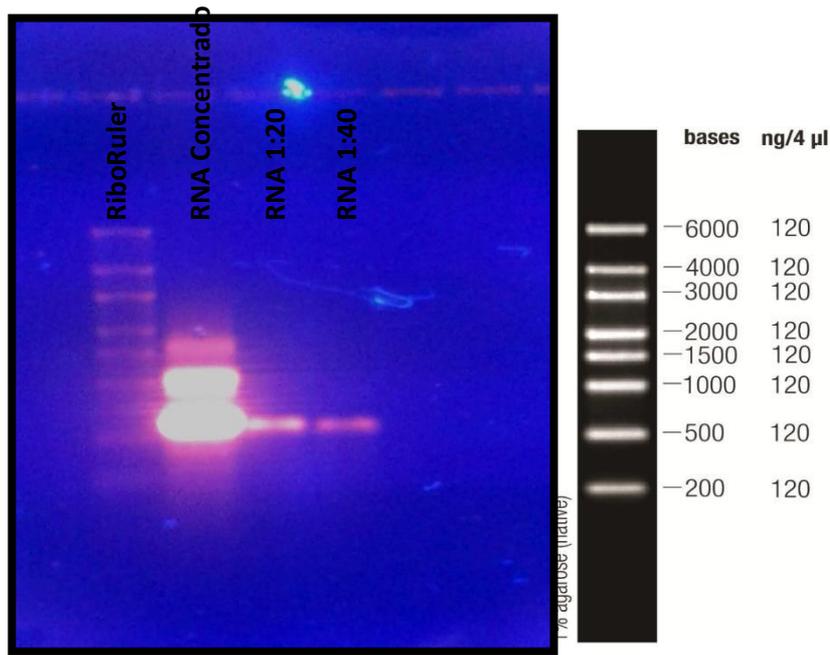


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de los transcritos de tmRNA, directo y sus diluciones. Los transcritos se encuentran en el peso correcto.

Luego de la verificación, se purificaron los transcritos mediante columnas de sílica con un volumen final de resuspensión de 50 µL de Agua libre de nucleasas. La cuantificación de los productos se realizó mediante Nanodrop® (Figura 33) y dio como resultado 3.0 µg/uL con un ratio 260/230 superior a 2.0.

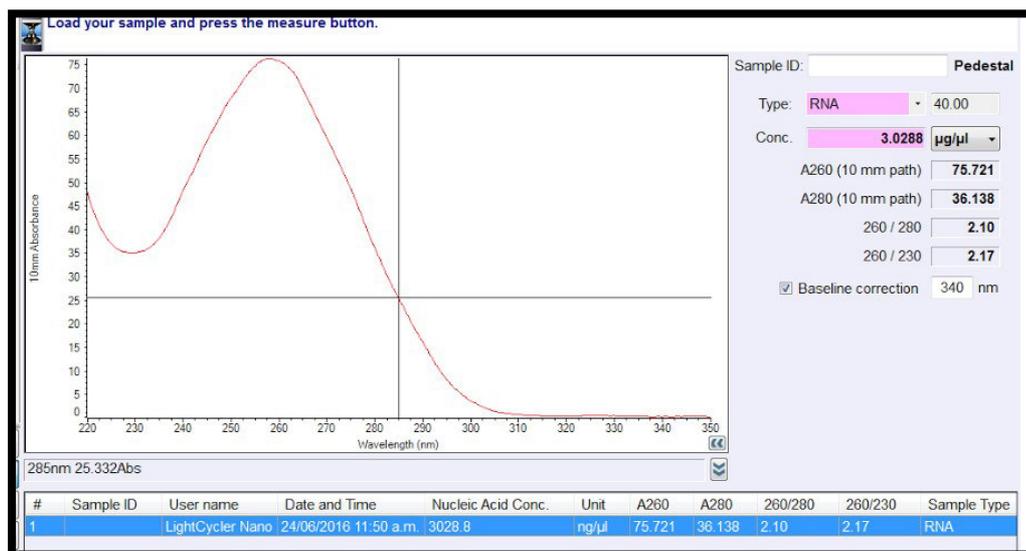


Figura 33. Espectro de absorbancia del transcrito tmRNA. Pico de absorbancia a 260 y ratio 260/280 ~2.0, indicando buena calidad del producto.

5.3 SISTEMA I.- INMUNOENSAYO UTILIZANDO NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE STREPTAVIDINA (NPMs) Y ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-RPSA

5.3.1 Ensamblaje de sistema de detección (NPM-RNA-PROTEÍNA)

El primer proceso para iniciar el ensamblaje del sistema es fijar el tmRNA biotinilado a las nanopartículas magnéticas de estreptavidina (NPMs), para ello se realizó una curva de concentración de tmRNA en picomoles (Tabla 18) para conocer la cantidad óptima que se une a las NPMs.

Tabla 18. Cantidad de tmRNA utilizado para unir a NPMs

NPMs (μL)	tmRNA _{bio} (500ng/ μL) (μL)	tmRNA _{bio} (picomoles)	Volumen de reacción (μL)
5	1	2.5	50
	2	5	
	3	7.5	
	4	10	

Una vez realizada la reacción de unión, se verificó en un gel de agarosa al 1%, los buffers antes de la interacción y después de ella (Figura 34).

Se observó que la cantidad de 5 picomoles de tmRNA por cada 5 μL de NPMs se fija casi en su totalidad, sin embargo, posteriormente se decidió trabajar en adelante con 7.5 picomoles de tmRNA a modo de exceso para asegurar la máxima cantidad fijada y este sistema tmRNA-NPMs fue resuspendido en 20 μL de Buffer Tris pH 7.5, y se almacenó hasta la siguiente interacción.

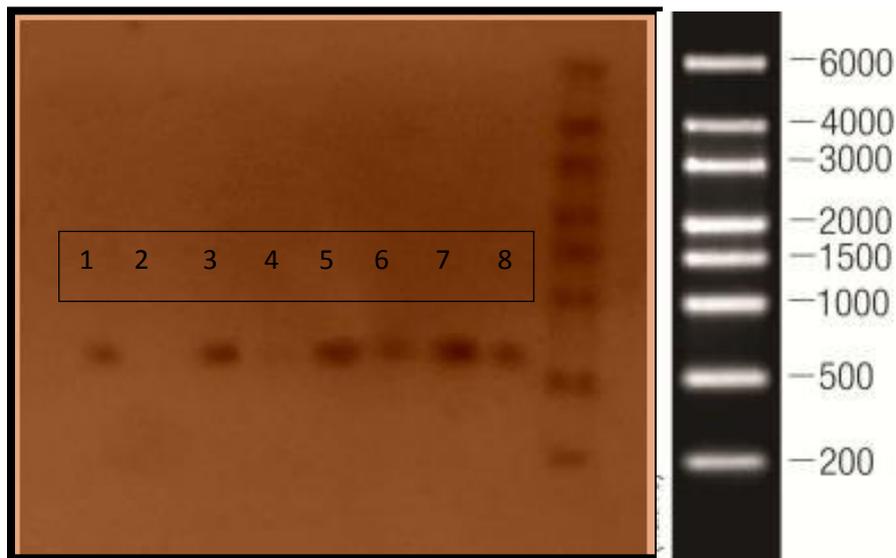


Figura 34. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%: Antes y después de la interacción con NPMs a diferentes concentraciones en picomoles.

- 1= 2.5 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 2= 2.5 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 3= 5.0 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 4= 5.0 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 5= 7.5 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 6= 7.5 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 7= 10 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 8= 10 picomoles de tmRNA después de la interacción.

Como control se preparó un lote de nanocomplejo tmRNA-NPMs, el cual servirá como control negativo para la posterior interacción.

Para realizar la segunda Interacción, se procede con la unión de la proteína RpsA al sistema tmRNA-NPMs, previamente almacenado en 20 μ L de Buffer. Para ello, el buffer fue retirado utilizando el magneto para tubos, quedando solo los nanocomplejos (~5 μ L), seguidamente se agregó la proteína a diferentes cantidades en picomoles como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Cantidad de RpsA para unir a Sistema tmRNA-NPMs.

RpsA (picomoles)	RpsA (ng)	Volumen Complejos NPM-RNA (μ L)	Volumen reacción (ul)
2.5	153	5	100
5	306	5	100
7.5	459	5	100
10	612	5	100

Para verificar que el sistema haya sido ensamblado y cuánto de RpsA se puede unir como máximo, se realizó un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) con nanopartículas (ELISA-BEADS) con HCL 0.5 M como solución de parada y la lectura se realizó en un Lector de microplacas a 490 nm de longitud de onda. En el ELISA se utilizaron las siguientes diluciones de anticuerpos (Tabla 20)

Tabla 20. Anticuerpos policlonales utilizados en el ELISA-Beads

ANTICUERPOS	DILUCIÓN	BUFFER
ANTI RPSA	1:10000	PBS+T
ANTI IgG	1:7500	

En la placa se colocaron los controles de acuerdo a la tabla 21:

Tabla 21. Esquema de controles y muestra en la placa de ELISA.

CONTROLES	NPM	RNA	PROTEINA	ANTIRPSA	ANTI IgG	
C1	X				X	Control Negativo 1
C2	X	X		X	X	Control negativo 2
C3	X	X	X		X	Control negativo 3
C4	X	X	X	X		Control negativo 4
C5				X	X	Blanco
C6	X	X	X	X	X	Muestras

Por cada cantidad en picomoles de RpsA se realizaron los 6 controles, y por cada control, dos repeticiones, como se observa en la figura 35. En la placa se observa que la fila que corresponde a la muestra con RpsA ha reaccionado, mientras que los controles negativos no reaccionan. En el caso de los tres primeros controles, se observa una pequeña reacción, atribuible probablemente a la interacción entre los anticuerpos IgG con las nanopartículas (C1), sin embargo la señal de la proteína RpsA es más fuerte en el sistema ensamblado (control 6).

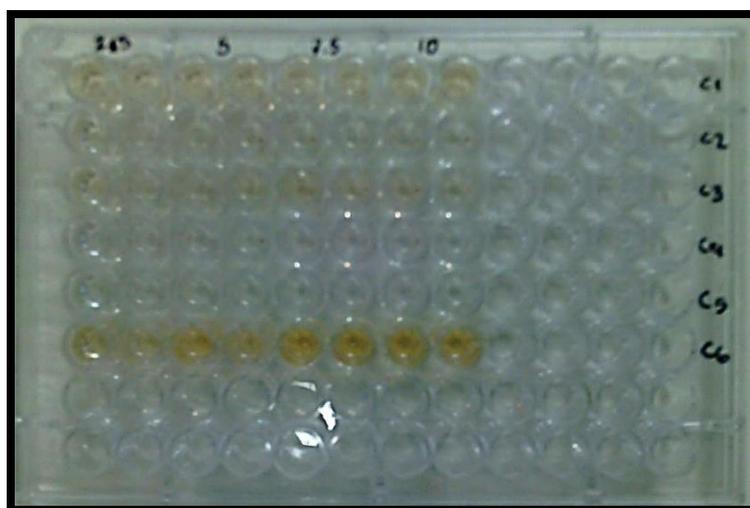


Figura 35. Placa de ELISA-BEADS con la curva de saturación de RpsA.

El promedio de las densidades ópticas obtenidas para el control negativo (C1) y por cada cantidad de RpsA utilizada, se observa en la figura 36.

Se observa que la absorbancia aumenta conforme aumenta la cantidad de proteína en el sistema de NPMs-RNA y que la saturación del sistema se alcanza con 7.5 picomoles de Rpsa, además, existe una diferencia significativa entre los grupos y control negativo sin proteína RpsA, con un $p < 0.05$.

Una vez verificado que el sistema de detección puede ser revelado mediante un ELISA, se procede a realizar la competencia entre nuestro sistema y el ácido pirazinoico.

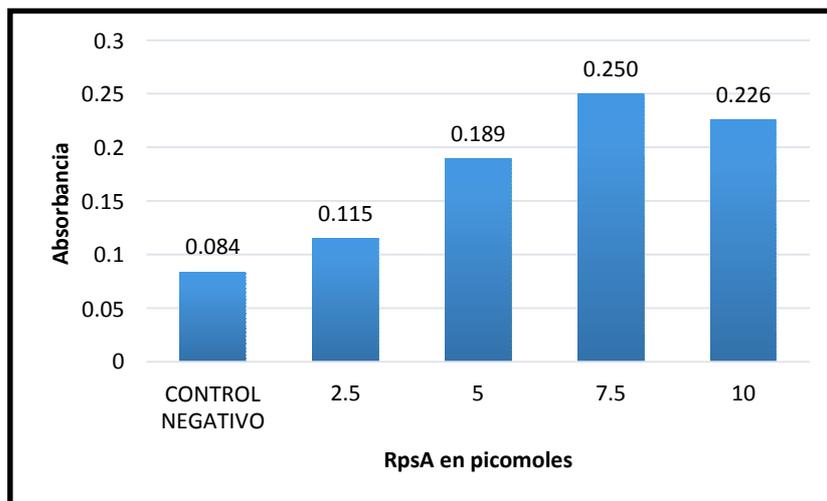


Figura 36. Curva de Saturación de RpsA en el sistema RNA-NPMs.

5.3.2 Interacción de los nanocomplejos con ácido pirazinoico comercial (Ensayo de competencia)

Una vez ensamblado el sistema I (nanocomplejos), estos fueron incubados con el POA tal y como se detalló en materiales y métodos. Finalizando la incubación, estos nanocomplejos fueron enfrentados a los anticuerpos anti rpsA en un ELISA y los resultados se detallan a continuación.

5.3.3 Detección indirecta de POA mediante ELISA

El proceso de Interacción Sistema I vs. POA, así como la detección, fueron reproducidas en tres días diferentes y con tres repeticiones cada uno.

Primer ensayo

Con este ensayo se espera que el control negativo, que no contiene las moléculas de interacción, dé una señal baja, ya que los anticuerpos deberían tener afinidad muy baja o nula. Mientras que el control positivo, que presenta NPMs+RNA+ proteína en la superficie, debería emitir una señal muy alta debido a su afinidad a los anticuerpos.

Cuando el sistema de detección (nanocomplejos) es sometido a la interacción con POA, se espera que se produzca una competencia entre el POA y el tmRNA por los sitios de unión a RpsA, de manera que se logre romper la interacción tmRNA-proteína y la RpsA sea desplazada del sistema, por lo tanto, la señal disminuye.

Al revelar el ELISA se obtuvo los siguientes resultados:

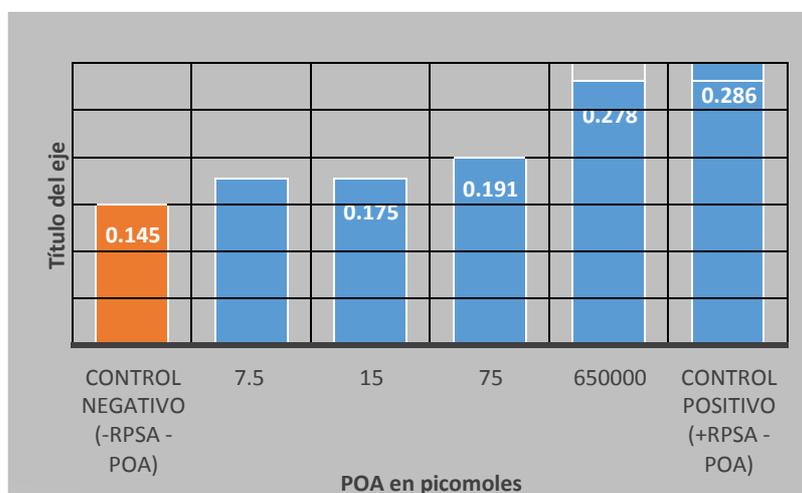


Figura 37. Competencia entre POA y tmRNA por sitios unión a RpsA.

Se realizó un análisis de varianzas de un solo factor, para calcular si existe diferencia significativa entre los grupos, y se obtuvo un $p < 0.05$. Según la figura 37, se puede observar que al agregar POA en diferentes concentraciones, la absorbancia disminuye con respecto al control positivo que no fue tratado con POA, y, asimismo, la absorbancia se asemeja al control negativo que no contiene RpsA. Por lo tanto, el POA ha desplazado a la proteína y se logró detectar mediante ELISA.

Segundo ensayo

Se realizó el mismo procedimiento y se obtuvo el siguiente resultado:

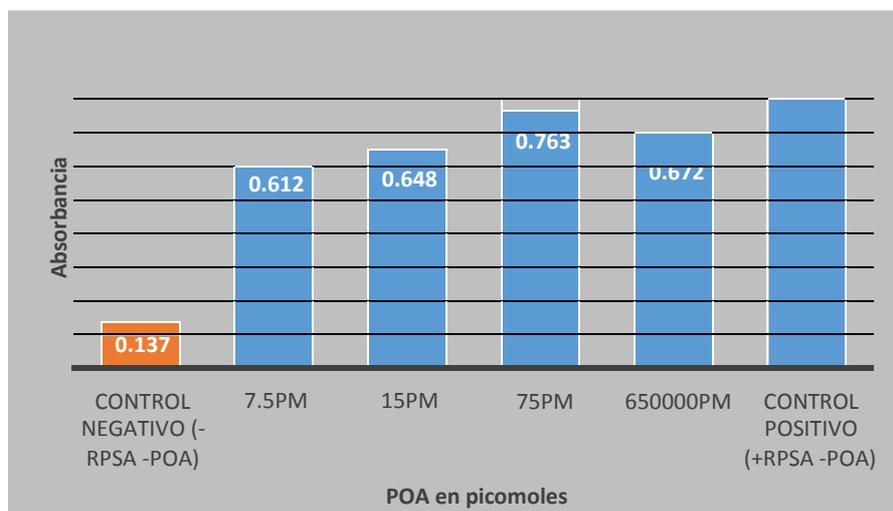


Figura 38. Repetición de la Competencia entre POA y tmRNA por sitios unión a RpsA.

De la figura notamos que POA ya no desplaza a la proteína RpsA como en el primer ensayo ya que no existe diferencia significativa entre el control positivo y los tratamientos con POA con un $p=0.4608$, mientras que la diferencia entre el control negativo y los tratamientos con POA es altamente significativa con un $p<0.05$.

Tercer ensayo

Se decidió repetir el experimento probando tres distintos pHs para ver si se tienen mejores resultados y utilizando 100x POA con respecto al sistema NPM+RNA+PROTEÍNA.

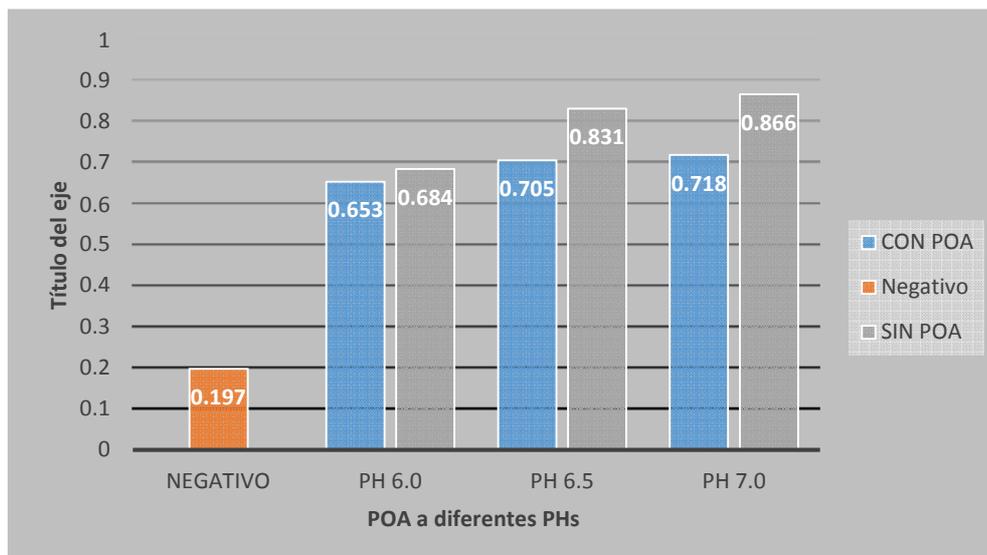


Figura 39. Competencia entre POA y tmRNA por sitios de unión a RpsA a tres pHs.

Se realizó la prueba T student para cada pH y se obtuvo diferencia significativa entre el sistema que fue tratado con POA y el que no fue tratado con POA a pH 7.0 con un valor $p < 0.05$, lo que nos corrobora que a $pH > 7.0$ la interacción con POA y RpsA es la óptima para este sistema.

Se realizó una última repetición para verificar que el sistema elaborado sea reproducible.

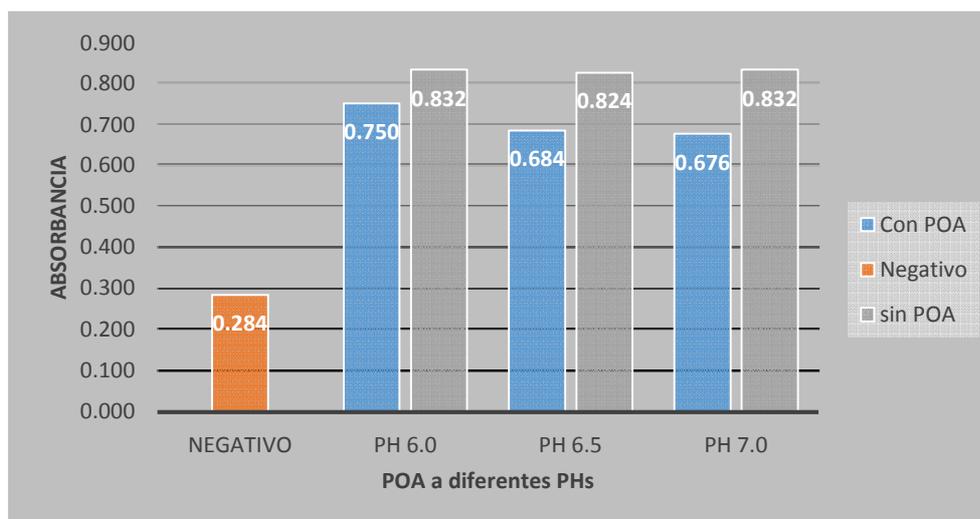


Figura 40. Repetición de la Competencia entre POA y tmRNA por sitios de unión a RpsA a tres pHs.

De igual manera al realizar la prueba T se obtuvo solo diferencia significativa entre el control sin POA y el tratamiento a pH 7.0 con un valor $p < 0.05$.

Sin embargo, a pesar que se mantuvo las condiciones similares en los cuatro ensayos, se puede observar que el rango de variabilidad en los datos de absorbancia entre ensayos es alto, por lo tanto, no resulta ser muy confiable.

5.4 SISTEMA II.- INMUNOENSAYO UTILIZANDO NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE COBALTO (NPMc) Y ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-RPSA

5.4.1 Ensamblaje de sistema de detección (NPM-PROTEÍNA-RNA)

El primer proceso para iniciar el ensamblaje del sistema, es fijar la proteína RpsA a las nanopartículas magnéticas de Cobalto (NPMc), mediante sus colas de Histidina. Luego de realizar la metodología descrita previamente, se midieron los sobrenadantes antes de la interacción RpsA-NPMc y después de ella. Se observa que cuando se trabaja con 15 μL y 25 μL de NPMc, hay mayor interacción entre la proteína y las nanopartículas ya que la cantidad de proteína en el sobrenadante disminuye (Gráfica 41).

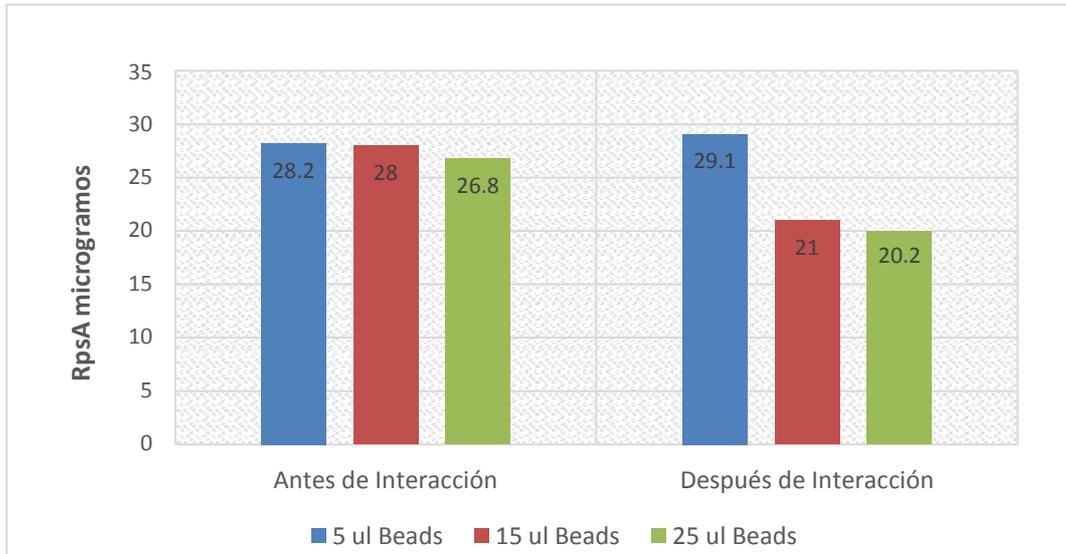


Figura 41. Unión de 20 µg RpsA a diferentes volúmenes de NPMc.

Luego se evaluó dos cantidades de RpsA con una cantidad fija de 15 µL de NPMc a diferentes temperaturas, 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C, durante 30 minutos (Figura 42). Se observa que con 15 µL de NPMc y 15 µg de RpsA hay mayor interacción. Por lo tanto se concluye que la mayor interacción se da cuando el volumen de nanopartículas y cantidad de proteína RpsA son proporcionales 1:1.

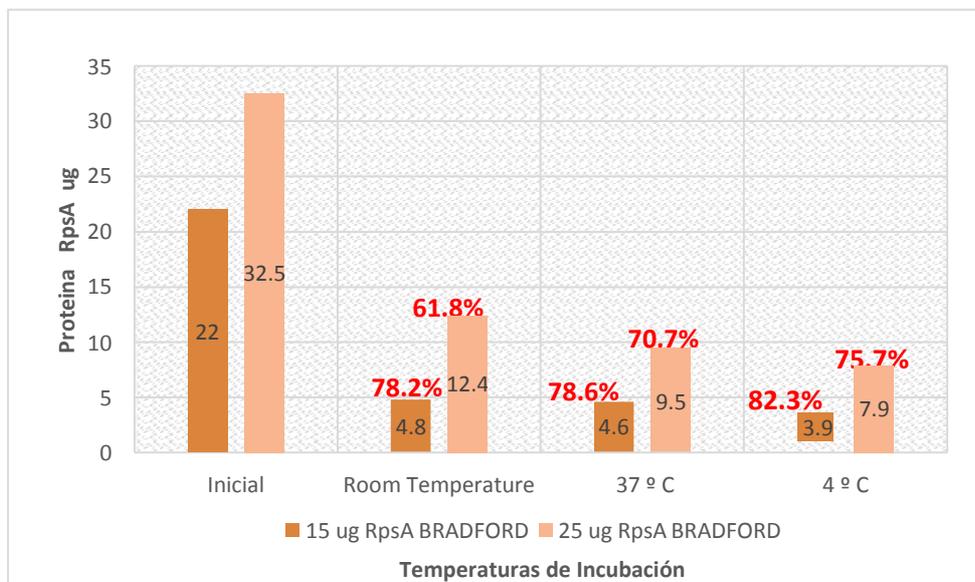


Figura 42. Unión de dos diferentes cantidades de RpsA a 15 uL de NPMc.

Una vez obtenida esta proporción, se procedió a evaluar las mejores condiciones para propiciar la interacción.

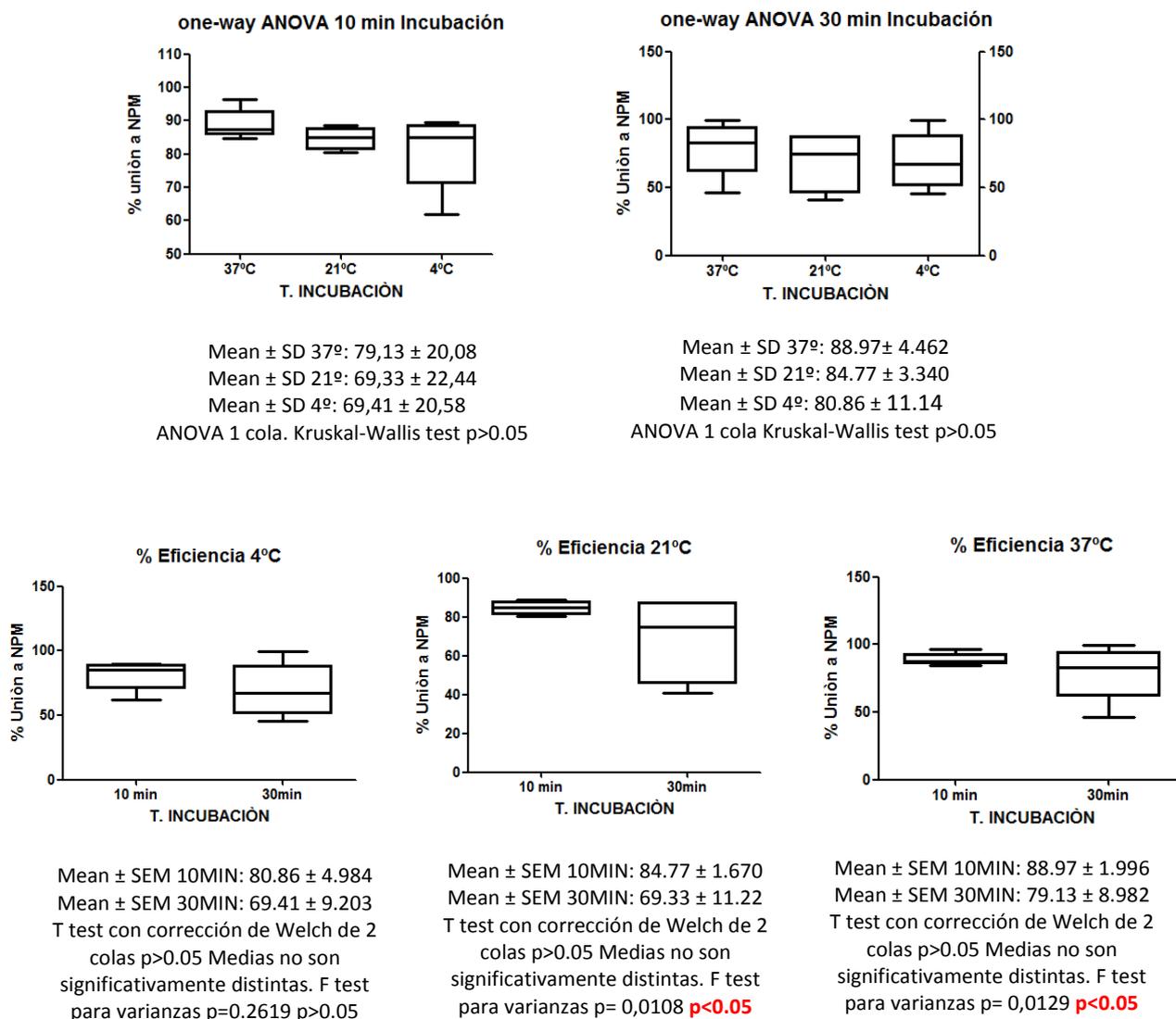


Figura 43. Análisis estadístico de las condiciones para el ensamblaje del sistema de detección.

La temperatura que brindó menos variabilidad y mayor porcentaje de unión fue a temperatura ambiente (21 °C) con una incubación durante 10 minutos. Pasado este tiempo la variabilidad incrementa en todas las temperaturas. Adicionalmente, ya con las condiciones estandarizadas, y sabiendo que la proporción 1:1 (NPMc:RpsA)

es la adecuada, se realizó una curva de saturación de RpsA para conocer cuánto máximo se une a 5 μL de NPMc, partiendo de 2.5 μg de proteína.

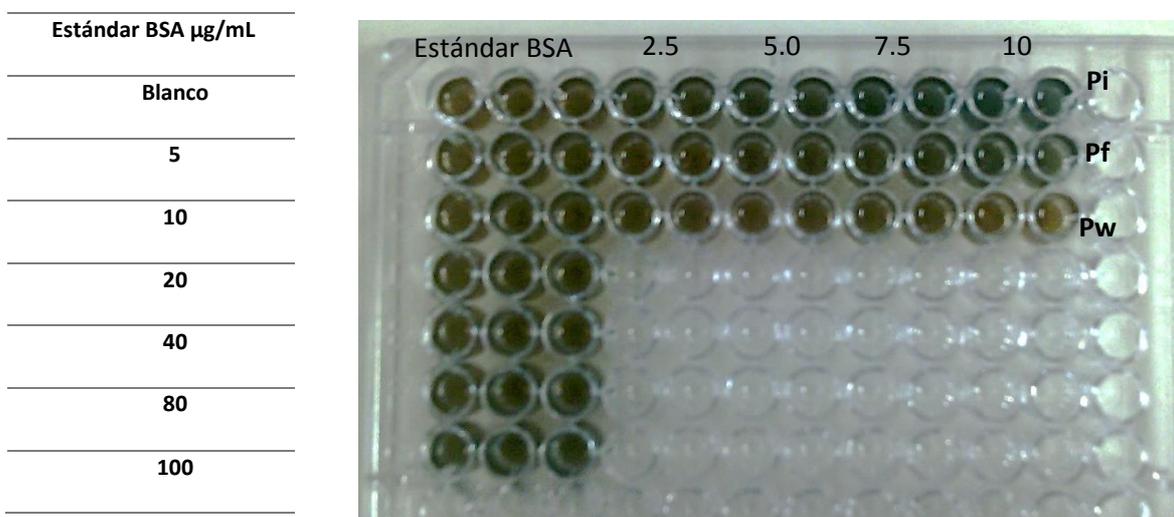


Figura 44. Método de Bradford para detectar proteínas. Utilizado para cuantificar la curva de saturación de RpsA en las nanopartículas.

La curva de saturación mostrada fue leída en un espectrofotómetro y se realizó el cálculo con la fórmula especificada en los métodos. La cantidad de saturación de proteína RpsA que soporta 5 μL de NPMc como máximo fue 6 μg cuando se hacen interaccionar de 7.5 μg a 10 μg de proteína. Se decidió trabajar con 10 μg de proteína por cada 5 μL de NPMc, para asegurar la máxima saturación de la nanopartícula.

Para iniciar con el ensamblaje, en un tubo se realizó la interacción proteína-MPNc y se resuspendió en un volumen final de 50 μL de buffer.

Tabla 22. Cantidades utilizadas para realizar la interacción RpsA-NPMc.

Volumen de beads (μL)	Cantidad de Proteína (μg)	Porcentaje de Unión (%)	Complejos Prot:beads (μg)	Volumen resuspensión (μL)	Volumen retirado (otro tubo) (μL)	Proteína / tubo (ng)
5	10	61.4	6.2	50	5	600

Con este dato se procedió a realizar la segunda interacción con el tmRNA sin biotinilar:

Tabla 23. Cantidades usadas en la segunda interacción RNA-Nanocomplejos

Volumen de complejos / tubo (μL)	5	5	5	5
Complejos (pmoles)	~10	~10	~10	~10
Volumen tmRNA (μL)	1	2	3	4
tmRNA (picomoles)	2.5	5	7.5	10

Para verificar si ha ocurrido la unión RpsA con el tmRNA, se corrió un gel de agarosa 1%:



Figura 45. Electroforesis en gel de Agarosa al 1%: Antes y después de la interacción con RpsA a diferentes concentraciones en picomoles.

- 1= 2.5 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 2= 2.5 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 3= 5.0 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 4= 5.0 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 5= 7.5 picomoles de tmRNA antes de la interacción.
- 6= 7.5 picomoles de tmRNA después de la interacción.
- 7= 10 picomoles de tmRNA antes de la interacción.

Se observa que sí hay interacción entre el tmRNA y la proteína, *in vitro* en este sistema, aunque la banda correspondiente a 5 picomoles de tmRNA no haya desaparecido, puede tratarse de una falla mecánica durante los pipeteos o que sí haya habido interacción pero en menos proporción.

Debido a que, para este sistema también se realizó dos ensayos en diferentes días con tres repeticiones cada uno, se decidió verificar el ensamblaje del sistema II antes de cada ensayo, con NanoDrop.

Primer ensayo

Tabla 24. Lecturas de las cantidades de RNA en los sobrenadantes antes y después de la reacción de unión Proteína-RNA.

Sample ID	User name	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type
Lectura Inicial	LightCycler Nano	20.3	ng/μL	1.97	1.02	RNA
Lectura Final Rep 1	LightCycler Nano	6.7	ng/μL	2.41	2.98	RNA
Lectura Final Rep 2	LightCycler Nano	7.4	ng/μL	2.48	2.16	RNA
Lectura Final Rep 3	LightCycler Nano	6.9	ng/μL	2.24	2	RNA

Se puede verificar que antes de la unión Proteína-RNA (Lectura inicial), la concentración en el sobrenadante es 20.3 ng/μL y luego de la reacción de unión (Lectura final), la concentración en los sobrenadantes disminuye a 6-7 ng/μL, lo cual indica que las $\frac{3}{4}$ partes de RNA total, se unieron a la proteína.

Segundo ensayo

Igualmente, antes de realizar la interacción con POA, se verificó mediante lecturas en NanoDrop cuánto aproximadamente de tmRNA se unió a la proteína RpsA.

Tabla 25. Lecturas de las cantidades de RNA en los sobrenadantes antes y después de la interacción

Sample ID	User name	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	Sample Type
Lectura Inicial	LightCycler Nano	20	ng/μL	1.95	0.99	RNA
Lectura Final Rep 1	LightCycler Nano	6.1	ng/μL	2.44	3.49	RNA
Lectura Final Rep 2	LightCycler Nano	6.5	ng/μL	2.49	2.61	RNA
Lectura Final Rep 3	LightCycler Nano	6.3	ng/μL	2.58	2.78	RNA

Se observa que antes de la unión Proteína-RNA (Lectura inicial), la concentración en el sobrenadante es 20.0 ng/μL y luego de la reacción de unión (Lectura final), la concentración en los sobrenadantes disminuye a 6 ng/μL, lo cual indica que las $\frac{3}{4}$ partes de RNA total, se unieron a la proteína.

5.4.2 Interacción de los nanocomplejos con ácido pirazinoico comercial

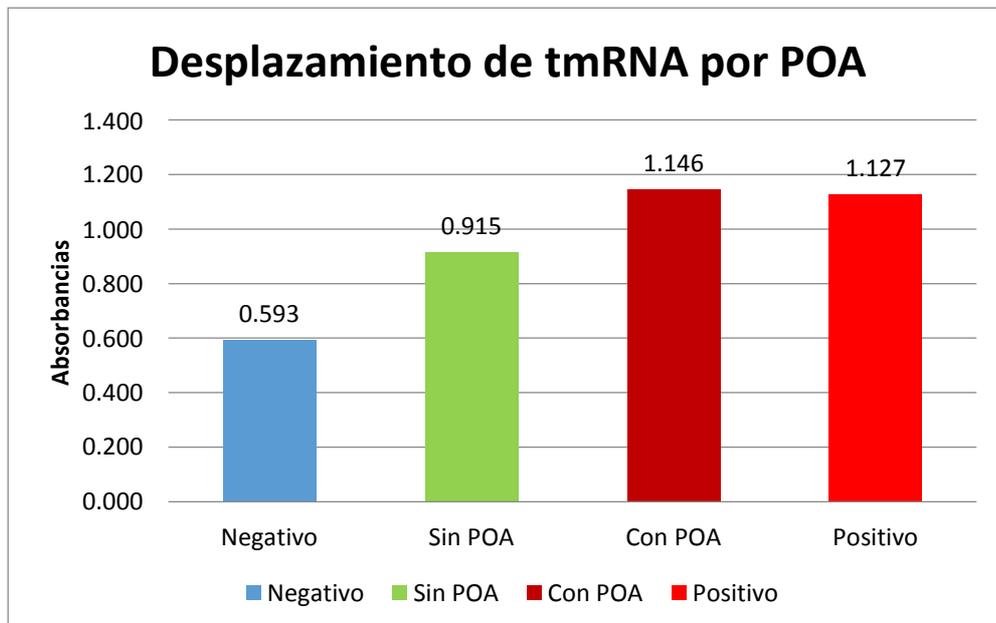
Luego de la verificación, los tubos correspondientes a las 3 repeticiones que contenían aproximadamente 7.5 picomoles del sistema, se incubaron con 100X POA (750 picomoles) y las otras tres repeticiones se incubaron en el mismo buffer pero sin POA según las condiciones mencionadas previamente.

De estos tubos (10 μL) se tomaron tres alícuotas de 2.5 μL cada una y se colocaron en la placa para ELISA de 96 pocillos previamente bloqueada, siguiendo los pasos ya descritos.

5.4.3 Detección indirecta de POA mediante ELISA

Primer ensayo

Con este ensayo se espera que el control negativo que consta de solo NPMc dé una señal baja o nula. El control positivo en este ensayo está compuesto por NPMc + Proteína, por lo tanto la señal que da es alta. Por otro lado, el tratamiento sin POA que consta del sistema completo (NPMc+RpsA+RNA) debería emitir una señal baja, ya que el tmRNA estaría bloqueando la interacción Proteína-Anticuerpo. Mientras, que el tratamiento con POA, que consta del sistema completo (NPMc+RpsA+RNA) debería emitir una señal alta, similar al control positivo, ya que al competir el POA por la unión con RpsA, el tmRNA debería ser desplazado y la proteína quedaría con su superficie libre para ser detectada por los anticuerpos.

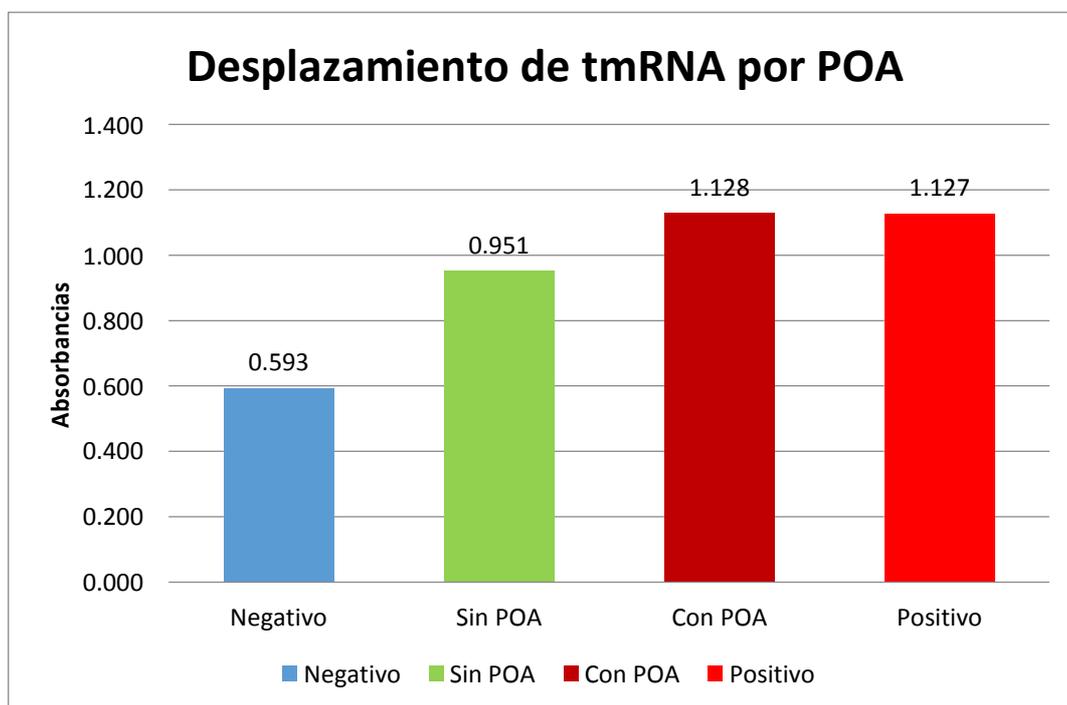


Gráfica 12. Competencia entre POA y tmRNA por sitios unión a RpsA.

Al realizar el revelado por ELISA se obtuvo la gráfica que nos muestra las medias de las tres repeticiones aleatorias, para el grupo Con POA (CV =7.5%) y Sin POA (CV=18%). Asimismo, Se realizó la prueba T para el grupo Sin POA y Con POA, obteniendo diferencia significativa con valor $p < 0.05$, lo que quiere decir que el tmRNA ha sido desplazado por el POA.

Segundo ensayo

La gráfica nos muestra las medias de las tres repeticiones aleatorias, para el grupo Con POA (CV =4.3%) y Sin POA (CV=10.7%). Asimismo, se realizó la prueba T para el grupo Sin POA y Con POA, obteniendo diferencia significativa con valor $p < 0.05$, lo que quiere decir que el tmRNA ha sido desplazado por el POA.



Gráfica 13. Competencia entre POA y tmRNA por sitios unión a RpsA.

6. DISCUSIÓN

La pirazinamida (PZA) tiene una acción exitosa frente a la tuberculosis latente, sin embargo, en el Perú existe un crecimiento de casos de MultiDrogoResistencia y un tercio de estos casos de TB-MDR, son resistentes a PZA (Castillo et al. 2009). En este sentido, es importante determinar la susceptibilidad de PZA en la etapa temprana del tratamiento, para proporcionar un régimen seguro y mejorar el tratamiento. Sin embargo, los ensayos de susceptibilidad a PZA son por lo general difíciles de realizar y están lejos de ser adecuados, es por ello que los esfuerzos apuntan a optimizar o implementar nuevos métodos. Los ensayos de susceptibilidad a la pirazinamida basados en el cultivo son difíciles de llevar a cabo, debido a la dificultad de controlar la capacidad de tamponamiento de los medios de cultivo, el uso de pH del medio ácido que inhibe el crecimiento y los inóculos excesivamente grandes que reducen la actividad de Pirazinamida, lo que conduce a una falsa resistencia (Chang et al. 2011).

Entre los métodos más difundidos en el Perú se encuentran el test de Wayne, el cual es ampliamente usado para detectar susceptibilidad a PZA, este ensayo cuantifica la metabolización de PZA de *M. tuberculosis* y la producción de POA mediante espectrofotometría. Sin embargo los períodos de incubación llegan hasta los 7 días (Meinzen et al. 2016). Otro de los métodos más importantes es el MODS (Microscopic-Observation Drug-Susceptibility) desarrollado por la peruana Luz Caviedes en el 2000, en el que se puede diagnosticar de manera considerablemente rápida, eficaz y sobre todo económica infección por TB y resistencia a drogas, a través de la observación de la morfología de los bacilos en el medio líquido de cultivo (Caviedes et al. 2000), sin embargo, aun así se requiere entre 7 a 10 días para su diagnóstico.

Tomando en cuenta que el diagnóstico temprano de resistencia es importante para lograr un tratamiento adecuado, es que en este estudio se planteó desarrollar un método molecular e inmunológico para detectar susceptibilidad a PZA, basándose en las propiedades que tiene el POA de interrumpir la interacción RpsA-tmRNA.

6.1 *Producción de proteína RpsA*

La complejidad de la función de la RpsA ha conllevado a que su purificación y análisis haya resultado más laboriosa que con otras proteínas. El principal problema observado fue el relacionado a la contaminación con ARN, esto debido a que la proteína RpsA, es una proteína Ribosomal (S1), la cual se encuentra asociada a los Ribosomas para promover el adecuado desempeño del tmRNA en la trans-traducción (Duval et al. 2013) así como en el ensamblaje de los complejos ribosomales (Korobeinikova et al. 2012). Para lograr una adecuada purificación y aislamiento de los ribosomas, el procesamiento de proteínas ribosomales se realiza a través de tratamientos denaturantes, como el uso de Guanidina 6 M (Malygin et al. 2003) o Úrea (Saguy et al. 2007). Esta fue la primera opción de purificación alternativa realizada en este trabajo, sin embargo, a pesar de que el tratamiento denaturante fue exitoso, este no resulta ser muy confiable, a menos que pueda ser evaluado a través de técnicas como el Dicroísmo circular, el cual permite realizar estudios de plegamiento al caracterizar la estructura secundaria proteica (Clarke 2011). En la segunda metodología alternativa, se basó sobre la propiedad de digestión que poseen las enzimas ribonucleasas, las cuales realizan el clivaje de los enlaces P-O5' de un ARN (Messmore et al. 1995) y que por lo tanto, podrían eliminar restos de RNA acoplados a la proteína RpsA. De acuerdo a los resultados, la preincubación del extracto proteico crudo con la RNasa A permitió la adecuada

limpieza de la proteína, la cual se evidenció a través del Native-PAGE al disminuir significativamente la intensidad de fluorescencia del Bromuro de Etidio, tal y como lo reporta Kang, Lee, y Gorenstein (2007) quienes realizan la purificación de una proteína con alta afinidad a RNA (Ribonucleoprotein C1) utilizando RNasa logrando remover exitosamente la contaminación por RNAs. Asimismo, en las lecturas en NanoDrop, se observa que el ratio 260/280 es menor 1, indicando disminución de RNA en la muestra (Thermo Scientific 2012).

6.2 Producción de tmRNA y Biotinilación

La síntesis de tmRNA in vitro fue altamente eficiente, la concentración obtenida a partir de un microgramo de DNA template fue de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen total de 50 μL , lo cual indica una eficiencia de 150 veces la concentración inicial del template. Esta técnica es un procedimiento sencillo que permite la síntesis dirigida a partir de un template de ADN que debe incluir una secuencia promotora de bacteriófago (por ejemplo, del colifago T7) *upstream* de la secuencia de interés seguido por transcripción usando la ARN polimerasa correspondiente (Beckert y Masquida 2011).

El proceso de biotinilación del tmRNA no pudo ser corroborado, ya que para confirmar que la molécula se encuentre biotinilada o etiquetada en su extremo 3' es necesario utilizar un equipo de quimioluminiscencia, con el cual no se cuenta, sin embargo, midiendo la concentración de RNA en el sobrenadante al interactuar con las NMPs se puede detectar cuánto se ha unido a las nanopartículas y visualizar en un gel de agarosa. La proporción de unión máxima que se encontró fue de 1:1 es decir, 5 picomoles de RNA con 5 μL de NPMs

6.3 *Ensamblaje de los sistemas de detección de POA*

El uso de nanopartículas en nanobiotecnología aplicada a la medicina ha ido incrementando en los últimos años, sin embargo, el diseño de sistemas ensamblados en NP, es decir, NP funcionalizadas que se apliquen para la detección, es un campo poco explorado. En este trabajo el ensamblaje de los sistemas I y II para detección de POA, se realizó sobre nanopartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y cobalto, respectivamente y representa un trabajo nuevo en área del diagnóstico en Tuberculosis.

El uso de nanopartículas como las de Oro (AuNP) o los Quantum Dots, para la detección tiene más frecuencia y difusión ya que son métodos sensibles que permiten la identificación de biomarcadores tales como proteínas y ácidos nucleicos en una determinada enfermedad (Agasti et al. 2010), sin embargo, el acoplamiento de otras moléculas así como de ácidos nucleicos o proteínas en estos sistemas es menos frecuente. El sistema I, consistió en conjugar primero el tmRNA biotinilado sobre las nanopartículas recubiertas con estreptavidina y luego conjugar la proteína RpsA con el tmRNA ya fijado, este tipo de sistema, en el que se conjuga un ácido nucleico con una NP, se puede comparar con el diseño de otros sistemas de detección en el que se funcionaliza la nanopartícula con un ácido nucleico de captura, sin embargo, estos sistemas cumplen su función de detección al hibridizar estos ácidos nucleicos con los DNAs o RNAs *target*, en una técnica llamada hibridación tipo sándwich (Ranki et al. 1983). Un ejemplo de ello, es el novedoso Magneto-DNA, el cual consiste en nanopartículas magnetizada conjugadas con oligonucleótidos (Microesferas) las cuales capturan un determinado DNA *target* de cadena simple (Chung et al. 2013). Sin embargo, no todos se acoplan a ácidos nucleicos sino a otras moléculas por ejemplo, los quantum Dots se acoplan al

polietilenglicol-pilicapro lactona, y pueden detectar proteínas, anticuerpos o alguna droga (Maysinger et al. 2015).

El Sistema II fue ensamblado sobre NPM de cobalto, cuya aplicación original es aislar y purificar proteínas mediante sus colas de histidinas capturadas por los iones cobalto que recubren la NP (Zhang et al. 2013), sin embargo, el sistema diseñado en este trabajo planteó el uso de estas NPM como soporte para el ensamblaje. Por lo tanto, el sistema II consistió en acoplar primero una proteína a las NPM y luego realizar la conjugación del tmRNA a la proteína. El uso de proteínas junto con nanopartículas puede darse en dos niveles, el primero en el que las proteínas forman parte de la misma nanopartícula, es decir, esta NP está formada de un nanomaterial proteico, el cual tiene la ventaja de ser biodegradable en comparación con otros nanomateriales, éstas pueden incorporarse en el sistema vivo y servir como *delivery* de drogas para diferentes enfermedades (Jahanshahi y Babaei 2008). El segundo nivel es en el que ciertas proteínas son acopladas a la NP ya diseñada y permiten la detección de algún antígeno o molécula *target*. El sistema II producido encajaría dentro de este tipo de ensamblaje, sin embargo, no hay precedentes de algún sistema similar al producido aquí para detectar tuberculosis resistente, no obstante, existen algunos dispositivos de detección similares al sistema II en algunos aspectos, por ejemplo, el dispositivo de flujo lateral (LFD) basado en AuNP acopla en su superficie anticuerpos IgG de conejo y oligonucleótidos de DNA para la detección de biomarcadores en fluidos biológicos (Mao et al. 2014). Asimismo, el dispositivo para detectar daño renal, MicroUrin Nanoparticle (uUNP) utiliza el mecanismo de detección por anticuerpos similar al sistema II, sin embargo, este dispositivo no tiene acoplado una proteína de

estructura general sino un anticuerpo específico y luego detecta el antígeno utilizando otro anticuerpo secundario (Chung et al. 2015).

6.4 *Inmunoensayo con el Sistema I*

Se realizaron cuatro ensayos de competencia con POA comercial, con tres repeticiones cada uno; el primer y segundo ensayo se llevaron a cabo con una curva ascendente de concentración de POA, empezando desde 7.5 picomoles, equimolar a la cantidad de nanocomplejos, hasta 86 mil veces dicha cantidad, este valor fue escogido como valor extremo correspondiente a 600uM (800 µg/mL), el cual es detectado por un test de Wayne en presencia de RpsA (Reinoso 2012). En el primer ensayo se encontró diferencia altamente significativa entre el control sin POA (Positivo para RpsA) y los tratamientos con POA (Desplazamiento de RpsA) a las concentraciones de 5, 7.5 y 15 picomoles, este alto rango de detección y sensibilidad es comparable con otros inmunoensayos (Wang et al. 2006) e incluso Kits de detección en el que el límite de detección es <1pmol (Andric et al. 2007; Brown et al. 2016).

Para comprobar la reproducibilidad del ensayo, se realizaron repeticiones en días diferentes, sin embargo, los resultados fueron variables. Al notar esta variabilidad se decidió evaluar el pH del sistema y se encontró que a pH neutro la diferencia era significativa, pero seguía siendo no reproducible. En este sentido, una de las probables causas de esta variabilidad entre ensayos sea debido a uso de anticuerpos policlonales (Pac), si bien es cierto que el uso de Pac tiene ventajas en cuanto a rapidez y facilidad de obtención, así como su economía (Lipman et al. 2005), estos anticuerpos pueden detectar múltiples epítopes y por lo tanto disminuir su especificidad al provenir de una población heterogénea (Nelson et al. 2000).

Según Yang et al. (2015) la constante de disociación calculada para el POA y la RpsA se encuentra en el orden de Micromolar, siendo = $2.81 \pm 0.67 \mu\text{M}$, pero esta afinidad se localiza en el extremo C-terminal de la proteína. Ello estaría implicando que para que exista una adecuada disrupción de la interacción RNA- PROTEÍNA, el extremo C-terminal debe estar expuesto en una posición tal que interactúe con POA, lo cual no puede asegurarse en este sistema.

6.5 *Inmunoensayo con el Sistema II*

En el Sistema II, el orden del ensamblado fue distinto y se utilizaron las NPM de cobalto, en las cuales se fijaron en primer lugar la proteína RpsA, seguida del tmRNA.

Se realizaron dos ensayos de competencia con POA comercial en días distintos con tres repeticiones cada uno, se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos *Con POA* y *Sin POA*, aunque esta diferencia no fue muy amplia, no fue tan variable como en el primer sistema. La diferencia observada entre los tratamientos no fue mayor a 1.2 *folds*, lo cual podría ser considerado bajo, ya que se ha recomendado de manera general que exista 3 *folds* de diferencia entre tratamientos y el control (BioReba AG. 2011). Sin embargo, este método de análisis resulta ser muy restrictivo, por lo que se han planteado otros métodos más sofisticados, como por ejemplo el uso de la media de los controles más/menos 3 veces la desviación estándar de los mismos controles, es decir $X \pm 3SD$ (Lardeux et al. 2016) , siendo significativamente distinto cualquier valor que no toque dicha área. Utilizando este tipo de análisis, los dos ensayos realizados resultan totalmente significativos.

El hecho de que la variabilidad haya sido menor puede deberse a la disposición espacial de la proteína. El clonamiento del gen RpsA en el plásmido pET28a, se realizó colocando una cola de seis histidinas en el extremo amino terminal como lo detalla Antiparra (2016). Esta disposición, ha permitido que la interacción RpsA-NPMc se dé a través de estas colas de histidinas, dejando expuesto por lo tanto, el lado carboxilo terminal de la proteína, siendo de esta manera más propensa a la interacción con el ácido pirazinoico.

La falta de congruencia entre los dos inmunoensayos realizados, lo cual revela la complejidad de la interacción POA-RpsA, es también palpable en investigaciones internacionales. La información previamente publicada por los autores Shi et al. en el 2011 y Yang et al. en el 2015, afirmaban que el Kd del POA con RpsA es menor a los 3uM, es decir, tendrían una afinidad altísima; así como, Fan et al. este año 2017, quienes reportaron que el Kd del tmRNA con RpsA es 13.6uM, confirmando que el POA sigue siendo más afín al RpsA; con esto se esperaría obtener un ensayo de competencia fuerte, en el que el POA desplace sin problemas al tmRNA, sin embargo, ello no fue observado en estos ensayos. Por otro lado, este año fue publicado un trabajo en el que se reporta que la afinidad del POA por la RpsA es mucho menor que la del tmRNA, concluyendo que el POA no podría interrumpir la interacción RpsA-tmRNA y por ende no inhibiría la trans-traducción (Dillon et al. 2017). Aunque dicho trabajo se realizó en una cepa distinta a la de este trabajo y no se señala algún proceso de purificación que eliminase restos de RNA, dicha afirmación revela que la posible interacción entre el POA y la proteína RpsA es mucho más compleja de describir y probablemente implique otros factores que estarían generando variación en los resultados, lo cual ha sido corroborado con este trabajo.

7. CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados fueron realizados con ácido pirazonoico comercial, bajo la premisa de sentar las bases preliminares de un inmunoensayo que pueda detectar POA en bajas concentraciones y de manera rápida y eficaz y representa un primer esfuerzo en el desarrollo de nuevas tecnologías para detectar resistencia a drogas antituberculosas de primera línea como la Pirazinamida.

- Con este trabajo se logró diseñar dos inmunoensayos para detectar ácido pirazonoico comercial, realizando un ensamble de nanopartículas magnéticas, proteína Ribosomal RpsA y tmRNA, de manera estable.
- Los sistemas ensamblados, lograron detectar cantidades de POA en el rango de los picomoles, lo cual indica su alta sensibilidad.
- El Sistema I no resultó ser reproducible, sin embargo su sensibilidad fue muy alta, logrando detectar hasta 5 picomoles de POA.
- El Sistema II que sí logró reproducirse, no fue tan sensible como el primer sistema, pues logró detectar 100 veces los picomoles del sistema (75 pm de nanocomplejos), es decir, 750 picomoles de POA.

8. RECOMENDACIONES

- Los dos inmunoensayos no fueron congruentes, observándose variabilidad y falta de reproducibilidad, por lo tanto se recomienda realizar más estudios sobre el mecanismo de interacción entre el ácido pirazinoico y la proteína Ribosomal RpsA, para sentar correctamente las bases moleculares del mecanismo de acción del POA.
- Debido a que este trabajo se realizó con POA comercial, se recomienda realizar la validación utilizando ácido pirazinoico de cultivos de esputos de pacientes con tuberculosis y pacientes controles sanos, con una muestra poblacional significativa.
- Se recomienda repetir estos ensayos utilizando anticuerpos AntiRpsA de origen monoclonal, para ver si estos logran disminuir la variabilidad de los resultados.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agasti, Sarit S., Subinoy Rana, Myoung-Hwan Park, Chae Kyu Kim, Chang-Cheng You, y Vincent M. Rotello. 2010. «Nanoparticles for detection and diagnosis». *Advanced Drug Delivery Reviews, Targeted Delivery Using Inorganic Nanosystem*, 62 (3):316-28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.004>.
2. Amanfu, William. 2006. «The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest». *Tuberculosis, International Workshop on Tuberculosis Vaccines*, 86 (3):330-35. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.01.007>.
3. Andric, Silvana A., Marija M. Janjic, Natasa J. Stojkov, y Tatjana S. Kostic. 2007. «Protein Kinase G-Mediated Stimulation of Basal Leydig Cell Steroidogenesis». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 293 (5):E1399-1408. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00482.2007>.
4. Antiparra, Ricardo. 2016. «Efecto de la presencia de la proteína RpsA de Mycobacterium tuberculosis en la susceptibilidad a pirazinamida en Mycobacterium smegmatis». Master, Universidad Peruana Cayetano Heredia. <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/690>.
5. Beckert, Bertrand, y Benoît Masquida. 2011. «Synthesis of RNA by In Vitro Transcription». En *RNA*, 29-41. Methods in Molecular Biology. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9_3.
6. Bedanta, S., A. Barman, W. Kleemann, O. Petravic, y T. Seki. 2013. «Magnetic Nanoparticles: A Subject for Both Fundamental Research and Applications». *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2013/952540>.
7. BioReba AG. 2011. «Simple ELISA Data Analysis». Información Técnica 2. http://www.bioreba.ch/files/Technical_Info/Simple_ELISA_Data_Analysis.pdf.
8. Brown, Kevin M., Sebastian Lourido, y L. David Sibley. 2016. «Serum Albumin Stimulates Protein Kinase G-Dependent Microneme Secretion in Toxoplasma Gondii». *Journal of Biological Chemistry* 291 (18):9554-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700518>.
9. Castillo, Hernán Del, Alberto Mendoza-Ticona, Juan Carlos Saravia, y José G. Somocurcio. 2009. «Epidemia de tuberculosis multidrogo resistente y extensivamente resistente a drogas (TB MDR/XDR) en el Perú: situación y propuestas para su control.» *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 26 (3). <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2009.263.1391>.
10. Caviedes, Luz, Tien-Shun Lee, Robert H. Gilman, Patricia Sheen, Emily Spellman, Ellen H. Lee, Douglas E. Berg, y Sonia Montenegro-James. 2000. «Rapid, Efficient Detection and Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Microscopic Observation of Broth Cultures». *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3):1203-8.

11. CDC. 2011. «Mycobacterium bovis in Humans - Publications - Fact Sheets - TB». Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/general/mbovis.htm>.
12. CDC. 2012. «Tuberculosis: información general». <http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/SintomasTuberculosis/>.
13. CDC. 2013. «Availability of an Assay for Detecting Mycobacterium tuberculosis, Including Rifampin-Resistant Strains, and Considerations for Its Use. United States, 2013». *Morbidity and mortality weekly Report* 62 (41). <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6241a1.htm>.
14. CDC. 2003. «Treatment of Tuberculosis.» *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 2003.
15. Chang, Kwok Chiu, Wing Wai Yew, y Ying Zhang. 2011. «Pyrazinamide Susceptibility Testing in Mycobacterium Tuberculosis: A Systematic Review with Meta-Analyses». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (10):4499-4505. <https://doi.org/10.1128/AAC.00630-11>.
16. Cheng, Shao-Ji, Louise Thibert, Tracy Sanchez, Leonid Heifets, y Ying Zhang. 2000. «pncA Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (3):528-32.
17. Chung, Hyun Jung, Cesar M. Castro, Hyungsoon Im, Hakho Lee, y Ralph Weissleder. 2013. «A Magneto-DNA Nanoparticle System for Rapid Detection and Phenotyping of Bacteria». *Nature Nanotechnology* 8 (5):369-75. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.70>.
18. Chung, Hyun Jung, Kathryn L. Pellegrini, Jaehoon Chung, Kamani Wanigasuriya, Innocent Jayawardene, Kyungheon Lee, Hakho Lee, Vishal S. Vaidya, y Ralph Weissleder. 2015. «Nanoparticle Detection of Urinary Markers for Point-of-Care Diagnosis of Kidney Injury». *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133417>.
19. Clarke, David T. 2011. «Circular Dichroism and Its Use in Protein-Folding Studies». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 752:59-72. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-223-0_5.
20. Cox, Karen L., Viswanath Devanarayan, Aidas Kriauciunas, Joseph Manetta, Chahrazad Montrose, y Sitta Sittampalam. 2004. «Immunoassay Methods». En *Assay Guidance Manual*, editado por G. Sitta Sittampalam, Nathan P. Coussens, Kyle Brimacombe, Abigail Grossman, Michelle Arkin, Douglas Auld, Chris Austin, et al. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>.
21. Dillon, Nicholas A., Nicholas D. Peterson, Heather A. Feaga, Kenneth C. Keiler, y Anthony D. Baughn. 2017. «Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA». *Scientific Reports* 7 (julio). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06415-5>.
22. Duval, Mélodie, Alexey Korepanov, Olivier Fuchsbaauer, Pierre Fechter, Andrea Haller, Attilio Fabbretti, Laurence Choulier, et al. 2013. «Escherichia

- coli Ribosomal Protein S1 Unfolds Structured mRNAs Onto the Ribosome for Active Translation Initiation». *PLOS Biology* 11 (12):e1001731. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001731>.
23. Fan, Yi, Yazhuang Dai, Meijing Hou, Huilin Wang, Hongwei Yao, Chenyun Guo, Donghai Lin, y Xinli Liao. 2017. «Structural Basis for Ribosome Protein S1 Interaction with RNA in Trans-Translation of Mycobacterium Tuberculosis». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 487 (2):268-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.048>.
 24. Garnier, Thierry, Karin Eiglmeier, Jean-Christophe Camus, Nadine Medina, Huma Mansoor, Melinda Pryor, Stephanie Duthoy, et al. 2003. «The Complete Genome Sequence of Mycobacterium Bovis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13):7877-82. <https://doi.org/10.1073/pnas.1130426100>.
 25. Heijden, E. M. D. L. van der, A. O. Jenkins, D. V. Cooper, V. P. M. G. Rutten, y A. L. Michel. 2016. «Field application of immunoassays for the detection of Mycobacterium bovis infection in the African buffalo (Syncerus caffer)». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 169 (Supplement C):68-73. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.12.003>.
 26. Iseman, M. D. 2002. «Tuberculosis Therapy: Past, Present and Future». *The European Respiratory Journal. Supplement* 36 (julio):87s-94s.
 27. Issa, Bashar, Ihab M. Obaidat, Borhan A. Albiss, y Yousef Haik. 2013. «Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (11):21266-305. <https://doi.org/10.3390/ijms141121266>.
 28. Jahanshahi, M., y Z. Babaei. 2008. «Protein Nanoparticle: A Unique System as Drug Delivery Vehicles». *African Journal of Biotechnology* 7 (25). <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59701>.
 29. Johnson R, Streicher EM, Louw GE, Warren RM, Van Helden PD, y Victor TC. 2006. «Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.» *Current issues in Molecular Biology* 8 (2):97-111.
 30. Kalinda, Alvin, y Courtney Aldrich. 2012. «Pyrazinamide: A Frontline Drug Used for Tuberculosis. Molecular Mechanism of Action Resolved after 50 Years?» *ChemMedChem* 7:558--560. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100587>.
 31. Kang, Jonghoon, Myung Soog Lee, y David G. Gorenstein. 2007. «Application of RNase in the purification of RNA-binding proteins». *Analytical biochemistry* 365 (1):147-48. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.003>.
 32. Kolyva, Anastasia S., y Petros C. Karakousis. 2012. «Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance». En *Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*, Pere-Joan Cardona. INTECH Open Access Publisher.
 33. Korobeinikova, A. V., M. B. Garber, y G. M. Gongadze. 2012. «Ribosomal Proteins: Structure, Function, and Evolution». *Biochemistry. Biokhimiia* 77 (6):562-74. <https://doi.org/10.1134/S0006297912060028>.

34. Lacroix, C., T. P. Hoang, J. Nouveau, C. Guyonnaud, G. Laine, H. Duwoos, y O. Lafont. 1989. «Pharmacokinetics of Pyrazinamide and Its Metabolites in Healthy Subjects». *European Journal of Clinical Pharmacology* 36 (4):395-400.
35. Lardeux, Frédéric, Gino Torrico, y Claudia Aliaga. 2016. «Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls». *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (8):501-4. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160119>.
36. Lipman, Neil S., Lynn R. Jackson, Laura J. Trudel, y Frances Weis-Garcia. 2005. «Monoclonal versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources». *ILAR Journal* 46 (3):258-68.
37. Lozano, José Antonio. 2002. «Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento». *Offarm* 21 (8):102-10.
38. Lu, Ping, Anna C. Haagsma, Hoang Pham, Janneke J. Maaskant, Selena Mol, Holger Lill, y Dirk Bald. 2011. «Pyrazinoic Acid Decreases the Proton Motive Force, Respiratory ATP Synthesis Activity, and Cellular ATP Levels». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11):5354-57. <https://doi.org/10.1128/AAC.00507-11>.
39. Malygin, Alexey, Oxana Baranovskaya, Anton Ivanov, y Galina Karpova. 2003. «Expression and purification of human ribosomal proteins S3, S5, S10, S19, and S26». *Protein Expression and Purification* 28 (1):57-62. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00652-6](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00652-6).
40. Mao, Xun, Anant Gurung, Hui Xu, Meenu Baloda, Yuqing He, y Guodong Liu. 2014. «Simultaneous Detection of Nucleic Acid and Protein Using Gold Nanoparticles and Lateral Flow Device». *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 30 (6):637-42.
41. Maysinger, Dusica, Jeff Ji, Eliza Hutter, y Elis Cooper. 2015. «Nanoparticle-Based and Bioengineered Probes and Sensors to Detect Physiological and Pathological Biomarkers in Neural Cells». *Frontiers in Neuroscience* 9 (diciembre). <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00480>.
42. Meinzen, Christopher, Alvaro Proaño, Robert H. Gilman, Luz Caviedes, Jorge Coronel, Mirko Zimic, y Patricia Sheen. 2016. «A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance». *Tuberculosis* 99 (julio):41-46. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2016.03.011>.
43. Messmore, June M., Dana N. Fuchs, y Ronald T. Raines. 1995. «Ribonuclease A: Revealing Structure–Function Relationships with Semisynthesis». *Journal of the American Chemical Society* 117 (31):8057-60. <https://doi.org/10.1021/ja00136a001>.
44. Ministerio de Salud, Perú. 2013. «Respira vida: Juntos contra la tuberculosis». Estudio comparativo. <http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2014/respiravida/index.html>.

45. MINSA. 2014. «Situación de la Tuberculosis en el Perú y política nacional para su control». Reporte. Perú.
46. MINSA. 2016. «Análisis de la situación epidemiológica de la Tuberculosis en el Perú 2015». *Ministerio de Salud del Perú, Dirección de Epidemiología*.
47. Moore, Sean D., y Robert T. Sauer. 2007. «The tmRNA System for Translational Surveillance and Ribosome Rescue». *Annual Review of Biochemistry* 76:101-24. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142733>.
48. Nasiruddin, Mohammad, Md Kausar Neyaz, y Shilpi Das. 2017. «Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment». *Tuberculosis Research and Treatment* 2017 (enero):e4920209. <https://doi.org/10.1155/2017/4920209>.
49. Nelson, P N, G M Reynolds, E E Waldron, E Ward, K Giannopoulos, y P G Murray. 2000. «Monoclonal antibodies». *Molecular Pathology* 53(3):111-17.
50. Nezhad, Kazemi, Seyed Reza, Fateme Montazeri, y Seyed Mehdi Hoseini. 2015. «Role of the Transfer-Messenger RNA Pathway _ Trans-Translation _ in Bacterial Physiology». *Genetics in the 3rd Millennium* 13 (2):4008-15.
51. OPS. 2013. «La Tuberculosis en las Américas: Epidemiología, control y financiamiento». *Organización Panamericana de la Salud*.
52. Pandey, Rajesh, y G. K. Khuller. 2006. «Nanotechnology Based Drug Delivery System(s) for the Management of Tuberculosis». *Indian Journal of Experimental Biology* 44 (5):357-66.
53. Personne, Yoann, y Tanya Parish. 2014. «Mycobacterium Tuberculosis Possesses an Unusual tmRNA Rescue System». *Tuberculosis* 94(1):34-42. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.007>.
54. Petrella, Stéphanie, Nathalie Gelus-Ziental, Arnaud Maudry, Caroline Laurans, Rachid Boudjelloul, y Wladimir Sougakoff. 2011. «Crystal Structure of the Pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide». *PLoS ONE* 6 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015785>.
55. Ramos, D. F., P. E. A. Silva, O. A. Dellagostin, D. F. Ramos, P. E. A. Silva, y O. A. Dellagostin. 2015. «Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques». *Brazilian Journal of Biology* 75 (4):830-37. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23613>.
56. Ranki, M., A. Palva, M. Virtanen, M. Laaksonen, y H. Söderlund. 1983. «Sandwich Hybridization as a Convenient Method for the Detection of Nucleic Acids in Crude Samples». *Gene* 21 (1-2):77-85. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90149-X)
57. Ranzoni, Andrea, Gwenola Sabatte, Leo J. van IJzendoorn, y Menno W. J. Prins. 2012. «One-Step Homogeneous Magnetic Nanoparticle Immunoassay for Biomarker Detection Directly in Blood Plasma». *ACS Nano* 6 (4):3134-41. <https://doi.org/10.1021/nn204913f>.
58. Reinoso Rhosalyns. 2012. «Estudio de la afinidad Rpsa-Poa En M. tuberculosis: Hacia un mejor nntendimiento del Mecanismo de acción de la Pirazinamida». Master, Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

59. Saguy, Matthieu, Reynald Gillet, Patricia Skorski, Sylvie Hermann-Le Denmat, y Brice Felden. 2007. «Ribosomal protein S1 influences trans-translation in vitro and in vivo». *Nucleic Acids Research* 35 (7):2368-76. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm100>.
60. Sheen, Patricia, Patricia Ferrer, Robert H. Gilman, Jon López-Llano, Patricia Fuentes, Eddy Valencia, y Mirko J. Zimic. 2009. «Effect of Pyrazinamidase Activity on Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium Tuberculosis». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 89 (2):109-13. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.01.004>.
61. Shi W, Zhang X, X Jiang, Yuan H, Lee JS, y Barry CE. 2011. «Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis.» *Science* 333 (6049):1630-32. doi: 10.1126/science.1208813
62. Shpanchenko, Olga V., Andrey V. Golovin, Elizaveta Y. Bugaeva, Leif A. Isaksson, y Olga A. Dontsova. 2010. «Structural Aspects of Trans-Translation». *IUBMB Life* 62 (2):120-24. <https://doi.org/10.1002/iub.296>.
63. Silva, Pedro Eduardo Almeida Da, y Juan Carlos Palomino. 2011. «Molecular Basis and Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Classical and New Drugs». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, mayo, dkr173. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr173>.
64. Smith, Issar. 2003. «Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence». *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3):463-96. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463-496.2003>.
65. Thermo Scientific. 2012. «Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios». *Technical Bulletin* T123:1. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
66. Thoen, Charles O., Philip A. Lobue, Donald A. Enarson, John B. Kaneene, y Isabel N. de Kantor. 2009. «Tuberculosis: A Re-Emerging Disease in Animals and Humans». *Veterinaria Italiana* 45 (1):135-81. http://www.izs.it/vet_italiana/2009/45_1/135.htm
67. Valle, Mikel, Reynald Gillet, Sukhjit Kaur, Anke Henne, V. Ramakrishnan, y Joachim Frank. 2003. «Visualizing tmRNA Entry into a Stalled Ribosome». *Science* 300 (5616):127-30. <https://doi.org/10.1126/science.1081798>.
68. Velayati, Ali Akbar, y Parissa Farnia. 2017. «Chapter 1 - The Species Concept». En *Atlas of Mycobacterium Tuberculosis*, 1-16. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803808-6.00001-3>.
69. Wade Mm, y Zhang Y. 2004. «Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis.» *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 9 (enero):975-94. <https://doi.org/10.2741/1289>.
70. Wang, Zhouping, Jianqiang Hu, Yan Jin, Xin Yao, y Jinghong Li. 2006. «In Situ Amplified Chemiluminescent Detection of DNA and Immunoassay of IgG Using Special-Shaped Gold Nanoparticles as Label». *Clinical Chemistry* 52 (10):1958-61. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.071399>.
71. WHO. 2016. «Global Tuberculosis Report 2016». *World Health Organization*.

- 72 World Health Organization. 2011. *Noncommercial Culture and Drug-Susceptibility Testing Methods for Screening Patients at Risk for Multidrug-Resistant Tuberculosis*. WHO. http://www.who.int/tb/publications/2011/mdr_tb_diagnostics_9789241501620/en/.
- 73 WHO. 2014. «Global Tuberculosis Report». Reporte. World Health Organization.
- 74 Wower, Iwona K., Nusrat Jahan, Christian Zwieb, y Jacek Wower. 2012. «Ribosomal Protein S1: An Important Trans-Translational Factor». *Biochemistry & Physiology: Open Access*, diciembre. <https://doi.org/10.4172/2168-9652.S2-001>.
- 75 Yang, Che-Chuan, Shieh-Yueh Yang, Chia-Shin Ho, Jui-Feng Chang, Bing-Hsien Liu, y Kai-Wen Huang. 2014. «Development of antibody functionalized magnetic nanoparticles for the immunoassay of carcinoembryonic antigen: a feasibility study for clinical use». *Journal of Nanobiotechnology* 12 (noviembre). <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0044-6>.
- 76 Yang, Juanjuan, Yindi Liu, Jing Bi, Qixu Cai, Xinli Liao, Wenqian Li, Chenyun Guo, et al. 2015. «Structural Basis for Targeting the Ribosomal Protein S1 of Mycobacterium Tuberculosis by Pyrazinamide». *Molecular Microbiology* 95 (5):791-803. <https://doi.org/10.1111/mmi.12892>.
- 77 Zhang, Hua, Jiao-Yu Deng, Li-Jun Bi, Ya-Feng Zhou, Zhi-Ping Zhang, Cheng-Gang Zhang, Ying Zhang, y Xian-En Zhang. 2008. «Characterization of Mycobacterium Tuberculosis Nicotinamidase/Pyrazinamidase». *FEBS Journal* 275 (4):753-62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06241.x>.
- 78 Zhang, Lianying, Xinjun Zhu, Dejie Jiao, Yongling Sun, y Hanwen Sun. 2013. «Efficient Purification of His-Tagged Protein by Superparamagnetic Fe₃O₄/Au-ANTA-Co²⁺ Nanoparticles». *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 33 (4):1989-92. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.011>.
- 79 Zhang, Y., y D. Mitchison. 2003. «The curious characteristics of pyrazinamide: a review». *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7 (1):6-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12701830>
- 80 Zhang, Y., y W. W. Yew. 2009. «Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis». *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 13 (11):1320-30.
- 81 Zhang, Ying, Wanliang Shi, Wenhong Zhang, y Denis Mitchison. 2014. «Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance». *Microbiology Spectrum* 2 (4):MGM2-0023-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013>.
- 82 Zhang, Ying, Mary Margaret Wade, Angelo Scorpio, Hao Zhang, y Zhonghe Sun. 2003. «Mode of Action of Pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium Tuberculosis Membrane Transport and Energetics by Pyrazinoic Acid». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (5):790-95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg446>.

83. Zimhony, Oren, Catherine Vilchèze, Masayoshi Arai, John T. Welch, y William R. Jacobs. 2007. «Pyrazinoic Acid and Its N-Propyl Ester Inhibit Fatty Acid Synthase Type I in Replicating Tubercle Bacilli». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2):752-54. <https://doi.org/10.1128/AAC.01369-06>.
84. Zimic, Mirko, Patricia Fuentes, Robert H. Gilman, Andrés H. Gutiérrez, Daniela Kirwan, y Patricia Sheen. 2012. «Pyrazinoic Acid Efflux Rate in Mycobacterium Tuberculosis Is a Better Proxy of Pyrazinamide Resistance». *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 92 (1):84-91. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.09.002>.