

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Escaneo Cromatográfico de las Proteínas de Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv



TESIS

TODO · LO · ILUMINAN

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

1942
PRESENTA

Edson Norberto Cárcamo Noriega

Hermosillo Sonora

Julio de 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de tesis de **QBC. Edson Norberto Cárcamo Noriega**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dra. Maria del Carmen Candia Plata
Director Académico

Dr. Enrique Bolado Martínez
Secretario

M. en C. Lucía Guadalupe Castillón Campaña
Vocal

Dr. Luis Fernando López Soto
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme regalado la vida y con ella los factores que la complementan, que debido a eso he alcanzado las metas propuestas.

A mi mamá por tener tanta fe en mi y sobreestimarme tanto, lo cual me da confianza para lograr lo que sea. Por todo tu apoyo incondicional, tu ejemplo y amor.

A mi familia por ser una motivación en mi vida y por todos los momentos que hemos compartido, de los cuales he aprendido mucho.

A la Dra. Maria del Carmen Candia Plata por ser una motivación académica, pero también por tenerme tanta fe y cariño. Le agradezco enormemente su dedicación al formarme como investigador.

A mis sinodales: Dr. Enrique Bolado Martínez, M.C Lucía Castellón, Dr. Luis Fernando López Soto, por su accesibilidad, disponibilidad y por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al laboratorio estatal, en especial a Miriam Zazueta Lugo y Lizbeth Alejandra Burboa Rodríguez por su gran apoyo en la obtención de los cultivos bacterianos.

A mis compañeros de laboratorio: Miriam Denisse García Villa, Karla Monge Villegas y Aby Cervantes Domínguez por ayudar en el trabajo experimental de esta tesis.

A Daniela Vega Mendoza, por estar conmigo y darme ánimos, Lip.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
OBJETIVOS.....	viii
Objetivo General.....	viii
Objetivos Específicos.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Proteínas.....	3
Estudio del Proteoma.....	4
Cromatografía.....	5
Cromatografía de Filtración en Gel.....	6
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	8
Cromatografía de Intercambio Iónico.....	10
Cromatografía de Afinidad.....	11
Cromatografía de Afinidad a Metales.....	12
Características Generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
Proteoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	14
Proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Tipo de Estudio, Plan Experimental General y Sesgos Previstos.....	17
Materiales y Reactivos.....	17
Obtención de Filtrado Proteico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	17
Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	17

Obtención del Filtrado de Cultivo.....	18
Ensayos Cromatográficos.....	18
Adsorbentes Cromatográficos.....	18
Cromatografía en “Batch”.....	20
Cromatografía en Columna.....	22
Ensayo de Hemaglutinación.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Ensayos de Adsorción.....	25
Aislamiento del Antígeno 85.....	29
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Clasificación funcional de los genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	16
II	Adsorbentes ensayados y sus componentes.....	19
III	Condiciones de adsorción y elución ensayadas en “batch”.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Serie de Hofmeister.....	9
2	Esquema cromatográfico para el aislamiento del complejo de 30-32 kDa.....	23
3	Perfiles de adsorción de ensayos cromatográficos en “batch”..	28
4	Cromatograma y electroforetograma de Sefarosa fenilada.....	30
5	Cromatograma y electroforetograma del aislamiento del antígeno 85 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	32

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la adsorción del filtrado proteico del cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv hacia matrices y esquemas cromatográficos hasta ahora no ensayados con este tipo de proteínas.

Objetivos Específicos

1. Obtener las proteínas de filtrado de cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivadas en medio Sauton.
2. Analizar el filtrado proteico de *M. tuberculosis* H37Rv mediante ensayos de adsorción con varias matrices cromatográficas.
3. Diseñar un esquema cromatográfico para el aislamiento de antígenos de importancia patogénica.
4. Obtener el perfil electroforético de las fracciones adsorbidas mediante SDS-PAGE.

RESUMEN

El estudio del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv es de gran importancia en la meta de mejorar el diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Una fracción importante del proteoma micobacteriano la constituyen las proteínas del filtrado de cultivo líquido, de las cuales sólo se han identificado 136 y sus diversas isoformas y una pequeña fracción de ellas ha sido purificada por medio de cromatografía y estudiada en su forma nativa. En este trabajo se evaluó la adsorptividad de las proteínas de filtrado de cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv hacia ocho matrices cromatográficas con el fin de aislar antígenos de importancia patogénica. Los resultados negativos en los ensayos de adsorción con adsorbentes sacáridos y con agarosa-jacalina, sugirieron la ausencia de lectinas afines a galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y a las cadenas oligosacáridas de fetuína, así como de proteínas con N-acetilgalactosamina, respectivamente. Finalmente, los ensayos de adsorción con matrices de afinidad a metales e interacción hidrofóbica permitieron el diseño de un esquema cromatográfico de dos etapas, utilizando los adsorbentes Sefarosa fenilada y agarosa di-(2-picolil)amina, para el aislamiento del complejo 85, uno de los principales antígenos micobacterianos de importancia inmunológica. Por su simplicidad, buena resolución y rendimiento, el esquema de aislamiento diseñado en este trabajo constituye una herramienta importante para el estudio proteómico e inmunológico de antígenos micobacterianos.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección crónica que afecta principalmente a los pulmones, pero que puede dañar otros órganos. Es causada principalmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la incidencia mundial en el 2009 fue de 137 por cada 100,000 habitantes (9.4 millones) con 1.7 millones de muertes por tuberculosis. Existe un pobre control epidemiológico de la tuberculosis debido a la falta de un método de alta sensibilidad y especificidad para el oportuno diagnóstico de la tuberculosis, lo que impide el control de la propagación de la infección, así como a la carencia de estrategias de control farmacológico, lo que ha llevado a la aparición de cepas multirresistentes y ultrarresistentes (Marahatta, 2010). Lo anterior, anudado a las deficiencias en el entendimiento de la patogénesis del bacilo hace de la tuberculosis un gran problema de salud pública.

Por lo anterior, *M. tuberculosis* ha sido muy estudiado con la finalidad de desarrollar nuevos medios de diagnóstico, fármacos y vacunas para combatir la tuberculosis. Hace menos de 15 años, cuando se descifró su genoma (Cole y col., 1998), se pudo predecir la estructura y función de muchas de las proteínas codificadas por los 3924 genes de *M. tuberculosis* (Cole y col., 1998; Fleischmann y col., 2002; Waddell y Butcher, 2007). Sin embargo, los estudios proteómicos más recientes han revelado productos génicos no predichos por la genómica del bacilo (Jungblut y col., 2001). La proteómica ha demostrado que la expresión génica es mucho más compleja de lo previsto y que *M. tuberculosis* expresa un amplio y complejo repertorio de productos proteicos entre los cuales se encuentran proteínas modificadas postraduccionalmente, tales como factores de virulencia como el regulador de persistencia mprA (Pang y col., 2007), la superóxido dismutasa (Bunting y col., 2002), la alanina deshidrogenasa (Deshpande y col., 1994a), el sistema de secreción proteica

ESX-1 (Raghavan y col., 2008), el proteosoma (Li y col., 2010), la lipoproteína lprG que inhibe el procesamiento de antígeno (Gehring y col., 2004), así como proteínas altamente inmunogénicas como la ESAT-6 (Brodin y col., 2006), la CFP10 (Barnes y col., 1992), el Ag38 (Andersen y col., 1991) y el Ag85, entre otras (Harth y col., 1996).

Para el estudio bioquímico de las proteínas micobacterianas se han usado estrategias como la expresión de proteínas recombinantes en modelos bacterianos, así como su aislamiento y/o purificación por electroforesis o por métodos cromatográficos. Esta última estrategia ha proporcionado mayor información, porque permite la obtención de cantidades considerables de proteínas nativas y con ello facilita su estudio estructural y funcional.

Las técnicas cromatográficas más utilizadas han sido las de intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad a metales y afinidad biológica (Deshpande y col., 1994a; Deshpande y col., 1994b; Dobos y col., 1996; Montañó y col., 1994; Nagai y col., 1991; Rosenkrands y col., 1998), con las que se ha logrado purificar a las proteínas MPT44, MPT45, MPT59, MPT32, MPT51, MPT53, MPT63, TB66, TB33, entre otras. Sin embargo, estas proteínas representan una muy baja proporción de las proteínas que teóricamente podrían ser purificadas a partir del filtrado proteico obtenido de cultivos líquidos de *Mycobacterium tuberculosis* con los adsorbentes cromatográficos que no han sido utilizados hasta ahora.

En este trabajo se ensayó la adsorptividad de las proteínas de filtrado de cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante ensayos con ocho matrices cromatográficas que no habían sido utilizadas previamente con este objetivo. El análisis electroforético e inmunoquímico de las fracciones cromatográficas demostró el aislamiento del complejo 85, uno de los principales antígenos inmunodominantes micobacterianos, utilizando los adsorbentes Sefarosa fenilada y agarosa di-(2-picolil)amina (DPA), en un esquema de dos etapas.

ANTECEDENTES

Proteínas

Las proteínas son biomoléculas esenciales para las células, que se sintetizan como resultado de la transcripción y traducción genética. Reflejan el estado metabólico de las células, participando en todos los procesos vitales de dos maneras: Una de tipo estructural, formando parte del propio organismo y otra de tipo funcional. Uno de los grupos de proteínas más importantes son las enzimas, catalizadores que determinan el ritmo y rumbo de toda la bioquímica celular (Koolman y Roehm, 2005).

Las proteínas son biopolímeros constituidos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, y aunque su estructura primaria es de cadena lineal, su estructura final es tridimensional gracias a las interacciones intra e intermoleculares (Lubert, 1995). La diversidad en la estructura de los aminoácidos hace de las proteínas, unas moléculas altamente dinámicas y complejas. La función de una proteína está directamente relacionada con su estructura; ésto es debido a que la organización espacial de la proteína establece dominios capaces de interaccionar con otras moléculas (Sinha y Smith-Gill, 2002). La disposición superficial de una proteína depende tanto de su secuencia de aminoácidos como de las condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura en las que se encuentre (Nelson y Cox, 2004).

El estudio de las proteínas en su nivel más básico es de gran importancia ya que permite entender aun más la relación que tienen su estructura, composición e interacciones con los procesos fisiológicos y patológicos.

Estudio del Proteoma

Las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) no son suficientes para determinar la localización celular de las proteínas y más importante aún, no predicen las modificaciones postraduccionales importantes para la funcionalidad de las proteínas, tales como la glicosilación y la fosforilación (Zhou y col., 2008). Para complementar la información acerca de los componentes dinámicos y estructurales de la célula, la información genómica y la transcriptómica, obtenida a lo largo de las últimas décadas es actualmente apoyada por la proteómica (Ge y col., 2003).

El proteoma (conjunto de proteínas expresadas por un genoma) de un organismo es extremadamente complejo y dinámico, debido a que es el resultado de la expresión genética influida por factores externos de la célula, condiciones nutricionales, temperatura, etc. Esto es debido a que la mayoría de los genes sufren la influencia de factores epigenéticos, aun en los organismos relativamente sencillos como las bacterias.

La proteómica (estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma) ha avanzado bastante en los últimos años, al punto que actualmente incorpora la estimación de los niveles de expresión proteica, la identificación de la proteína y sus modificaciones postraduccionales, así como la caracterización de las interacciones realizadas por la proteína dentro de toda la red interactómica del organismo (Jungblut, 2001). Sin embargo, la diversidad y complejidad del proteoma no puede ser resuelta por una sola tecnología. Se ha demostrado que la mejor estrategia es el uso de una combinación de técnicas de separación y de identificación de proteínas, genéricamente conocida como separación multidimensional (Gao y col., 2010; Neverova y Van Eyk, 2005). Hasta hace poco tiempo, la electroforesis en dos dimensiones (2-DE, por sus siglas en inglés) fue la técnica más usada en la separación de proteínas, pero debido a las limitaciones que tiene para la detección de

proteínas de muy alto o muy bajo peso molecular, altamente hidrofóbicas o proteínas de baja concentración, la proteómica se ha visto en la necesidad de recurrir a otros métodos de separación como la cromatografía acoplada a espectrometría de masas (Walther y Mann, 2010).

Cromatografía

Cromatografía es el término usado para describir al conjunto de técnicas de separación de moléculas cuyo principio es la retención selectiva del analito de interés. Esta retención puede ser debida a la acción de una fase móvil sobre el analito (solubilidad) o a la interacción preferencial del analito por una fase estacionaria (adsorción). La diferencia en la fuerza de retención entre las dos fases es la que logra la separación de los componentes de una mezcla. La fuerza en la interacción va a depender de la naturaleza molecular del compuesto, así como de las características de las fases cromatográficas (Zhang y col., 2010).

Los métodos cromatográficos pueden basarse en el principio de partición o adsorción, dependiendo del tipo de interacciones que ocurran entre la muestra y el medio. La cromatografía por partición se basa en interacciones no específicas entre los componentes de la muestra y el medio cromatográfico. La diferencia en la solubilidad de un analito en la fase móvil y la fase estacionaria permite su separación de una mezcla. En la cromatografía por adsorción, la matriz interacciona específicamente con ciertos componentes de la mezcla. Las condiciones cromatográficas son seleccionadas para incrementar o disminuir estas interacciones específicas logrando una mayor resolución en la separación. Existen básicamente cuatro principios de separación en los que se basan las técnicas cromatográficas estándar: filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica y afinidad (Lubert, 1995).

La fase móvil, puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria, conocida también como adsorbente, puede ser líquida o sólida. La clasificación de los distintos tipos de cromatografía depende de cómo se presente el adsorbente (líquido, en capa plana, en columna, etc.), la naturaleza del mismo (cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrofóbica, filtración en gel, bioafinidad, etc.) o el estado físico de la fase móvil (cromatografía líquida, cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos) (Nelson y Cox, 2004) .

La cromatografía ha sido muy usada para la separación de proteínas, debido a que la complejidad estructural de estas biomoléculas ha permitido el uso de un gran número de distintos adsorbentes. En la actualidad se cuenta con un gran número de adsorbentes diferentes, gracias a la invención de soportes polisacáridos inertes que permiten la adición de una enorme variedad de ligandos a su superficie. La adsorción de proteínas a ciertos adsorbentes indica una afinidad que puede sugerir su importancia biológica (Bruce Alberts, 2002). Es importante tomar en cuenta que en el estudio del proteoma, la cromatografía no sólo es una herramienta para la separación de las proteínas, sino que también sirve para caracterizar su adsorptividad (Calleri y col., 2011).

Cromatografía de Filtración en Gel

Conocida también como cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés), la filtración en gel es una técnica cromatográfica de partición que separa las moléculas por tamaño molecular. La matriz cromatográfica es empaquetada en columna y consiste en esferas de un gel relativamente inerte, entrecruzado con una red molecular tridimensional de poros con un rango de tamaño definido (O'Fágáin y col., 2011).

La separación de las moléculas contenidas en una mezcla que se aplica a las columnas con geles de exclusión molecular, depende de la capacidad que tienen éstas de entrar a los poros, lo que las retiene por más tiempo, retardando

así su elución. Esta capacidad de penetrar la red interna de las esferas está dada tanto por el tamaño como por la forma de las moléculas. Moléculas de gran tamaño, las cuales no logran entrar a los poros, se mueven por fuera de la red interna más rápidamente que las moléculas pequeñas ya que éstas recorren la columna entrando y saliendo de las esperas, retardando así su corrimiento; consecuentemente las moléculas son eluidas en orden a la disminución de tamaño.

Debido a que en la cromatografía de filtración en gel, el grado de retención está dado en función al tamaño del poro del gel, así como al tamaño de la molécula, el corrimiento cromatográfico de los solutos presentes en una muestra está determinado por el coeficiente de retención (R_f), el cual corresponde a la relación entre la distancia del soluto y el frente del solvente. La diferencia en la retención del soluto entre el solvente y la matriz permite tres posibilidades: 1.- la nula retención del soluto por parte de la matriz, lo que permite que pueda correr junto con el frente del solvente ($R_f = 1$) y ser lavado de la columna rápidamente, 2.- ser retenido totalmente por la matriz y permanecer en la posición inicial de inyección de la muestra ($R_f = 0$), ó 3.- en el caso más útil, los solutos son parcialmente retenidos por la matriz y eventualmente eluidos ($0 < R_f < 1$). Para lograr una mayor resolución en la separación de una mezcla de solutos se esperaría que los R_f de los solutos sean distintos a 0 y 1, además de que exista una gran diferencia entre sus R_f (Nelson y Cox, 2004) .

Esta técnica, además de lograr la separación de moléculas permite la estimación del tamaño de las moléculas contenidas en una muestra por medio de la comparación de su R_f con moléculas estándares con masa conocida.

En el estudio de la proteómica de *M. tuberculosis*, la SEC ha permitido la purificación de diversos antígenos, como los antígenos de 32, 30, 24 y 16 kDa, al ser usada como ultimo parámetro cromatográfico (Horwitz y col., 1995).

Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

La hidrofobicidad de superficie de las proteínas es una propiedad bioquímica que dicta su solubilidad, influye en su conformación e interviene en sus interacciones con otras moléculas. Esta propiedad bioquímica es utilizada para la separación de proteínas en la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés).

La HIC, tiene el mismo principio de separación de la cromatografía de fase reversa, pero es más usada debido a que permite la recuperación de las proteínas en su estado nativo, por lo que puede ser aplicada a la purificación de enzimas, inmunoglobulinas, proteínas recombinantes, hormonas, etc., (Builder, 1993). La adsorción de las proteínas al adsorbente hidrofóbico es facilitada por altas concentraciones de sales, como las usadas para precipitar proteínas (Figura 1). En la HIC los perfiles de adsorción dependen del tipo de sal, su concentración y el adsorbente usado (Nelson y Cox, 2004) y el uso de gradientes de sales permite una mayor resolución en el aislamiento de proteínas, ya que el grado de hidrofobicidad de éstas se relaciona inversamente con la concentración de las sales durante la retención al adsorbente.

En trabajos previos se ha usado a la HIC como una etapa cromatográfica en esquemas de aislamiento de antígenos micobacterianos como la ESAT-6, MPT59, MPT51, el antígeno de 16 kDa y el complejo 85 (Nagai y col., 1991; Sørensen y col., 1995; Kumar, 2002), entre otros.

Cromatografía de Intercambio Iónico

En la separación de proteínas, la cromatografía de intercambio iónico (IEC, por sus siglas en inglés) es el método cromatográfico más usado. Esta técnica aprovecha el carácter anfotérico de las proteínas (cargas positiva a pH bajo y cargas negativas a pH alto). La separación de proteínas por IEC se basa no sólo en el número de cargas presentes en la proteína sino también en la distribución superficial, lo que permite la adsorción de la proteína al adsorbente iónico (Bruce Alberts, 2002).

Las condiciones de adsorción son seleccionadas dependiendo de las características de la muestra o proteína de interés. Para la separación de una proteína específica, es muy útil conocer su punto isoeléctrico ya que a partir de él se pueden seleccionar la matriz cromatográfica y las condiciones de adsorción. Si una proteína es más estable debajo de su punto isoeléctrico entonces se recomienda usar una matriz de intercambio catiónico.

La elución de las proteínas puede realizarse aumentando la fuerza iónica de la solución, de esta manera los iones compiten por los sitios de adsorción de la matriz disociando la unión matriz-proteína. Otra alternativa de elución es el cambio de pH, que es de gran utilidad en la cromatografía de intercambio catiónico pero de escaso valor en la de intercambio aniónico. Al acercarse el pH al punto isoeléctrico la proteína pierde sus cargas, permitiendo así su elución. La manipulación de las condiciones de adsorción y elución permiten la optimización en la separación de proteínas por este método.

La IEC es una de las técnicas más utilizadas en la purificación de proteínas de *M. tuberculosis*, lo cual ha permitido la recuperación de antígenos como la tiorredoxina 12 kDa, la ESAT-6, CFP-10, la glicoproteína de 45 kDa, la MPT63, MPT51, MPT59, MPT53, los antígenos de 32, 30, 24 y 16 kDa (Horwitz y col., 1995; Lim y col., 1999; Nagai y col., 1991; Romain y col., 1993; Sørensen y col., 1995) , entre otras.

Cromatografía de Afinidad

De entre todas las técnicas cromatográficas, la cromatografía de afinidad ofrece la mayor especificidad y selectividad para el aislamiento y purificación de biomoléculas. Esta técnica se basa en el aprovechamiento de las interacciones bioespecíficas reversibles presentes en la naturaleza, inducidas *in vitro* gracias al acoplamiento de ligandos específicos al soporte cromatográfico. Cuando el compuesto retenido es eluido, se consiguen niveles de pureza extraordinarios en una sola corrida cromatográfica, así como la recuperación de la biomolécula en una forma concentrada, además de poder discernir entre las formas activas de una biomolécula de las desnaturalizadas, todo esto gracias a la elevada selectividad de las matrices (Bruce Alberts, 2002).

La unión biológica entre el ligando y la molécula de interés es el resultado de interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno (Fitzgerald y col., 2011). Por esta razón, la elución de la molécula adsorbida a una matriz de afinidad puede lograrse por medios no específicos como el cambio de pH, fuerza iónica o polaridad, o por medios específicos como la adición de agentes que compitan por el ligando. Prácticamente cualquier componente biológico puede ser usado como ligando para la purificación de una molécula afín a él. Algunos ligandos biológicos comúnmente usados en cromatografía de afinidad son: Enzimas, anticuerpos, lectinas, receptores de hormonas, ácidos nucleicos, iones metálicos, etc.

Debido a la afinidad que presentan las proteínas micobacterianas a diversas biomoléculas se ha podido purificar antígenos tales como la glicoproteína de 45 kDa, la glicoproteína de 32, la hemaglutinina de unión a heparina y la proteína afín a fibronectina TB66 (Deshpande y col., 1994c; Dobos y col., 1996; Montaña y col., 1994; Verbelen y col., 2008). Sin embargo, la bioafinidad no ha sido lo suficientemente estudiada en antígenos micobacterianos, lo cual pudiera permitir la purificación de más proteínas de interés patogénico.

Cromatografía de Afinidad a Metales

La cromatografía de afinidad a metales (IMAC, por sus siglas en inglés), es un método muy usado para enriquecer o purificar proteínas de características definidas. Esta técnica separa proteínas de acuerdo a la distribución y contenido de algunos de sus aminoácidos, como histidina, triptófano, cisteína y fenilalanina, que actúan como donadores de electrones cuando son expuestos en la superficie proteica bajo condiciones específicas de pH y fuerza iónica (Block y col., 2009). En la IMAC, estos aminoácidos interactúan con aceptores de electrones, como los metales de transición inmovilizados en una matriz con quelantes fuertes como el ácido iminodiacético (IDA) o el ácido nitrilotriacético (NTA).

La elección del quelante y el metal generalmente se realiza empíricamente. Sin embargo, se sabe que los metales como Cu^{+2} , Zn^{+2} y Ni^{+2} interactúan fuertemente con la proteína formando complejos con los grupos imidazol de la histidina y el sulfhidrilo de la cisteína. Metales como el Co^{+2} , Mn^{+2} y Mg^{+2} pueden interactuar con la superficie de la proteína pero forman complejos más débiles. También se sabe que estas interacciones son dependientes del pH y que el pH neutro proporciona una adsorción más fuerte y selectiva de la mayoría de las proteínas (Block y col., 2009; Porath, 1992).

El complejo de coordinación proteína-metal puede ser disociado disminuyendo el pH, para protonar a los aminoácidos responsables de la unión, o agregando un agente que compita por el sitio de unión, como el imidazol (Porath, 1992).

Se ha demostrado la afinidad a níquel por parte de las proteínas de *M. tuberculosis* usando como quelante al ácido nitrilotriacético, llegando así a la purificación del antígeno 84, la NAD(P) transhidrogenasa y la TB66 (Deshpande y col., 1994a; Deshpande y col., 1994c; Deshpande y col., 1994d; Deshpande y col., 1996), sin embargo el uso de otros metales y quelantes puede permitir la purificación de otras proteínas.

Características Generales de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, es una especie bacteriana del Complejo *M. tuberculosis*, que aparece típicamente como bastoncillo recto (forma bacilar) o ligeramente curvo, con extremos redondeados (forma cocoide), de 1 - 10 μm de largo (generalmente de 3 - 5 μm) y de 0.2-0.6 μm en ancho (Brennan y Nikaido, 1995). Los bacilos son inmóviles, no forman esporas y no poseen flagelos, son de crecimiento lento (12 a 24 horas) y se desarrollan preferentemente en condiciones aerobias (Betancourt y col., 2002), aunque pueden sobrevivir durante mucho tiempo en ambientes microaerófilos (Wayne y Hayes, 1996). La fuente de energía principal de la bacteria en condiciones aerobias es el carbono, sin embargo en condiciones microaerófilas el bacilo puede obtener su energía por medio del catabolismo de lípidos.

Las micobacterias se caracterizan por presentar una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica, a la cual están ancladas moléculas de lipoarabinomano (LAM) que son los equivalentes micobacterianos del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas. Así mismo, se encuentra unida a la bicapa lipídica una pared de peptidoglucano que confiere a la bacteria su forma y su rigidez. A ésta, se encuentra covalentemente unida una red polisacárida formada por arabinosa y galactosa (arabinogalactano). En la porción exterior de la red polisacárida se encuentran los ácidos micólicos los cuales son β hidroxiácidos grasos ramificados de alto peso molecular (60 a 90 carbonos) (Barrera, 2007). Otro grupo de compuestos que componen la pared bacteriana son los glucolípidos (micolatos de trehalosa, sulfolípidos, micósidos, etc.), que se encuentran unidos no covalentemente a los ácidos micólicos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a la micobacteria una escasa permeabilidad celular, que es la responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de varios de los agentes antimicrobianos, así como de la resistencia a la decoloración con alcohol ácido (tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun) (Brennan y Nikaido, 1995).

Desde su aislamiento en 1905, la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, una de las principales cepas de referencia, ha sido de las más estudiadas a escala mundial, debido a que ha conservado su virulencia en los modelos animales de tuberculosis, no pierde su patogenicidad al hacer pasajes en el laboratorio, es susceptible a las drogas y es muy favorable a la manipulación genética. En 1998, fue publicado el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv y con ello se avanzó en el entendimiento de la fisiopatología de la tuberculosis (Cole y col., 1998), sin embargo aún falta mucho por entender acerca de los mecanismos involucrados en la capacidad del bacilo para producir la enfermedad, así como los que subyacen a su supervivencia en medios hostiles. Con ayuda de la información genómica de *M. tuberculosis* H37Rv se ha podido estudiar más a fondo el proteoma micobacteriano, haciendo uso de técnicas como la expresión de proteínas recombinantes y la predicción de estructuras y función. Sin embargo, como en otros patógenos, es probable que el poder patogénico del bacilo radique en las modificaciones postraduccionales de las proteínas que produce (Greenstein y col., 2005), y por ello es importante estudiar el proteoma nativo micobacteriano.

Proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tiene una secuencia de 4,411,529 pares de bases con un contenido de citosina-guanina del 65.5% y con 3924 marcos de lectura abiertos. Una alta proporción de los genes expresados están destinados a la síntesis de enzimas implicadas en la lipogénesis y la lipólisis micobacterianas (Cole y col., 1998). Mediante el uso de bases de datos ha sido posible precisar la función de aproximadamente el 40 % del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y prever la función de otro 44%, sin embargo queda un 16% del proteoma del que aún no se tiene idea de su función en el bacilo (Cole y col., 1998).

El objetivo del estudio del proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv, es conocer no sólo los productos génicos directos sino también las modificaciones postraduccionales que son claves para la funcionalidad proteica (Del Portillo y col., 2007). Estudios proteómicos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv han permitido clasificar funcionalmente las proteínas, demostrado cierta coherencia con las predicciones genómicas (Tabla I), pero se cree que aún falta mucho por conocer de ellas. Hasta ahora, se han identificado 290 manchas electroforéticas asociadas con proteínas celulares y 510 manchas de las proteínas de filtrado de cultivo, lo cual es una fracción del proteoma (Proteome 2D-PAGE Database). Además, a pesar de los avances logrados en la caracterización funcional de las proteínas micobacterianas predichas, el estudio de las propiedades bioquímicas y estructurales de las proteínas nativas se ha quedado atrás.

Proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. En las últimas décadas, el estudio del proteoma de *M. tuberculosis* se ha enfocado de manera importante en las proteínas de filtrado de cultivo (CFP, por sus siglas en inglés), que contienen principalmente proteínas de secreción, proteínas solubles de lisado bacteriano y extracto soluble de pared bacteriana (Andersen y coll., 1991). El gran interés por esta mezcla de proteínas reside en la capacidad que tienen para estimular respuestas inmunes específicas contra el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, de la que depende su potencial utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas y métodos inmunodiagnósticos (Hutter y Singh, 1999; Smith, 2003). Se cree que las CFP son claves en la supervivencia intracelular del bacilo ya que *M. tuberculosis* modula el sistema inmune del hospedero impidiendo la maduración del lisosoma (Russell, 2001), pero se requiere aún de muchos estudios para avanzar significativamente en el conocimiento del papel de las proteínas del CFP, motivo por el que es de gran importancia la purificación de la mayor cantidad de las proteínas nativas.

Tabla I. Clasificación funcional de los genes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Clase	Función	Número de genes (1998)	Número de genes (2002)
0	Virulencia, destoxificación, adaptación	91	99
1	Metabolismo de lípidos	225	233
2	Información de vías metabólicas	207	229
3	Pared celular y procesos celulares	516	708
4	RNAs estables	50	50
5	Inserción de secuencias y fagos	137	149
6	Proteínas PE y PPE	167	170
7	Metabolismo intermediario y respiración	877	894
8	Proteínas de función desconocida	606	272
9	Proteínas regulatorias	188	189
10	Proteínas hipotéticamente conservadas	910	1,051

Fuente: Del Portillo y col., 2007.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Estudio, Plan Experimental General y Sesgos Previstos

Este trabajo fue de tipo experimental. Se utilizaron cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv desarrollados en el medio Sauton para ensayar la adsorptividad de las proteínas del filtrado de cultivo hacia adsorbentes cromatográficos en búsqueda de esquemas cromatográficos que permitan el aislamiento de antígenos micobacterianos. Para controlar los sesgos experimentales propios de la muestra se excluyeron todos los cultivos contaminados (para evitar la presencia de proteínas exógenas) así como los extractos proteicos degradados.

Materiales y Reactivos

El medio de cultivo Sauton fue preparado según lo especifica Andersen y col., 1991. Los adsorbentes cromatográficos se obtuvieron de GE, Healthcare (Sephadex G-25 y Sefarosa-6B CL) y de Sigma Chemical Co., (agarosa-N-acetilgalactosamina, agarosa-fetuina y agarosa-jacalina). Los reactivos utilizados en los procedimientos cromatográficos y electroforéticos fueron de grado analítico (Fermont y Sigma Chemical Co.)

Obtención de Filtrado Proteico de *M. tuberculosis* H37Rv

Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv

La manipulación de la cepa se realizó en el Departamento de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) del estado de Sonora, México, utilizando una campana de bioseguridad tipo 2. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, donada por el LESP y tipificada como cepa de referencia por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), se reactivó en el medio de Löwenstein-Jensen en plano inclinado, a 37°C, de 18

a 21 días. La pureza de la cepa se verificó mediante pruebas bioquímicas y tinción de Ziehl-Neelsen. Posteriormente se inoculó la totalidad de la biomasa obtenida del medio Löwenstein-Jensen en 750 mL de medio de cultivo líquido Sauton, en matraces Erlenmeyer de 1000 mL, y se incubó a 37°C por un mes. Se descartó contaminación bacteriana al no observar crecimiento en un cultivo de agar sangre a partir de un inóculo del cultivo en Sauton.

Obtención del Filtrado de Cultivo

Para obtener el filtrado proteico, cada cultivo se filtró en un sistema estéril de filtración Millipore-Stericup de 500 mL acoplado a una bomba de vacío, con punto de corte de 0.2 μ m. El filtrado de cultivo se concentró con sistemas de concentración Amicon, Millipore-Ultra 4, con punto de corte de 10,000 daltones a 4,000 g, en una centrifuga refrigerada a 4°C. Después, el concentrado proteico se dializó exhaustivamente contra agua tridestilada y por último, se liofilizó y almacenó en refrigeración a 4°C.

Ensayos Cromatográficos

Adsorbentes Cromatográficos

En el presente estudio se utilizaron 8 matrices cromatográficas las cuales fueron ensayadas primeramente por cromatografía en "batch". Las matrices que adsorbieron proteínas con este método, fueron ensayadas posteriormente en columna. Se usaron adsorbentes con ligandos de naturaleza hidrofóbica, quelante, monosacárida, polisacáridas y proteica, acoplados a soportes polisacáridos principalmente agarosa y Sefarosa (Tabla II). Los adsorbentes fueron previamente regenerados con NaOH 1M. Todas las matrices cromatográficas fueron comerciales, con excepción de la matriz agarosa-IDA (agarosa-iminodiacetato) y agarosa-DPA (agarosa- di-(2-picolil)amina, las cuales fueron sintetizadas por el método de activación de hidroxilos con epíclorohidrina (Matsumoto y col., 1979).

Tabla II. Adsorbentes ensayados y sus componentes.

Nombre	Ligando
Sephadex G-25	Dextrán
Sefarosa 6B	Galactosa (Gal)
Agarosa-GalNAc	N-Acetilgalactosamina
Agarosa-fetuina	Fetuína
Agarosa-jacalina	Jacalina
Agarosa-IDA-Ni ⁺²	Ácido iminodiacético-níquel
Agarosa-DPA- Ni ⁺²	di-(2-picolil)amina-níquel
Sefarosa fenilada	Grupo fenilo

Cromatografía en “Batch”

Se realizaron ensayos de adsorción por cromatografía en “batch” con todos los adsorbentes. Este método es comúnmente usado en ensayos preliminares de cromatografía analítica debido a que no requiere grandes cantidades de muestra y se puede ajustar a cualquier escala de purificación, aunque la más usada es en la que se emplean de 10-200 μL de adsorbente. Los ensayos en “batch” son de menor resolución que los realizados en columna debido a que al realizar los lavados, un pequeño volumen de solución queda atrapado en la matriz cromatográfica reteniendo inespecíficamente pequeñas cantidades de proteínas (Pierce Biotechnology, 2006).

Las matrices con los ligandos bioafines (carbohidratos y proteínas) fueron ensayados con el propósito de evidenciar la presencia de lectinas micobacterianas y glicoproteínas en el CFP. Por otro lado la finalidad de los ensayos de adsorción con adsorbentes hidrofóbicos e IMAC fue obtener información preliminar de los perfiles de adsorción para el diseño de esquemas cromatográficos en columna, para el aislamiento de antígenos micobacterianos.

Para realizar la cromatografía de afinidad, el método usado fue el propuesto por Thermo Fisher Scientific Inc. Aproximadamente 100 μL de adsorbente fueron colocados en tubos de polipropileno de 1.5 mL de volumen. El adsorbente se equilibró mediante 5 lavados de 1 mL con el amortiguador de adsorción (Tabla III). Se cargaron 300 μg de proteína micobacteriana disuelta en el amortiguador de adsorción a un volumen final de 1 mL. La mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó el gel 5 veces o hasta obtener lecturas con DO (densidad óptica) ≤ 0 a $\lambda=280\text{nm}$, con el amortiguador de lavado correspondiente. Posteriormente se realizó un último lavado con 1 mL del eluyente dejándolo actuar por 20 minutos a temperatura ambiente. Los lavados se llevaron a cabo re-suspendiendo el adsorbente y centrifugando a 800 g para sedimentar el gel, el sobrenadante fue recolectado y analizado como fracción cromatográfica.

Tabla III. Condiciones de adsorción y elución ensayadas en “batch”.

Condiciones		
Adsorbente	Adsorción (a)	Elución (b)
Sephadex G-25	TBS y PBS	Elución pH 2.6
Sefarosa 6B	TBS y PBS	Elución pH 2.6
Agarosa (GalNAc)	TBS y PBS	Elución pH 2.6
Agarosa Fetuína	TBS y PBS	Elución pH 2.6
Agarosa Jacalina	TBS y PBS	Elución pH 2.6
Agarosa (IDA-Ni ⁺²)	TBS, PBS y Na ₂ SO ₄	Elución pH 4.0
Agarosa (DPA- Ni ⁺²)	TBS, PBS y Na ₂ SO ₄	Elución pH 4.0
Sefarosa fenilada	Na ₂ SO ₄	PB

- a)** Amortiguador de adsorción.- TBS (Trizma-base 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7.4), PBS (Amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y Na₂SO₄ (MOPS 20 mM, Na₂SO₄ 0.5 M, pH 7.4)
- b)** Amortiguador de elución.- Elución pH 4.0 (MOPS 20 mM, pH 4.0), Elución pH 2.6 (Glicina 100 mM, pH 2.6) y PB (Amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4)

Como control del método se probó la adsorción de la lectina Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*) a Sefarosa 6B para descartar uniones inespecíficas; así mismo se ensayó con la matriz agarosa-fetuína y Sephadex G-75 para corroborar la sensibilidad de la técnica.

Cromatografía en Columna

Usando la información obtenida en los ensayos de adsorción en “batch” con los adsorbentes agarosa-IDA, agarosa-DPA y Sefarosa fenilada, se diseñó un esquema cromatográfico para el aislamiento del complejo de 30-32 kDa (Figura 2). Para ésto, los adsorbentes fueron empacados en columnas de polipropileno acopladas a un sistema para cromatografía de baja presión (Bio-Rad, México), a una velocidad de flujo de 1 mL/min, usando agua deionizada con NaN_3 al 0.02% como solución de empaque. El volumen de cama se ajustó a 1 mL. Los adsorbentes se equilibraron pasando 5 volúmenes de cama del amortiguador de adsorción.

Aproximadamente 2 mg de proteína de filtrado de cultivo disuelta en 1 mL del amortiguador de adsorción, se aplicaron a la columna cromatográfica a un flujo de 0.25 mL/min. La columna se lavó a un flujo de 0.5 mL/min con el amortiguador de lavado correspondiente hasta obtener lecturas de absorbancia menores de 0.010 a $\lambda=280$ nm. Las fracciones fueron dializadas para cambiar el amortiguador de adsorción entre cada método cromatográfico.

Las fracciones cromatográficas fueron monitorizadas a 280 nm (Aquamate Termo-Spectronic, Accesolab, México) y la concentración de proteína fue estimada a 595 nm por el método de Bradford (Bradford, 1976). La homogeneidad de las fracciones cromatográficas fue evaluada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 15% de acrilamida (Mini-protean II, BioRad, CA, USA) según el sistema desarrollado por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Steinberg, 2009) .

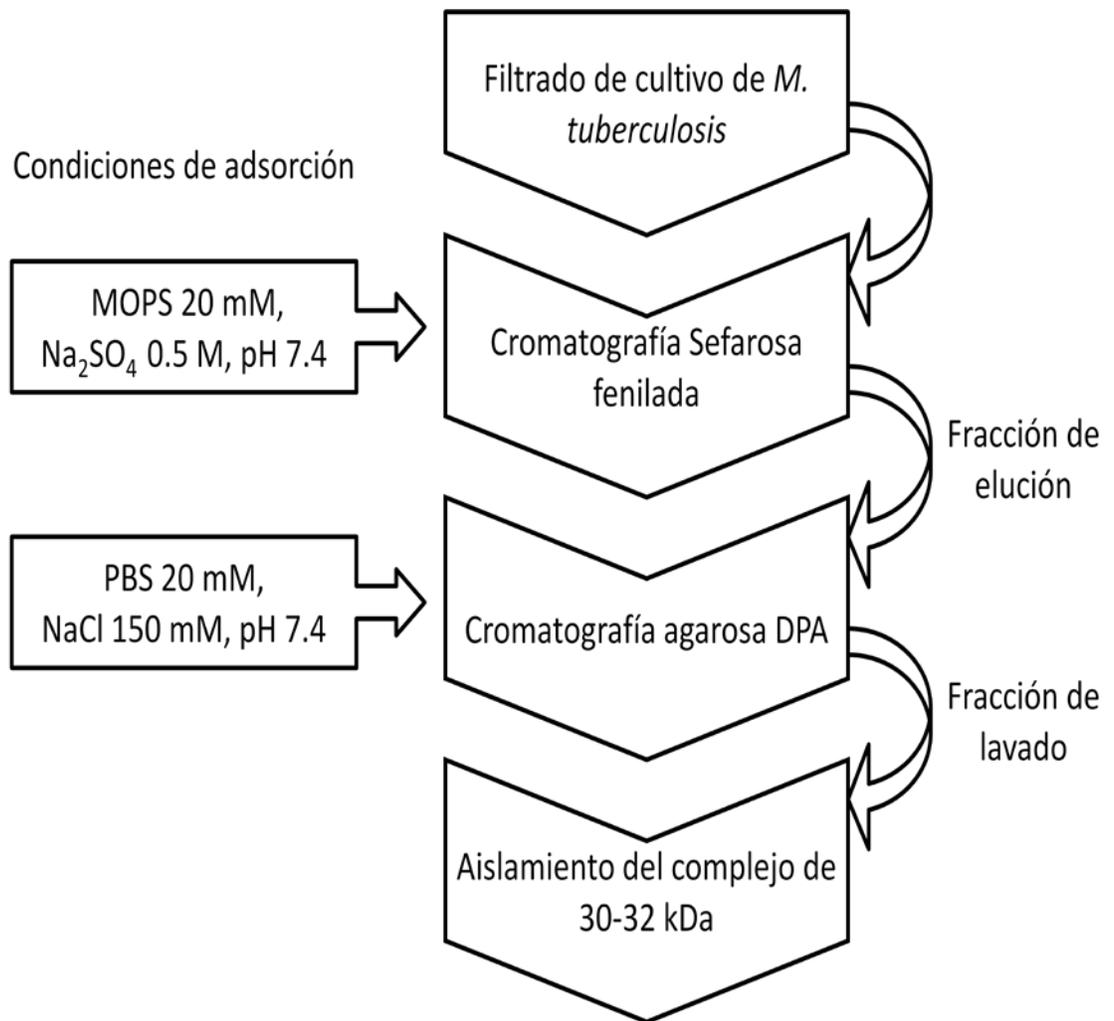


Figura 2. Esquema cromatográfico para el aislamiento del complejo de 30-32 kDa.

Ensayo de Hemaglutinación

Para la prueba de aglutinación se utilizaron eritrocitos humanos obtenidos por punción venosa. Los eritrocitos fueron lavados 5 veces con PBS (amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) y posteriormente tratados con tripsina al 0.075 % por una hora a temperatura ambiente. El ensayo de hemaglutinación se realizó en placas de fondo redondo, mezclando 50 μ L de la suspensión de eritrocitos lavados y tripsinizados al 2% con 100 μ L de las distintas diluciones de la proteína a evaluar. Se probaron diluciones seriadas 1:2 de las proteínas de filtrado de cultivo hasta la dilución 1:128. La mezcla se incubó a 37 ° C por una hora y después se observó la aglutinación. La actividad hemaglutinante (AH) se reportó como la mayor dilución que dio aglutinación. Se usó como control positivo a la lectina Concanavalina A, a una concentración de 1 mg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de Adsorción

Las corridas cromatográficas en “batch” se realizaron como ensayos de adsorción para la búsqueda preliminar de proteínas afines a los adsorbentes y para conocer perfiles de adsorción que podrían ser usados para diseñar un esquema de aislamiento potencialmente útil para el aislamiento de grupos proteicos específicos. La búsqueda de proteínas bioafines fue dirigida específicamente a lectinas y O-glicoproteínas micobacterianas.

En los ensayos de adsorción para la búsqueda de lectinas se usaron matrices cromatográficas con monosacáridos, homopolisacáridos y heteropolisacáridos como ligandos. La afinidad de las proteínas del filtrado de cultivo micobacteriano (CFP) hacia los adsorbentes se probó en presencia y ausencia de cationes divalentes, para buscar la unión de posibles lectinas tipo-C. Los ensayos fueron negativos en ambas condiciones, lo que sugiere la ausencia de lectinas afines a galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina, así como a los diversos carbohidratos presentes en la fetuína. A pesar de que un estudio genómico realizado recientemente, identificó 11 genes codificadores de potenciales lectinas en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Singh y col., 2007), en este estudio no se aislaron proteínas afines a los carbohidratos ensayados. Dentro de las potenciales lectinas, se sugiere la existencia de siete hemaglutininas, dos aglutininas sensibles a manosa (MSHA, por sus siglas en inglés), una lectina afín a galactosa y una lectina tipo-C. De ellas, sólo se han podido purificar dos proteínas con afinidad a manosa (MSHA) que fueron identificadas por su homología a proteínas intracelulares de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Singh y col., 2007). Además, las potenciales MSHA micobacterianas (Rv2813 y Rv3659) son proteínas aún no caracterizadas de las cuales se desconoce su localización subcelular y es posible que no se encuentren en el filtrado de cultivo. De igual manera, el estudio realizado por

Singh y col., hace referencia a la proteína Rv1419, una potencial lectina sensible a galactosa; sin embargo esta proteína se localiza en la membrana de *Mycobacterium tuberculosis* (Proteome Database Uniprot), lo que puede ser la razón por lo que no se recuperó en este estudio con los ensayos realizados con Sefarosa 6B y agarosa-fetuína.

Para corroborar la ausencia de hemaglutininas se realizó un ensayo de hemaglutinación al filtrado de cultivo micobacteriano, en presencia y ausencia de cationes divalentes. No se observó actividad hemaglutinante en el filtrado de cultivo a diferencia del control positivo (Concanavalina A) que mostró actividad hasta la dilución 1:64 (20 µg/mL), lo que es una demostración de que los resultados de los ensayos cromatográficos son confiables. Además, la adsorción observada de la lectina Concanavalina A al adsorbente agarosa-fetuína y al Sephadex G-75, así como la falta de adsorción a la Sefarosa 6B, le proporcionan certidumbre a los resultados obtenidos.

En la búsqueda de glicoproteínas en el CFP de *M. tuberculosis* H37Rv se usó como adsorbente a jacalina, la cual es una lectina con afinidad a N-acetilgalactosamina- α 1-Ser/Thr con el carbono 6 de GalNAc no sustituido (Tachibana y col., 2006). El resultado negativo en el ensayo de adsorción con agarosa-jacalina sugiere la ausencia de este tipo de O-glicanos en las proteínas de filtrado de cultivo micobacteriano. Lo anterior es apoyado por el hecho de que hasta el momento no se ha encontrado ninguna acetilgalactosamil transferasa en el proteoma micobacteriano (Proteome Database Uniprot).

Los ensayos de interacción hidrofóbica del CFP, se realizaron con Sefarosa fenilada, en condiciones caotrópicas (MOPS 20 mM, Na₂SO₄ 0.5 M, pH 7.4). La electroforesis de la fracción de elución, obtenida con MOPS 20 mM (Figura 3, A) muestra la presencia de 8 bandas con masas moleculares estimadas de 31, 43.5, 49, 54.5, 60.6, 68.6, 75.9 y 86.6 kDa. Los resultados revelan principalmente el enriquecimiento de la fracción de elución con las proteínas que forman parte del complejo de 30-32 kDa, lo cual es consistente a

estudios previos (Castillon-Campaña, 2008; Nagai y col., 1991). Estos resultados sugieren que la matriz Sefarosa fenilada tiene un potencial uso como primer adsorbente en un esquema cromatográfico para el aislamiento de este complejo.

Al igual que con Sefarosa fenilada, los ensayos con agarosa-IDA-Ni⁺² y agarosa-DPA-Ni⁺² en condiciones caotrópicas (Figura 3, B y C) permitieron la adsorción principal del complejo proteico de 30-32 kDa. Los mismos adsorbentes equilibrados en condiciones fisiológicas (Amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) (Figura 3, D y E) no adsorbieron estas proteínas, lo que sugiere el fuerte componente hidrofóbico de la interacción entre el adsorbente y las proteínas del complejo de 30-32 kDa. Cabe destacar que los perfiles de adsorción de agarosa-IDA-Ni⁺² y agarosa-DPA-Ni⁺² en condiciones fisiológicas (Figura 3, D y E) muestran otras proteínas con afinidad a níquel entre las cuales destaca la proteína de 66 kDa, la cual fue recuperada de ambos adsorbentes. Esta proteína puede corresponder a la TB66 la cual fue aislada previamente de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv mediante cromatografía de afinidad a níquel usando el ácido nitrilotriacético (NTA-Ni⁺²) (Deshpande y col., 1994c). Para corroborar lo anterior se sugiere realizar posteriormente ensayos de adsorción con agarosa-fibronectina, por la afinidad que tiene la TB66 hacia esta proteína.

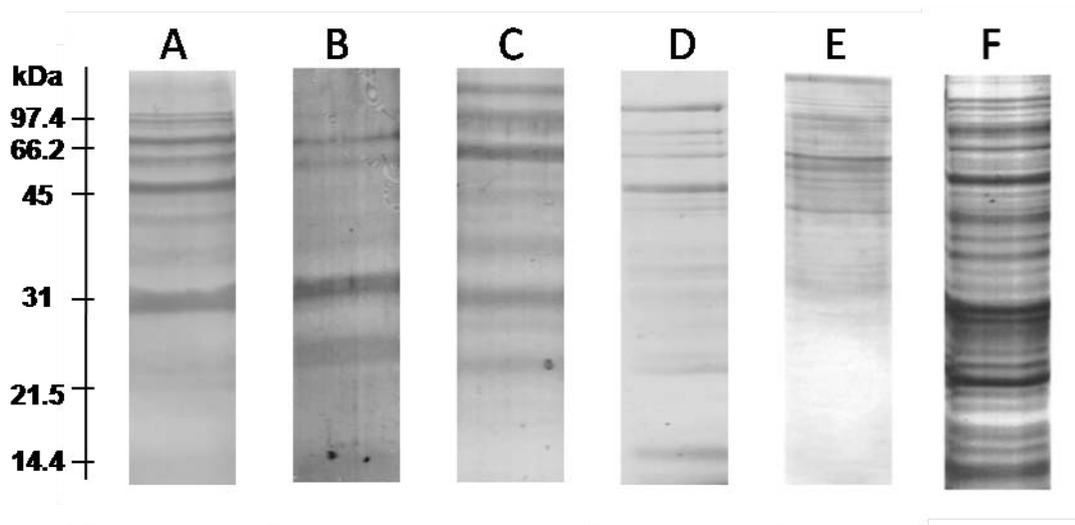


Figura 3. Perfiles de adsorción de ensayos cromatográficos en “batch”. (A) Sefarosa fenilada en condiciones castrópicas. (B y C) Agarosa IDA-Ni⁺² y Agarosa DPA-Ni⁺² en condiciones castrópicas. (D y E) Agarosa IDA-Ni⁺² y Agarosa DPA-Ni⁺² en condiciones fisiológicas. (F) Proteína total.

Aislamiento del Antígeno 85

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos de adsorción por cromatografía en “batch” se escogió la Sefarosa fenilada como primer parámetro de un esquema cromatográfico en columna para el aislamiento del complejo de 30-32 kDa. Con el método en “batch” el porcentaje de recuperación es relativamente bajo debido a la dificultad de separar completamente el eluato. Por ello, al ensayar el CFP con la Sefarosa fenilada, el porcentaje de recuperación fue del 89 % y tal como se esperaba, este porcentaje se incrementó significativamente (97.4%) al hacer la separación cromatográfica en columna.

Para determinar la cantidad de muestra inicial para los ensayos en columna, se estimó el índice de saturación de la Sefarosa fenilada con proteína de filtrado de cultivo, mismo que fue de 1.67 mg/mL de matriz. Tomando en cuenta este valor se pudo concluir que en los ensayos cromatográficos en “batch” la matriz fue saturada, porque se aplicaron 3 mg de proteína por cada mL de matriz. Por ello, en los ensayos en columna se cargaron 2 mg de proteína de filtrado de cultivo micobacteriano a 1 mL de adsorbente; un elemento adicional para calcular la cantidad total de proteína debería cargarse a la matriz fue la estimación previa, de que el 50 % del filtrado proteico posee carácter hidrofóbico (Castillon-Campaña, 2008). De esta manera, pudo demostrarse que las fracciones de elución obtenidas en los ensayos cromatográficos en columna de Sefarosa fenilada mostraron un mayor grado de pureza (por la homogeneidad electroforética observada en las proteínas que componen al complejo de 30-32 kDa) que el método en “batch” (Figura 4).

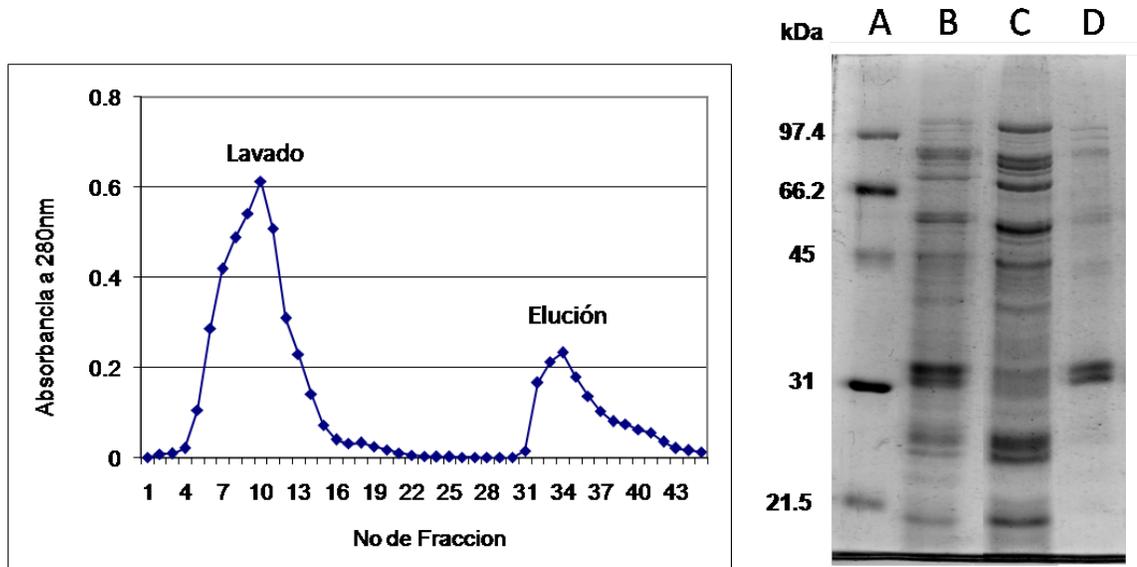


Figura 4. Cromatograma y electroforetograma de Sefarosa fenilada.

Fracciones cromatográficas del filtrado proteico de *M. tuberculosis* H37Rv obtenidas con Sefarosa fenilada bajo condiciones caotrópicas. (A) Marcador de peso moléculas de bajo rango. (B) Proteína total. (C) Fracción de lavado (D) Fracción de elución.

Finalmente, el aislamiento del antígeno 85 se logró acoplado una segunda etapa cromatográfica a la realizada con Sefarosa fenilada en condiciones caotrópicas. Para ello, la fracción de elución obtenida al cargar el CFP a la Sefarosa fenilada (Figura 5, B), fue aplicada después a la matriz agarosa-DPA-Ni⁺² bajo condiciones fisiológicas. Esta segunda etapa cromatográfica, fue definida así debido a que las proteínas del complejo 85 solamente se adsorben a la matriz IMAC en condiciones caotrópicas. Al usar condiciones fisiológicas en la matriz IMAC, las proteínas del complejo 85 fueron recuperadas en la fracción de lavado (Figura 5B). El notable enriquecimiento de esta fracción con las proteínas de interés se demuestra al compararla con la fracción de elución (Figura 5C). El aislado se confirmó como antígeno 85 por medio de Western-Blot usando el anticuerpo monoclonal anti-Ag85 [HYT27]. No obstante los buenos resultados en el aislamiento de las proteínas del complejo 85, una debilidad importante es la baja recuperación proteica en la fracción de lavado, que fue solamente del 4.8%. Otro elemento que debe destacarse es la presencia en la fracción de lavado de una banda contaminante (Figura 5, B) que se logra apreciar en la región de 16 kDa y puede corresponder a la proteína de shock térmico Hsp16.3 ya que, debido a su carácter hidrofóbico reportado, pudo haber sido adsorbida a Sefarosa fenilada (Yang y col., 1999) pero no por agarosa-DPA-Ni⁺². En un estudio de los principales antígenos inmunogénicos de *Mycobacterium tuberculosis*, se aisló al antígeno 85 mediante cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel, con un rendimiento aproximado de 160 µg por litro cultivo (medio Middlebrook 7H9) (Horwitz y col., 1995), lo cual es muy similar a los 153 µg por litro de medio Sauton obtenidos con el esquema propuesto en este trabajo, lo que sugiere una buena eficiencia en el aislamiento del antígeno 85.

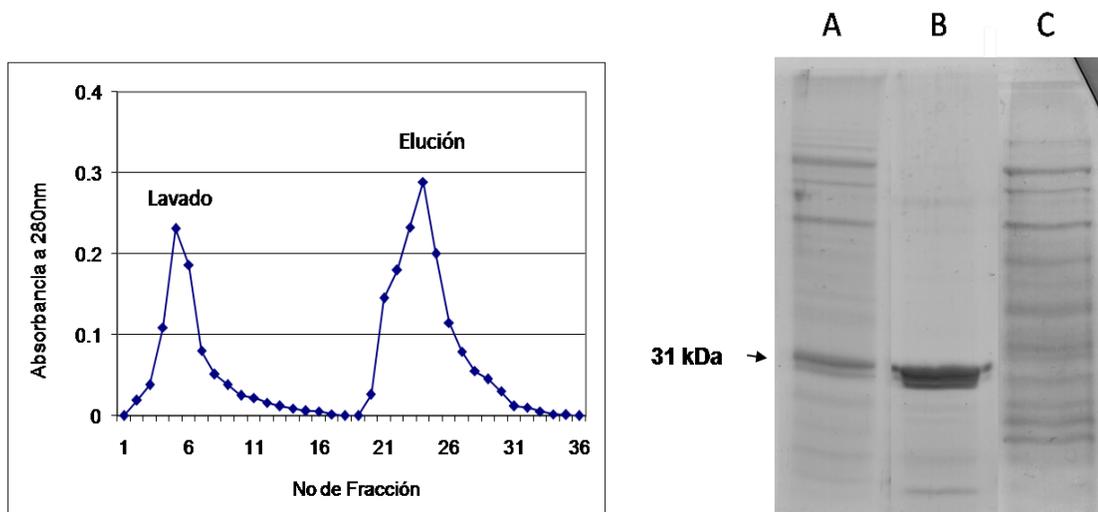


Figura 5. Cromatograma y electroforetograma del aislamiento del antígeno 85 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

La fracción de elución obtenida por la cromatografía del CFP en Sefarosa fenilada fue cargada en agarosa-DPA-Ni⁺² bajo condiciones fisiológicas. (A) Elución de Sefarosa fenilada en condiciones caotrópicas. (B) Fracción de lavado de agarosa-DPA- Ni⁺². (C) Fracción de elución de agarosa-DPA- Ni⁺².

En otros trabajos, también se ha logrado el aislamiento de las proteínas del complejo 85, pero en ellos se han tenido que usar esquemas de tres a cuatro etapas cromatográficas, principalmente filtración en gel, interacción hidrofóbica e intercambio aniónico (Horwitz y col., 1995; Nagai y col., 1991), reduciendo con ello tanto el rendimiento como la estabilidad proteica (Ly y Wasinger, 2011; Zhang y col., 2010). En este trabajo se demostró que al usar adecuadamente la cromatografía de afinidad por metales acoplada a la cromatografía de interacción hidrofóbica, es posible obtener un buen aislamiento proteico; además la utilidad de IMAC para el aislamiento del complejo 85, sugiere su potencial aplicación para el aislamiento de otros antígenos micobacterianos, bajo condiciones cromatográficas alternativas a las utilizadas en el presente trabajo

Finalmente, algunas modificaciones al esquema propuesto en este trabajo podrían reducir la contaminación de la fracción de lavado hasta llegar a la purificación del antígeno 85. El uso de gradientes de Na_2SO_4 en la primera etapa del esquema podría permitir la elución selectiva del complejo de 30-32 kDa separándolo de las demás proteínas hidrofóbicas. De igual manera, modificaciones en las condiciones de adsorción en la cromatografía de afinidad a metales así como el uso de diferentes quelantes y metales podría ayudar a conseguir tal objetivo.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción bajo las condiciones probadas indican la ausencia de lectinas afines a galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina y a fetuína en el filtrado de cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- Las proteínas de filtrado de cultivo líquido de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv no mostraron actividad para glutinar eritrocitos humanos.
- No se encontraron O-glicoproteínas de N-acetilgalactosamina- α 1-Ser/Thr en el filtrado de cultivo micobacteriano, lo que sugiere que *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv no expresa la enzima acetilgalactosamil transferasa.
- En este trabajo se desarrolló, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica y de afinidad a metales, un esquema para el aislamiento del complejo 85, el cual podría ser una herramienta más para los estudios proteómicos e inmunológicos de *Mycobacterium tuberculosis* así como de otras especies del género.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J. y Heron, I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 59, 1905.
- Barnes, P. F., Mehra, V., Rivoire, B., Fong, S. J., Brennan, P. J., Voegtline, M. S., Minden, P., Houghten, R. A., Bloom, B. R. y Modlin, R. L. 1992. Immunoreactivity of a 10-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 148, 1835.
- Betancourt J., Ruiz N., Cruces P., Velásquez W. 2002. Sensibilidad de los métodos baciloscopía, cultivo y ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, en pacientes del Edo. Vargas-Venezuela, *Kasmera*. 30-2: 137-144.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. y Schäfer, F. 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol* 463, 439.
- Brennan, P. y Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64, 29.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M. I., Bottai, D., Demangel, C., Hinds, J., Neyrolles, O., Butcher, P. D., Leclerc, C., Cole, S. T. y Brosch, R. 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* 74, 88.
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Cuarta edición ed. Garland Science.
- Builder, S. 1993. *Hydrophobic Interaction Chromatography: PRINCIPLES AND METHODS*. Second Edition ed. amersham pharmacia biotech.
- Bunting, K. A., Cooper, J. B., Tickle, I. J. y Young, D. B. 2002. Engineering of an intersubunit disulfide bridge in the iron-superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 397, 69.

- Calleri, E., Temporini, C. y Massolini, G. 2011. Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors. *J Pharm Biomed Anal* 54, 911.
- Castillon-Campaña, L. G. 2008. Estandarización del Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9 y Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas del Filtrado de Cultivo. Universidad de Sonora, Hermosillo Sonora México.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. r., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M., Rajandream, M., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J., Taylor, K., Whitehead, S. y Barrell, B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537.
- Cummins, P. M., Dowling, O. y O'Connor, B. F. 2011. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Methods Mol Biol* 681, 215.
- Del Portillo P., Reyes A., Salazar L., Menéndez M., García M. 2007. Genomics and Proteomics. Palomino JC., Cardoso LS., Ritacco V. Ch4: In *Tuberculosis 2007. From basic science to patient care.* p 113-127. Brazil. www.TuberculosisTextbook.com
- Deshpande, R. G., Khan, M. B., Bhat, D. A. y Navalkar, R. G. 1994a. Isolation of a 43 kDa protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its identification as a pyridine nucleotide transhydrogenase. *J Appl Bacteriol* 77, 639.
- Deshpande, R. G., Khan, M. B., Bhat, D. A. y Navalkar, R. G. 1994b. Purification and partial characterisation of a novel 66-kDa seroreactive protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Med Microbiol* 41, 173.

- Deshpande, R. G., Khan, M. B., Bhat, D. A., y Navalkar, R. G. (1994c). Skin reactivity and fibronectin-binding property of TB66 (66-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*). *J Med Microbiol* 41, 378.
- Dobos, K., Khoo, K., Swiderek, K., Brennan, P. y Belisle, J. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 178, 2498.
- Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E. y O'Kennedy, R. 2011. Immunoaffinity chromatography. *Methods Mol Biol* 681, 35.
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bishai, W., Jacobs Jr, W. R., Venter, J. C. y Fraser, C. M. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184, 5479.
- Gao, M., Qi, D., Zhang, P., Deng, C. y Zhang, X. 2010. Development of multidimensional liquid chromatography and application in proteomic analysis. *Expert Rev Proteomics* 7, 665.
- Ge, H., Walhout, A. J. y Vidal, M. 2003. Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends Genet* 19, 551.
- Gehring, A. J., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Harding, C. V. y Boom, W. H. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 173, 2660.
- Greenstein, A. E., Grundner, C., Echols, N., Gay, L. M., Lombana, T. N., Miecskowski, C. A., Pullen, K. E., Sung, P. Y., y Alber, T. 2005. Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9, 167.

- Harth, G., Lee, B. Y., Wang, J., Clemens, D. L. y Horwitz, M. A. 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry y immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 64, 3038.
- Horwitz, M., Lee, B., Dillon, B. y Harth, G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1530.
- Hutter, B. y Singh, M. 1999. Properties of the 40 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, a functional L-alanine dehydrogenase. *Biochem J* 343 Pt 3, 669.
- Jungblut, P. 2001. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes Infect* 3, 831.
- Jungblut, P., Müller, E., Mattow, J. y Kaufmann, S. 2001. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun* 69, 5905.
- Koolman, J. y Roehm, K.-H. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd edition ed.
- Kumar, K. S., Uma Devi, K. R., y Alamelu, R. 2002. Isolation and evaluation of diagnostic value of two major secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 44, 225.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Lim, J. H., Park, J. K., Jo, E. K., Song, C. H., Min, D., Song, Y. J., y Kim, H. J. 1999. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 67, 6187.
- Lubert, S. 1995. *Bioquímica*. Cuarta ed. Editorial Reverte, S.A.
- Ly, L., y Wasinger, V. C. 2011. Protein and peptide fractionation, enrichment and depletion: tools for the complex proteome. *Proteomics* 11, 513.

- Marahatta, S. B. 2010. Multi-drug resistant tuberculosis burden and risk factors: an update. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 8, 116.
- Montaño, L., Massó, F., Páez, A., Sandoval, S., Vázquez, L., Sánchez, L., Fournet, B. y Zenteno, E. 1994. Isolation of a 32 kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein by lectin affinity chromatography. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 108, 265.
- Nagai, S., Wiker, H., Harboe, M. y Kinomoto, M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59, 372.
- Nelson, D. y Cox, M. 2004. *Lehninger PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY*. Fourth edition ed.
- Neverova, I. y Van Eyk, J. E. 2005. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815, 51.
- O'Fágáin, C., Cummins, P. M. y O'Connor, B. F. 2011. Gel-filtration chromatography. *Methods Mol Biol* 681, 25.
- Pierce Biotechnology, I. 2006. Batch and spin cup methods for affinity purification of proteins. Printed in the USA.
- Porath, J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 3, 263.
- Romain, F., Augier, J., Pescher, P., y Marchal, G. 1993. Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5322.
- Rosenkrands, I., Rasmussen, P., Carnio, M., Jacobsen, S., Theisen, M. y Andersen, P. 1998. Identification and characterization of a 29-kilodalton protein from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate recognized by mouse memory effector cells. *Infect Immun* 66, 2728.

- Russell, D. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 569.
- Singh, D., Chandran, D., Jeyakani, J. y Chandra, N. 2007. Scanning the genome of *Mycobacterium tuberculosis* to identify potential lectins. Protein Pept Lett 14, 683.
- Sinha, N. y Smith-Gill, S. J. 2002. Protein Structure to Function Via Dynamics. Protein & Peptide Letters 9, 367.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 16, 463.
- Tachibana, K., Nakamura, S., Wang, H., Iwasaki, H., Maebara, K., Cheng, L., Hirabayashi, J. y Narimatsu, H. 2006. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. Glycobiology 16, 46.
- Vashishtha, V. M. 2009. WHO Global Tuberculosis Control Report 2009: Tuberculosis elimination is a distant dream. Indian Pediatr 46, 401.
- Verbelen, C., Dupres, V., Raze, D., Bompard, C., Loch, C., y Dufrêne, Y. (2008). Interaction of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin with actin, as evidenced by single-molecule force spectroscopy. J Bacteriol 190, 7614.
- Waddell, S. J. y Butcher, P. D. 2007. Microarray analysis of whole genome expression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Mol Med 7, 287.
- Walther, T. C. y Mann, M. 2010. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. J Cell Biol 190, 491.
- Wayne, L. G. y Hayes, L. G. 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. Infect Immun 64, 2062.

- Xia F., Nagrath D., Garde S., Steven M. 2004. Evaluation of selectivity changes in HIC systems using a preferential interaction based analysis cramer. *Biotechnol Bioeng.* 87(3):354-363.
- Yang, H., Huang, S., Dai, H., Gong, Y., Zheng, C. y Chang, Z. 1999. The *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Sci* 8, 174.
- Zhang, X., Fang, A., Riley, C. P., Wang, M., Regnier, F. E. y Buck, C. 2010. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics--a review. *Anal Chim Acta* 664, 101.
- Zhou, Z., Yang, H. y Zhong, B. 2008. From genome to proteome: great progress in the domesticated silkworm (*Bombyx mori* L.). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 601.