

# UNIVERSIDAD DE SONORA

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



**Estandarización del Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9 y Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas del Filtrado de Cultivo**

Tesis de Maestría que para obtener el Grado de

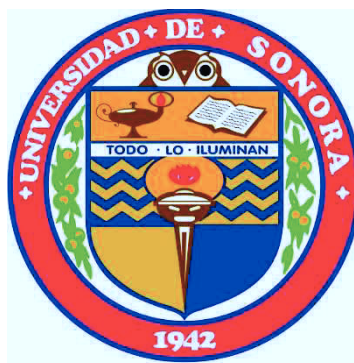
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

Presenta:

**Lucía Guadalupe Castellón Campaña**

# 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

## APROBACIÓN

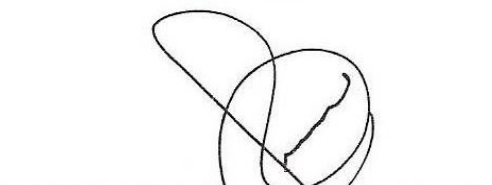
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de la Q.B. Lucía Guadalupe Castillón Campaña, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

  
Dra. Maria del Carmen Candia Plata

Director Académico

  
Dra. Luz Vázquez Moreno

Secretario

  
Dr. Ramón Alberto Rascón Pacheco

Vocal

  
M.C. Griselda M. Moreno Ibarra

Suplente

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Ciencias Químico Biológicas y a la Dirección de Desarrollo Académico por darme la oportunidad de cumplir una etapa más de mi crecimiento académico.

A la Fundación Mexicana para la Salud, Capítulo Sonora, por los fondos asignados al proyecto “Identificación de Antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv” cuyo responsable fue la Dra. Maria del Carmen Candia Plata.

Al Departamento de Polímeros de la Universidad de Sonora y en especial a Rocío Sugich por su gran disposición y apoyo en el estudio microcalorimétrico realizado en este proyecto.

Al Laboratorio Estatal de Salud de Pública y muy en especial al Laboratorio de Micobacterias, por habernos donado el material biológico y permitimos usar sus instalaciones. Agradezco al M en C Román Escobar López, a la QB Ma. del Rosario Aguayo Verdugo y en especial a Miriam Patricia Lugo Zazueta por su gran apoyo y por compartir su valiosa experiencia.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis Dra. Maria del Carmen Candia Plata, ejemplo de disciplina y profesionalismo, por su valiosa dirección y asesoría permanente, por su apoyo incondicional, su confianza y la amistad que me brindó durante este tiempo.

A mis sinodales, Dra. Luz Vázquez Moreno, M.C. Griselda M. Moreno Ibarra y al Dr. Alberto Rascón por su gran disposición y acertados comentarios en el desarrollo del presente trabajo, así como por sus valiosos consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Karla, Lino, Edson, Gaby, Iriqui, Leonel, Carla, Jonathan, Alma, Denisse, Abi, Susana, Karen, Roberto, Irma, Carlos e Irasema, por todos los buenos momentos compartidos y su incondicional apoyo en el desarrollo de mi tesis, a Cayita por su amistad y por compartirme sus conocimientos, y a Lucila, por guiar mis primeros pasos en el laboratorio.

A Karla Elena Zavalza, por su gran disposición y eficiencia en la solución de los problemas administrativos.

A las chicas del café, compañeras, compañeros y amigas de Q. B. por estar ahí, siempre con palabras de ánimo y sobre todo por los buenos momentos compartidos

A Samuel y Armida por compartir los momentos importantes de mi vida.

A mi familia, que desde la distancia, en todo momento me ha brindado su apoyo moral y todo su amor, principalmente a mi hermano Mario quien ha compartido conmigo la ilusión de cumplir una meta más en mi vida.

Y por último y no menos importante, sino por el contrario, mi agradecimiento eterno a mi hijo Omar, por apoyarme en todo momento, principalmente siendo un excelente hijo pero de manera muy importante por ser mi fuente de inspiración. A Ernesto por su amor, paciencia y la ayuda que me ha dado siempre. Gracias mis amores.

## **DEDICATORIA**

**Con todo mi amor:**

**A mi hijo, ya que él ha sido y es, fuente continua de energía para seguir avanzando**

**A la memoria de mi padre**

**A Mario por estar siempre ahí**

**A Ernesto, por haber llegado a mi vida**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>OBJETIVOS</b> .....	xii
Objetivo General.....	xi
Objetivos Específicos.....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	4
Etiología y Epidemiología de la Tuberculosis Humana .....	4
Características Generales de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
El Proteoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	10
Proteínas del Filtrado de Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	14
Métodos de Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para la Realización de Estudios Proteómicos.....	16
Estrategias para la Identificación y Caracterización de las Proteínas Micobacterianas.....	17
Aislamiento y Purificación de Proteínas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	18
Factores que Afectan la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	20

## ÍNDICE (Continuación)

	<b>Página</b>
Tipo y densidad de ligando.....	20
Tipo y concentración de sal.....	22
Potencial de dispersión iónico en el efecto de la especificidad iónica.....	22
Efecto del pH.....	24
Efecto de la temperatura.....	24
Aditivos.....	24
Ventajas de la HIC para Separar Proteínas Nativas.....	25
Calorimetría de Titilación Isotérmica.....	26
Importancia del Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas en el Filtrado de Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en Medio Líquido M7H9.....	31
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
Tipo de Estudio, Plan Experimental General y Sesgos Previstos.....	34
Materiales y Reactivos.....	34
Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	35
Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	35
Obtención de Filtrado Proteico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv....	36
Síntesis de los Geles para Cromatografía de Interacción Hidrofóbicas.....	36



## ÍNDICE (Continuación)

	<b>Página</b>
Condiciones Cromatográficas.....	37
Monitoreo de los ensayos cromatográficos y cuantificación de proteínas.....	37
Caracterización Electroforética de Filtrado Proteico.....	37
Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).....	38
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
Estandarización del Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en Medio Líquido M7H9 y Caracterización Electroforética del Filtrado Proteico Crudo.....	39
Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas, a Partir del Filtrado del Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en Medio Líquido M7H9.....	58
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Clasificación funcional de los genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	13
II	Serie de Hofmeister, efecto de algunos aniones y cationes en la precipitación de proteínas.....	21
III	Composición de los enriquecimientos usados en el medio M7H9 para el cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv. ....	41
IV	Concentración proteica aparente del filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, utilizando los métodos de Lowry y Bradford.....	57
V	Parámetros termodinámicos, obtenidos por calorimetría isotérmica, entre los adsorbentes hidrofóbicos y el filtrado proteico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv de 4 semanas, en medio líquido M7H9 enriquecido con 2% de Triptosa.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Esquema de las envolturas de una eubacteria ácido-alcohol resistente .....	7
2	Obtención de los datos crudos de las inyecciones automáticas realizadas en un microcalorímetro.....	28
3	Gráfica obtenida a partir de los datos microcalorimétricos procesados .....	29
4	Isotermas de unión entre una biomolécula y un ligando, para varios valores del parámetro c, presentadas como derivadas.....	30
5	Perfiles electroforéticos de los filtrados de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en M7H9, en SDS-PAGE al 15% y teñidos con plata.....	42
6	Perfiles electroforéticos de las proteínas aisladas con Sefarosa acetilada a partir de los filtrados del cultivo de 4 semanas, en M7H9, de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	43
7	Perfil electroforético del filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv de 4 semanas en M7H9, enriquecido con Bactocasitona al 2, 4 y 6%.....	45
8	Perfil electroforético del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en M7H9, enriquecido con Triptosa al 2, 4 y 6%.....	47
9	Perfiles electroforéticos del filtrado de cultivo en M7H9, por 6 semanas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	49
10	Perfiles electroforéticos del filtrado de cultivo en M7H9, por 8 semanas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	50
11	Características macroscópicas de los cultivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en medio M7H9 enriquecido con Bactocasitona .....	52

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
12	Perfiles electroforéticos de los filtrados de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa en concentraciones de 2, 4 y 6%, separados por SDS-PAGE y teñidos con plata.....	53
13	Perfil electroforético de filtrado de cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en medio Sauton.....	54
14	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa acetilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con triptosa al 2%.....	60
15	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa acetilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.....	62
16	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa butilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa al 2%.....	63
17	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa butilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.....	64
18	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa hexilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa al 2%.....	65
19	Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa hexilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.....	67
20	Titulación calorimétrica típica de la interacción entre Sefarosa acilada y proteínas micobacterianas.....	69

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estandarizar el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en medio líquido M7H9 para el aislamiento de las proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo.

### **Objetivos Específicos**

1. Estandarizar el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en medio líquido M7H9, para la obtención de proteínas en el filtrado de cultivo.
2. Sintetizar tres matrices aciladas, para aislar las proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por cromatografía de interacciones hidrofóbicas.
3. Caracterizar las fracciones proteicas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras y determinar el tipo de interacción termodinámica y las constantes de afinidad hacia Sefarosa-acetilada y Sefarosa hexilada, por microcalorimetría.

## RESUMEN

Justificación: En las últimas décadas, una parte de la investigación del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se ha centrado en las proteínas que éste libera al medio de cultivo en el que crece *in vitro* (CFP, por las siglas del término en inglés Culture Filtrate Protein). Con este enfoque se espera un avance significativo en el conocimiento de la patogénesis de la tuberculosis y el desarrollo de nuevas vacunas y métodos para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Entre las proteínas del CFP, se encuentran proteínas hidrofóbicas relacionadas con la capacidad de invasión, proliferación y supervivencia de la bacteria dentro de las células infectadas, lo que sugiere el potencial valor del aislamiento y purificación este tipo de proteínas. Sin embargo, para estudiar estas proteínas es necesario obtener el CFP en cantidades adecuadas y luego separar a las hidrofóbicas bajo condiciones que preserven su estabilidad. Hipótesis: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, cultivado en medio líquido M7H9 enriquecido con caseína hidrolisada, expresa proteínas hidrofóbicas en la cantidad necesaria para separarlas por cromatografía de interacciones hidrofóbicas. Objetivo: Estandarizar el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en medio líquido M7H9 enriquecido con caseína hidrolisada, para el aislamiento de las proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo. Materiales y Métodos: Este fue un trabajo experimental, en el que se utilizaron cultivos axénicos de *M. tuberculosis* H37Rv desarrollados en el medio de cultivo líquido M7H9 para obtener las proteínas del medio líquido e identificar proteínas afines a adsorbentes hidrofóbicos acilados. Para ello, se probaron dos fuentes distintas de caseína hidrolisada (Bacto-casitona y Triptosa) para enriquecer el medio M7H9, a tres porcentajes (2, 4 y 6%) y tres diferentes tiempos de incubación (4, 6 y 8 semanas). El FP fue cargado a tres adsorbentes hidrofóbicos (Sefarosa acetilada, Sefarosa butilada y Sefarosa hexilada,) y, finalmente, los aislados proteicos obtenidos con Sefarosa acetilada y Sefarosa hexilada, fueron evaluados por microcalorimetría isotérmica para estimar el tipo de interacción hidrofóbica y la constante de afinidad entre el adsorbente y las proteínas. Resultados y Conclusiones: Se

establecieron las condiciones de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio líquido M7H9 enriquecido con Triptosa y Bacto-casitona, con un rendimiento proteico en el filtrado de cultivo de 2.3 a 3.5 mg/L. Al comparar los filtrados de cultivo nativos obtenidos con Bacto-casitona y Triptosa, los perfiles electroforéticos fueron aparentemente similares, sin embargo se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas mediante los ensayos cromatográficos. Con ambos enriquecimientos se demostró que una proporción inesperadamente alta de proteínas del filtrado proteico micobacteriano (aproximadamente 50%) asume un comportamiento hidrofóbico bajo las condiciones cromatográficas ensayadas en este trabajo; la adsorción de las proteínas del filtrado de cultivo y los geles acilados, se basa en una interacción endotérmica entrópicamente dirigida. La fracción de elución obtenida con Sefarosa acetilada y el cultivo de 4 semanas con Triptosa al 2%, parece ser una fuente para la purificación de bandas asociadas por su masa molecular con las proteínas del complejo 85, mientras que las fracciones de elución obtenidas en Sefarosa butilada y hexilada, a partir del mismo cultivo, podrían servir como fuente para la purificación de bandas relacionadas con proteínas de estrés térmico tales como las de 10, 23, 65 y 70 kDa (estas bandas son más intensas en los cultivos de 6 y 8 semanas) y bandas como la 38 y 45/47 kDa, asociadas con proteínas fuertemente inmunorreactivas. Finalmente, con la estandarización del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la demostración de la presencia de proteínas hidrofóbicas en el filtrado de cultivo y su aislamiento con las matrices hidrofóbicas, se sientan las bases para la purificación y caracterización bioquímica e inmunoquímica de estas proteínas micobacterianas.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), es una infección bacteriana crónica, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Esta bacteria, afecta particularmente a los pulmones, pero puede dañar también otros órganos del cuerpo. De acuerdo con las cifras de la Organización Mundial de Salud (OMS), el número estimado de nuevos casos de tuberculosis en el 2006 fue de 139 por cada 100,000 habitantes (9,2 millones), además cada año se producen 24 muertes por tuberculosis por cada 100,000 habitantes (1.6 millones) (Bermejo y col., 2007)

Con los conocimientos recientes del genoma de *M. tuberculosis* (Cole y col., 1998) se creyó que se avanzaría radicalmente en el control de la enfermedad, sin embargo muy rápido se supo que las secuencias genómicas de la bacteria no predicen fielmente las características de la mayoría de las proteínas micobacterianas (Málen y col., 2007), por el contrario, tales proteínas son mucho más complejas de lo que se esperaría a partir de la lectura del código genético de la bacteria. Es en parte por esta razón, que aún no se conoce completamente la patogénesis de la tuberculosis ni se cuenta con métodos para su control epidemiológico global.

Las proteínas hidrofóbicas constituyen una proporción significativa del proteoma de *M. tuberculosis*. Este subgrupo proteico está localizado principalmente en la membrana micobacteriana y en él destacan cuantitativamente proteínas como las PE\_PGRS, que al parecer son la base de la variación antigénica micobacteriana (Brennan y col., 2005), y las Erp (exported repetitive protein) de la superficie celular. Los segmentos hidrofóbicos de estas proteínas les permiten mantenerse en su localización membranal nativa, asegurando así su participación en mecanismos de virulencia y patogenicidad específicos. Pero debido a que se han detectado algunas de esas proteínas hidrofóbicas en los compartimentos de las células infectadas, se cree que allí cumplen otras funciones, distintas o complementarias a las que realizan cuando



forman parte de las membranas (Berthet y col., 1995; Berthet y col., 1998; Kosíncová y col., 2004).

Por otro lado, la facultad que tiene *M. tuberculosis* de crecer extracelularmente y diseminarse fuera de los pulmones, se ha relacionado con la presencia de proteínas de superficie (como las de 30, 60 y 66 kDa) que se liberan al filtrado de cultivo (Monroy y col., 2000); en algunas de esas proteínas se han identificado grandes dominios hidrofóbicos con funciones desconocidas. Otras proteínas con regiones hidrofóbicas extensas, han sido vinculadas a la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir y proliferar en el interior de los macrófagos (un grupo de células que forman parte del sistema inmune). Esta inhibición no se lleva a cabo cuando la bacteria está muerta, lo que sugiere que las proteínas que exporta *M. tuberculosis* al medio en el que se desarrolla, tienen un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis (Beatty y Russell, 2000). Por estas razones, el estudio de las proteínas hidrofóbicas de *M. tuberculosis* constituye una prioridad (Xiong y col, 2005; Yang y col., 2007) y, en consecuencia, cobran importancia los métodos que favorecen el aislamiento de las proteínas en sus condiciones nativas.

Los más recientes intentos por definir al proteoma de las proteínas de secreción de *M. tuberculosis* (Málen y col., 2007), destacan que los cultivos en medio líquido Sauton sintético de 3 semanas, sin agitación, tienen 257 proteínas, de las cuales sólo 159 tienen el péptido señal de secreción y un número variable de otras proteínas. Esto, significa que el filtrado de cultivo contiene también proteínas intracelulares (Wiker, 2001) y es una muestra de que la composición proteica de los filtrados micobacterianos depende de las condiciones de cultivo, pero también destaca la importancia de la caracterización proteica de los cultivos específicos. Entre los medios de cultivo líquidos que han sido utilizados para el análisis del proteoma de *M. tuberculosis*, se encuentran el medio Sauton y el medio líquido M7H9; sin embargo, en este último no existen reportes proteómicos actuales, a pesar de que es un medio que favorece la expresión de proteínas de gran interés inmunológico y bioquímico.

Con base en los argumentos anteriores, en este trabajo se estandarizaron las condiciones de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv en medio líquido M7H9 y una vez que se logró el crecimiento de la bacteria, se ensayó la afinidad de las proteínas del filtrado de cultivo hacia tres matrices hidrofóbicas. Los adsorbentes hidrofóbicos y las condiciones cromatográficas utilizadas en este trabajo (Vázquez-Moreno y col., 1992) facilitaron el aislamiento de las proteínas hidrofóbicas del filtrado micobacteriano, bajo condiciones que aseguraron su estabilidad y la subsiguiente evaluación calorimétrica de la interacción entre las proteínas y los ligandos hidrofóbicos. Cabe destacar que la calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés), ha sido usada muy poco para medir directamente las entalpías de adsorción de proteínas en adsorbentes hidrofóbicos (Lin y col., 2000), pero los trabajos publicados hasta ahora han brindado información termodinámica valiosa de la adsorción de proteínas puras a matrices hidrofóbicas con grupos alquilo como ligandos y por ello en este trabajo se utilizó ITC para estimar la influencia de las diferencias de los grupos acilo ligados a Sefarosa sobre la interacción de las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv.

## ANTECEDENTES

### **Etiología y Epidemiología de la Tuberculosis Humana**

La tuberculosis (TB), es una enfermedad pulmonar infectocontagiosa, de naturaleza crónica y endémica, que afecta a seres humanos de todas las edades, aunque en mayor grado a las poblaciones desprotegidas social, económica e inmunológicamente (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007). De acuerdo con las cifras de la Organización Mundial de Salud (OMS), en el 2006 el número estimado de nuevos casos de tuberculosis fue de 139 por cada 100 000 habitantes (9.2 millones), además se producen 24 muertes al año por cada 100,000 habitantes (1.6 millones), siendo el continente africano el de mayor incidencia (363 por 100 000 habitantes) (Bermejo y col., 2007). Además se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada con el microorganismo (Málen y col., 2007).

*M. tuberculosis*, es la principal bacteria productora de la tuberculosis humana y forma parte del Complejo *M. tuberculosis*, que incluye a *M. africanum*, una bacteria ampliamente distribuida en el sur del Sahara; *M. microti*, un patógeno de los roedores; *M. bovis*, que infecta a una gran variedad de especies de mamíferos (incluyendo a los seres humanos); y *M. canettii*, una variante lisa que rara vez provoca la enfermedad en humanos (Cole, 2002).

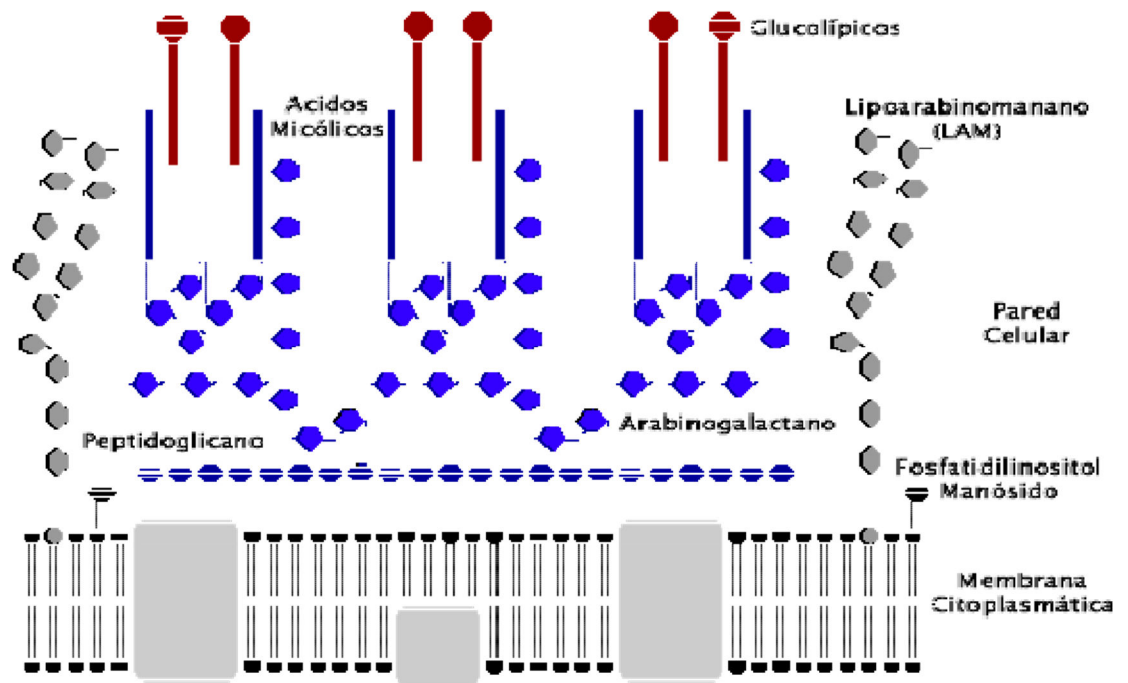
La tuberculosis pulmonar es la forma clínica más común de tuberculosis, y la más importante en términos epidemiológicos debido a que la diseminación aérea, y por ende su transmisión a otros sujetos, se produce por los aerosoles emitidos con la tos de las personas enfermas. Las micobacterias también pueden diseminarse por medio del sistema linfático hacia otras partes del cuerpo, originando así la tuberculosis extrapulmonar (en riñones, meninges, etc), una entidad nosológica que debe tenerse siempre en mente para evitar errores de diagnóstico, pero que por fortuna tiene un bajo riesgo de contagio (Palma-Nicolás y Bocanegra-García, 2007).

No se ha logrado reducir la incidencia de TB, a pesar de la amplia disponibilidad y la aplicación masiva de la vacuna antituberculosa (BCG) en muchos de los países más afectados (Horwitz y col., 1995), porque a pesar de que la BCG reduce el riesgo de desarrollar las formas extrapulmonares de la enfermedad (especialmente la tuberculosis meníngea en los niños), los adultos no tienen una protección eficaz (Jungblut y col., 2001). Otro factor que ha contribuido en la última década a elevar las cifras de incidencia y mortalidad por TB es la pandemia provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), ya que esta infección es el factor de riesgo más fuerte para la reactivación y progresión de la tuberculosis. Además, la tasa creciente de enfermedades asociadas con los cambios en los estilos de vida y la pobreza mundial (como la diabetes y la malnutrición) y la aparición de cepas bacterianas multirresistentes, han sido factores que también han contribuido al incremento de la morbimortalidad por TB. Por ello, en el 2006, la OMS puso en marcha la nueva estrategia “Alto a la Tuberculosis” a través de la cual se pusieron de manifiesto los principales desafíos del programa, entre ellos la comorbilidad tuberculosis/VIH y la tuberculosis multirresistente. Entre las estrategias prioritarias del programa, está la de fomentar y promover la investigación biomédica en TB, porque los instrumentos actuales sólo permiten luchar medianamente contra la tuberculosis; el perfeccionamiento de las prácticas y la ulterior eliminación de esta enfermedad dependerán de las innovaciones en materia de métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas. Cabe destacar, que el problema de la TB en México es comparable al de muchos de los países más afectados pues, según las cifras oficiales de la Secretaría de Salud, la tuberculosis ocupa el lugar 17 como causa de muerte en la población general en edad productiva, pero, al igual que en el resto del mundo, *M. tuberculosis* es el microorganismo que ocasiona el mayor número de defunciones por sí solo (Palma-Nicolás, y Bocanegra-García, 2007), con una tasa de incidencia de 13.5 de TB en todas sus formas (17,143 casos nuevos). Sonora se ubica entre los estados con mayor incidencia (26.6, <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem14/>)

### **Características Generales de *M. 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), dependiendo de las condiciones y tiempo del cultivo. Las dimensiones de los bacilos van de 1 - 10  $\mu\text{m}$  de largo (generalmente de 3 - 5  $\mu\text{m}$ ), y 0.2- 0.6  $\mu\text{m}$  en ancho (Barrera, 2007; Brennan y Nikaido, 1995). Los bacilos son inmóviles, no forman esporas y no poseen flagelos, crecen preferentemente en condiciones aerobias (lo cual explica su predilección por tejidos muy oxigenados como los lóbulos pulmonares; Betancourt y col., 2002), aunque pueden sobrevivir durante mucho tiempo en ambientes microaerofílicos, siempre y cuando el cambio no sea brusco (Wayne y Hayes, 1996).

*M. tuberculosis*, al igual que otras micobacterias, presenta una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica (Figura 1), a la cual están ancladas moléculas de lipoarabinomanano (LAM) que son los equivalentes micobacterianos del lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas. En las micobacterias más virulentas, la arabinosa terminal del LAM (araLAM) está recubierta con residuos de manosa (manLAM). La bacteria también tiene una pared celular constituida por una capa interna de peptidoglucano; esta capa, le confiere a la bacteria su forma y su rigidez y contiene ácido N-glucolilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina y se halla unida covalentemente al arabinogalactano, un polisacárido ramificado de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos se hallan los ácidos micólicos, los cuales son  $\beta$  hidroxíácidos grasos ramificados de alto peso molecular (60 a 90 carbonos). Los ácidos micólicos, junto con otros lípidos, constituyen más de la mitad del peso seco de las micobacterias y su composición específica varía dependiendo del tipo y disponibilidad de los nutrientes contenidos en el medio de cultivo (Barrera, 2007); son específicos en cada especie y, en consecuencia, permiten la identificación de muchas especies micobacterianas (Barrera, 2007).



**Figura 1.** Esquema de la envoltura de una eubacteria ácido-alcohol resistente.

Fuente: <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriología>.

Otro grupo de compuestos, los glucolípidos (micolatos de trehalosa, sulfolípidos, micósidos, etc.), se encuentran en la periferia de la pared micobacteriana, asociados no covalentemente a los ácidos micólicos. Los micolatos de trehalosa (por ejemplo la trehalosa 6,6'-dimicolato), son los responsables de que las bacterias crezcan en forma de cordones serpenteantes y, por ello, reciben el nombre de Factor Cuerda. También hay sulfolípidos, principalmente en las cepas de micobacterias más virulentas. 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 cuando son teñidos con fucshina básica (tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun) (Brennan y Nikaido, 1995).

En la pared celular también se encuentran muchas proteínas, sin embargo, sólo se conocen algunas de ellas. Se ha especulado, que su presencia en la membrana celular está vinculada no sólo con procesos como la síntesis de la pared celular (proteínas con funciones catalíticas) y la formación de canales hidrofílicos (en las porinas) para el paso pasivo de solutos acuosos a través de la capa de ácidos micólicos (Barrera, 2007), sino también con los mecanismos patogénicos y la defensa de las micobacterias. Por otro lado, las micobacterias también presentan una gran cantidad de proteínas citoplásmicas, que de forma similar a las proteínas de la envoltura micobacteriana se han agrupado, por su función, secuencia y características físico-químicas, en: 1) Proteínas de estrés térmico (hsp, del inglés heat shock protein), las cuales son un grupo de proteínas esencialmente citoplasmáticas; 2) Lipoproteínas, que ocupan un papel fundamentalmente constitutivo en la pared celular pero pueden encontrarse también en el citoplasma; 3) Proteínas secretorias; y 4) Enzimas (Ramírez y col., 2002).

El contenido proteico de *M. tuberculosis*, así como el contenido de polisacáridos y lípidos, parece depender de las condiciones en las que crece la bacteria; por ejemplo, en un cultivo líquido estático o dentro de una célula del huésped, la bacteria parece crecer con una pseudo-cápsula rica en proteínas y polisacáridos, pero con bajo contenido de lípidos (Daffé y Etienne, 1999). Sin embargo, cuando el medio está en agitación la

cápsula se separa, dejando la superficie lipofílica expuesta y liberando al medio de cultivo gran cantidad de proteínas y polisacáridos; es por esto que muchos de los componentes de la envoltura micobacteriana (pared y membrana) han sido aislados e identificados en el filtrado de los cultivos líquidos de *M. tuberculosis* (Barrera, 2007).

Aunque el crecimiento de *M. tuberculosis* es lento (12 a 24 horas en condiciones favorables), la bacteria puede obtener su energía a partir de la oxidación de muchos compuestos sencillos de carbono, tales como el glicerol. Además, siendo una bacteria heterótrofa no fastidiosa, también puede utilizar diversos compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno (como las sales amoniacales o los aminoácidos) y, en consecuencia, puede adoptar diferentes caminos fisiológicos para sobrevivir, incluso en condiciones adversas. Por ello, aunque la bacteria, es principalmente mesófila y neutrófila (lo que significa que su multiplicación es óptima a 37°C, en pH neutro) puede adaptarse a diversos ambientes naturales y sintéticos, con condiciones variables de oxígeno, temperatura, pH, salinidad y calidad nutricia (Barrera, 2007). Se ha demostrado que, durante el curso de la infección en ratones, el metabolismo de *M. tuberculosis* puede cambiar de aerobio (metabolizando principalmente carbohidratos) a microaerofílico, utilizando lípidos. Estas evidencias experimentales, han sido correlacionadas recientemente con la información derivada del ordenamiento completo del genoma de *M. tuberculosis*, en el cual fueron identificados un número inusualmente alto de genes que están implicados en el metabolismo de ácidos grasos (Barrera, 2007).

De las aproximadamente 50 cepas de *M. tuberculosis* (considerando las cepas de referencia y las cepas clínicas) que tiene la ATCC (<http://www.atcc.org/common/catalog/wordSearch/results.cfm>), sólo unas cuantas han sido bien caracterizadas. 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 pases en el laboratorio, es susceptible a las drogas y es muy favorable a la manipulación genética. Por ello, aunque se desconoce su virulencia en seres humanos, fue la cepa elegida para determinar el genoma de la



bacteria (Betts y col., 2000; Cole y col., 1998; Cole S., 2002). En 1998, fue publicado el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv y con ello se pensó que se avanzaría radicalmente en el control de la enfermedad, pero si bien es cierto que las secuencias genómicas de la bacteria han favorecido el avance en el conocimiento de la TB, el poder patogénico del microorganismo parece radicar en componentes antigénicos (como las proteínas), que no son el resultado de la expresión lineal del genoma sino de complejas interacciones genéticas y procesos postraduccionales. Es en parte por esta razón, que aún no se conocen completamente los mecanismos patogénicos de la bacteria, ni se cuenta con métodos para el control epidemiológico global de la TB.

### **El Proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

*M. tuberculosis* H37Rv tiene una secuencia de 4.411.529 pares de bases nucleotídicas con un contenido importante de citosina-guanina (65.5%) y una elevada proporción de genes (entre los 4, 006 genes de la bacteria), destinados a la expresión de enzimas implicadas en la lipogénesis y lipólisis (Cole y col., 1998). De estos genes, 3,924 fueron identificados antes de 1998 (Cole y col., 1998) y se han ido sumando nuevos genes como consecuencia de la utilización reciente de algoritmos informáticos (Tekaiya y col., 1999) que permiten predecir e identificar nuevas secuencias codificadoras (Campus y col., en el 2002, agregaron a la lista inicial otros 82 genes). El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv difiere del de otras bacterias en que posee secuencias codificadores de las familias de proteínas Pro-Glu (PE), Pro-Pro-Glu (PPE) y PE\_PGRS. Las diferencias intra e intercepas existentes entre las proteínas PE\_PGRS ha llevado a postular que éstas podrían ser una fuente de variación antigénica en *M. tuberculosis* (Cole y col., 1998; Smith, 2003; Tekaiya y col., 1999).

Gracias al conocimiento del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, se ha podido avanzar en el entendimiento de mecanismos bioquímicos básicos tales como los que le permiten a la bacteria cambiar su respiración aerobia (fosforilación oxidativa) a la anaerobia (reducción del nitrato) y adaptarse a los diferentes tejidos del huésped; este

proceso de adaptación explica la supervivencia de la bacteria en los alvéolos pulmonares (con presiones de oxígeno muy altas) y en las condiciones microaerofílicas/anaerobias del granuloma tuberculoso (Del Portillo y col., 2007). No obstante, el entendimiento de la patogénesis y la fisiopatología de la tuberculosis, así como los caminos metabólicos de la bacteria, es aún escaso debido a los incipientes avances en el conocimiento del proteoma (las proteínas expresadas por el genoma de un organismo; Gupta y Guglani, 2001) de *M. tuberculosis*.

Conocer el proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv, representa conocer no sólo los productos directos de sus genes, sino también conocer las modificaciones post-traduccionales de las proteínas (Del Portillo y col., 2007), tales como la fosforilación, la glicosilación y la sulfatación, que son extremadamente importantes para la función de las proteínas pues pueden determinar la actividad, estabilidad, localización y el recambio de las mismas. Además, el proteoma refleja el estado funcional de una célula en respuesta a estímulos ambientales y por lo tanto posee un carácter dinámico en el que la expresión de las proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular pero también en respuesta a factores externos (Jungblut y col., 2001) y por ello, sólo caracterizando ampliamente el repertorio proteómico de *M. tuberculosis* se abrirá la posibilidad de conocer integralmente su patogénesis así como de identificar nuevos blancos farmacológicos, nuevas moléculas bioactivas y marcadores biológicos que puedan usarse en el control de la tuberculosis. Adicionalmente, el análisis proteómico que se tiene hasta el día de hoy ha revelado varias diferencias entre la composición proteica de *M. tuberculosis* y otras especies del Complejo *M. tuberculosis*, tales como la cepa vacunal BCG de *M. bovis*, aunque las consecuencias de esas diferencias en la virulencia y la patogénesis de *M. tuberculosis* no se conocen completamente (Málen y col., 2007).

Diversas investigaciones han demostrado que el proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv, está constituido de una elevada proporción de proteínas citosólicas, de pared celular, filtrado de cultivo, y proteínas que se expresan durante la latencia del bacilo (Jungblut y col., 1999; Monahan y col., 2001; Rosenkrands y col., 1998; Sonnenberg y Belisle, 1997; Urquhart y col., 1998; Ge y col., 2003; Xiong y col., 2005). Estas

proteínas han sido clasificadas con varios propósitos que incluyen el taxonómico y el funcional (Tabla I).

El análisis de la composición de aminoácidos de un alto porcentaje de proteínas (tanto citoplásmicas como de secreción) de *M. tuberculosis* H37Rv, ha demostrado la abundancia de alanina, glicina, triptofano, prolina y arginina. Este último aminoácido parece compensar la deficiencia de lisina en las proteínas micobacterianas. Además, la asparagina es relativamente abundante en las proteínas PPE, lo cual resulta intrigante dada su falta relativa en el proteoma. Esto último sugiere que una posible función de las proteínas de PPE podría ser el almacenamiento de la asparagina, pues este aminoácido es una de las fuentes de nitrógeno preferidas de las micobacterias (Cole y col., 1998; Tekaia y col., 1999).

Por otro lado, la mayor parte de las proteínas citoplásmicas de *M. tuberculosis* son proteínas ácidas (punto isoelectrico  $< 7$ ), entre ellas se encuentran muchas enzimas, las proteínas PE y las proteínas PPE y representan el 60% de las proteínas micobacterianas identificadas hasta la fecha.

Un número significativo de proteínas micobacterianas son proteínas exportadas, a través de la membrana citoplasmática, en forma de proteínas desplegadas que luego se insertan en la pared bacteriana o que son exportadas al ambiente extracelular. Tales proteínas contienen secuencias señales N-terminales específicas con tres distintas regiones: Las regiones N-, H- y C-. El centro hidrofóbico (región H) tiene de 10-15 aminoácidos hidrofóbicos que parecen adoptar una conformación  $\alpha$ -hélice en la membrana; esta región H es flanqueada por un segmento de residuos polares básicos (región N). Del lado carboxilo, la región H es flanqueada por la región C, un segmento de residuos polares pequeños sin carga que usualmente tiene la secuencia consenso AXA en las posiciones -1 a -3, con relación al sitio de ruptura de la peptidasa. Después de que las proteínas son exportadas, se pierde la secuencia señal y la proteína madura se libera del lado externo de la membrana celular (Málen y col., 2007).

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

<b>CLASE</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>NUMERO DE GENES (1998)</b>	<b>NUMERO DE GENES (2002)</b>
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.

Una característica importante de *M. tuberculosis* es su habilidad de sobrevivir y proliferar dentro de los macrófagos, inhibiendo la acidificación y maduración de los fagosomas. Esta inhibición no se observa cuando los macrófagos fagocitan bacilos muertos, lo que sugiere que las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* juegan un papel central en el proceso de inhibición de los fagosomas (Málen y col., 2007). Por otro lado, varias de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* son antígenos promotores de respuestas inmunes celulares y humorales en el huésped y, aunque no se han logrado identificar proteínas con alto valor diagnóstico o preventivo contra la TB, se tiene la esperanza de que dentro de las que aún no han sido caracterizadas esté la base del desarrollo de métodos para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas, así como para el diagnóstico temprano de la TB.

### **Proteínas del Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

En las últimas décadas, una parte de la investigación del proteoma de *M. tuberculosis* se ha centrado en las proteínas que son liberadas por la bacteria al medio de cultivo (CFP, por sus siglas en inglés). Las razones de este enfoque se relacionan con la capacidad que tienen algunas de ellas de estimular inmunorespuestas específicas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y con la esperanza asociada de que servirán para el desarrollo de nuevas vacunas y métodos para el diagnóstico temprano de la TB (Hutter y Singh, 1999). Sin embargo, sólo una fracción de las proteínas del CFP son verdaderas proteínas de secreción, ya que casi siempre el medio de cultivo contiene proteínas citosólicas y proteínas de la pared bacteriana liberadas tras la muerte *in vitro* de las bacterias.

Los avances en la caracterización del CFP de *M. tuberculosis* H37Rv, se han logrado utilizando la cepa ATCC 27294 (Sonnenberg y Belisle, 1997), incubándola en medio GAS (sales de glucosa-alanina, pH 6.6, con 0.3 g/L de casitona y citrato de amonio férrico, entre otros componentes), por 14 días con agitación. En estos cultivos se han detectado hasta 205 bandas proteicas por electroforesis en doble dimensión (2DE)

con las cuales se han desarrollado 34 antisueros monoclonales comerciales. Intentos más recientes destacan que los cultivos en medio líquido Sauton sintético de 3 semanas de incubación, sin agitación, tienen 257 bandas en 2DE, de las cuales sólo 159 tienen el péptido señal de secreción (Málen y col., 2007).

Para identificar los componentes patogénicos e inmuno-reactivos específicos del CFP se han purificado y caracterizado algunas de las proteínas contenidas en él, tales como el complejo 85 (de 30/32 kDa) que posee afinidad hacia la fibronectina humana (Abou-Zeid y col., 1988; Nagai y col., 1991; Harth y col., 1996), las glicoproteínas de 19, 38 y 45 kDa (Dobos y col., 1996), la proteína de 38 kDa que es considerada hasta ahora como el antígeno con mayor potencial para el diagnóstico serológico de la tuberculosis (Andersen y col., 1991; Espitia y col., 1992), la enzima L-alanina deshidrogenasa (EC 1.4.1.1) de 40 kDa, involucrada en los mecanismos de defensa del bacilo dentro de los macrófagos (Hutter y Singh, 1999) y la superóxido dismutasa de 23 kDa, enzima responsable de la eliminación de los grupos radicales del oxígeno, que podría ser una de las moléculas más tóxicas de la mezcla proteica contenida en los fagolisosomas (Andersen y col., 1991). Las Proteínas Hsp, que también forman parte del proteoma, son un grupo de proteínas esencialmente citoplasmáticas, que forman parte de una respuesta probablemente tendiente a proteger a la micobacteria durante situaciones adversas, mediante el mantenimiento de la conformación funcional de proteínas esenciales (Ramírez y col., 2002). Entre las proteínas Hsp que más se han estudiado están la Hsp de 16 kDa, que es la principal proteína producida en la fase estacionaria de cultivos *in vitro* y es fuertemente inducida por hipoxia (Yuan y col., 1998) y la de 65 kDa que se ha sugerido como indicador de autólisis (Andersen y col. 1991). Otras proteínas relevantes son la proteína de 10 kDa (CFP10) y la de 6 kDa (ESAT-6) que han demostrado buenas propiedades inmunodominantes en un alto porcentaje de pacientes con TB y por ello son candidatos para la generación de vacunas antituberculosis (Skjøl y col., 2000).

Por otro lado, la facultad que tiene *M. tuberculosis* de crecer extracelularmente y diseminarse fuera de los pulmones, se ha relacionado con la presencia de proteínas de

superficie (como las de 30, 60 y 66 kDa) que se liberan al filtrado de cultivo (Monroy y col., 2000). Cabe destacar que estas proteínas, que tienen gran afinidad por el plasminógeno, también tienen grandes dominios hidrofóbicos, cuya participación en tal acción es desconocida. Las proteínas de *M. tuberculosis* con extensos dominios hidrofóbicos parecen constituir una proporción significativa del proteoma. En este subgrupo proteico, destacan cuantitativamente las proteínas PE\_PGRS, que atraviesan la superficie celular bacteriana y al parecer son la base de la variación antigénica micobacteriana (Brennan y col., 2005). Además, entre las proteínas localizadas en la superficie celular, están las proteínas Erp (del inglés, exported repetitive protein), en las que la región hidrofóbica representa la cuarta parte de la estructura proteica. La participación de estas proteínas en la virulencia de la micobacteria, y en particular de sus regiones hidrofóbicas, es motivo de controversia (Berthet y col., 1995; Berthet y col., 1998; Kosíncová y col., 2004) ya que las proteínas han sido localizadas también en los compartimentos de las células infectadas (Berthet y col., 1998). Sin embargo, el hecho de que más del 60% de las proteínas del filtrado de cultivo sean proteínas secretadas al medio (Málen y col., 2007) y que en la estructura de ellas se hayan detectado regiones muy hidrofóbicas sugiere la importancia de estimar cuantitativamente el componente proteico hidrofóbico del filtrado de cultivo.

### **Métodos de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* para la Realización de Estudios Proteómicos**

El proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tiene un carácter dinámico, lo que significa que la expresión de sus proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular, pero también en respuesta a las acciones externas. *In vitro*, el ambiente donde se desarrolla el bacilo puede activar diferentes caminos fisiológicos para favorecer su supervivencia, incluso en condiciones adversas, lo que permite estudiar a las proteínas bajo condiciones específicas, variando la disponibilidad del oxígeno, la temperatura, el pH, la salinidad, así como los nutrientes del medio de cultivo.

Los medios líquidos que más se han utilizado para cultivar a *M. tuberculosis* y estudiar su proteoma son el Sauton enriquecido con 0.5% de piruvato de sodio, 0.5% de glucosa y Tween 80 al 0.05% (Sauton modificado; Andersen y col., 1991; Nagai y col., 1991; Sørensen y col., 1995; Weldingh y col., 1998), el medio GAS (Sonnenberg and Belisle, 1997), y el Middlebrook 7H9 suplementado con glicerol (del  $0 \pm 0.2\%$  v/v), catalasa, albúmina, dextrosa al 10% (ADC) y Tween 80 ( $0 \pm 0.25\%$ ; Betts y col., 2000). En todos los casos, antes de cultivar en medio líquido a la bacteria, se le aísla, identifica y comprueba su pureza; el medio más utilizado para la obtención de subcultivos es el Löwenstein-Jensen (LJ), debido a que con él se tienen estandarizadas las pruebas fenotípicas de identificación. Además, el medio LJ favorece la aplicación inmediata de las pruebas bioquímicas para la identificación de *M. tuberculosis*, tales como las pruebas de producción de niacina, reducción de nitratos, actividad pirazaminidasa, y de la catalasa a 68°C.

### **Estrategias para la Identificación y Caracterización de las Proteínas Micobacterianas**

El primer requisito para la identificación y caracterización de las proteínas micobacterianas es su separación a partir de las mezclas complejas de proteínas. Cuando se requieren cantidades pequeñas de las proteínas (ng o pg) se utilizan métodos como la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) de una y dos dimensiones (2DE; McGregor y Dunn, 2003). La electroforesis 2DE combina dos métodos individuales de alta resolución, el isoelectroenfoque (IE) y la electroforesis con dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés; Del Portillo y col., 2007). En la primera dimensión (IE), las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI) y luego, en la segunda dimensión, las proteínas se separan en base en su masa molecular. Luego las proteínas se tiñen usando azul de Coomassie o plata para permitir su visualización en el gel (Gupta y Guglani, 2001). La identificación de las proteínas también se logra con el uso de anticuerpos, monoclonales y policlonales,



usando diversas técnicas inmunoquímicas. Sin embargo, cuando se requieren cantidades mayores de proteína, por ejemplo para llevar a cabo su caracterización fisicoquímica o para utilizarlas en diversas aplicaciones biomédicas, se utilizan métodos con los que se pueden obtener cantidades mayores ( $> \text{ng}$  y  $\text{pg}$ ). Entre los métodos más utilizados para lograr este último fin, se encuentran los métodos cromatográficos, que tienen grandes ventajas no sólo porque permiten la obtención de cantidades grandes de proteínas, sino porque a diferencia de la 2DE permiten la separación de las proteínas nativas (cuando se utilizan esquemas cromatográficos no desnaturalizantes). Finalmente, la caracterización bioquímica y fisicoquímica de las proteínas implica el uso de técnicas como la secuenciación de las porciones amino o carboxilo terminales (actualmente realizada principalmente por espectrometría de masas; McGregor y Duna 2003), y la determinación de sus interacciones moleculares (realizada por microcalorimetría, entre otras técnicas; Lin y col., 2001).

### **Aislamiento y Purificación de Proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

La mayor parte de las investigaciones bioquímicas a gran escala requieren de la purificación (o al menos del aislamiento) de las proteínas (Queiroz y col., 2001). La pureza de una proteína es un requisito previo para el estudio de su estructura y función o su potencial uso, por lo que hoy en día está disponible una variedad amplia de técnicas de purificación de proteínas. Sin embargo, la utilidad de los diferentes tipos de cromatografía depende de la resolución que se alcance con ellos, así como de la posibilidad de obtener cantidades importantes de proteína nativa. Uno de los métodos que en los últimos años ha mostrado tener muchas ventajas, con relación a los métodos tradicionales, es la Cromatografía de Interacciones Hidrofóbicas (HIC), la cual separa a las proteínas de acuerdo con su hidrofobicidad diferencial en un ambiente salino acuoso. Las proteínas son solubles en el agua debido a los aminoácidos hidrofílicos de su superficie, sin embargo, hay algunos residuos hidrofóbicos colocados externamente que forman áreas hidrofóbicas que se pueden utilizar para separar a las proteínas por HIC.

La base de la separación proteica en HIC es la adsorción de las proteínas a una matriz hidrofóbica, lo cual implica que se produzca una interacción entre los grupos hidrofóbicos expuestos de las proteínas y los grupos hidrofóbicos de la matriz cromatográfica (Queiroz y col., 2001). Se cree que la adsorción en HIC es un proceso entrópico que se da a expensas del aumento de la entropía del sistema cromatográfico (Xia y col., 2004). La adsorción aumenta en forma dependiente de la concentración de la sal en la fase móvil y la elución es promovida por la disminución de la concentración de la sal en el sistema cromatográfico (Melander y Horváth, 1977; Fausnaugh y Regnier, 1986; Roe, 1989). Por lo tanto, bien se podría utilizar el término “cromatografía de adsorción promovida por sal”, en lugar del término HIC (Queiroz, 2001).

En HIC, pueden utilizarse diversas condiciones de adsorción y elución para la purificación de mezclas complejas de proteínas, que serían difíciles de separar con otras técnicas cromatográficas, por ello, la HIC tiene actualmente diversas aplicaciones para el aislamiento de proteínas hidrofóbicas, tales como las proteínas de membrana, proteínas nucleares y proteínas recombinantes, entre otras (Ghosh 2001) y podría ser utilizada como herramienta para estimar el porcentaje de proteínas hidrofóbicas contenidas en mezclas biológicas.

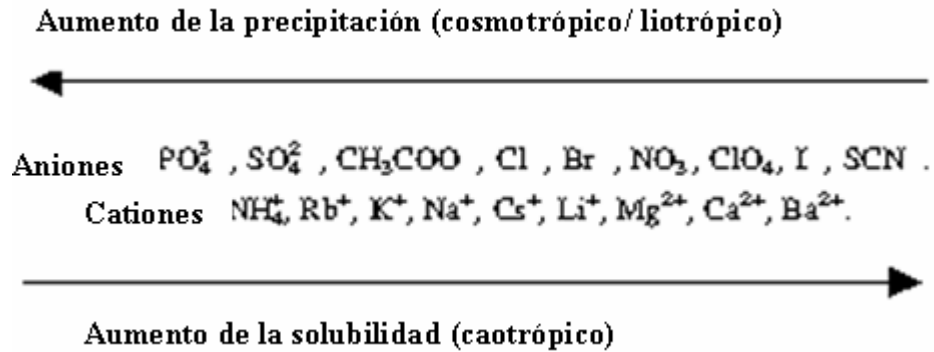
En 1992, se dio a conocer el primer adsorbente de una nueva generación de geles HIC: la Sefarosa altamente acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992) y con él se abrió la posibilidad de desarrollar nuevos procesos para el aislamiento de proteínas de interés médico e industrial (Vázquez-Moreno y col., 2001; Candia-Plata y col., 2006; Ramos-Clamont y col., 2006). La capacidad de este gel para adsorber inmunoglobulinas séricas humanas, de 3.2 mg (Candia-Plata, 2000), no es tan alta como la de otros geles (por ejemplo la Sefarosa-iminodiacetato-níquel) usados en cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Vázquez-Moreno y Candia-Plata, 1996), pero por la nobleza del proceso de separación (Vázquez-Moreno y col., 2001) sus aplicaciones son potencialmente mayores. Además, las posibilidades de ampliar el uso de este tipo de adsorbentes es muy grande debido a que pueden utilizarse grupos acilo de mayor longitud (por ejemplo, con los grupos propilo, butilo, pentilo, hexilo, etc.).

## **Factores que Afectan a la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

Diseñar un proceso selectivo de HIC es una tarea desafiante ya que la selectividad del proceso es influida por muchos factores; los principales parámetros que deben ser considerados son: el tipo de ligando y su grado de sustitución, el tipo de matriz, tipo de sal y concentración, pH, temperatura y aditivos.

**Tipo y densidad del ligando.** En HIC, generalmente los ligandos son hidrocarburos de cadena recta que poseen un carácter hidrofóbico; los ligandos más utilizados son alcanos de cadena lineal con o sin un grupo amino terminal. Los grupos fenilo (y otros grupos aromáticos) también se utilizan como ligandos con buenos resultados debido a que producen interacciones hidrofóbicas y aromáticas ( $\pi$ - $\pi$ ). Generalmente los ligandos de cadena recta (hidrocarburos) demuestran un carácter hidrofóbico puro mientras que los ligandos de tipo aromático presentan un comportamiento mixto (Queiroz y col., 2001). La hidrofobicidad y la fuerza de la interacción aumentan con la longitud de la cadena n-alcano, pero la selectividad de la adsorción puede disminuir a medida que incrementa la longitud de la cadena (Tanford, 1972; Jennissen y col., 2002). Un factor importante a considerar en la interacción hidrofóbica es la densidad del ligando (concentración superficial) en la matriz; al respecto, Lin y col., (2000) utilizando matrices hidrofóbicas (con grupos butilo y octilo inmovilizados en CM-Sefarosa) demostraron, por microcalorimetría, que la entalpía de adsorción entre las matrices y tripsina y/o quimotripsinógeno se hace más positiva a medida que aumenta la densidad del ligando. Además, la entropía de adsorción se hace más positiva a medida que la longitud de la cadena alquilo o la densidad del adsorbente se incrementa.

**Tabla II.** Serie de Hofmeister, efecto de algunos aniones y cationes en la precipitación de proteínas.



Fuente: Xia y col., 2004

**Tipo y concentración de la sal.** Las sales se emplean en HIC para promover interacciones ligando-proteína ya sea aumentándolas o disminuyéndolas. Los efectos de las sales en HIC se pueden explicar a través de la serie de Hofmeister (Tabla II). Esta serie describe el comportamiento de los iones de las sales en solución acuosa; las cosmotrópicas, que poseen una alta polaridad y se unen fuertemente al agua, inducen la exclusión del agua de las superficies de la proteína y del ligando, favoreciendo con ello la interacción proteína-ligando. Por otro lado, una sal caotrópica, que es menos polar que las sales cosmotrópicas, favorece la permanencia del agua alrededor de la proteína y de las superficies de la fase inmóvil, reduciendo así la posibilidad de que la proteína exponga sus superficies hidrofóbicas y con ello su oportunidad de interactuar con los ligandos de la fase estacionaria. Las sales neutras tienen una influencia intermedia en la interacción de las proteínas y los sistemas de HIC (Xia y col., 2004). Además del tipo de sal, la concentración de la misma influye fuertemente en la intensidad y la selectividad de la adsorción de las proteínas a la fase estacionaria (Queiroz y col., 2000).

**Potencial de dispersión iónico en el efecto de la especificidad iónica.** Poco se sabe de las leyes que rigen la solubilidad de las proteínas y que determinan que dos sales aún siendo igualmente monovalentes (por ejemplo tiocianato de potasio y cloruro de potasio) favorezcan efectos distintos en la solubilidad de las proteínas y, por ende, en sus interacciones (Boström y col., 2003). La teoría electrostática de la doble capa (Belloni, 1998) y sus extrapolaciones usadas para definir los detalles de las interacciones moleculares (Pandit y Berkowitz, 2002) o los efectos de las cargas no uniformes (Grant, 2001), aunque consideran la carga iónica, no pueden explicar los efectos diferenciales de las dos sales antes citadas sobre las proteínas.

Una fuente de especificidad iónica que no es considerada en la teoría de doble capa es el potencial de dispersión iónico. Boström y col., en el 2003, demostraron que el potencial de dispersión iónico, que actúa entre cada ión de la sal y la proteína es, al parecer, el origen de la especificidad, debido a que el pH y la carga de las proteínas dependen fuertemente de los iones en los que están disueltas. Por ejemplo, en solución

de tiocianato de sodio, la carga neta de la lisozima es mayor (y la correspondiente longitud de Debye menor), que la que se presenta cuando está disuelta en cloruro de sodio (usando la misma concentración de ambas sales). Esto supone que los valores de pKa de los aminoácidos de la superficie de las proteínas, dependen de la concentración de sal en la que se disuelve la proteína pero también de las especies iónicas producidas por la disociación de la sal (Boström y col., 2003), debido a que la polarización de los iones en solución acuosa, es específica para cada ión, y los iones muestran un potencial de dispersión muy específico cerca de la superficie proteica (Netz, 2001). Pero aunque a concentraciones de sal elevadas, el potencial de dispersión iónico domina la interacción completamente, no se sabe cómo es que la fuerza de dispersión de una proteína y la nube iónica que la rodea afecta la naturaleza de la nube, la carga proteica y la longitud de Debye.

Las fuerzas de dispersión iónica no brindan una imagen completa acerca del efecto Hofmeister, pero son una parte importante de la explicación y probablemente contienen los fundamentos físicos requeridos para su explicación. Esta teoría (doble capa iónica específica) puede usarse para modelar las propiedades electrostáticas de una proteína globular en solución salina y, en el caso de la lisozima, puede explicarnos porqué la carga neta de la proteína es distinta en tiocianato de sodio con relación al cloruro de sodio. En este ejemplo, los aniones son atraídos hacia la superficie proteica por fuerzas electrostáticas, pero las fuerzas de dispersión iónica que son más atrayentes en tiocianato que en cloruro también influyen en los aniones. Esto puede explicar el hecho de que la carga de la lisozima sea tan grande como el potencial de membrana, tanto en tiocianato como en cloruro. La diferencia de carga proteica da lugar a una longitud de Debye iónica específica muy alta en soluciones proteicas altamente cargadas (aún a la menor concentración de proteína usada por Hofmeister). Esta es una de las razones por la que las interacciones proteína-proteína son más atrayentes en tiocianato que en cloruro de sodio (Curtis y col, 2002) y por la que la temperatura de fusión de la lisozima es mayor en una solución de  $\text{NaNO}_3$  que en una solución de  $\text{NaCl}$  (el ión nitrato es más polarizable que el cloruro; Grigsby y col., 2001). Adicionalmente,

Boström y col., 2003, demostraron que aunque los valores de pKa aparentes de los grupos ionizables (por ejemplo la histidina) dependen de la concentración de la sal utilizada, la interpretación de las variaciones tangenciales de la carga proteica sólo puede explicarse por variaciones sutiles de los valores de pKa de las proteínas, provocadas por las diferencias en el comportamiento de los aniones de cada sal. Es decir, los valores de pKa de los grupos ionizables de una proteína pueden cambiar con la concentración de la sal (Lee y col., 2002) pero también con el tipo de sal (Boström y col., 2003), por ejemplo, los valores de pKa de la histidina de la lisozima son muy parecidos con KCl 0.5 M y con KCN 0.1 M, y son más altos con KCN que con KCl cuando se usa la misma concentración de sal.

**Efecto del pH.** El pH de la fase móvil puede ser un factor importante que afecta la retención de la proteína en HIC. Teóricamente, el aumento en el valor de pH (hasta 9-10) o la acidificación del medio, disminuyen la interacción hidrofóbica entre las proteínas y los ligandos hidrofóbicos (Queiroz y col., 2001). Sin embargo, puesto que cada proteína tiene un comportamiento específico en valores de pH distintos, este parámetro se debe utilizar en la optimización de la separación de las proteínas por HIC.

**Efecto de la temperatura.** Se ha observado que la retención de las proteínas aumenta cuando la temperatura se incrementa (sin alcanzar las temperaturas desnaturizantes), probablemente debido a que las interacciones hidrófobas aumentan por los cambios conformacionales reversibles que provocan la mayor exposición de los residuos hidrofóbicos respecto de las proteínas nativas (Haidacher y col., 1996). Sin embargo, este parámetro debe ser muy bien controlado para evitar la desnaturización irreversible de las proteínas.

**Aditivos.** Los aditivos tales como diversos alcoholes, detergentes y soluciones acuosas caotrópicas, aún usadas en baja concentración causan el debilitamiento de las

interacciones entre las proteínas y sus ligandos en la HIC, que conduce a la desorción de los solutos unidos. Lo anterior es debido a que los segmentos no polares de los alcoholes y los detergentes compiten con los ligandos de la HIC por las proteínas; en el caso de las sales caotrópicas se produce la afectación de la estructura del agua y/o la de las proteínas unidas a la matriz. Ambos aditivos, además también disminuyen la tensión superficial del agua, debilitando así las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y los ligandos y disociando subsecuentemente el complejo.

### **Ventajas de la HIC para Separar Proteínas Nativas**

La cromatografía de interacciones hidrofóbicas, es una técnica muy versátil, que facilita la separación de diversas proteínas manteniendo su integridad (Vázquez-Moreno y col., 1992; Vázquez-Moreno y col., 2001; Candia-Plata y col., 2006; Ramos-Clamont y col., 2006). La recuperación es a menudo muy satisfactoria y las matrices HIC poseen relativa buena capacidad; además, los procesos de bioseparación HIC son generalmente económicos y estables y requieren de un mínimo de pre-tratamiento de la muestra. En suma, la HIC es un método alternativo para el aislamiento de proteínas a partir de mezclas de ellas y puede servir para lograr la purificación de una gran cantidad de proteínas usándolo en esquemas cromatográficos específicos. Pero a pesar de sus ventajas, esta técnica ha sido utilizada únicamente para el aislamiento de proteínas séricas y algunas proteínas recombinantes, aún cuando se ha demostrado que algunas de las proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* (como la proteína de ESAT-6, que fue purificada a través de HIC y cromatografía de intercambio iónico por Sudgen y col., en 1996) tienen afinidad hacia matrices hidrofóbicas como la fenil-sefarosa. Tampoco se han usado las matrices HIC para explorar las propiedades hidrofóbicas de proteínas en ambientes polares no desnaturizantes.



## Calorimetría de Titulación Isotérmica

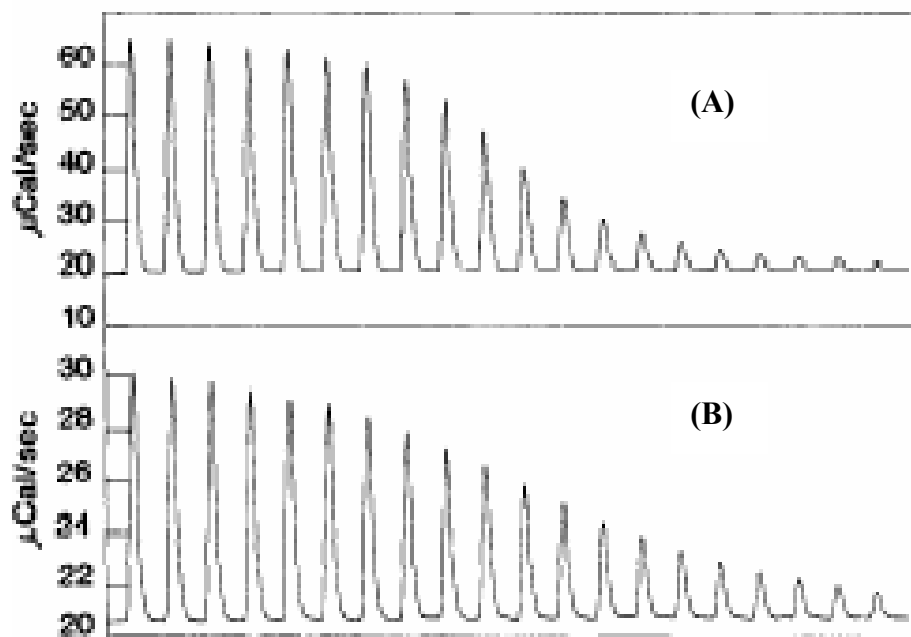
Para caracterizar las interacciones entre biomoléculas, o entre biomoléculas y sus ligandos de bajo peso molecular, se utilizan comúnmente variables termodinámicas tales como la constante de afinidad  $K$ , el cambio de entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) y el número de sitios  $n$  de interacción. La entropía  $\Delta S^\circ$  y la energía libre  $\Delta G^\circ$  de la unión, son variables dependientes que se obtienen a partir de la ecuación  $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$  (Wiseman y col., 1989).

La mayoría de los métodos usados comúnmente para medir constantes de afinidad (por ejemplo, la diálisis de equilibrio, la ultrafiltración y la cromatografía de exclusión molecular), involucran la partición entre las moléculas interactuantes y, aunque permiten medir los ligandos libres y los unidos, requieren grandes cantidades tanto de las biomoléculas como de los ligandos, así como diferentes etapas de equilibrio y carga para obtener las isothermas de unión que, por el contrario, se obtienen fácilmente por calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés). Ésta, es una herramienta de gran utilidad actual para la obtención directa de todos los parámetros termodinámicos ( $K$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  y  $n$ ) en un solo experimento, con una relación señal/ruido muy favorable (Wiseman y col., 1989). Sus aplicaciones son múltiples e incluyen el estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-ácidos nucleicos, enzimas-inhibidores, anticuerpos-antígenos, etc. La información que se obtiene por calorimetría permite explicar, con base en los parámetros termodinámicos, la forma en la que se producen las interacciones moleculares y complementa la información estructural de las biomoléculas obtenida por otros métodos. Tiene además la ventaja de estudiar las interacciones en su estado nativo, lo que significa que no es un pre-requisito que las biomoléculas estén inmovilizadas o marcadas, y puede realizarse a diferentes condiciones de temperatura, pH y con distintas soluciones amortiguadoras, además de permitir el estudio de diluciones muy grandes para medir constantes de afinidad muy altas (Wiseman y col., 1989).

Con la ITC también se puede determinar el efecto del pH y del solvente sobre la interacción molecular, y se pueden identificar grupos activos y sus mecanismos de acción en las proteínas (Michon y col., 1991). En la literatura, existe mucha información en la que se usa la ITC, en conjunto con otros métodos biofísicos tales como la resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas y el dicroísmo circular, que ha permitido obtener información estructural y funcional de muchas biomoléculas. Sin embargo, son escasas las publicaciones que informan sobre la interacción de biomoléculas con ligandos de bajo peso molecular inmovilizados (Lin y col., 2000 y 2001; Michon y col., 1991; Sigurskjold, 2000; Velásquez-Campoy y col., 2001; Wiseman y col., 1989), a pesar de que este tipo de análisis es de gran utilidad para describir los parámetros termodinámicos de la adsorción cromatográfica.

En un experimento típico, un ligando en solución es titulado contra una solución de la biomolécula a temperatura constante. El calor (liberado o absorbido) en la interacción entre la biomolécula y el ligando ( $\Delta H^\circ$ ), es monitoreado en el tiempo (Figura 2). A medida que se aplican inyecciones sucesivas del ligando en la celda de interacción, la cantidad de calor absorbida o liberada, está directamente relacionada con la cantidad de uniones que se llevan a cabo entre la biomolécula y el ligando. Cuando el sistema se satura, la señal disminuye hasta que se observa sólo el calor de dilución. Se genera una curva de unión, a partir de la gráfica del calor absorbido o liberado en cada inyección, así como el patrón de unión (Figura 3).

La constante de afinidad, también puede ser obtenida con ITC. El rango que se puede medir directamente con la técnica es de  $10^2$  a  $\sim 10^9$   $M^{-1}$ , ya que las titulaciones que pierden la curvatura sigmoideal no permiten estimar exactamente la constante de asociación (Wiseman y col., 1989). Sin embargo, Sigurskjold, en el 2000, diseñó un método para medir constantes de afinidad superiores a  $10^9$   $M^{-1}$ . Este método requiere dos ligandos: Un ligando de alta afinidad (A) y un segundo ligando (B) de menor afinidad, que compite por el sitio de unión en la biomolécula. En el primer experimento, el ligando B es titulado en la solución proteica y se determina su  $K$  y el  $\Delta H$ . En el segundo ensayo el ligando A es titulado en el complejo proteína-ligando B y el ligando

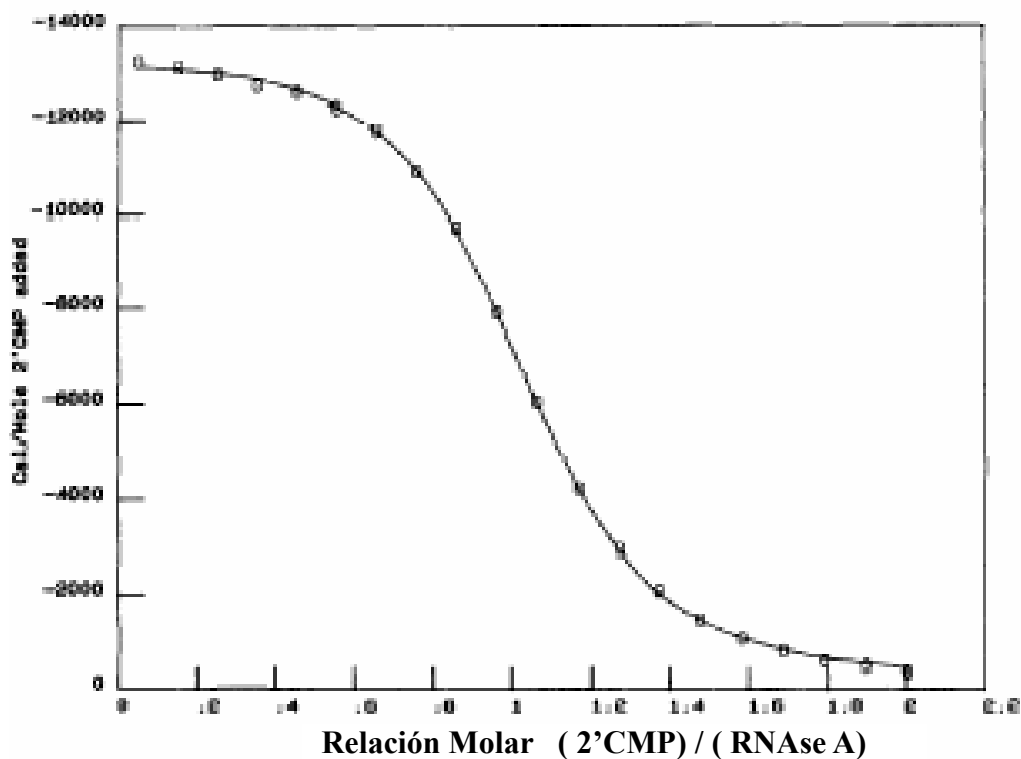


### Secuencia de Inyección

**Figura 2.** Obtención de los datos crudos de las inyecciones automáticas realizadas en un microcalorímetro.

El ligando se añade a la celda de reacción en inyecciones secuenciales, en un volumen pequeño ( $\mu\text{L}$ ). La celda contiene la biomolécula con la que interacciona el ligando en una relación molar (ligando/biomolécula apropiada). En el ejemplo de esta figura, las inyecciones del ligando fueron de  $4 \mu\text{L}$  y la celda tenía una solución de RNasa en una concentración de  $0.651 \text{ mM}$  (A) y  $0.177 \text{ mM}$  (B), de manera que la concentración de la solución (en la jeringa de inyección) con el ligando (que en el ejemplo es  $2'\text{CMP}$ ) fue 25 veces mayor que la concentración de RNasa. La temperatura, así como la concentración y el pH del solvente fueron constantes en este experimento.

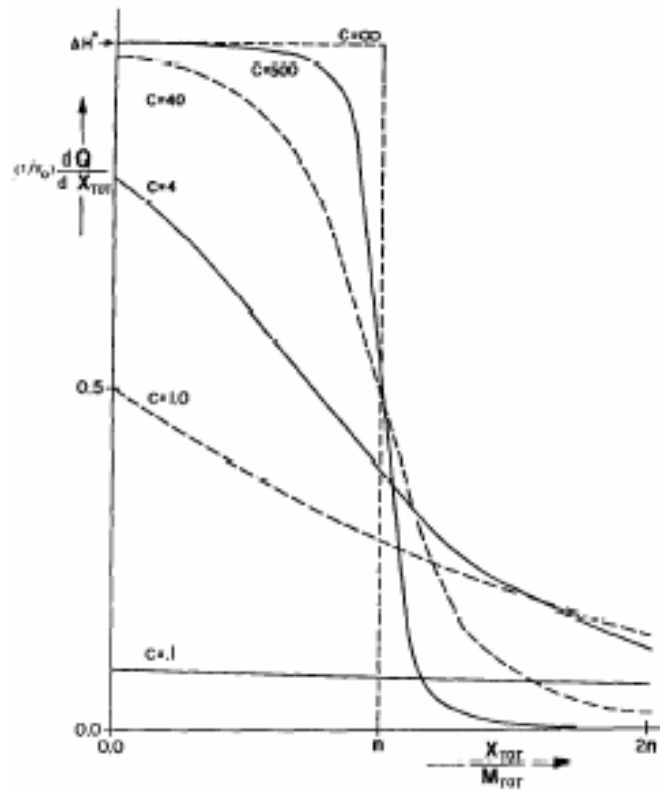
**Fuente:** Wiseman y col., 1989. La redacción del pie de la figura fue modificada para explicar en esta tesis los fundamentos de la microcalorimetría.



**Figura 3.** Gráfica obtenida a partir de los datos microcalorimétricos procesados.

Los datos procesados se obtienen a partir de los datos crudos de la Figura 2 sirven a su vez para obtener un gráfico de datos simulados, como el que se muestra en la Figura 4. En este gráfico, los puntos abiertos corresponden a los datos experimentales y la línea sólida corresponde a la curva corregida por la suma de los cuadrados de los datos experimentales. En este ejemplo, los datos que caen mejor en la curva son  $n = 1.05$ ;  $K = 48,000 \text{ M}^{-1}$ ; y  $\Delta H = -13,700 \text{ cal/mol}$ . La desviación estándar de los puntos, a partir de la línea calculada, es 0.047% del calor total para saturar todos los sitios en la muestra de RNasa.

**Fuente:** Wiseman y col., 1989. La redacción del pie de la figura fue modificada para explicar en esta tesis los fundamentos de la microcalorimetría.



**Figura 4.** Isotermas de unión entre una biomolécula y un ligando, para varios valores del parámetro  $c$ , presentadas como derivadas.

El parámetro  $c$ , es igual al producto de los tiempos constantes de unión por la concentración total de la macromolécula.

**Fuente:** Wiseman y col., 1989. La redacción del pie de la figura fue modificada para explicar en esta tesis los fundamentos de la microcalorimetría.

A desplaza al ligando B. Con un modelo apropiado (Velásquez-Campoy y col., 2001) se pueden determinar, finalmente, todas las variables termodinámicas.

### **Importancia del Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas en el Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9**

Actualmente, el estudio de las proteínas hidrofóbicas, tanto de las proteínas de secreción como de las proteínas de membrana, constituye una prioridad, debido a que muchas de ellas son o podrían llegar a ser la clave para el avance en el conocimiento de la patogénesis de la tuberculosis (Xiong y col, 2005; Yang y col., 2007) y porque algunas de las proteínas hidrofóbicas son el blanco de los agentes quimioterapéuticos (Mattow y col., 2007). Sin embargo, aún con los recientes desarrollos tecnológicos para el estudio del proteoma bacteriano, las proteínas hidrofóbicas están infra-representadas en los análisis proteómicos de *Mycobacterium tuberculosis* publicados hasta la fecha y, por lo tanto, se desconoce la magnitud con la que la bacteria libera este tipo de proteínas al medio de cultivo y en consecuencia el papel que desempeñan en la patogénesis de la bacteria.

En la mayoría de los estudios del proteoma micobacteriano diseñados para analizar proteínas hidrofóbicas de membrana, se ha utilizado la electroforesis de doble dimensión (2DE). Esta es una técnica que tiene muchas ventajas para la separación y análisis de proteínas, pero en el caso de las proteínas hidrofóbicas micobacterianas no da buenos resultados porque la 2DE convencional no permite la detección de las proteínas alcalinas (pI >10). Por esta razón, tampoco podrían esperarse buenos resultados al utilizar esta técnica para el análisis de las proteínas hidrofóbicas del medio de cultivo.

Por otro lado, ninguno de los protocolos de fraccionamiento proteico reportados hasta ahora en estudios del proteoma micobacteriano (ni electroforéticos ni cromatográficos) han permitido saber la magnitud con la que las proteínas hidrofóbicas están representadas en el filtrado de cultivo (Mattow y col., 2007) a pesar de que la estimación de la proporción de proteínas hidrofóbicas es importante para después

diseñar estrategias específicas para la purificación de las proteínas de interés. En la literatura se menciona sólo un intento exitoso de purificación de una proteína hidrofóbica en su estado nativo, utilizando un adsorbente comercial para cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Sefarosa fenilada; Sørensen y col., 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en ese trabajo, fueron una demostración clara de que este tipo de adsorbentes podrían brindar buenos resultados para estimar la proporción de proteínas hidrofóbicas micobacterianas, así como para diseñar esquemas de aislamiento y purificación de las proteínas de interés.

Por otro lado, se cree que el contenido de proteínas hidrofóbicas es más abundante en los cultivos estacionarios de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que en los cultivos logarítmicos, debido a que la muerte de las bacterias trae consigo la liberación de muchas proteínas de la envoltura micobacteriana, pero en realidad se desconoce la proporción relativa de las proteínas hidrofóbicas en los cultivos logarítmicos con relación a la de los cultivos estacionarios. De ahí la importancia de realizar el análisis del contenido de proteínas hidrofóbicas en cultivos de diferentes edades.

El tipo de proteínas liberadas al medio por las bacterias, también depende del medio de cultivo seleccionado así como del tipo y concentración del enriquecimiento, por lo que antes de proponer un esquema para el aislamiento de proteínas hidrofóbicas es importante estandarizar las condiciones de cultivo hasta conseguir un crecimiento bacteriano adecuado. Uno de los medios de cultivo para *Mycobacterium tuberculosis* es el medio Middlebrook 7H9, que enriquecido con caseína hidrolisada brinda un suministro adecuado de aminoácidos para el crecimiento óptimo de la bacteria (<http://www.condalab.com> ) ya que la caseína contiene arginina, uno de los aminoácidos preferidos por las micobacterias como fuente de nitrógeno (Cole y col., 1998; Tekaiya y col., 1999). A partir de esta información y de las experiencias preliminares exitosas con este medio de cultivo (Bolado, 2003), en este trabajo se propuso la hipótesis de que *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, cultivado en medio líquido M7H9 enriquecido con caseína hidrolisada, expresa proteínas hidrofóbicas en la cantidad necesaria para

separarlas por cromatografía de interacciones hidrofóbicas. Para demostrar esta hipótesis, el objetivo de este trabajo fue el de estandarizar el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, en medio líquido M7H9 enriquecido con caseína hidrolisada, para el aislamiento de las proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de Estudio, Plan Experimental General y Sesgos Previstos**

Este fue un trabajo experimental, en el que se utilizaron cultivos axénicos de *M. tuberculosis* H37Rv desarrollados en el medio de cultivo líquido M7H9 para identificar proteínas del filtrado de cultivo afines a adsorbentes hidrofóbicos acilados.

Se excluyeron todos los cultivos contaminados para evitar la presencia de proteínas exógenas y antes de aplicar las proteínas al adsorbente cromatográfico, se evaluó el perfil electroforético del filtrado proteico total (FP), con el fin de descartar los filtrados proteicos degradados. El FP fue cargado a tres adsorbentes hidrofóbicos (Sefarosa acetilada, Sefarosa butilada y Sefarosa hexilada) y, finalmente, los aislados proteicos obtenidos con Sefarosa acetilada y Sefarosa hexilada, fueron evaluados por microcalorimetría isotérmica para estimar la influencia de las diferencias del ligando hidrofóbico en la interacción hidrofóbica y en la constante de afinidad entre el adsorbente y las proteínas.

### **Materiales y Reactivos**

El medio de cultivo M7H9 y los enriquecimientos (Bacto-casitona y Triptosa) fueron adquiridos en Difco, México. La Sefarosa-6B CL, fue adquirida de Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden. El resto de los reactivos para la preparación de los medios de cultivo, así como todos los reactivos utilizados en los procedimientos cromatográficos, la electroforesis y la calorimetría isotérmica fueron de grado analítico (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA).

### **Cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, fue tipificada como cepa de referencia por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) y conservada en leche descremada en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que el Laboratorio Estatal de Salud de Pública (LESP) la donó para este estudio. La cepa fue reactivada en el medio sólido Lôwenstein Jensen, a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 21 a 28 días. La pureza de la cepa fue comprobada cultivando (en agar sangre) una asada del desarrollo bacteriano confluyente, e indirectamente por la ausencia de turbidez del medio de cultivo líquido. Además se realizó la tinción de Ziehl Neelsen y las pruebas bioquímicas catalasa semicuantitativa, termotolerancia de la catalasa, producción de niacina, reducción de nitratos y la actividad pirazinamidasa. Todos los procedimientos que involucraron la manipulación de la cepa, desde el cultivo hasta la obtención de los filtrados proteicos, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Micobacterias del LESP del Estado de Sonora.

### **Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Después de haber comprobado la pureza de la cepa, se procedió a la preparación del inóculo, con base en el estándar de turbidez de Mac Farland. La concentración del inóculo fue ajustada a 0.5 de esta escala, inoculando la cepa en un tubo de ensayo con 5 ml de solución salina al 0,9% estéril, hasta hacerlo corresponder con el estándar de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Posteriormente se aplicó 1 mL del inóculo ajustado a 400 mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2, 4 y 6 % y Triptosa al 2%, 4% (Bolado-Martínez, 2003) y 6 %. Los medios inoculados fueron incubados a temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$ , sin agitación, durante 4, 6 y 8 semanas.

### **Obtención de Filtrado Proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

La fracción celular fue separada del filtrado proteico utilizando dos sistemas de filtración estériles en secuencia, con membranas de nylon con punto de corte de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Sigma Chemical Co., St Louis Mo, USA). Los sistemas fueron acoplados a una bomba de vacío con trampa de hipoclorito de sodio al 7% a 300 mm de Hg. La concentración de proteína de los filtrados se determinó por los métodos de Bradford y Lowry (Bradford, 1976; Lowry, 1951), usando albúmina de suero bovino como proteína estándar y finalmente los filtrados proteicos fueron concentrados, en centricones con membrana de nitrocelulosa con punto de corte de 10,000 Da (Amicon, México), a 4°C y 2,500 rpm (centrífuga Marathon 3000R, Fisher Scientific), dializados exhaustivamente contra agua tridestilada y liofilizados (Labconco, México). Los concentrados proteicos liofilizados fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento cromatográfico.

### **Síntesis de los Geles para Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

Se sintetizaron tres geles para interacción hidrofóbica: Sefarosa-6B acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992; Vázquez-Moreno y col., 2001), Sefarosa-6B butilada y Sefarosa-6B hexilada. La síntesis inició deshidratando 10 g de Sefarosa-6B CL mediante la adición sucesiva de un volumen de etanol al 95%, acetona y piridina. Posteriormente, los geles fueron incubados, a temperatura ambiente y velocidad moderada durante 18 h, con 0.68 moles de anhídrido acético, butírico o hexanoico, para preparar Sefarosa acetilada, butilada o hexilada, respectivamente. Los geles acilados, fueron lavados con 2 volúmenes de etanol al 95%, seguidos por un volumen de ácido acético, butírico o hexanoico al 10%, para cada una de las matrices respectivamente, y agua deionizada en exceso.

### **Condiciones Cromatográficas**

Los geles hidrofóbicos 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 como fase móvil agua deionizada con  $\text{NaN}_3$  al 0.02%. El volumen de cama de la Sefarosa acetilada empacada fue de 3.1 mL, el de la Sefarosa butilada de 7.8 mL y el de la Sefarosa hexilada de 3.6 mL. Después los geles fueron acondicionados y equilibrados con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, pH 7.6. Las columnas fueron cargadas con 20 mg (peso seco) de la proteína solubilizada en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, pH 7.6, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min (Candia-Plata, 2000). Las proteínas no adsorbidas a la matriz y las unidas inespecíficamente fueron eliminadas lavando la columna con la misma solución de equilibrio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, pH 7.6) a 0.5 mL/min. Las proteínas unidas específicamente fueron eluidas en un solo paso con MOPS 10 mM, pH 7.6, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y, finalmente, los geles fueron regenerados con guanidina-HCl 6 M, pH 7.6 y agua deionizada en exceso.

**Monitoreo de los Ensayos Cromatográficos y Cuantificación de la Proteína.** El aislamiento de los componentes del filtrado proteico fue monitoreado a 280 nm (Aquamate Thermo-Spectronic, Accesolab, México) y la concentración de proteína de las fracciones de lavado y elución fue estimada a 595 nm por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### **Caracterización Electroforética de Filtrado Proteico**

El filtrado proteico, así como las fracciones cromatográficas de lavado y elución, fueron evaluadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 15%. La separación se llevó a cabo bajo condiciones estándares utilizando el método de Laemmli (1970) a 102 v, durante 2.5 h, utilizando una cámara de electroforesis vertical (Mini Protean 3 cell de Bio-Rad, México) y una fuente de poder EC-105 (Thermo Electron Co, USA). Las proteínas fueron visualizadas

con tinción de plata, utilizando la técnica de Blue y col. (1987) y las masas relativas de las bandas individuales fue estimada utilizando marcadores de masa de amplio rango (Bio-Rad, México).

### **Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)**

Los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica se llevaron a cabo en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal Inc, USA) controlado por un software digitalizado. El filtrado proteico fue inyectado en la celda conteniendo el gel en suspensión una vez alcanzado el equilibrio térmico en la celda de reacción (25°C). En cada experimento se utilizaron 2 mL de la suspensión de Sefarosa acetilada o hexilada con una concentración del ligando aproximada de 0.6 mM. La titulación fue realizada con 25 inyecciones consecutivas, en alícuotas de 10 µL (con intervalos de 240 segundos) del filtrado proteico, en concentración de 24 mM, en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M, pH 7.6, obtenido del cultivo de 4 semanas de *M tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con triptosa al 2%. A medida que se aplicaron las inyecciones sucesivas del filtrado proteico en la celda de interacción, la cantidad de calor absorbida o liberada, fue directamente relacionada con la cantidad de uniones que se llevaron a cabo entre las proteínas y el ligando.

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura constante de 25° C, a presión constante de 1 atm (atmósfera) y a una velocidad de 47 rpm. El calor aparente de los ensayos de titulación isotérmica fue corregido con el calor de dilución del filtrado proteico y el del adsorbente para obtener el calor neto de la interacción entre el adsorbente y las proteínas. La señal de salida fue integrada en el programa Origin (Microcal, Massachussets, MA, USA) y se generaron gráficas de µcal/seg contra Tiempo (en min) y de Kcal/mol de inyección contra Relación Molar para estimar el cambio de entalpía ( $\Delta H^\circ$ ) del sistema y la constante de afinidad entre las proteínas y el ligando ( $K$ ). La entropía  $\Delta S^\circ$  y la energía libre  $\Delta G^\circ$  de la unión, fueron variables dependientes que fueron obtenidas en el programa a partir de la ecuación  $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$  (Wiseman y col., 1989).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Estandarización del Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9 y Caracterización Electroforética del Filtrado Proteico Crudo**

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv es una bacteria que tiene una tasa de crecimiento muy baja, tanto *in vivo* (Lewin y col., 2005) como *in vitro* (James y col., 2000), y requiere condiciones de cultivo óptimas para expresar sus componentes patogénicos específicos. Además, las diferentes condiciones de cultivo (disponibilidad de nutrimentos, temperatura, pH y oxígeno) influyen en el tipo y composición de las proteínas que las bacterias liberan al medio (Sonnenberg y Belisle, 1997).

Los medios líquidos brindan mayor índice de recuperación celular que los medios sólidos (Flournoy y Twilley, 2001), favorecen la recuperación de las proteínas que produce y libera la micobacteria durante su crecimiento (Mattow y col., 2007; Málen y col. 2007). Por esta razón, la mayoría de los estudios del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa virulenta) o H37Ra (no virulenta) han sido realizados en cultivos líquidos, aunque no en todos los medios de cultivo se obtiene la cantidad de proteína necesaria para realizar procedimientos cromatográficos. Por ejemplo, en el medio líquido Sauton (Andersen y col., 1991; Málen y col., 2007; Sørensen y col., 1995; Weldingh y col., 1998), que es uno de los más usados en los estudios del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se obtienen en promedio 600 µg de proteína por litro de medio de cultivo después de 3-4 semanas, una cantidad suficiente para realizar ensayos inmunoquímicos, electroforesis de doble dimensión, espectrometría de masas u otros métodos que requieren cantidades bajas de proteína, pero insuficiente para estimar la hidrofobicidad proteica mediante ensayos cromatográficos. Por el contrario, en uno de los estudios en los que se trabajó con el medio de cultivo líquido Middlebrook 7H9 (M7H9), se obtuvo un rendimiento proteico considerablemente bueno (150 µg/100 mL; Bolado, 2003) utilizando caseína hidrolisada como enriquecimiento del medio de cultivo base.

Considerando los resultados anteriores, en este trabajo fue usado el medio M7H9 enriquecido con casitona para estandarizar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e identificar proteínas hidrofóbicas en el filtrado proteico bacteriano. Se usaron dos fuentes comerciales de caseína hidrolisada: Triptosa (Tabla IIIa) y Bacto-casitona (Tabla IIIb), que fueron añadidas al medio base M7H9 en tres porcentajes (2, 4 y 6%). La diferencia entre los dos enriquecimientos está dada por la proporción de aminoácidos; en la Bacto-casitona el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos es del 38.34%, en tanto que en la Triptosa es del 29.82%. Además, la histidina se encuentra en un porcentaje mayor en la Bacto-casitona (2.38%), en comparación con el porcentaje en el que aparece en la Triptosa (<0.01%).

Las diferencias en la composición de la Bacto-casitona y la Triptosa, aparentemente no influyeron en el perfil electroforético general (gel desnaturizante y reductor en una dimensión) de los filtrados de cultivo obtenidos con los dos enriquecimientos (Figura 5) dado que se presentaron bandas nítidas en el mismo rango de masa molecular (10 a 250 kDa aproximadamente). Sin embargo, sí se observó diferencia en la cantidad de proteínas hidrofóbicas entre los filtrados de cultivo obtenidos con Bacto-casitona y Triptosa; aunque este punto se discutirá posteriormente, cabe mencionar por ejemplo, que al cargar los filtrados proteicos en Sefarosa acetilada, para identificar a las proteínas hidrofóbicas, sólo se aislaron cuatro bandas (en el rango de 30 a 36 kDa) a partir del filtrado proteico con Triptosa, mientras que se aislaron alrededor de 7 bandas (en el rango de 10 a 75 kDa) a partir del filtrado proteico obtenido en Bacto-casitona (Figura 6). Estos resultados, sugieren que la Bacto-casitona, por ser un enriquecimiento con mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, favoreció la expresión de proteínas hidrofóbicas micobacterianas que no se expresaron en los cultivos con Triptosa.

**Tabla III.** Composición de los enriquecimientos usados en el medio M7H9 para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

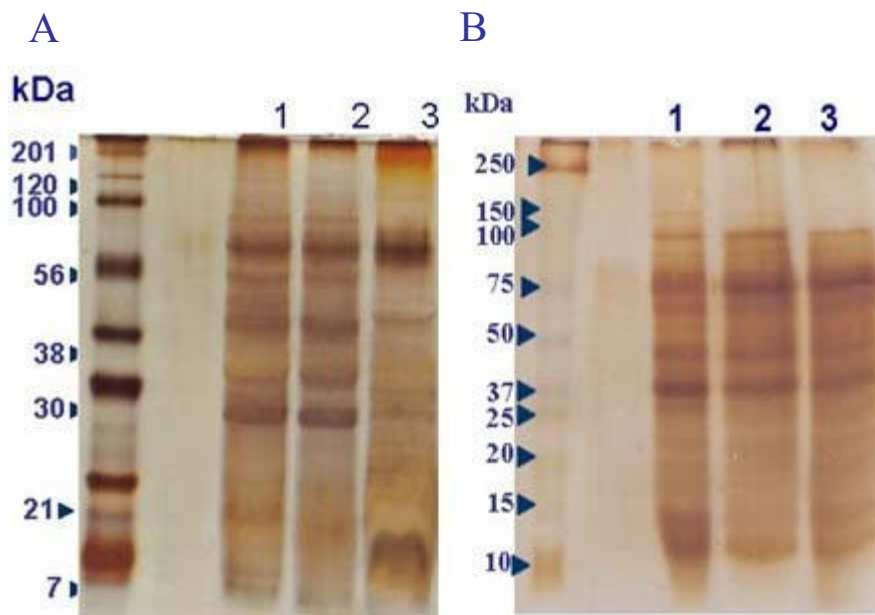
a) Aminoácidos en la Triptosa (g/100g)					
Alanina	4.45	Histidina	< 0.01	Prolina	6.33
Arginina	4.65	Isoleucina	0.34	Serina	4.09
Ac. Aspártico	6.34	Leucina	3.87	Treonina	3.55
Cisteína	0.44	Lisina	4.64	Triptofano	0.62
Ac. Glutámico	13.92	Metionina	1.92	Tirosina	2.21
Glicina	2,84	Fenilalanina	7.52	Valina	1.93

b) Aminoácidos en la Bacto-casitona (g/100g)					
Alanina	2.91	Histidina	2.38	Prolina	8.65
Arginina	3.30	Isoleucina	4.45	Serina	5.09
Ac. Aspártico	6.99	Leucina	7.62	Treonina	3.91
Cisteína	0.44	Lisina	6.60	Triptofano	0.95
Ac. Glutámico	18.74	Metionina	2.32	Tirosina	1.86
Glicina	1,86	Fenilalanina	4.11	Valina	5.51

a) Triptosa, b) Bacto-casitona

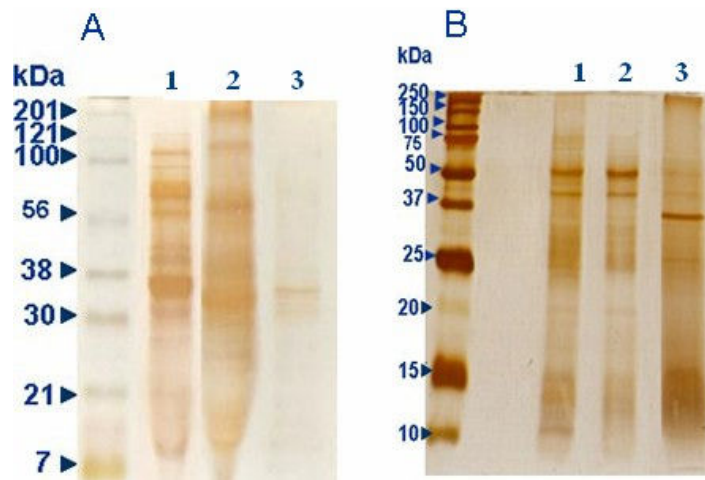
Fuente: <http://www.condalab.com/>





**Figura 5:** Perfiles electroforéticos de los filtrados de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en M7H9, en SDS-PAGE al 15% y teñidos con plata.

A) M7H9 enriquecido con Triptosa y B) M7H9 enriquecido Bacto-casitona. El carril 1 tiene 2% del enriquecimiento, el carril 2 tiene el 4% y el carril 3 el 6%. Los geles A y B, muestran un perfil electroforético similar, caracterizado por la presencia de bandas en el rango de 10 a 250 kDa aproximadamente.

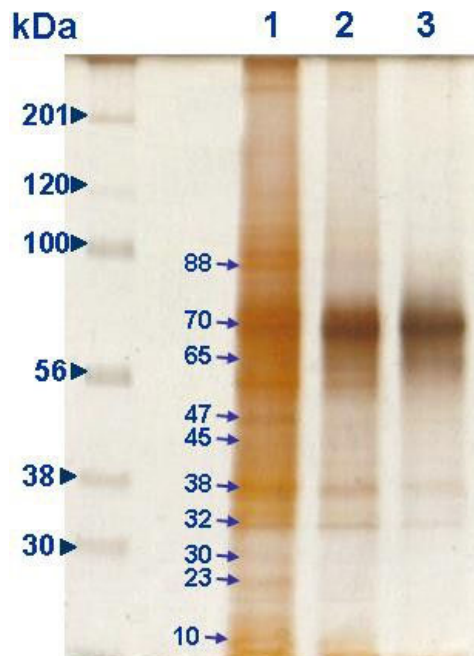


**Figura 6.** Perfiles electroforéticos de las proteínas aisladas con Sefarosa acetilada a partir de los filtrados del cultivo de 4 semanas, en M7H9, de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

A) Perfil electroforético de las fracciones proteicas del filtrado enriquecido con Triptosa al 2%: Carril 1 filtrado proteico total, carril 2 fracción de lavado y carril 3 fracción de elución; se aislaron cuatro bandas, en el rango de 30 a 38 kDa. B) Perfil electroforético de las fracciones proteicas del filtrado enriquecido con Bactocasitona al 2%: Carril 1 proteína total, carril 2 fracción de lavado y carril 3 fracción de elución; se aislaron alrededor de 7 bandas en el rango de 10 a 75 kDa.

Por otro lado, se ha dicho que la fase de crecimiento logarítmico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medios líquidos va de 7 a 21 días (Sonnenberg y Belisle, 1997) y que es en este periodo cuando se observan principalmente proteínas de secreción en el filtrado de cultivo y sólo algunas proteínas de membrana (Andersen y col., 1991; Sonnenberg y Belisle, 1997; Málen y col., 2007; Sheng y col., 2007). Sin embargo, la experiencia de grupos como el de Nagai y col., (1991) demuestra que se obtienen rendimientos proteicos óptimos aún en cultivos de 5 semanas en medio líquido Sauton, con abundancia de proteínas de secreción. En contraparte, en los cultivos a largo plazo (de más de 5 semanas), aumenta el contenido de proteínas de estrés térmico, proteínas citosólicas y proteínas de superficie membranal (Nagai y col., 1991). Por estas razones, en este trabajo se tomó la decisión de obtener filtrados proteicos de cultivos de 4, 6 y 8 semanas, para abarcar la etapa final de la fase logarítmica y la fase estacionaria completa del crecimiento micobacteriano y, en consecuencia, tener la posibilidad de analizar tanto proteínas de secreción como proteínas de membrana celular y proteínas de estrés térmico.

En los cultivos de 4 semanas teóricamente todavía se presentan muchas proteínas de secreción (Andersen y col., 1991), aunque también hay algunas proteínas citosólicas y proteínas de estrés metabólico. Por esta razón, en el perfil electroforético de los cultivos de 4 semanas enriquecidos con Bacto-casitona se encontraron bandas en el rango de 10 a 200 kDa (Figura 7), aunque fueron más abundantes las bandas relacionadas (por su masa molecular) con proteínas de secreción como las proteínas del complejo 85 (30 a 32 kDa), la de 38 kDa y la proteína APA (45 a 47 kDa). Entre las bandas más intensas se encontraron las de masa molecular aparente de 30 a 32 kDa, relacionadas con las proteínas que forman parte del complejo 85 el cual es un complejo proteico que tiene actividad micoliltransferasa y tiene afinidad hacia fibronectina y plasminógeno (Monroy y col., 2000; Nagai y col., 1991; Rosseels y col., 2006), la proteína de 38 kDa (equivalente a la PhoS) que es el más potente inmunógeno micobacteriano caracterizado a la fecha, la proteína de 45 y 47 kDa (MPT32 o APA; Wilkinson y col.,

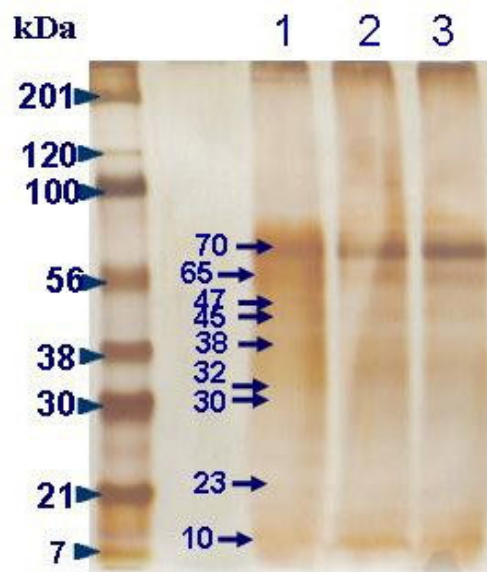


**Figura 7.** Perfil electroforético del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de 4 semanas en M7H9, enriquecido con Bacto-casitona al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente).

En los cultivos de 4 semanas, con Bacto-casitona al 2% se expresaron principalmente proteínas de secreción, tales como las que forman parte del complejo 85 (de masa molecular ente 30 y 32 kDa) y las proteínas de 38 kDa, APA (de 45/47 kDa) y la de 88 kDa. Además, se expresaron proteínas de estrés térmico como la de 10 kDa, la de 23 kDa (superóxido dismutasa), la de 65 y la de 70 kDa.

1997) y la proteína de 88 kDa, una de las más prometedoras para el serodiagnóstico de tuberculosis en individuos con inmunodeficiencia adquirida (Sonnerberg y Belisle, 1997). Otra banda que aparece en los cultivos de 4 semanas es la de 23 kDa, que parece corresponder a la SOD (superóxido dismutasa) una proteína que se presenta también en los filtrados de cultivo en fase logarítmica y que cumple con la función de eliminar los radicales de oxígeno. Además, la presencia de las bandas de 70 kDa (probablemente la Hsp70) y la banda de 65 kDa (Hsp) en los cultivos de 4 semanas, fueron señales del fin de la fase logarítmica del cultivo (Andersen y col., 1991; Sonnerberg y Belisle, 1997) ya que son proteínas que se sobre-expresan en condiciones de hipoxia, estrés térmico y nutricio (particularmente la Hsp65; Qamra y Mandes, 2004). Cabe señalar que el estudio de las propiedades de las proteínas de estrés térmico (hsp: “heat-shock protein”), incluyendo las fisicoquímicas (como la hidrofobicidad), es de gran importancia debido a que juegan un papel importante en la evasión del sistema inmune durante la infección micobacteriana, sirven como señales de alerta para el sistema de defensa (Stewart y col., 2001) y como chaperonas (Kong y col., 1993). El valor aparente de varias de estas proteínas, como antígenos inmunodominantes y/o marcadores de infección o enfermedad, también ha conducido a la búsqueda de estrategias para su purificación (Jae-Hyun y col., 1999; Sorensen y col., 1995; Sugden y col., 1996) y su caracterización bioquímica e inmunológica.

Otra banda que se observó muy intensamente en los cultivos de 4 semanas con Bacto-casitona fue la de 10 kDa, que podría corresponder a la CFP (culture filtrate protein, de 10 kDa; Laurens y col., 2000) una proteína que tiene gran potencial inmunodiagnóstico (Laurens y col., 2000). Esta banda, además de las bandas de 10, 23, 30/32, 38, 45/47, 65, 70, aparece también en el electroforetograma de los cultivos de 4 semanas enriquecidos con Triptosa. Sin embargo, la banda de 88 kDa no aparece en este último perfil electroforético, lo que sugiere que la Triptosa no favorece su expresión en cultivos de 4 semanas (Figura 8) y por lo tanto no sería éste el medio idóneo para el aislamiento de esa banda.

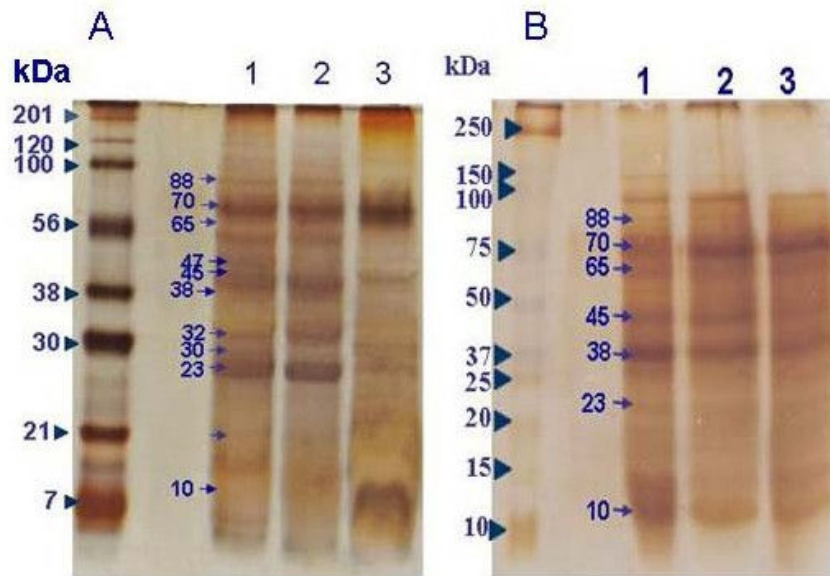


**Figura 8.** Perfil electroforético del filtrado de cultivo de 4 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en M7H9, enriquecido con Triptosa al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente).

Las bandas de 10, 23, 30/32, 38, 45/47, 65 y 70 kDa, fueron las más abundantes de este electroforetograma; la diferencia entre este perfil electroforético y el del cultivo de 4 semanas enriquecido con bacto-casitona, fue la ausencia de la banda de 88 kDa.

En los cultivos de 6 semanas con Bacto-casitona, se notó la capacidad de la bacteria para continuar secretando proteínas como las de 30, 32, 38, 45 y 88 kDa, pero se intensificaron las bandas de 10, 23, 65 y 70 kDa, probablemente por el agotamiento del oxígeno y los nutrientes (Qamra y Mandes, 2004). Con el enriquecimiento con Triptosa, los cultivos de 6 semanas mostraron el mismo patrón electroforético que con el de Bacto-casitona, pero la banda 38 kDa fue más intensa (Figura 9). Estos resultados sugieren que los cultivos enriquecidos con Triptosa son una fuente adecuada para el aislamiento de la proteína de 38 kDa, pero si lo que se desea es aislar a las proteínas de estrés térmico (de 10, 23, 65 y 70 kDa) entonces podrían utilizarse cualquiera de los dos cultivos de 6 semanas.

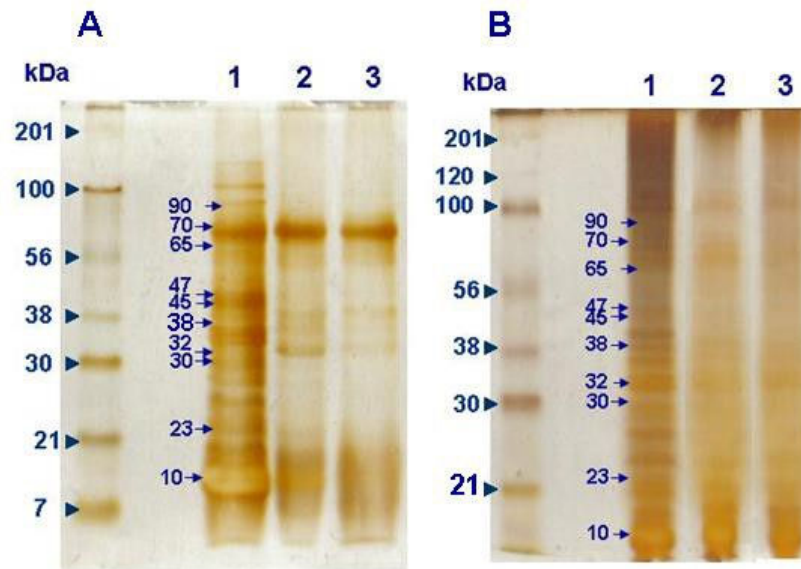
A las 8 semanas con Bacto-casitona al 2%, aumentó la intensidad de la banda de 10 kDa y las bandas de 23, 45, 65 y 70 se mantienen con el mismo patrón que en el cultivo de 6 semanas. Débilmente también siguen estando presentes las bandas de 30/32 y la de 38 kDa (Figura 10). Es probable que la reducción de la intensidad de las bandas relacionadas con las proteínas de secreción y el aumento de la intensidad de las bandas relacionadas con las proteínas de estrés térmico, haya sido la consecuencia del envejecimiento del cultivo y del agotamiento concomitante de los nutrientes (Dave y col., 2002). La comparación del perfil de 8 semanas con Bacto-casitona con respecto del perfil obtenido con Triptosa, mostró muchas semejanzas en términos de la presencia de las bandas anteriormente citadas, aunque se presentó una mayor proporción de bandas minoritarias que no pudieron asociarse (por su masa molecular) con las proteínas reportadas en publicaciones similares. Una banda, que no aparece en los cultivos de 4 semanas de Triptosa, que aparece débilmente en los cultivos de 4 semanas con Bacto-casitona, pero se intensifica notablemente a medida que envejecen los cultivos y, por lo tanto, es más intensa en los cultivos de 8 semanas, es la banda de 90 kDa, que podría corresponder a la proteína de fase aguda de 90 kDa. Estos resultados concuerdan con reportes en los que se dice que esta proteína, por ser de estrés térmico, se expresa fundamentalmente en la fase estacionaria de los cultivos micobacterianos (Young y



**Figura 9.** Perfiles electroforéticos del filtrado de cultivo en M7H9, por 6 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

A) M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). En el carril 1 demuestra la capacidad de la bacteria para continuar secretando proteínas como las de 30, 32, 38, 45 y 88 kDa pero también su estrés nutricio por la intensificación de las bandas de 10, 23, 65 y 70 kDa. B) M7H9 enriquecido con Triptosa al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente); se observa el mismo patrón electroforético que con el cultivo con Bacto-casitona pero con la expresión abundante de la banda de 38 kDa.





**Figura 10.** Perfiles electroforéticos del filtrado de cultivo en M7H9, por 8 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

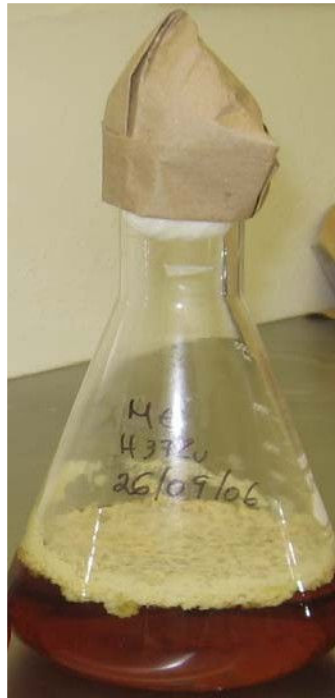
A) M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). En el carril 1 se observa que aumentó la intensidad de la banda de 10 kDa mientras que las bandas de 23, 45, 65 y 70 se mantienen con el mismo patrón que en el cultivo de 6 semanas. Débilmente, también están presentes las bandas de 30/32 y la de 38 kDa. B) M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2, 4 y 6% (carriles 1, 2 y 3, respectivamente) que mostró muchas semejanzas con relación al M7H9 enriquecido con triptosa, aunque se presentó una mayor proporción de bandas minoritarias no identificadas.

Garbe, 1991), de ahí que su intensidad haya sido mayor a medida que los cultivos envejecieron.

Es importante destacar que los cultivos suplementados con 4 y 6% del enriquecimiento mostraron un número de bandas inferior al que presentaron los cultivos enriquecidos con caseína hidrolisada al 2%. Por la constancia de este fenómeno en los cultivos enriquecidos con Bacto-casitona y Triptosa, es probable que las bacterias hayan reducido la expresión de algunas proteínas como consecuencia del estrés hipertónico asociado a la alta concentración del enriquecimiento.

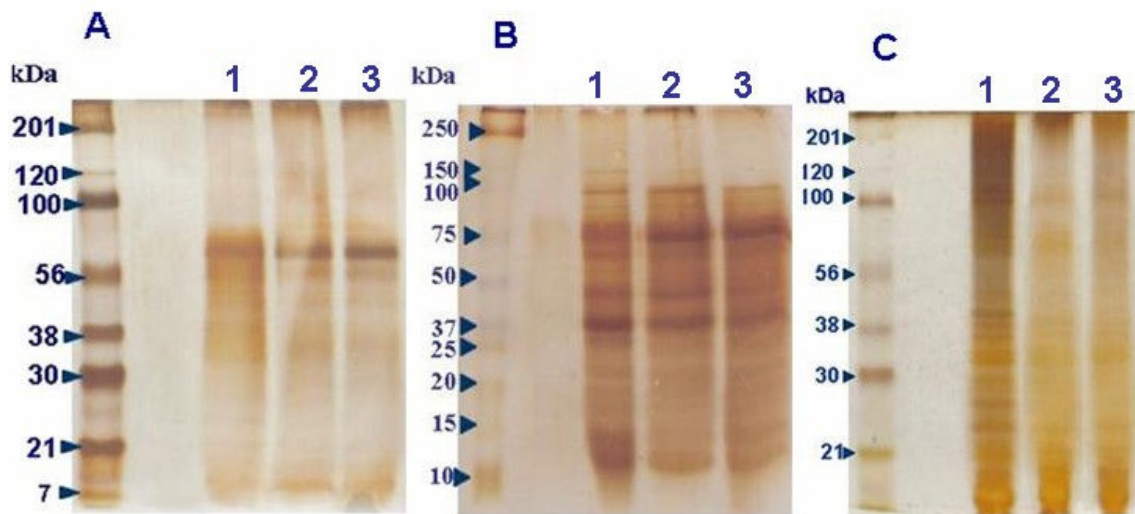
Por otro lado, todos los cultivos mostraron las características fenotípicas macroscópicas propias de los cultivos líquidos estacionarios de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, con agregados celulares localizados principalmente como películas superficiales (Figura 11; Satioh y col., 2000). Esta agregación se puede evitar cuando a los cultivos se les adicionan detergentes no aniónicos, tales como el Tween 80; con esta medida podría haberse inhibido la agregación celular que probablemente provocó el consumo más rápido de los nutrientes del cultivo a nivel local, sin embargo en este trabajo se tomó la decisión de no agregar el detergente por los efectos tóxicos que tiene hacia las bacterias (Anderson y col., 1991).

Cabe destacar que la electroforesis de los filtrados proteicos invariablemente mostró un fondo café, cuya intensidad aumentó a medida que fueron envejeciendo los cultivos (Figura 12) Este fondo redujo la nitidez de las bandas de los perfiles electroforéticos, en comparación con la nitidez de los perfiles que se obtienen con medios de cultivo como el Sauton (Figura 13). La pérdida de nitidez también estuvo asociada al oscurecimiento de las bandas proteicas, que fue aumentando a medida que aumentaron el porcentaje del enriquecimiento en el medio de cultivo y el tiempo de incubación, de tal manera que los filtrados proteicos más oscuros fueron los que estuvieron enriquecidos con 6% de Bacto-casitona y que estuvieron en incubación por 8 semanas. Pero tanto estos cultivos como los cultivos menos oscuros (con Bacto-casitona al 2 y 4%) fueron aclarados parcialmente (40% en promedio, en una escala analógica visual) mediante la precipitación de las proteínas con acetona al 90%, lo cual fue una



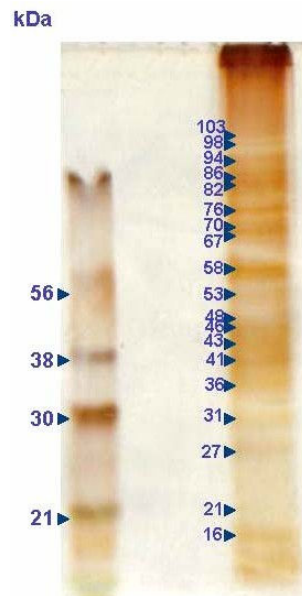
**Figura 11.** Características macroscópicas de los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio M7H9 enriquecido con Bacto-casitona.

La imagen muestra el crecimiento característico de la bacteria, en medio líquido sin detergente, con agregados celulares que forman películas superficiales.



**Figura 12.** Perfiles electroforéticos de los filtrados de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa en concentraciones de 2, 4 y 6%(carriles 1, 2, y 3, respectivamente), separados por SDS-PAGE y teñidos con plata.

En las imágenes se observa que los filtrados proteicos mostraron un fondo café, cuya intensidad aumentó a medida que fueron envejeciendo los cultivos. A) 4 semanas de incubación, B) 6 semanas de incubación y C) 8 semanas de incubación.



**Figura 13** Perfil electroforético de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio Sauton.

demostración del alto contenido lipídico en los filtrados proteicos. Otra posible explicación del oscurecimiento de las bandas en la electroforesis, es que se haya producido la modificación de las proteínas (por glicación y subsecuente oxidación) tras su contacto con los carbohidratos del medio de cultivo (Mikušnikova y col., 2005), pues el M7H9 fue suplementado con 0.2% de glucosa (Bolado-Martínez, 2003), una cantidad lo suficientemente alta para estimular procesos de glicación (Mikulíková y col., 2005), especialmente después de la incubación de los filtrados de cultivo a 37°C durante 8 semanas. Sin embargo, en esta tesis no fue determinada la influencia de la glicoxidación en el encafecimiento de los filtrados proteicos, por lo que queda como una propuesta para posteriores investigaciones.

La estimación de la concentración de proteína en los cultivos micobacterianos es un paso previo y también indispensable para llevar a cabo los procesos analíticos electroforéticos y cromatográficos. La selección del método para la estimación de la concentración proteica, depende del conocimiento que se tenga de la composición de las proteínas que se desea cuantificar; pero si se desconoce la composición proteica, entonces debe elegirse alguno de los métodos más comúnmente usados en Bioquímica. Un método de gran utilidad para estimar la concentración de proteína es el método ultravioleta (UV; Somonian y Smith, 2006), por ser un método no destructivo, muy rápido y sencillo. Sin embargo, el método UV no pudo ser aplicado en este caso debido a que para utilizarlo es indispensable que las soluciones proteicas no tengan color y, como se señaló previamente, el filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tenía un intenso color café. Luego entonces, la opción era la utilización de un método colorimétrico; dentro de éstos, el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y el método de Bradford (Bradford, 1976), son los más frecuentemente usados por su relativa sencillez, exactitud y sensibilidad (Somonian y Smith, 2006) y por ello fueron utilizados en este trabajo para estimar la concentración de proteína micobacteriana.

En el caso del método de Lowry, es importante señalar que no es apropiado para estimar la concentración de proteínas que no tienen tirosinas, ya que el ensayo se basa en la reacción entre estos residuos y el reactivo fenólico de Folin (la base del reactivo de

Lowry; Simonian y Smith, 2006). Por el contrario, cuando las proteínas de la muestra problema tienen un elevado contenido de tirosinas y la proteína estándar tiene un contenido de tirosinas relativamente bajo, el reactivo de Lowry sobreestima la concentración de las proteínas de la muestra problema. En este trabajo, el contenido proteico de los filtrados de cultivo micobacterianos fue sobreestimado (Tabla IV) con el reactivo de Lowry. Una posible causa de este problema podría haber sido que el contenido de tirosinas/ $\mu\text{g}$  de proteína del filtrado hubiera sido mayor que el contenido de este aminoácido en la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) que se usó como estándar. Sin embargo, el análisis de la composición general del filtrado proteico, ha demostrado que los aminoácidos más abundantes en las proteínas micobacterianas son alanina, glicina, triptófano, prolina y arginina (Cole y col., 1998; Tekaia y col., 1999). Otra posible causa de la sobreestimación podría ser la modificación por glicación de arginina (porque las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* casi no tienen lisina; Cole y col., 1998; Tekaia y col., 1999) pero como se dijo anteriormente, la identificación de la causa de la sobreestimación no fue uno de los objetivos de este trabajo, por lo que se reserva para otros estudios.

Por lo anterior, el método de Bradford constituyó una alternativa para estimar la concentración de proteína en los filtrados proteicos obtenidos en este estudio. El método de Bradford, es el método colorimétrico más usado para estimar la concentración de proteína, por su rapidez y porque tiene menos interferentes que el método de Lowry (Simonian y Smith, 2006); sin embargo, su valor analítico y su sensibilidad hacia las distintas proteínas es muy variable (Pierce y Suelter, 1977) porque depende del contenido de arginina (las proteínas micobacterianas tienen el contenido requerido de este aminoácido para aplicar el método de Bradford; Cole y col., 1998; Tekaia y col., 1999), histidina, tirosina y fenilalanina que tengan las proteínas (Bradford, 1976). En este trabajo, la estimación de la proteína contenida en los filtrados proteicos con este método brindó resultados similares a los obtenidos mediante la estimación de la proteína por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, por lo que fue el

**Tabla IV.** Concentración proteica aparente del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, utilizando los métodos de Lowry y Bradford

<b>Tiempo de incubación del cultivo (semanas)</b>	<b>Concentración de Proteína en el Filtrado Proteico (µg/mL)*</b>	
	<b>Lowry</b>	<b>Bradford</b>
<b>4</b>	<b>383</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>506</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>586</b>	<b>107</b>

\*En la tabla, los valores obtenidos para estimar la concentración de proteína en los filtrados de cultivo micobacterianos, son ejemplificados con los datos obtenidos con el filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, obtenido en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 4%. Los valores de concentración son expresados como la media de dos mediciones.



método seleccionado para realizar la estimación del contenido proteico en todos los filtrados micobacterianos.

### **Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas, a Partir del Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9**

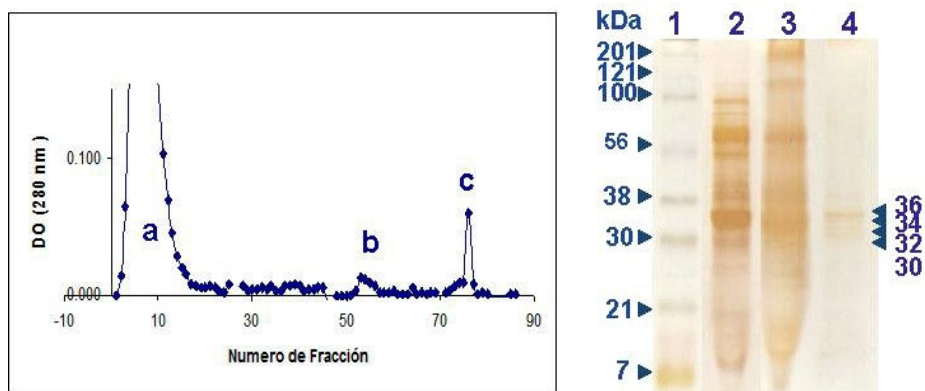
En este trabajo, se sintetizaron tres adsorbentes HIC (Sefarosa acetilada, Sefarosa butilada y Sefarosa hexilada) y se utilizaron como herramientas analíticas para aislar proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Una vez que se establecieron las condiciones de crecimiento bacteriano, se eligieron dos de los filtrados proteicos para el aislamiento de las proteínas hidrofóbicas: El filtrado del cultivo de 4 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv enriquecido con Bactocasitona al 2% y el filtrado del cultivo de 4 semanas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv enriquecido con Triptosa al 2%; la selección de estos dos filtrados se basó en el hecho de que en ellos la cantidad de proteínas de secreción y de estrés térmico era muy similar, lo que nos brindaría la oportunidad de estimar la hidrofobicidad de ambos grupos proteicos.

Para estimar el contenido relativo de proteínas hidrofóbicas en los filtrados proteicos, se utilizaron como modelos los filtrados proteicos de los cultivos de 4 semanas enriquecidos con Triptosa (en lo sucesivo FT) y los filtrados proteicos de los cultivos de 4 semanas enriquecidos con Bacto-casitona (en lo sucesivo FB). Debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de filtrado proteico en los cultivos micobacterianos (en este trabajo se obtuvo un rendimiento proteico de 2.3 a 3.5 mg/L de cultivo), se aplicó una cantidad de proteína (1.3 a 1.8 mg por corrida cromatográfica) inferior a la necesaria para saturar los geles, ya que por ejemplo, la Sefarosa acetilada adsorbe 3.2 mg/mL del gel (Candia-Plata, 2000). Por esta razón no se estimó su capacidad de adsorción, aunque la cantidad aplicada por corrida cromatográfica fue suficiente para estimar la proporción relativa de proteínas hidrofóbicas adsorbidas a los tres geles.

Los resultados de los ensayos cromatográficos mostraron, en general, que el filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, obtenido de cultivos de 4 semanas en medio líquido M7H9 enriquecido con Bacto-casitona y Triptosa, contiene proteínas hidrofóbicas. El perfil electroforético de las fracciones de elución fue evidencia de que la adsorción a los geles dependió no sólo del adsorbente sino del tipo de enriquecimiento, pero en todas las fracciones de elución se observaron bandas con la masa aparente de algunas proteínas de secreción (que se expresan en las fases logarítmica y estacionaria del crecimiento micobacteriano) y con la masa aparente de algunas proteínas de estrés térmico; las bandas asociadas con proteínas de secreción representaron la mitad (50%) de las bandas observadas en los perfiles electroforéticos de las fracciones de elución. Esto significa que una proporción inesperadamente alta de proteínas del filtrado proteico micobacteriano asume un comportamiento hidrofóbico bajo las condiciones cromatográficas ensayadas en este trabajo y, en consecuencia, con el aislamiento de estas proteínas se abre la posibilidad de iniciar estudios que aborden la relación entre la hidrofobicidad de las proteínas micobacterianas y la patogénesis de la tuberculosis.

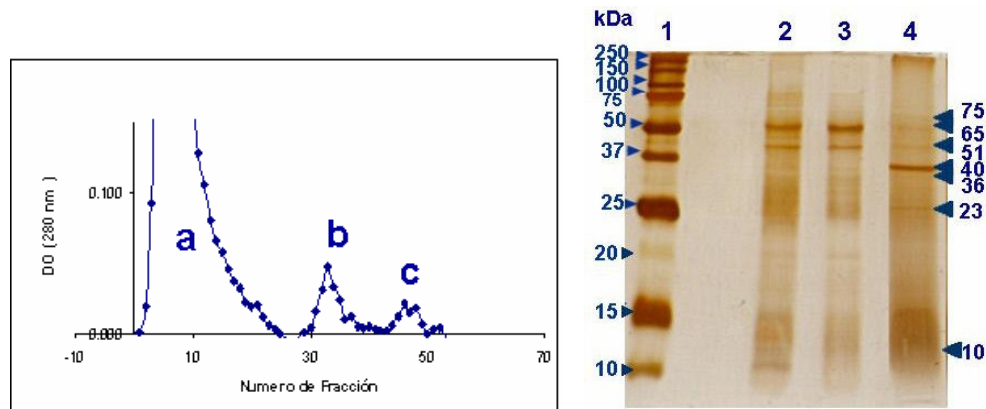
Los ensayos cromatográficos en Sefarosa acetilada, se llevaron a cabo cargando de 1.3 a 1.8 mg de proteína de FT y FB al gel con un volumen de cama de 3.1 mL. Bajo estas condiciones analíticas, el perfil electroforético de la fracción de elución (Figura 14) obtenida con FT mostró solamente 4 bandas en el rango de 30 a 36 kDa, que sugiere el enriquecimiento con proteínas del complejo 85. Este enriquecimiento fue evaluado a través de un ensayo inmunoenzimático utilizando un anticuerpo monoclonal anti-C85 (Abcam, USA) que generó una densidad óptica mayor (0.345) que la del filtrado proteico (0.248); este resultado constituye una prueba preliminar del enriquecimiento de la fracción de elución con las proteínas del complejo 85, pero es necesaria su corroboración posterior mediante un sistema de inmunodetección en membrana que, en



**Figura 14.** Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa acetilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con triptosa al 2%.

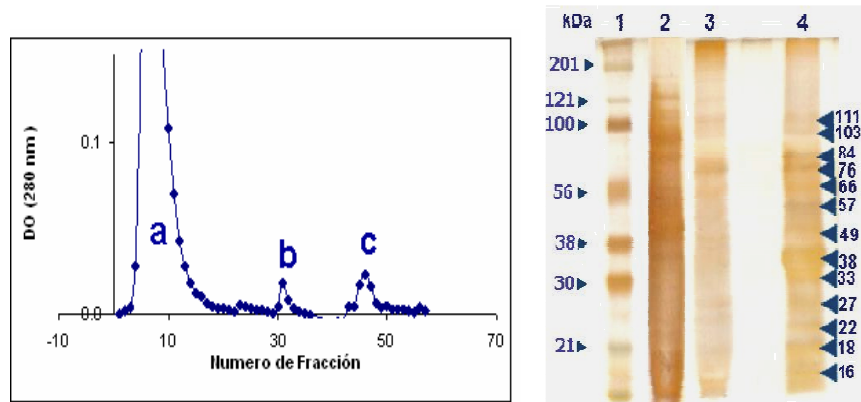
El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 3.1 mL de Sefarosa acetilada. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular (Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución).

caso de confirmarse, abre la posibilidad de diseñar un esquema de purificación (en pocas etapas) para las proteínas que componen ese complejo. En el caso de la fracción de elución obtenida en la corrida cromatográfica con Sefarosa acetilada y FB, se presentaron 7 bandas bien definidas y varias minoritarias en la fracción de elución (Figura 15). Es interesante notar que en este caso prácticamente fueron indistinguibles las bandas de 30/32 y, por el contrario, una banda de 40 kDa (que podría corresponder a la L-alanina deshidrogenasa) fue comparativamente muy intensa. Además, se observaron dos bandas de menor intensidad que teóricamente podrían corresponder a la superóxido dismutasa y a la proteína de 10 kDa; estas proteínas de estrés térmico tienden a incrementar su concentración a medida que el cultivo micobacteriano envejece. En la fracción de elución de los ensayos con FT y Sefarosa butilada (una matriz teóricamente más hidrofóbica que la Sefarosa acetilada) se observaron 13 bandas (Figura 16), entre ellas una de 70 kDa que podría corresponder a la proteína Hsp de masa equivalente y es interesante por su potencial papel como señalizador inmunológico (Mundaliar y col., 2006). La banda de 16 kDa, que parece estar relacionada con una proteína hidrofóbica de estrés térmico (Yang y col., 1999), también se enriqueció significativamente, en cambio, la banda asociada con la superóxido dismutasa (SOD) tuvo muy baja intensidad en comparación con la banda que se presentó en la fracción de elución obtenida en Sefarosa butilada a partir de FB (Figura 17). En esta última fracción, además del enriquecimiento de la banda SOD se observaron otras 8 bandas, entre las cuales tres bandas intensas están en el rango de 44 a 70 kDa y pueden constituir una fuente importante para la purificación subsecuente de las proteínas de 45/47, 65 y 70 kDa. Por otro lado, en los ensayos con la Sefarosa hexilada y FT sólo se observaron 7 bandas, en el rango de 30 a 90 kDa. Entre las bandas que podrían ser recuperadas en esta fracción de elución están las del complejo 85, la L-alanina deshidrogenasa y las bandas asociadas con las proteínas de 38, 65, 70 y 90 kDa (Figura 18). Esta última, al igual que las proteínas de 65 y 70 kDa, es una proteína de estrés térmico pobremente caracterizada.



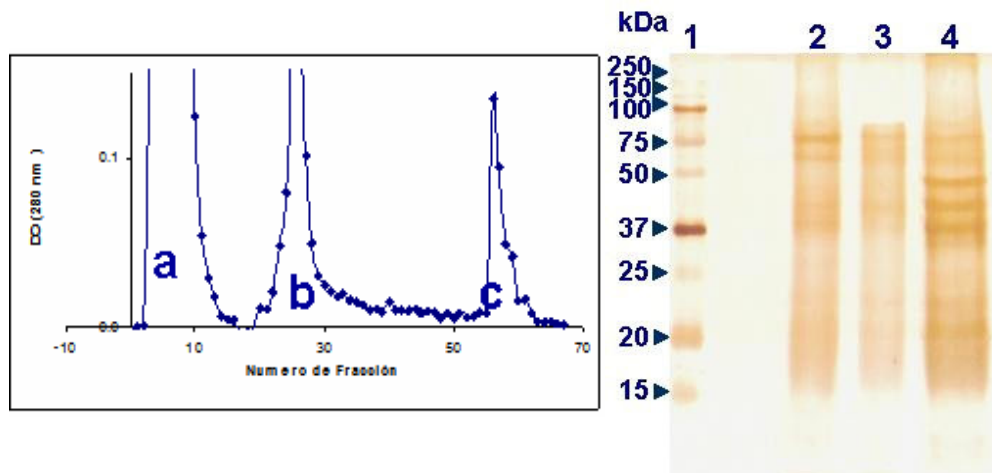
**Figura 15.** Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa acetilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.

El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 3.1 mL de Sefarosa acetilada. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular (Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución).



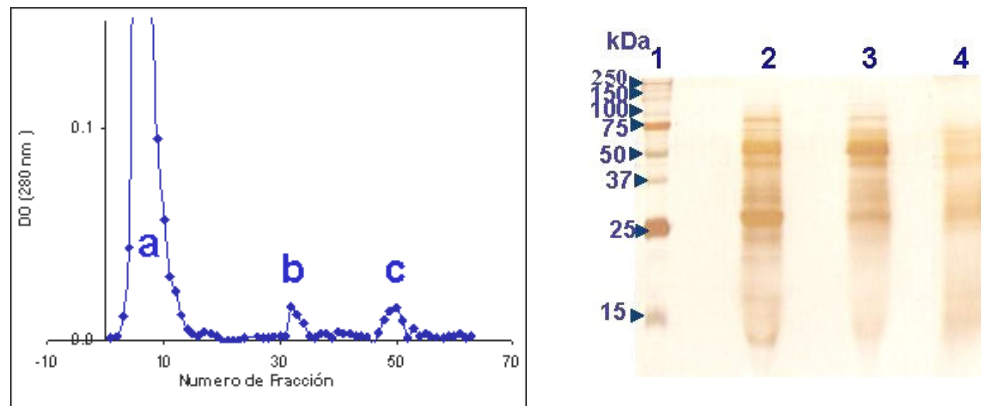
**Figura 16.** Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa butilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa al 2%

El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 7.8 mL de Sefarosa butilada. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular (Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución)



**Figura 17.** Cromatograma y electrofretograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa butilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.

El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 7.8 mL de Sefarosa butilada. a corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular ( Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución).



**Figura 18.** Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa hexilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Triptosa al 2%.

El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 3.6 mL de Sefarosa acetilada. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular (Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución).

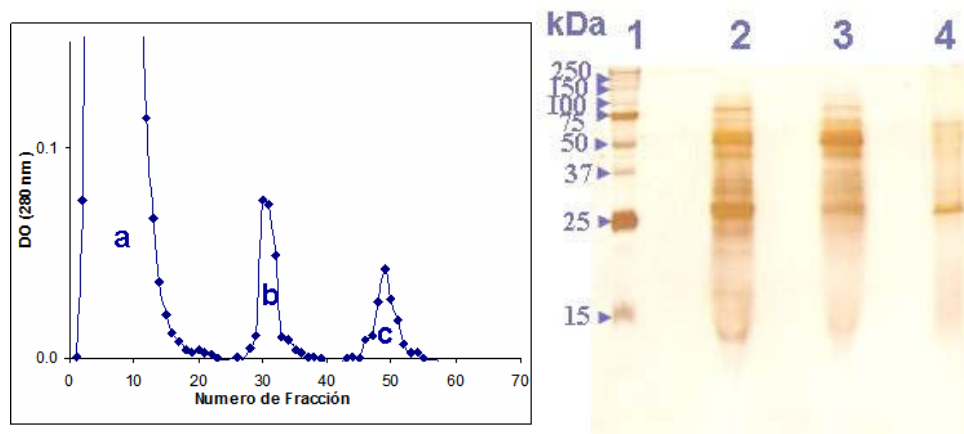


Es importante destacar que, en contra de lo esperado por ser la Sefarosa hexilada de aparente mayor hidrofobicidad que la Sefarosa butilada, se adsorbieron menos proteínas al gel hexilado que al butilado. La diferencia, que no fue sólo cuantitativa sino también cualitativa, es una demostración de la alta especificidad que podrían alcanzar los geles HIC. En el caso de la interacción entre la Sefarosa hexilada y el FB, se presentaron 10 bandas en la fracción de elución (en el rango de 19 a 82 kDa; Figura 19), aunque la mayoría fueron de baja intensidad, con excepción de una banda de 23 kDa muy intensa que podría corresponder a la SOD y de la que dependería la relevancia de esta fracción en posteriores estudios.

Para estimar la interacción termodinámica entre los adsorbentes hidrofóbicos y el filtrado proteico de *M. tuberculosis* H37Rv, por calorimetría isotérmica, se eligió el filtrado del cultivo de 4 semanas, en medio líquido M7H9 enriquecido con 2% de Triptosa. Además, considerando las diferencias entre los ligandos y partiendo de la hipótesis de que la Sefarosa hexilada es el gel más hidrofóbico y la Sefarosa acetilada el menos hidrofóbico, se eligieron estos dos adsorbentes para los ensayos microcalorimétricos.

Son muchos los factores que afectan las interacciones hidrofóbicas entre proteínas y ligandos no polares inmovilizados en geles inertes, por ejemplo el tipo de sal y su concentración en la fase móvil y el tipo de ligando del adsorbente, el tipo de proteínas y su concentración en la fase móvil, etc. En estudios previos, se ha demostrado que el efecto de la sal sobre el proceso de adsorción proteica se basa en su capacidad para aumentar la tensión superficial molal; esta propiedad está relacionada con la capacidad de la sal para estructurar el agua, de manera que la tensión de superficie molal depende entonces del tipo de sal; la sal facilita la expulsión de las proteínas del solvente, trayendo como consecuencia la adsorción proteica.

Otras investigaciones han demostrado que las interacciones hidrofóbicas dependen de la hidrofobicidad de los adsorbentes y de las proteínas, y que la predicción de las interacciones entre las proteínas y los ligandos, no es una labor sencilla,



**Figura19.** Cromatograma y electroforetograma característicos del aislamiento de proteínas hidrofóbicas en Sefarosa hexilada, a partir del filtrado de cultivo de 4 semanas de *M. tuberculosis* H37Rv en M7H9 enriquecido con Bacto-casitona al 2%.

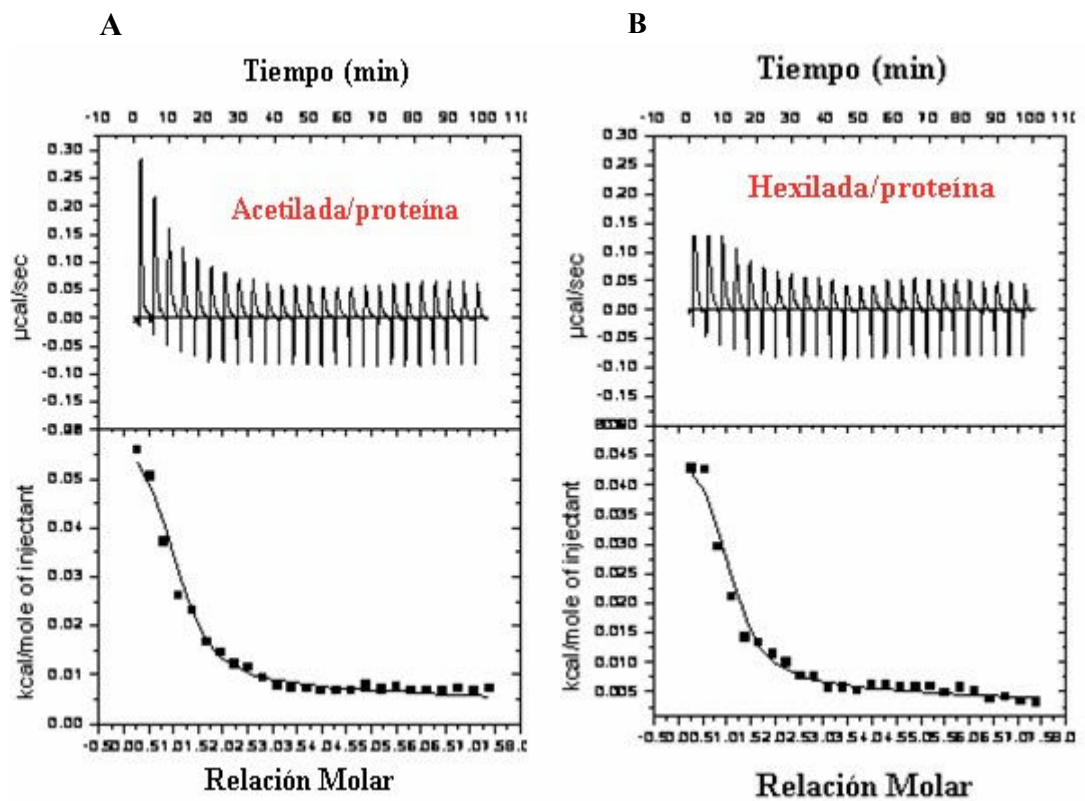
El ensayo cromatográfico fue realizado por triplicado, aplicando 1.8 mg de proteína en  $\text{Na}_2 \text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6, a la cama de 3.6 mL de Sefarosa acetilada. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo con velocidad de flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Las fracciones de lavado (pico a) fueron obtenidas con  $\text{Na}_2 \text{SO}_4$  0.5 M, en MOPS 10 mM, pH 7.6; las fracciones de elución (pico b) fueron obtenidas con MOPS 10 mM, pH 7.6 y la matriz fue regenerada (pico c) con guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras, en gel al 15%, y teñida con plata (carril 1: marcador de masa molecular (Bio-Rad); carril 2: proteína total; 3: fracción de lavado y carril 4: fracción de elución).

especialmente cuando los ligandos son grupos aromáticos (tales como los grupos fenilo y benzilo) por la participación de interacciones  $\pi$ - $\pi$  en estos últimos (Lin y col, 2001).

La interacción HIC, fue concebida originalmente como un proceso de adsorción; sin embargo este aspecto, como muchos otros, aún no se conoce bien. Por ello, se piensa que la determinación de los parámetros termodinámicos puede brindar información que facilite la interpretación de interacciones particulares. De lo que se sabe, puede decirse que los efectos entrópicos que favorecen la adsorción en HIC, aumentan con el incremento de la superficie no polar expuesta de las proteínas. Pero el efecto del cambio en entropía sobre el cambio en energía libre en los adsorbentes de alta densidad, o alternativamente en las proteínas con muchas áreas expuestas, trae como consecuencia un cambio en el proceso de interacción entre las proteínas y el adsorbente, pasando de un evento dominado por la adsorción a un evento dominado por la partición.

La Figura 20 muestra los registros directos de la titulación calorimétrica típica derivada de la interacción entre la Sefarosa acetilada y el filtrado proteico por un lado, y la Sefarosa hexilada y el filtrado proteico, por otro. El área de cada pico en las figuras es igual a la cantidad de calor involucrado en la reacción de complejación entre la Sefarosa acilada y las proteínas micobacterianas. Además, la figura presenta la cantidad de calor involucrado durante la titulación en términos de la relación molar entre las moléculas interactuantes. Lo que se desprende de la interpretación de ambas curvas de titulación, tras corregir la línea base y sustraer los calores no específicos de dilución, es que en ambos casos se trata de interacciones endotérmicas favorecidas por el cambio en entropía positivo. En las gráficas se muestran los valores corregidos (cuadrados) tras la integración de los picos, la substracción de la señal generada por el blanco (que no se muestra) y la normalización para la concentración de ligando muestra el registro directo de una titulación calorimétrica.

Como puede observarse en la tabla V, la  $\Delta H^\circ$  fue positiva en ambos ensayos, lo que significa que la interacción entre los geles HIC utilizados en este trabajo y las proteínas micobacterianas se basa en una interacción endotérmica. Esta información es relevante, debido a que se ha demostrado que el tipo de interacción termodinámica



**Figura 20.** Titulación calorimétrica típica de la interacción entre Sefarosa acilada y proteínas micobacterianas.

A) Interacción entre la Sefarosa acetilada y el filtrado proteico, y B) Interacción entre la Sefarosa hexilada y el filtrado proteico.

**Tabla V.** Parámetros termodinámicos, obtenidos por calorimetría isotérmica, entre los adsorbentes hidrofóbicos y el filtrado proteico de *M. tuberculosis* H37Rv de 4 semanas, en medio líquido M7H9 enriquecido con 2% de triptosa.

<b>Matriz</b>	<b><math>\Delta G</math> Kcal/mol</b>	<b><math>\Delta H_{ads}</math> Kcal/mol</b>	<b><math>\Delta S</math></b>	<b>K</b>
<b>Sefarosa Acetilada</b>	<b>-5481.7</b>	<b>63.93±3.20</b>	<b>18.6</b>	<b>1.07E4±2.9E3</b>
<b>Sefarosa Hexilada</b>	<b>-5675.1</b>	<b>48.40±3.86</b>	<b>19.2</b>	<b>1.43E4±7.0E3</b>

Los valores  $\Delta H$  y K son estimados a partir de 25 inyecciones sucesivas de la solución proteica y la desviación estándar señala la dispersión de los valores individuales alrededor del valor medio de  $\Delta H$  y K. En el caso de la  $\Delta H$ , la desviación estándar es aceptable porque el valor es menor al 10% con relación valor promedio. En el caso de la K, los valores grandes de la desviación estándar son la expresión de las diferencias de afinidad entre las diversas proteínas que componen al filtrado proteico y el adsorbente.

depende del sistema cromatográfico en su conjunto, de tal manera que pueden encontrarse geles HIC, con ligandos n-alquilo y fenilo con interacciones endotérmicas y exotérmicas hacia proteínas puras (Lin y col., 2000; Lin y col., 2001). Por otro lado, el valor de la entalpía de las interacciones ensayadas en nuestro trabajo fue superior a la de las interacciones reportadas por Lin y sus colaboradores, lo que significa que la interacción entre la Sefarosa acilada y las proteínas micobacterianas podría exigir un cambio en entropía mayor para dirigir favorablemente la interacción entre las proteínas y los ligandos. Este fenómeno puede ejemplificarse por el valor del cambio en entalpía, que fue mayor en la calorimetría de la Sefarosa acetilada con relación a la de la Sefarosa hexilada, mientras que el cambio en entropía fue mayor en la calorimetría con la Sefarosa hexilada en comparación con la Sefarosa acetilada.

Finalmente, una semejanza que debe ser destacada entre el proceso de unión de las proteínas micobacterianas con los ligandos acilo, respecto de los modelos usados por Lin y col., (2001), es que ambos procesos fueron dirigidos entrópicamente (el cambio en entropía fue positivo), lo que probablemente se explica por la pérdida de moléculas de agua durante la formación del complejo; este elemento parece ser el común en las interacciones de tipo HIC y de hecho constituyen la base de la interacción hidrofóbica.

## CONCLUSIONES

1. Se establecieron las condiciones de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio líquido M7H9 enriquecido con Triptosa y Bacto-casitona, con un rendimiento proteico en el filtrado de cultivo de 2.3 a 3.5 mg/L.
2. El método más adecuado para estimar la concentración de proteínas en los filtrados de cultivo fue el método de Bradford.
3. No se observaron diferencias generales en los perfiles electroforéticos de los filtrados de cultivo nativos obtenidos con Bacto-casitona y Triptosa.
4. Con excepción de la banda de 88 kDa, los cultivos de 4 semanas enriquecidos con Triptosa mostraron el mismo patrón electroforético que los cultivos con Bacto-casitona, que mostraron bandas en el rango de 10 a 200 kDa con abundancia en las bandas de 23, 30/32, 38, 45/47, 70 y 88 kDa.
5. En los cultivos de 6 semanas con Bacto-casitona y Triptosa, se intensificaron las bandas de 10, 23, 65 y 70 kDa, probablemente por el agotamiento del oxígeno y los nutrimentos.
6. Con el enriquecimiento con Triptosa, los cultivos de 6 semanas mostraron una banda 38 kDa muy intensa por lo que podrían ser una fuente adecuada para el aislamiento de esta proteína.
7. En los cultivos de 8 semanas con Bacto-casitona, aumentó la intensidad de las bandas relacionadas con las proteínas de estrés térmico, especialmente la de 10 kDa, además de la banda de 90 kDa que podría corresponder a la proteína de fase aguda de 90 kDa.
8. Los perfiles de elución de la Sefarosa acetilada fueron distintos al cargar el filtrado proteico del cultivo de 4 semanas enriquecido con Triptosa y Bacto-casitona al 2%, porque mientras que en el primer caso se obtuvieron sólo 4 bandas en el rango de 30 a 36 kDa (entre las que se detectó la presencia de las proteínas del complejo 85) en el segundo se presentaron 7 bandas bien definidas

- y varias minoritarias; además, en este caso la banda de 40 kDa (que podría corresponder a la L-alanina deshidrogenasa) fue comparativamente muy intensa.
9. La fracción de elución de los ensayos realizados con la Sefarosa butilada mostró 13 bandas, entre ellas las de 16 y 70 kDa que podrían corresponder a las proteínas Hsp de 16 y 70 kDa, cuando se cargó al gel el filtrado de Triptosa.
  10. La fracción de elución obtenida en Sefarosa butilada a partir del filtrado proteico enriquecido con Bacto-casitona mostró 10 bandas con un importante enriquecimiento de la banda de 23 kDa (probablemente la superóxido dismutasa), además de otras tres bandas intensas están en el rango de 44 a 70 kDa y pueden constituir una fuente importante para la purificación subsecuente de las proteínas de 45/47, 65 y 70 kDa.
  11. En la fracción de elución de la Sefarosa hexilada y el filtrado de cultivo de Triptosa, sólo se observaron 7 bandas en el rango de 30 a 90 kDa; entre las bandas que podrían ser recuperadas de esta fracción están las del complejo 85, la L-alanina deshidrogenasa (40 kDa) y las bandas asociadas con las proteínas de 38, 65, 70 y 90 kDa.
  12. En contra de lo esperado, por ser la Sefarosa hexilada de aparente mayor hidrofobicidad que la Sefarosa butilada, se adsorbieron menos proteínas al gel hexilado que al butilado. La diferencia, que no fue sólo cuantitativa sino también cualitativa, es una demostración de la alta especificidad que podrían alcanzar los geles HIC.
  13. Las diferencias en la expresión de proteínas hidrofóbicas, relacionadas con el tipo de enriquecimiento, fueron demostradas mediante los ensayos cromatográficos.
  14. Una proporción inesperadamente alta de proteínas del filtrado proteico micobacteriano (aproximadamente 50%) asume un comportamiento hidrofóbico bajo las condiciones cromatográficas ensayadas en este trabajo.
  15. La adsorción de las proteínas del filtrado de cultivo a la Sefarosa acetilada y hexilada, se basa en una interacción endotérmica dirigida entrópicamente.



16. Finalmente, con la estandarización del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la demostración de la presencia de proteínas hidrofóbicas en el filtrado de cultivo y su aislamiento con las matrices hidrofóbicas, se sientan las bases para la purificación y caracterización bioquímica e inmunoquímica de estas proteínas micobacterianas.

## BIBLIOGRAFÍA

Abou-Zeid C., Timothy L., Ratliff L., Wiker H., Harboe M., Bennedsen J., Rook' G. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 56(12):3046-3051.

Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J., Heron N. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun.* 59(6):1905-1910.

Barrera L. 2007. The basics of clinical bacteriology. Ch3: In Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. p93-112. Brazil. [www.TuberculosisTextbook.com](http://www.TuberculosisTextbook.com)

Beatty W., Russell D. 2000. Identification of mycobacterial surface proteins released into subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun.* 68(12):6997–7002.

Belloni, L. 1998. Ionic condensation and charge renormalization in colloidal suspensions. *Colloid Surf A: Physicochem Eng Aspects.* 140(1-3):227–243.

Betts J., Dodson P., Quan S., Lewis A., Thomas P., Duncan K., McAdam R. 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology.* 146(Pt 12):3205–3216.

Berthet F., Rauzier J., Lim E., Philipp B., Gicquel B., Portnoï D. 1995. Characterisation of the *Mycobacterium tuberculosis erp* gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures. *Microbiology.* 141(Pt 9):2123–2130.

Bermejo M., Clavera, Michel de la Rosa F., B. Marín B. 2007. Epidemiología de la tuberculosis. *Anales Sis San Navarra V.* 30(2):7-19.

Berthet F., Lagranderie M., Gounon P., Laurent-Winter C., Ensergueix D., Chavarot P., Touron F., Maranghi E., Pelicic V., Portnoi D., Marchal G., and Gicquel B. 1998. Attenuation of virulence by disruption of *Mycobacterium tuberculosis erp* gene. *Science*. 282(5389):759–762.

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.

Bolado ME. 2003. Caracterización parcial de las proteínas del filtrado de cultivos subóptimos de *Mycobacterium tuberculosis* mediante ensayos de afinidad hacia nueve lectinas de origen vegetal y marino. Tesis de Especialidad. p 92-93. Depto. de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora.

Boström M., Williams D., Ninham B. 2003. Specific ion effects: why the properties of lysozyme in salt solutions follow a Hofmeister series. *Biophys J*. 85(2):686–694.

Blum H., Beier H., Gross H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8(2):93-99.

Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.

Brennan P., Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 64:29-63.

Brennan M., Gey Van N., Espitia C. 2005 The PE and PPE multigene families of mycobacteria Ch33, in *Tuberculosis and the tubercle bacillus*, Ed by Stewart T. Cole et al. Washington D.C. 513-525.

Candia-Plata MC. 2000. Caracterización de los oligosacáridos del Fc de la IgA1 sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Candia-Plata MC., García J., Guzmán R., Porath J., Vázquez-Moreno L. 2006. Isolation of human serum immunoglobulins with a new salt-promoted adsorbent. *J Chromatogr A*. 1118(2):211-217.

Camus J., Pryor M., Medigue C., Cole S. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 148:2967–2973.

Cole S. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*. 148:2919–2928.

Cole S., Brosch R., Parkhil J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S., Eiglmeier K., Gas S., Barry III E., 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., Barrell B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393(6685):537–544.

Curtis R., Ulrich J., Montaser A., Prusnitz J., Blanch H. 2002. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. *Biotechnol Bioeng*. 79(4):367–380.

Daffé M., Etinng G. 1999. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis*. 79(3):153-69.

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](http://www.TuberculosisTextbook.com)

Dobos K., Khoo K., Swiderek K., Brennan P., Belisle J. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 178(9):2498–2506.

Espitia C., Elinos M., Hernández-Pando R., Mancilla R. 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-Kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. Infect Immun. 60(7):2998-3001.

Fausnaugh JL., Regnier FE. 1986. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. J Chromatogr. 359:131-46.

Flournoy D., Twilley J. 2001. Modified Middlebrook 7H9 broth for the rapid detection of mycobacteria. Clin Lab Sci. 14(2):85-8.

Ge Y., El-Naggar M., Sze SK., Oh HB., Begley TP., McLafferty FW., Boshoff H., Barry CE 3rd. 2003. Top down characterization of secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* by electron capture dissociation mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 14(3):253-261.

Gupta P., Guglani L. 2001. Proteomics: Challenge for the new millennium. Indian. Pediatr. 38(8):875-883.

Ghosh R. 2001. Separation of proteins using hydrophobic interaction membrane chromatography. J Chromatogr A. 923(1-2):59-64.

Grant M. 2001. Nonuniform charge effects in protein-protein interactions. J Phys Chem B. 105(14):2858–2863.

Grigsby J., Blanch W., Prausnitz J. 2001. Cloud-point temperatures for lysozyme in electrolyte solutions: effect of salt type, salt concentration and pH. Biophys Chem. 91(3):231–243.

Haidacher D., Vailaya A., Horvath C. 1996. Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. *Proc Natl Acad Sci.* 93(6):2290–2295.

Harth G., Lee B., Wang J., Clemens D., Horwitz M. 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-Kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 64(8):3038–3047.

Horwitz M., Esther B., Jane B., Harth G. 1995. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci. Microbiology.* 92(5):1530-1534.

Hutter B., Singh M. 1999. Properties of the 40 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, a functional L-alanine dehydrogenase. *Biochem J.* 343(Pt3):669-672.

<http://www.condalab.com>

<http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia>

<http://www.atcc.org/common/catalog/wordSearch/results.cfm>

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem14>

Jae-Hyun L., Jeong-Kyu P., Eun-Kyeong J., Chang-Hwa S., Dullei M., Young-Ja S., Hwa-Jung K. 1999. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32 Kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 67(11):6187-6190.

James B., Williams A., Marsh P. 2000. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *J Appl Microbiol.* 88(4):669-677.

Jennissen HP. 2002. Hydrophobic interaction chromatography. in: *Nature encyclopedia of life sciences*, ed. Nature Publishing Group, London. 9:353-361.

Jungblut PR, Schaible UE., Mollenkopf HJ., Zimny-Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann SH. 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol.* 33(6):1103-17.

Jungblut P., Muller E., Mattow J., Kaufmann S. 2001. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun.* 69(9):5905–5907.

Kosíncová D., Sonde B., Bordat Y., Pivert E., Mendonc-LimaL., Gicquel B., Reyrat J. 2004. The hydrophobic domain of the mycobacterial Erp protein is not essential for the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 72(4):2379-2382.

Kong T., Coates R., Butcher P., Hickmant J., Shinnickt T. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs. *Proc Natl Acad Sci.* 90(7):2608-2612.

Kyte J., Doolittle R. 1982. Simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157(1):105-32.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nat.* 1(227):680-685.

Laurens A. Pinxteren V., Ravn P., Agger E., Pollock J., Andersen P. 2000. Diagnosis tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(2):155–160.

Lee K., Fitch C., Lecomte J., Garcia-Moreno E. 2002. Electrostatic effects in highly charged proteins: salt sensitivity of pKa values of histidines in staphylococcal nuclease. *Biochemistry.* 41(17):5656–5667.

Lewin U., Sharbati-Tehrani S. 2005. Slow growth rate of mycobacteria. Possible reasons and significance for their pathogenicity. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 48(12):1390-1399.

Lin FY., Chen WY., Ruaan RC., Huang HM. 2000. Microcalorimetric studies of interactions between proteins and hydrophobic ligands in hydrophobic interaction chromatography: effects of ligand chain length, density and the amount of bound protein. *J Chromatogr A*. 872(1-2):37-47.

Lin FY., Chen WY., Heam M. 2001. Microcalorimetric studies on the interaction mechanism between proteins and hydrophobic solid surfaces in hydrophobic interaction chromatography: Effects of salts, hydrophobicity of the sorbent, and structure of the protein. *Anal Chem*. 73(16):3875-3883.

Lowry O., Rosebrough N., Lewis A., Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1):265-75.

Málen H., Berven F., Fladmark K., Wiker H. 2007. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*. 7(10):1702-1718.

Mattow J., Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C, Treumann A., Schaible U., Kaufmann S. 2007. An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of mycobacteria. *Proteomics*. 7(10):1687-701.

Melander W., Horváth C. 1977. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography: an interpretation of the lyotropic series. *Arch Biochem Biophys*. 183(1):200-215.

Michon T., Sari J., Granosn S., Kerfelec B., Chapus C. 1991. Microcalorimetric investigation of the interactions between the subunits of the bovine pancreatic procarboxypeptidase A-S6 complex. *Eur J Biochem*. 201(1):217-222.



- Mikulíková K., Miksík I., Deyl Z. 2005. Non-enzymatic posttranslational modifications of bovine serum albumin by oxo-compounds investigated by chromatographic and electrophoretic methods. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 815(1-2):315-31.
- Monahan IM., Betts J, Banerjee DK., Butcher PD. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology.* 147(Pt 2):459-71.
- Monroy V., Amador A., Ruiz B., Espinoza-Cueto P., Xolalpa W., Mancilla R., Espitia C. 2000. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 68(7):4327-30.
- Mundaliar A., Kashyap R., Purohit H., Taori G., Dagainawala. 2006. Detection of 65 kD heat shock protein in cerebrospinal of tuberculous meningitis patients. *BMC Neurol.* 6:34.
- McGregor E., Dunn M. 2003. Proteomics of heart disease. *Hum Mol Genet.* 12(2):135–144.
- Nagai S., Wiker H., Harboe M., and Kinomoto M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 59(1):372-382.
- Palma-Nicolás J., Bocanegra-García V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol.* 43(4):225-32.
- Pandit A., Berkowitz M. 2002. Molecular dynamics simulation of dipalmitoylphosphatidylserine bilayer with Na<sup>+</sup> counterions. *Biophys J.* 82(4):1818–1827.

Pierce J., Suelter CH. 1977. An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal Biochem.* 81(2):478-80.

Qamra R., Mande S. 2004. Crystal structure of the 65-kilodalton heat shock protein, chaperonin 60.2, of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 86(23):8105–8113.

Queiroz J., Tomaza C., Carbal J. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol.* 87(2):143-59.

Ramírez A., Cocotle B., Méndez A., Arenas J. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: Su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Rev Med Facul de Med.Xalapa*.[http://www.uv.mx/m/num\\_anteriores/revmedica%20vol2\\_num2/vol2\\_num2/articulos/Mycobacterium.html](http://www.uv.mx/m/num_anteriores/revmedica%20vol2_num2/vol2_num2/articulos/Mycobacterium.html)

Ramos-Clamont G., Candia-Plata C., Zamudio R., Vázquez-Moreno L. 2006. Novel hydrophobic interaction chromatography matrix for specific isolation and simple elution of immunoglobulins (A, G, and M) from porcine serum. *J Chromatogr A.* 1122(1-2):28-34.

Roe S. 1989. Purification based on hydrophobicity. In: Harris,E.L.V., Angal, S. (Eds.), *Protein purification methods: A practical approach*. IRL Press, Oxford. 221–232.

Rosenkrands I., Rasmussen P., Carnio M., Jacobsen S., Theisen M., 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(6):2728-2735.

Rosseels V., Marche´S., Roupie,V., Govaerts M., Godfroid J., Walravens K., Huygen K. 2006. Members of the 30- to 32-kilodalton mycolyl transferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are immunodominant Th1-Type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Infect Immun.* 74(1):202–212.

Saitoh H., Yamane N., Miyagi C., Nakasone I. 2000. Comparative evaluation of two different formulae of Middlebrook 7H9 broth in a fully automated mycobacteria culture system, MB/BacT; the effect of Tween 80. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi.* 11(2):79-85.

Sigurskjold B. 2000. Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem.* 277(2):260-266.

Simonian MH, Smith JA. 2006. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 10:Unit 10.1A.

Sonnenberg M., Belisle J. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 65(11):4515-4524.

Sørensen A., Nagai S., Houen G., Andersen P., Andersen A. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 63(5):1710–1717.

Sugden E., Stilwell K., Watson D., Rohonczy E., Martineau P. 1996. Purification of *Mycobacterium bovis* BCG Tokio antigens by chromatofocusing, lectin-affinity chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3(5):541-546.

Skjøt R., Oettinger T., Rosenkrands I., Ravn P., Brock I., Jacobsen S., Andersen P. 2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-Cell antigens. *Infect Immun.* 68(1)214–220.

Stewart G., Snewin V., Walzl G., Hussell T., Tormay P., O'Gaora P., Goyal M., Betts J., Brown IN., Young DB. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med.* 7(6):732-7.

Tanford C. 1972. Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphiles. *J Mol Biol.* 67(1):59-74.

Tekaia F., Gordon S., Garnier T., Brosch R., Barrell B., Cole S. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber Lung Dis.* 79(6):329–342.

Vázquez-Moreno L., Candia-Plata MC., Robles-Burgueño MR. 2001 Hypersialylated macromolecular serum immunoglobulin A1 in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 34(1):35-41.

Vázquez-Moreno L., Candia-Plata MC. 1996. Scale up isolation of immunoglobulins from pig serum by immobilized metal affinity chromatography. *J Food Biochem.* 19:367-380.

Vázquez-Moreno L., Poráth J., Schluter S., Marchalonis J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum by gel-immobilized metal chromatography. *Comp Biochem Physiol B.* 103(3):563-8.

Velásquez-Campoy A., Kiso Y., Freire E. 2001. The binding energetics of first-and second-generation HIV-1 protease inhibitors: Implications for drug design *Arch Biochem Biophys.* 390(2):169-175.

Wayne L., Hayes L.1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun.* 64(6): 2062–2069.

Weldringh K., Rosenkrands I., Jacobsen S., Rasmussen P., Elhay M., Andersen P. 1998. Two dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture

filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 66(8):3492-3500.

Wiker H. 2001. Liberation of soluble proteins from live and dead mycobacterial cells and the implications for pathogenicity of tubercle bacilli. *Scand J Immunol.* 54(1-2):82-86.

Wilkinson R., Hasløv K., Rappuoli R., Giovannoni F., Narayanan R., Desai C., Vordermeier H., Paulsen J., Pasvo G., Ivanyi J., Singh M. 1997. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J Clin Microbiol.* 35(3):553–557.

Wiseman T., Williston S., Brands J., Lin L. 1989. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem.* 179(1):131-137

WHO | Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. 2008

Yang H., Huang S., Dai H., Gong Y, Zheng C., 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(1):174-179.

Young D., Garbe T. 1991. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 59(9):3086-3093.

Yuan Y., Crane D., Simpson R., Zhu Y., Hickey M., Sherman D., Barry C. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Nat Microbiol.* 95:9578–9583.

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.

Xiong Y., Chalmers M., Philip Gao F., Cross T., Marshall A. 2005. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* 4(3):855-861.