

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
NUEVA GLUCOPROTEÍNA DE *M. bovis*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
BIOLOGÍA CELULAR
P R E S E N T A :
ELVIRA VARELA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FELIPE ALONSO MASSÓ ROJAS

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fué realizado en el Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo la dirección del Dr. Felipe Massó Rojas y del Dr. Luis Felipe Montaña Estrada.

Agradezco a los miembros del jurado, al Dr. Felipe Massó Rojas, al Dr. Edgar Zenteno Galindo, al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada y al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma, por sus críticas y sugerencias para mejorar este trabajo.

A mi mamá María Elena con todo mi cariño.

A mis hermanos Gerardo, Raymundo, Cristina, Eva y Citlali, por estar
siempre presentes

A la memoria de mi papá.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	3
II. INTRODUCCION.....	6
2.1 Epidemiología.....	6
2.2 Inmunoprofilaxis.....	7
2.3 Diagnóstico.....	8
2.4 Estructura y fisiología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.5 Glucoproteínas.....	17
2.6 Respuesta inmune en la tuberculosis.....	22
III. ANTECEDENTES.....	32
IV. HIPOTESIS.....	34
V. OBJETIVOS.....	35
5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos particulares.....	35
VI. MATERIALES Y METODOS.....	36
6.1 Cultivo Micobacteriano.....	36
6.2 Extracto Proteico.....	36
6.3 Separación de Proteínas por Isoelectroenfoque.....	37

6.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.....	38
6.5 Purificación de Proteínas por Cromatografía.....	39
6.7 Secuenciación de la región Amino Terminal.....	39
6.8 Análisis de la Secuencia Amino Terminal.....	39
6.9 Tratamiento con Endoglucosidasa.....	40
VII. RESULTADOS.....	41
VIII. DISCUSION.....	50
IX. CONCLUSIONES.....	62
X. BIBLIOGRAFIA.....	63

I. RESUMEN

La identificación y caracterización de antígenos micobacterianos son factores críticos para poder evaluar su papel en el diagnóstico, vacunación y patogénesis de la tuberculosis. Anteriormente se había asumido que el extracto protéico del cultivo filtrado (EPCF), posee un número reducido de proteínas cuando es analizado por electroforesis de una dimensión; ahora es claro que la mezcla de proteínas presentes en el extracto protéico es muy compleja, las bandas protéicas observadas en geles de poliacrilamida de una dimensión pueden contener varias proteínas de peso molecular idéntico, pero con diferentes propiedades fisicoquímicas. Sutiles métodos de identificación han mostrado homología en la secuencia de proteínas, por ejemplo MPB70/80 de *Mycobacterium bovis* con MPB83 de *M. bovis* y la proteína del gen Rv-2870c de *M. tuberculosis* (1), o diferente forma y masa molecular de una proteína como MPB70/80 de *M. bovis* (2,3), o gran heterogeneidad de antígenos micobacterianos con peso molecular idéntico. Dado que hay diferencias en la respuesta de células mononucleares de sangre periférica a proteínas de *M. bovis* obtenidas por isoelectroenfoque (4), dos de estas proteínas con un peso molecular de 19 kDa, con diferente punto isoeléctrico, en ensayos para INF- γ , la respuesta fue diferente. Por otro lado estas dos proteínas se encontraban en una forma enriquecida con diferencias entre sus puntos isoeléctricos. Nosotros pensamos que la caracterización de estas proteínas es relevante.

A partir del extracto protéico del medio de cultivo filtrado de *M. bovis*, en un cultivo de diez semanas, precipitado con sulfato de amonio

sólido a una saturación final de 80%, se obtuvo el EPCF, las proteínas resultantes fueron sometidas a un isoelectroenfoque en fase líquida con un rango de pH de 3-10, las fracciones obtenidas fueron analizadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, el patrón electroforético mostró una separación de proteínas de manera heterogénea, sin embargo se observó la presencia de una banda de 19 kDa de peso molecular distribuida prácticamente en la mitad de las fracciones, en la región ácida de la separación, y por ende con diferentes puntos isoelectrónicos, tomamos dos fracciones donde dicha proteína se observaba con mas concentración con suficiente diferencia de pH entre ambas; posteriormente purificamos estas dos proteínas con puntos isoelectrónicos de 4.5 y 6.0, por cromatografía de exclusión molecular. La secuencia de la región amino terminal de ambas proteínas fue hecha por degradación automática de Edman; las secuencias resultantes fueron comparadas con el banco de datos de proteínas micobacterianas del Instituto Sanger, se observó que la secuencia de la proteína con punto isoelectrónico de 4.5 correspondía a la de una proteína hipotética madura del gen Rv1174c de *M. tuberculosis*, se analizaron otros bancos de datos como swissprot, no encontrando homología con ninguna otra proteína reportada; la otra proteína con punto isoelectrónico de 6.0 presentó un 100% de homología con la glicoproteína MPB70/80. Posteriormente esta nueva proteína fue sometida a tratamiento enzimático con endoglucosidasa F, una enzima específica para carbohidratos que hidroliza la unión N-acetilglucosamina -asparagina, con lo cual se produjo una reducción en el peso molecular de la proteína y la generación de otra banda protéica.

Nuestros resultados muestran que esta nueva proteína no había sido reportada para *M. bovis*, y está constituida por dos monómeros, uno de los cuales se encuentra modificado por carbohidratos. Proteína homologa al producto del gen Rv-1174c de *Mycobacterium tuberculosis* la cual puede resultar útil para pruebas diagnósticas para tuberculosis bovina.

II. INTRODUCCION

2.1 Epidemiología

Aún cuando la tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas que conoce la humanidad, continúa siendo un problema de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Cada año, 54 millones de personas son infectadas por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*; 6.8 millones desarrollan la enfermedad clínica, y 2.4 millones mueren de tuberculosis (5). La tuberculosis es responsable del 5% del total de muertes reportadas mundialmente y 9.6% de muertes en adultos de entre 15 y 59 años de edad (5). Hasta hoy la mayoría de personas infectadas, vive en países en desarrollo, sin embargo, en los países industrializados la incidencia de tuberculosis ha presentado un marcado incremento a causa de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), debido a la asociación que existe entre la inmunosupresión ocasionada por el VIH con el incremento de la susceptibilidad para desarrollar tuberculosis y con la acelerada progresión de la tuberculosis pulmonar en estos pacientes, lo que ha generado una mayor tasa de mortalidad (6). La mayoría de personas infectadas con tuberculosis no presentan manifestaciones clínicas por lo que se puede considerar que son tuberculosis asintomáticas, subclínicas, o latentes; solo entre el 5 y el 10 % de los individuos infectados desarrollan la enfermedad activa en algún momento de su vida, y en algunos de ellos la enfermedad se desarrolla hasta después de 4 o 5 décadas de la infección inicial (7).

2.2 Inmunoprofilaxis

La vacuna que existe actualmente contra la tuberculosis, la llamada BCG, deriva de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, cuyo origen se remonta a principios del siglo pasado. Entre 1906 y 1919 Calmette y Guerin lograron atenuar una cepa de *M. bovis* mediante 253 pases *in vitro*; esta vacuna es hasta la fecha administrada como parte del Programa Extendido de Inmunización de la Organización Mundial de la Salud. Sin embargo, a pesar de su amplio uso y sus ventajas, la vacuna BCG permanece como la mas controversial de todas las vacunas empleadas actualmente, ya que su eficacia protectora ha mostrado amplias variaciones en diferentes partes del mundo y su impacto en cuanto a la prevención de la tuberculosis pulmonar es poco claro. En el momento actual, cuando la incidencia de la tuberculosis esta incrementándose tanto en países en desarrollo como en países industrializados, cuando el riesgo de la tuberculosis se ha incrementado en muchas poblaciones, particularmente en individuos infectados con VIH o con algún otro tipo de inmunosupresión, y con el surgimiento de cepas multiresistentes a drogas, se ha renovado el interés y la urgencia de comprender el porqué de la variabilidad en la eficacia de la vacuna BCG (8).

Una serie de pruebas clínicas han demostrado que la vacuna BCG protege desde la niñez contra la infección primaria por *M. tuberculosis*, pero el tipo de protección que se genera es muy variable, especialmente en la forma pulmonar de la enfermedad que es la que predomina en la vida adulta (9,10).

2.3 Diagnóstico

La identificación oportuna de personas infectadas por *M. tuberculosis* y la rápida confirmación de la presencia de la micobacteria por parte del laboratorio son piezas claves para generar e instaurar medidas efectivas de salud pública para combatir el resurgimiento y la diseminación de la tuberculosis (11). Las técnicas de laboratorio utilizadas para identificar personas infectadas por *M. tuberculosis* son de limitada eficacia por la pobre sensibilidad o especificidad, y aunque está bien establecido que la prueba más segura para diagnosticar tuberculosis, es el aislamiento y caracterización de la micobacteria a partir de muestras del paciente en donde los especímenes bacterianos son crecidos en medios sintéticos y posteriormente son identificados; la confirmación por cultivo primario en el laboratorio suele requerir de cuando menos 7 semanas. Por lo que debido al largo y tardado proceso para llegar a un diagnóstico seguro y confiable, son necesarias técnicas de diagnóstico rápidas y específicas para lograr una mayor eficiencia en el control de la enfermedad (12).

Históricamente, la detección de personas infectadas se basó inicialmente en la prueba de la tuberculina, la cual consistía de preparaciones crudas de antígenos de micobacterias infectivas inoculadas intradérmicamente para detectar la respuesta inmune mediada por células; esta prueba ha sido modificada y actualmente se emplean antígenos protéicos purificados de medios de cultivo de la bacteria, eliminando sobre todo las porciones lipídicas esto es lo que se conoce como derivado protéico purificado (PPD) de *M. tuberculosis* y se obtiene a partir del crecimiento in vitro de la micobacteria (13). Sin

embargo la utilización de dicha prueba es limitada debido a su falta de especificidad para *M. tuberculosis* y por su incapacidad para distinguir entre la enfermedad activa, una sensibilización previa por contacto con *M. tuberculosis*, o por vacunación con BCG o por sensibilización cruzada por otras especies de micobacteria (14). Dicho derivado protéico esta constituido por una compleja mezcla de proteínas presentes en el material filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, o *M. bovis* para diagnóstico de tuberculosis en ganado. La mayoría de las proteínas comparten una variedad de determinantes antigénicos comunes para muchas especies de micobacterias. Estos antígenos de reactividad cruzada conducen a resultados falsos positivos en pruebas intradérmicas y ensayos serológicos y estos son principales problemas para la diagnosis de la enfermedad (2).

La sospecha de tuberculosis activa deriva de las manifestaciones clínicas y alteraciones en las radiografías de tórax, los cuales tienen baja especificidad diagnóstica. Como ya he mencionado, la confirmación del diagnóstico se basa en el aislamiento y caracterización de la micobacteria. Los procedimientos para caracterizar a este patógeno consisten en el reconocimiento y detección microscópica por la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen, a partir de un frotis del esputo del bacilo, cuya sensibilidad diagnóstica es baja, particularmente cuando el número de muestras excede la capacidad del laboratorio (15). Los métodos de cultivo para identificar la especie de micobacteria presente en la muestra suelen tomar varias semanas desde el tiempo de colección de espécimen hasta la identificación de la especie, debido principalmente por el lento

crecimiento de la micobacteria (16). Por otra parte, la determinación de la susceptibilidad a drogas de un aislado por cultivo puede tomar de 3 a 6 semanas más (11).

Los ensayos basados en la detección de la respuesta inmunológica contra antígenos específicos de la micobacteria son una alternativa atractiva a los métodos actuales que se utilizan para el diagnóstico de la tuberculosis activa porque no dependen de la detección de la micobacteria (15). Los avances tecnológicos en amplificación y detección de regiones específicas de ADN o ARN bacteriano han provisto los métodos necesarios para hacer mejores y mas eficientes pruebas en los laboratorios de diagnóstico para la tuberculosis. En años recientes, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue reportada como útil para el diagnóstico directo de infecciones de tuberculosis (17). Sin embargo, diversos reportes publicados muestran grandes variaciones con respecto a la capacidad de la PCR para detectar *M. tuberculosis* a partir de material clínico (18); además la técnica de PCR no es fácilmente establecida en laboratorios clínicos de rutina porque usualmente se carece del equipo necesario, de gente capacitada, y debido que el costo de este tipo de ensayos es muy elevado (19).

2.4 Estructura y fisiología de *Mycobacterium tuberculosis*

El agente etiológico de la tuberculosis más frecuente en el humano es *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria ocupa un nicho taxonómico entre eubacteria y actinomicetos (20). El bacilo de la tuberculosis es

recto o curvado, mide de 0.2 a 0.5 por 2 a 5 μ m, y es ácido-alcohol resistente en tinción de Ziehl-Neelsen. En el laboratorio la bacteria puede ser cultivada en medios simples, básicamente constituidos con sales de fosfato, sulfato de magnesio, citrato, glicerol y asparagina o sales de amonio como fuente de carbono; su crecimiento es lento, debido a que el tiempo de división en cultivo es de 16 a 18 h (21).

La micobacteria es un aerobio estricto, sin embargo, se ha demostrado que *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG tienen la capacidad de adaptarse y sobrevivir en condiciones de anaerobiosis (22,23). El bacilo logra adaptarse a través de un cambio de crecimiento a un estado no replicativo o de letargo. Se especula que en *M. tuberculosis* la respuesta al letargo pudiera jugar un papel en la tolerancia a drogas y la latencia de la tuberculosis (22). Una de las características particulares de *M. tuberculosis* es la de poseer una pared celular muy gruesa con una estructura química muy compleja, en la que se encuentran casi todos los elementos asociados con la patogenicidad, respuesta inmunológica e inmunopatológica de la tuberculosis, como son la necrosis caseosa, la inducción de protección e hipersensibilidad retardada así como la inducción en la producción de anticuerpos y de toxicidad (24).

M. tuberculosis es un patógeno intracelular que reside dentro de los fagolisosomas de los macrófagos alveolares. Quizás como consecuencia de este ambiente intracelular, las características altamente complejas de la pared celular del bacilo han sufrido extensos cambios evolutivos (25). El bacilo generalmente no está en contacto directo con los componentes de las vacuolas sino que está

separado por una zona transparente (26). Se cree que en esta zona está constituida por varias proteínas y carbohidratos los cuales son parte del mecanismo que le permite el crecimiento intracelular. La falta de acidificación de los lisosomas, restringe severamente la actividad de las hidrolasas lisosomales (27). La micobacteria es capaz de prevenir la fusión de la vacuola, donde se halla contenida, por las vesículas protón-ATPasa positivas, las cuales son asociadas con la acidificación de las vacuolas (28).

La complejidad de la pared celular de la micobacteria explica muchas de las propiedades intrínsecas del género (29,30) como la resistencia del bacilo frente al daño químico, a la deshidratación y al tratamiento a ciertos antibióticos está directamente relacionado con la baja permeabilidad de la envoltura constituida de moléculas hidrofóbicas (31,32). Una propiedad inherente de su superficie, cubierta con ácidos micólicos, es de retener colorantes después del tratamiento con ácido, y su capacidad para formar cordones (33-35). El estudio de la organización de los componentes de la pared celular ha sido muy amplio, se sabe que el núcleo básico de la pared celular, los ácidos micólicos asociados covalentemente, forman la principal barrera hidrofóbica por su asociación en una capa lipídica estrechamente empaquetada. Estos lípidos están arreglados para formar un gradiente en la fluidez de la membrana que incrementa el sistema de membranas que dan al citoplasma hasta la región más fluida que es la superficie del bacilo (31,36).

La complejidad química de los tres componentes: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos proporciona una plataforma para

los más sutiles procesos biológicos que dependen del microambiente o local. La alteración de las propiedades del micolil-arabinogalactano afectan la hidrofobicidad inherente de la superficie y tales alteraciones son asociadas directa o indirectamente con diversas consecuencias, como la movilidad, una forma de translocación que permite la colonización bacteriana en superficies es directamente afectada por la ausencia o presencia de glucopeptidolípidos en *M. avium* y *M. smegmatis*. Por supuesto los lípidos, carbohidratos, y proteínas expuestas cerca de la superficie celular dependen íntimamente del esqueleto de la pared celular. La estructura de la pared celular es fundamental que también proporciona una base estable para muchos de los procesos asociados con el paso de macromoléculas a través de ella. En general, tales procesos caen en varias categorías tal como la secreción de proteínas, secreción de lípidos y entrada de pequeñas moléculas (37).

Los antígenos micobacterianos han sido clasificados en antígenos somáticos, los cuales son parte del cuerpo bacteriano, y las proteínas de secreción las cuales son obtenidas de los cultivos filtrados. La observación de que la inmunización de ratones con micobacterias vivas induce protección e hipersensibilidad de tipo retardado, mientras que las micobacterias muertas con calor inducen solo hipersensibilidad de tipo retardado (38), ha surgido el interés en el estudio e identificación de proteínas liberadas al medio de cultivo por las micobacterias vivas.

Las propiedades de las proteínas de *M. tuberculosis*, han sido un tema importante de investigación casi desde los días en que el organismo

fue descubierto por Robert Koch en 1882. El estudio de las proteínas de *M. tuberculosis* se ha enfocado básicamente desde dos ángulos: (i) de la investigación microbiológica que tiene como fin mejorar el conocimiento de la fisiología de la bacteria, identificando vías metabólicas y sistemas enzimáticos, etc., y (ii) de la investigación inmunológica que se dirige a comprender las interacciones de los componentes individuales con el sistema inmune de los seres humanos o modelos animales. La meta de estos últimos esfuerzos es el identificar antígenos que puedan ser importantes en conferir protección contra la tuberculosis.

Generalmente, cada proteína de *M. tuberculosis*, como las proteínas de otros organismos, cumplen diferentes funciones. Prescindiendo si una proteína dada es considerada como un antígeno más o menos potente por los inmunólogos, en todos los casos estas proteínas tienen un propósito distinto y muchas veces una función indispensable para la micobacteria (39). Desde que Koch reportó en sus ensayos que los componentes liberados al medio de cultivo por *M. tuberculosis*, -producto conocido como tuberculina vieja de Koch, podrían servir como tratamiento contra la tuberculosis, (teoría que mas tarde fue abandonada), seguido de los trabajos de F. Seibert y B. Munday quienes demostraron que el principio activo de la tuberculina está presente en la fracción protéica de los cultivos filtrados precipitados con sulfato de amonio (40) (El material fue denominado derivado protéico purificado ó PPD), el estudio de las propiedades de las proteínas de micobacterias, en particular de aquellas que presentan capacidad antigénica ha continuado hasta nuestros días.

La búsqueda por mejorar los reactivos de diagnóstico, como antígenos especie-específicos para la prueba en cutánea y marcadores serológicos se ha llevado a cabo a través del fraccionamiento e identificación de proteínas antigénicas micobacterianas.

El uso de anticuerpos policlonales hechos en conejo o cabra hiperinmunizados con soncados o cultivos filtrados de cultivos no calentados de *M. tuberculosis* para identificar inmunógenos fue implementado en los primeros estudios mediante un sistema de inmunolectroforésis en donde fueron identificadas 11 bandas principales, este sistema fue estandarizado y denominado sistema US-Japan. Sin embargo esta técnica no tuvo suficiente poder de resolución para ilustrar la complejidad de la composición de proteínas de la bacteria. Esto llega a ser evidente cuando aparece la técnica de inmunolectroforésis cruzada o contrainmunolectroforésis (CIE) (41) y en donde se definen hasta 36 bandas principales. Sin embargo, este método no ha sido ampliamente usado a pesar de que ofrece ventajas analíticas que no presentan otros métodos electroforéticos (42). La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnatueralizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS) ha sido usada como la principal técnica para monitorear la separación de proteínas individuales durante procesos de purificación de acuerdo al tamaño molecular; sin embargo la separación de proteínas en una dimensión es generalmente insuficiente para resolver la gran cantidad de constituyentes proteicos presentes en el medio de cultivo de la micobacteria. La electroforésis de doble dimensión (2D-E) es una técnica muy poderosa donde la separación de proteínas es por a

través de dos dimensiones, por tamaño molecular y carga (43). La biotecnología moderna se ha enfocado al estudio de *M. tuberculosis* a nivel de ADN y de proteínas. El desarrollo de anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra *M. tuberculosis* ofrece la posibilidad de identificar proteínas individuales, por lo que han sido ampliamente utilizados, principalmente para la purificación por afinidad y para la detección de proteínas micobacterianas expresadas por otros microorganismos. La construcción de librerías de expresión de ADN de *M. tuberculosis* y *M. leprae* en el vector lambda gt11 (42), y el primer banco de DNA de BCG en el fago lambda EMBL3, han expandido el conocimiento de las proteínas de *M. tuberculosis*. En recientes revisiones alrededor de 50 proteínas antigénicas han sido registradas; las secuencias de nucleótidos de 20 de ellas son conocidas (44). La gran mayoría de estos antígenos sino es que todos han sido caracterizados en cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* (39).

La secuencia completa del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* ofrece una oportunidad para poder elucidar la biología de la micobacteria, con la ayuda de métodos analíticos, para la caracterización de proteínas, como la electroforesis de doble dimensión en fase líquida, así como en geles de poliacrilamida, con lo cual ha surgido el campo de la proteómica. A través de la electroforesis de doble dimensión en fase líquida se han resuelto 355 proteínas de cultivos filtrados de *M. tuberculosis* (45). Entre las proteínas que han sido caracterizadas y probadas inmunológicamente se destacan algunas que funcionan como potentes antígenos, un

ejemplo es la proteína observada, en geles de poliacrilamida, como una doble banda de peso molecular de 30/31 kDa, este complejo consiste de tres proteínas, 31,30, y 31.5 kDa, que son reconocidas por un anticuerpo monoclonal (46) y que antes de ser secretadas permanecen temporalmente unidas a la superficie de celular de la bacteria (47). Esta proteína es de importancia para la adhesión de la bacteria a las células eucariontes y la subsiguiente infección. Uno de los componentes de este complejo, específicamente el de 31 kDa (85A) induce la proliferación de linfocitos T y la liberación de interferón gama en linfocitos humanos y murinos (48).

Otro ejemplo de proteínas antigénicas es el de la proteína de 6 kDa (ESAT-6) y la recientemente reportada proteína 10 del cultivo filtrado (CFP-10), ambas expresadas en cepas patógenas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* pero no en cepas de BCG (49-51). Está demostrado que estas dos proteínas son altamente sensibles y específicas para la discriminación entre pacientes con tuberculosis e individuos no infectados, basados en la respuesta de células T (52).

2.5 Glucoproteínas

Las glucoproteínas son un complejo grupo de macromoléculas que están presentes virtualmente en todas las formas de vida. Su presencia en procariontes ha sido demostrada recientemente; estas macromoléculas han sido identificadas en arqueobacterias y en algunas eubacterias. Ellas comprenden un amplio rango de diferentes componentes de la envoltura celular tales como glucoproteínas

asociadas a la membrana, glucoproteínas asociadas a la superficie y de superficie de la capa cristalina, así como glucoproteínas de secreción y exoenzimas (53).

Las glucoproteínas de secreción y exoenzimas se han reportado principalmente en eubacterias (tabla 1), y han sido identificadas como tales por su aislamiento por cromatografía de afinidad con lectinas inmovilizadas como *Canavalia ensiformis* (54) y *Lens culinaris* (55) y su reacción positiva en pruebas de detección de azúcares.

Tabla 1

GLICOPROTEINAS DE SECRECION, EXOENZIMAS DE EUBACTERIAS

Cellulomonas sp., celulasa

Cellulomonas fimi, celulasa

Streptomyces lividan, celulasa

Thermoanaerobacterium (anteriormente *Clostridium thermosaccharolyticum*), complejo de proteína extracelular

Flavobacterium meningosepticum, endoglicosidasa, proteasa

Corynebacterium sepedonicum, fitotoxina

Mycobacterium tuberculosis, antígeno 55-kDa

Mycobacterium tuberculosis, antígeno 32-kDa

Mycobacterium tuberculosis, antígeno 19-kDa

Mycobacterium bovis, antígeno 55-kDa

La evidencia inicial de la presencia de glucoproteínas en *M. tuberculosis* se basó en la observación de la unión de concanavalina A, a las preparaciones de proteína separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y electrotransferidas en membranas de nitrocelulosa (56,57), entre las glucoproteínas descritas inicialmente se encuentra la proteína de 38 kDa, de *M. tuberculosis*, también conocida como antígeno 5, esta proteína es activamente secretada, pero también esta parcialmente unida a la superficie de la micobacteria; además de que su secuencia genómica presenta homología con la proteína PhoS transportadora de fosfato en *E. coli*. Existe una elevada concentración de anticuerpos contra esta proteína en pacientes con tuberculosis activa y tiene una alta especificidad por *M. tuberculosis* cuando se prueba en el ámbito de epítipo mediante ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales en un sistema de ELISA contra proteína nativa altamente purificada, también induce respuesta en linfocitos T y B. Se han encontrado carbohidratos asociados a esta proteína (58). Otras glucoproteínas micobacterianas aisladas empleando esta misma estrategia de afinidad a concanavalina-A son las glucoproteínas de 45 kilodalton del cultivo filtrado de *Mycobacterium tuberculosis* (59), que corresponde al complejo 50/55 kDa de *M. tuberculosis* que presenta reactividad cruzada con otras

glucoproteínas antigénicas de 45/47 kDa aisladas del medio de cultivo de *M. bovis* (60). Además se ha descrito el aislamiento de un antígeno proteico de 32 kDa asociado con azúcares, del cultivo filtrado de *M. tuberculosis*, a través de cromatografía de afinidad con *Lens culinaris* (55) otra lectina que reconoce manosas pero en estructuras sacarídicas distintas a la de la concanavalina-A. La caracterización inicial los antígenos de 39-, 25-, 22(b), y 19-kDa de *M. bovis* ha demostrado que estos antígenos tienen la capacidad de unirse a concanavalina A y dar un resultado positivo en la prueba de detección de glucanos, y la identificación de monosacáridos; en estudios posteriores de la caracterización del antígeno de 19 kDa de *M. tuberculosis*, en un sistema de expresión micobacterina, se observó una fuerte unión de esta proteína a concanavalina A (57).

Hasta la fecha se han reportado cuatro glucoproteínas, complejo de 50-55,38,32, y 19 kDa, en *M. tuberculosis* (57,59,60); y en *M. bovis* hemos identificado 11 glucoproteínas, en un trabajo previo donde la purificación de dichas glucoproteínas se basó en el marcaje de azúcares a través de biotina hidrazida y los carbohidratos fueron digeridos con endoglucosidasa F lo cual produjo la reducción de la masa molecular de algunas de estas proteínas (61). Entre estas proteínas destaca la proteína MPB70. MPB70, purificada por Nagai (62), por su alta concentración en cultivos líquidos de BCG, en la cual este mismo autor en dicho trabajo no reporta la presencia de azúcares, y que posteriormente Fifiis reporta la asociación de carbohidratos en esta proteína (2); por estudios inmunológicos se ha puesto de manifiesto que es altamente específica para cepas de *M.*

bovis y *M. bovis* BCG. Otra glucoproteína reportada es MPB80, esta es una proteína que da una marca distinta en el patrón de PAGE de doble dimensión de cultivos líquidos de BCG. Cuando los cultivos de diferentes cepas de BCG y especies de micobacterias fueron probados, las dos marcas de estas proteínas aparecieron juntas o bien ambas estuvieron ausentes.

Se sabe que las similitudes entre MPB70 y PMB80 son grandes. Existen diferencias no significativas en el peso molecular o composición de aminoácidos, y la secuencia de aminoácidos del N-terminal es idéntica para los primeros 30 residuos. Estas similitudes en las propiedades fisicoquímicas son paralelas con estudios inmunológicos, ya que en pruebas con anticuerpos monoclonales anti-MPB70 ambas proteínas son reconocidas por estos anticuerpos (63).

En estudios posteriores, mediante cromatoenfoque se demostró que un antígeno de 22 kDa de *M. bovis* y la proteína MPB70 son lo mismo. Una glucoproteína con un peso de 25 kDa es reconocida por varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes epítopes de MPB70 (2). MPB70 es un importante antígeno "blanco" de la respuesta inmune celular y humoral durante la infección con bacilos humanos o bovinos (64). En ganado infectado experimentalmente la respuesta a la prueba de PPD aparece al principio de la infección, y conforme la enfermedad progresa esta disminuye y coincide con la aparición de la respuesta de anticuerpos contra MPB70 (65). La respuesta inmune celular in vitro contra MPB70 pura en un modelo con linfocitos humanos derivados de pacientes con tuberculosis es también prominente y es comparable a la inducida por MPB64 (66). Varios de

los estudios enfocados a la purificación, caracterización, y respuesta inmunológica de MPB70 han sido realizados con la cepa de *M. bovis* BCG Tokyo, por lo que deben de tomarse con cautela los resultados que se realizan con otras cepas porque podrían surgir nuevos antígenos o mutaciones de antígenos conocidos que son importantes para la inmunopatogénesis de la tuberculosis (65).

2.6 Respuesta inmune en la tuberculosis

La infección de humanos con *Mycobacterium tuberculosis* puede resultar en un espectro amplio de manifestaciones clínicas que van desde la infección asintomática hasta su diseminación y una rápida enfermedad fatal. Este espectro de manifestaciones clínicas refleja la compleja interacción entre *M. tuberculosis* y la respuesta inmune del hospedero.

Las defensas del hospedero contra el bacilo dependen de la inmunidad mediada por células más que de la inmunidad humoral. Cuando la respuesta inmune mediada por células es deficiente, como es el caso de personas infectadas con VIH, pacientes recibiendo terapia inmunosupresora o en la vejez, existe un riesgo mayor de desarrollar la tuberculosis clínica. En contraste, personas con inmunidad humoral deficiente, como aquellas con enfermedad de células en hoz y mieloma múltiple no muestran incremento en la predisposición a contraer tuberculosis (67).

Existe evidencia experimental que indica que la inmunidad contra la tuberculosis consiste de una compleja serie de interacciones entre

varias poblaciones celulares que pueden controlar y contener la infección así como prevenir una futura reactivación (68). Entre estas poblaciones celulares los linfocitos T en sus diferentes variantes funcionales son muy relevantes.

En general, se acepta que la inmunidad mediada por células puede inducir dos tipos de respuesta: protección e hipersensibilidad de tipo retardado (DTH); al parecer estos dos mecanismos son fenómenos separados el primero confiere, inmunidad protectora mientras que el segundo genera lesiones tisulares.

La eliminación de la infección por *M. tuberculosis* depende principalmente del éxito de la interacción entre macrófagos infectados y de linfocitos T. Las células T CD4⁺ muestran su efecto protector por la producción de citocinas, principalmente interferón gama (IFN- γ), después de la estimulación con antígenos micobacterianos. Otro tipo de células T, como las células CD8⁺, contribuyen en la producción de citocinas y a la lisis de células infectadas (69).

La micobacteria esta adaptada para sobrevivir dentro de los macrófagos, a pesar de que el hospedero a través de los linfocitos T, reconoce a las células infectadas. Cuando las micobacterias son inhaladas hasta los pulmones, estas son fagocitadas por los macrófagos alveolares, los cuales llevan a cabo tres importantes funciones. Primero, ellos producen enzimas proteolíticas y otros metabolitos los cuales tienen efectos micobactericidas. Segundo, los macrófagos producen un patrón característico de mediadores solubles (citocinas) en respuesta a *M. tuberculosis* (tabla2), incluyendo

interleucina-1, (IL-1), IL-6, IL-10, TNF- α , factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estas citocinas tienen la capacidad de ejercer efectos inmunoregulatorios potentes y mediar muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis. La IL-1 es un pirógeno endógeno que puede contribuir a la fiebre que es característica de la tuberculosis. La IL-6, aumenta la producción de inmunoglobulinas por la activación de las células B, y mediante este mecanismo puede mediar la hipergammaglobulinemia que es común en pacientes con tuberculosis. El TNF- α sinergiza con el interferón gamma (IFN- γ) para incrementar la producción de metabolitos de óxido nítrico y matar a la micobacteria y es esencial para la formación del granuloma que contiene la infección micobacteriana. Por otro lado, el TNF- α puede participar en el desarrollo de efectos patológicos tales como la fiebre, pérdida de peso, y necrosis del tejido que es característico de la tuberculosis. La IL-10 antagoniza las citocinas proinflamatorias producidas por los monocitos y linfocitos, y el TGF- β suprime la proliferación de linfocitos T y la producción de IFN- γ ; en los macrófagos el TGF- β antagoniza la presentación antigénica, la producción de citocinas proinflamatorias y la activación celular. La tercera función crítica de los macrófagos, es el procesamiento y presentación de antígenos micobacterianos a los linfocitos T. Los macrófagos fagocitan a las micobacterias o ingieren proteínas secretadas por las mismas por pinocitosis, entonces degradan estas proteínas en péptidos que son expresados en la superficie celular en asociación con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La expresión de antígenos a través de esta

vía induce la expansión de linfocitos T, tanto CD4 como CD8 ambos son importantes para adquirir resistencia contra *M. tuberculosis* (70).

Tabla 2

CITOCINAS PRODUCIDAS POR MACROFAGOS Y POR CELULAS Th1 Y Th2

Citocinas	Producidas por:		
	Macrófagos	Th1	Th2
IL-2	-	+	-
IFN- γ	-	+	-
Linfotoxina	-	+	+
IL-4	-	-	+
IL-5	-	-	+
IL-6	+	-	+
IL-10	+	-	+
IL-3	-	+	+
GM-CSF	+	+	+

TNF	+	+	+
IL-1	+	-	-
IL-8	+	-	-
TGF- β	+	-	-

La gran mayoría de los datos experimentales sugieren que las células T CD4 juegan un papel predominante aunque no exclusivo en la defensa contra la tuberculosis. Esto ha surgido de estudios donde se demuestra el agravamiento de la enfermedad en ratones "knock out" para CD4 y la capacidad de las células T CD4 de ratones inmunizados para proteger a ratones no inmunizados contra un reto infeccioso con *M. tuberculosis*. La observación de que existe un dramático incremento en la susceptibilidad de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida a la tuberculosis sugiere una situación comparable al modelo anterior en humanos. Funcionalmente las células T CD4 comprenden al menos dos subpoblaciones distintas que difieren en el patrón de producción de citocinas, en los factores coestimulatorios requeridos y en el tipo de las células presentadoras de antígenos. Las células T con respuesta de tipo Th1 se caracterizan por la producción de IFN- γ , TNF- γ e IL-2; el incremento en la actividad microbicida de macrófagos, y el aumento de la respuesta de hipersensibilidad retardada (tabla 2). Las células T de tipo Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10; soportan la

diferenciación y crecimiento de células B y aumentan la respuesta inmune humoral. Ambos tipos de células T se desarrollan a partir de células "vírgenes", cuya diferenciación es influida por el microambiente. La IL-12, producida por macrófagos activados y células dendríticas, es la principal citosina inductora de células Th1, mientras que la IL-4 promueve la inducción de células Th2. Las células CD4 contribuyen a la protección contra la infección por micobacterias mediante la producción de citocinas, las cuales, como ya mencionamos antes, activan a los macrófagos infectados para matar a la bacteria intracelular. Entre estas citocinas se ha visto que el INF- γ es una molécula efectora crucial en ratones, así como en humanos. Esta citosina proinflamatoria tiene múltiples acciones benéficas, muchas de las cuales están centradas en la biología del macrófago. Por ejemplo la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno que han sido implicados en la inhibición del crecimiento intracelular y/o muerte de la micobacteria (67). Las células CD4 pueden clasificarse en células efectoras o de memoria y células "vírgenes" de acuerdo a la expresión de la isoforma de CD45, designadas como CD4RO y CD4RA, estas isoformas son producto del splicing alternativo del transcrito de ARN del gen que codifica para CD45. Esta molécula de membrana tiene actividad de fosfatasa y media la transducción de la señal TCR por la desfosforilación de un residuo de tirosina de las tirosinas cinasas Lck y Fyn, Este cambio activa estas cinasas y dispara los subsecuentes pasos en la activación de las células T. La isoforma CD45RO, expresada en células efectoras, está asociada con el complejo TCR y sus correceptores CD4 ó CD8 mucho mejor que la isoforma CD45RA, la cual es

expresada por células "vírgenes". Las células T de memoria tienen ambas isoformas, pero el CD45RO es predominante. Como resultado, las células T efectoras y memoria son más sensibles a la activación mediada por TCR que por un complejo MHC-péptido.

Las células T CD8 constituyen la principal población de células T citolíticas de defensa contra muchos patógenos intracelulares en modelos de infección animal. A diferencia de células CD4, las células CD8 no producen altos niveles de IL-2 sino que dependen de una fuente exógena de este factor de crecimiento. Se ha demostrado que los linfocitos murinos CD8, al igual que los CD4, juegan papeles complementarios en la respuesta inmune a *M. tuberculosis*, a través de la evidencia de modelos murinos en los cuales las células T CD8 pueden lisar directamente células infectadas con *M. tuberculosis* de una forma antígeno-específica, la supresión de células CD8 incrementa la severidad de la tuberculosis murina (70), y los ratones con el gen de la β_2 -microglobulina muestran células CD8 no funcionales por la alteración en el MHC-I, y se vuelven más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis* y *M. bovis* (71). Además, se ha encontrado que células T CD8 que secretan IFN- γ en sangre periférica de pacientes con tuberculosis en una alta frecuencia (67).

En estudios *in vivo* en ratones y en estudios *in vitro* en humanos, se ha observado una fuerte actividad de las células T citolíticas (CTL) contra macrófagos infectados o pulsados con *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, PPD, proteínas de cultivo filtrado, o los antígenos secretados Ag85A, Ag85B, 19 kDa, 38 kDa, y ESAT-6 cuando se comparó la respuesta de

células CD8 de personas sanas vacunadas con BCG y personas con tuberculosis pulmonar, observándose un incremento en los niveles de perforina, una molécula formadora de poros que se localiza con la granzima en los gránulos citotóxicos, de los linfocitos CD8. Estos linfocitos CD8+ se encuentran disminuidos en personas con tuberculosis al compararse con personas sanas, de la misma manera la actividad citotóxica de estas células fue menor en las personas con tuberculosis, una excepción fue la marcada respuesta citotóxica de los linfocitos CD8+ de los pacientes tuberculosos al ser estimulados con la proteína ESAT-6 (71).

Las células T que expresan el receptor de células T de tipo $\gamma\delta$ (TCR- $\gamma\delta$) se acumulan en las lesiones producidas por micobacterias (69), pero su papel en la protección es poco claro. Estas células son capaces de producir IFN- γ ; en una reciente evaluación usando ratones que no expresan TCR- $\gamma\delta$ infectados con micobacterias en aerosol parece ser que los linfocitos TCR- $\gamma\delta$ no juegan ningún papel protector en los pulmones; mas bien los datos sugieren una nueva actividad para estas células en cuanto al reclutamiento eficiente de monocitos en el granuloma, porque se observó una ausencia de los mismos en las lesiones de estos ratones, volviéndose una lesión piogranulomatosa (rica en neutrófilos). La hipótesis que se maneja es que las células T $\gamma\delta$ tienen un papel de "policía de tránsito" en la formación del granuloma, quizás a través de la producción de quimocinas, como la proteína quimioattractante de macrófagos-1 (MCP-1) como parte del mecanismo para asegurar la eficiente formación del granuloma. También se ha sugerido que estas células ayudan a

prevenir el daño local del tejido (57), impidiendo algunos procesos inflamatorios.

Existe otra población distinta a las células T $\gamma\delta$, células restringidas en su reconocimiento antigénico por la molécula CD1 que no reaccionan con antígenos protéicos micobacterianos en el contexto de las moléculas del MHC clase I o clase II. La molécula CD1 tiene una estrecha semejanza estructural a MHC clase I pero es relativamente no polimórfica. Actualmente el principal interés en el estudio de la molécula CD1 es su capacidad para reconocer antígenos no protéicos, tal como los ácidos micólicos, lipoarabinomanano, y estructuras que contienen pirofosfato. No se sabe si este subgrupo de células T contribuyen en la protección, pero al parecer juegan un papel en la eliminación de materiales de la pared celular a través de la producción de interleucina 4, esta citosina es mitógeno para las células B activadas, y estimula la respuesta por anticuerpos (69).

Se han postulado una gran variedad de teorías con respecto a los papeles biológicos de los oligosacáridos. Estas varían desde un papel puramente estructural, ayudar en la conformación y estabilidad de proteínas, proveer de estructuras blanco para microorganismos, toxinas y anticuerpos, el enmascaramiento de algunas estructuras blanco, el control de la vida media de proteínas y células, la modulación de funciones de proteínas, y la provisión de ligandos para eventos de unión específica mediante proteínas blanco hasta interacciones matriz-célula y célula-célula. En la micobacteria, que como se mencionó anteriormente, tiene la capacidad de glucosilar,

aún no se han definido con exactitud el papel de los carbohidratos unidos a proteínas en su metabolismo.

III. ANTECEDENTES

Lo complejo de la estructura y la fisiología de las micobacterias así como su intrincada interacción con el sistema inmune, ha hecho necesario el desarrollo de diferentes estrategias y métodos para identificar antígenos micobacterianos altamente reactivos con dicho sistema. La caracterización de antígenos micobacterianos, incluyendo antígenos de *M. bovis*, ha sido un campo de investigación altamente activo desde los trabajos de Seibert (40,72) en los años 30's y 40's. Actualmente se emplean principalmente el filtrado de medio de cultivo y el llamado derivado proteico purificado (PPD) con el objetivo de producir reactivos específicos y bien definidos para pruebas de diagnóstico y vacunas. En general la disección y el estudio de los componentes micobacterianos ha conducido a una mejor comprensión del curso de la infección, el desarrollo de la enfermedad y la respuesta inmunológica en modelos animales.

La mayoría de los antígenos de *M. bovis* caracterizados hasta la fecha son proteínas solubles presentes en preparaciones de extractos de células o aquellas activamente secretadas o liberadas en el medio de cultivo. Se han usado diferentes estrategias y métodos, para identificar antígenos presentes en el extracto proteico filtrado purificado que son altamente reactivos con linfocitos T. Por ejemplo, se ha empleado la técnica analítica de electroforesis en geles de poliacrilamida de doble dimensión donde se ha podido revelar la complejidad del contenido de

las proteínas presentes en el medio sintético después de haber cultivado las micobacterias durante diferentes periodos de tiempo.

En uno de los trabajos previos que hemos realizado, separamos las proteínas presentes en el extracto protéico del medio de cultivo mediante la técnica de isoelectroenfoque preparativo en fase líquida, la cual permite aislar proteínas en base a su punto isoelectrico. La separación de proteínas, a través de esta técnica, analizadas en una segunda dimensión empleando electroforesis en geles de poliacrilamida mostró que existen algunas proteínas que presentan el mismo peso molecular aparente pero distinto punto isoelectrico. Una de estas proteínas la identificamos como MPB70, en primera instancia por su migración electroforética y su abundancia, así también coincide con lo reportado por Fifis, donde informa que esta proteína existe en múltiples formas, debido a las modificaciones postraduccionales (73)

Sutiles métodos de identificación han mostrado homología en la secuencia de proteínas, por ejemplo MPB70/80 de *Mycobacterium bovis* con MPB83 de *M. bovis* y la proteína del gen Rv-2870c de *M. tuberculosis* (1) o diferente forma y masa molecular de una proteína como MPB70/80 de *M. bovis* (2,3), o gran heterogeneidad de antígenos micobacterianos con peso molecular idéntico. Debido a que hay diferencias en la respuesta de células mononucleares de sangre periférica a proteínas de *M. bovis* obtenidas por isoelectroenfoque (4), pudimos constatar que dos de estas proteínas con un peso molecular de 19 kDa, con diferente punto isoelectrico, en ensayos para INF- γ , la respuesta fue diferente. Por otro lado encontramos que en las fracciones obtenidas de la separación por isoelectroenfoque, estas dos

proteínas estaban presentes en una forma enriquecida y con diferencias entre sus puntos isoelectricos. Nosotros pensamos que la caracterización de estas proteínas era relevante.

En otro trabajo identificamos once glucoproteínas del extracto protéico del medio de cultivo filtrado de *M. bovis* (61), dos de estas proteínas correspondieron a las formas de 19 y 25 kDa de MPB70 que han sido previamente reportadas.

Por un análisis más minucioso se demostró la existencia de una nueva glucoproteína con un peso aparente de 19 kDa que no había sido previamente descrita entre las proteínas presentes en el extracto del medio de cultivo filtrado. Es la caracterización de esta proteína la que ocupa el tema central del presente trabajo.

IV. HIPOTESIS

Existen proteínas de secreción producidas por *Mycobacterium bovis* que pueden compartir estrechamente propiedades fisicoquímicas pero que son productos de genes diferentes

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio es de purificar y caracterizar una proteína de secreción con un peso molecular aparente de 19 kDa de *Mycobacterium bovis* distinta de la proteína conocida como MPB70.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Purificar proteínas por isoelectroenfoque en fase líquida.

Secuenciación del amino terminal.

Análisis de uniones sacarídicas en la proteína

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Cultivo micobacteriano

La cepa de *Mycobacterium bovis* AN-5 (74) se cultivó en el medio sintético modificado de Proskauer-Beck-Youmans (PBY) (75) constituido por los siguientes ingredientes: 5 g. de asparagina, 5 g. de fosfato de potasio, 0.6 g. de sulfato de magnesio, 1.5 g. de citrato de magnesio, 20 ml de glicerol, aforado a 1000 ml con agua destilada, se ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio al 40%; en frascos de 1 litro se alicuotaron 300 ml de medio, y se esterilizó a 15 libras por 20 minutos, posteriormente se sembraron las micobacterias en cada frasco y se dejó crecer a 37°C por 10 semanas. El sobrenadante del cultivo fue separado de la masa bacteriana por filtración, a través de papel filtro Whatman # 3, y posteriormente esterilizado por membranas de filtración con un tamaño de poro de 0.45 y 0.22 µm.

6.2 Extracto protéico

Las proteínas del sobrenadante esterilizado fueron precipitadas con sulfato de amonio a una saturación final del 80 % a 4°C en agitación constante. Posteriormente fueron centrifugadas a 23,700 g por 1 h.

El precipitado se resuspendió en agua destilada y se agregó una mezcla de inhibidores (aprotinina 2 µg/ml., leupeptina 2 µg/ml., pepstatina A 1 µg/ml., Sigma-Aldrich, St Louis Mo., USA), y posteriormente se dializó, empleando membranas con un corte de

12000 a 14000 Da., contra agua primero y después contra PBS (amortiguador de fosfato de sodio 0.015M, cloruro de sodio 0.15M, pH 7.4) a 4°C, hasta que el extracto de proteínas quedo libre de sulfato de amonio, determinado mediante la negatividad de la prueba de precipitación del sulfato en presencia de cloruro de bario.

La concentración de proteínas del extracto protéico fue cuantificada por el método de Bradford, con una curva de albúmina sérica bovina como estándar de referencia.

6.3 Separación de Proteínas por Isoelectroenfoque.

El extracto protéico fue fraccionado en un sistema de isoelectroenfoque preparativo Rotofor marca BioRad, el cual contiene 20 compartimientos, cada uno representa una fracción; la cámara con el electrodo positivo contiene ácido fosfórico 0.1 M, y la cámara con el electrodo negativo contiene hidróxido de sodio 0.1 M.

Para establecer el gradiente de pH, se preenfocó el medio sin las proteínas, dicho medio estuvo constituido por 20% de glicerol, 2% de anfólitos de pH 3-10, en un volumen total de 50 ml, se corrió a 12 W por 1 h. a 4°C. Una vez establecido el gradiente de pH, se cargó una alícuota del extracto protéico de *M. bovis*, y se continuó la corrida por tres horas más, bajo las mismas condiciones. Pasado este tiempo se cosecharon las fracciones ya enfocadas, dicho proceso se llevó a cabo a través de un sistema de vacío conectado a 20 tubos para coleccionar individualmente las fracciones posteriormente se midió el pH de cada fracción.

Para separar los anfolitos de las proteínas se tomó una alícuota de 200 μ l de cada fracción y se agregó NaCl hasta obtener aproximadamente una concentración de la sal de 1 M. y se mantuvieron así por 18 hr. a 4°C; pasado este tiempo se dializaron las fracciones, con membranas con un corte de poro de 12000 a 14000 Da, contra agua destilada primero y posteriormente contra PBS, a 4°C. Cuando las proteínas quedaron libres de anfolitos, éstas se liofilizaron y se guardaron a -20°C.

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El análisis del fraccionamiento por isoelectroenfoco del extracto proteico fue hecho por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes; los geles se prepararon a partir de soluciones concentradas de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%, SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10%, tris-HCl 1.5 M pH 8.8, TEMED, y persulfato de amonio al 10%.

Las 20 fracciones liofilizadas se solubilizaron con 50 μ l de agua destilada, se aplicaron 15 μ l de cada fracción al gel y se corrieron a 200V hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al borde del gel.

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se procedió a teñir las bandas protéicas con nitrato de plata, previamente tratadas en soluciones de ácido acético/ isopropanol al 10 %, y glutaraldehído al 3.75 % en amortiguador de fosfatos.

6.5 Purificación de proteínas por cromatografía

Una alícuota de las proteínas obtenidas del fraccionamiento por rotofor después de haber eliminado los anfolitos como se describe previamente fueron dializada contra agua y PBS, y concentradas por liofilización y se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, en una columna de sílica, Bio-Select SEC 125-5 de Bio-Rad empleando un sistema de cromatografía líquida de baja presión (FPLC).

6.6 Secuenciación del amino terminal.

La secuencia de aminoácidos fue realizada en un secuenciador automatizado de proteínas modelo Procise 491 de la marca Applied Biosystem. Se colocaron 10 picomoles de proteína en un filtro de fibra de vidrio previamente tratado con biobrene para conferirle una carga altamente positiva lo que permite retener la proteína en el filtro. Posteriormente las muestras fueron sometidas a la degradación secuencial de Edman.

6.7 Análisis de la secuencia de aminoácidos

La secuencia de aminoácidos fue analizada en sitio NewBlastProDom-CG (www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_tre.cgi?organism=euk) del banco de datos de proteínas micobacterianas del Instituto Sanger (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/dlast-submitblast/m_tuberculosis), y

analizada en el programa PROSITE (www.au.expasy.org/prosite/) para identificar los posibles sitios de glicosilación así como el péptido señal.

6.8 Tratamiento con endoglucosidasa

Una alícuota de la proteína pura fue sometida a digestión enzimática con endoglucosidasa F. La proteína se dializó en amortiguador de fosfato de sodio 0.15 M, pH 6.3, por toda la noche a 4°C. Al día siguiente se le agregó SDS a una concentración final de 0.2% y se calentó por 10 minutos. Posteriormente se adicionó 0.5 M EDTA , 1% de CHAPS, β-mercaptoetanol 1mM (BioRad), y 1unidad de glucosidasa F (Boehringer), de *Flavobacterium meningosepticum* y se incubó toda la noche a 37°C.

Posteriormente se realizó una electroforesis, PAGE-SDS, al 15%, y el gel se tiñó con nitrato de plata.

VII. RESULTADOS

7.1 Obtención del extracto protéico y su análisis por PAGE

El extracto protéico del medio de cultivo filtrado, obtenido después de haber crecido *M. bovis* AN-5 por 10 semanas en medio sintético libre de proteínas, se precipitó con sulfato de amonio al 80%, y fue analizado mediante separación electroforética en gel de poliacrilamida-SDS teñido con plata. Una muestra representativa se muestra en el carril 3 de la figura 1; este patrón proteico muestra un número elevado de proteínas con pesos moleculares que abarcan aproximadamente desde los 120 kDa hasta los 10 kDa, proteínas de menor peso molecular. En esta imagen se aprecian bandas con una alta concentración de proteína, entre las cuales se encuentra la banda con un peso molecular aparente de 19 kDa.

Figura 1

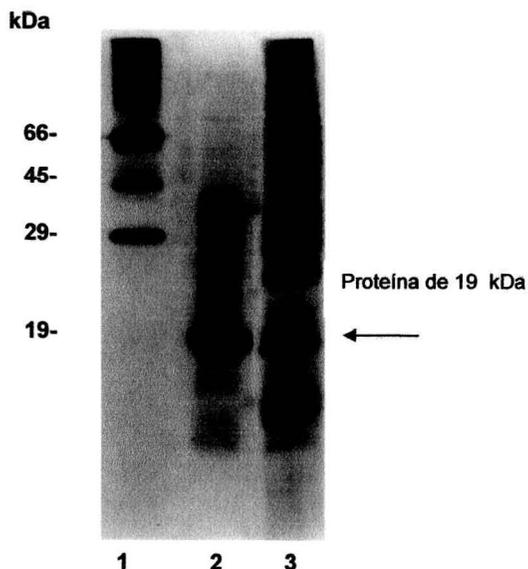


Fig.1. Patrón electroforético del extracto protéico del medio de cultivo filtrado de *M. bovis*, en gel de poliacrilamida-SDS al 15% en condiciones no reductoras, con tinción de plata. Carril 3 extracto proteico, carril 1 y 2 marcadores de peso molecular (Sigma).

7.3 Purificación del extracto protéico por isoelectroenfoque

El extracto protéico filtrado del medio de cultivo fue separado por isoelectroenfoque en fase líquida, en una solución de anfólitos con un rango de pH de 3-10, esta separación produjo veinte fracciones las cuales se muestran en la figura 2a y 2b. En dicha separación se obtuvo un mayor número de proteínas en el rango de pH ácido, en esta figura se observan principalmente en las 8 primeras fracciones, carril 2 al carril 10, una banda protéica de 19 kDa, con valores de pH de 3.8, 4.5, 4.9, 5.3, 5.7, 6.0, 6.4, y 6.6, con mayor concentración en las fracciones 5, 6, 7, 8 y 9; dos fracciones 4 y 8 se seleccionaron por su relativo enriquecimiento y diferencia en su punto isoelectrico la primer fracción con un pI de 4.5, y la segunda fracción con un pI de 6.0, respectivamente.

Figura 2a

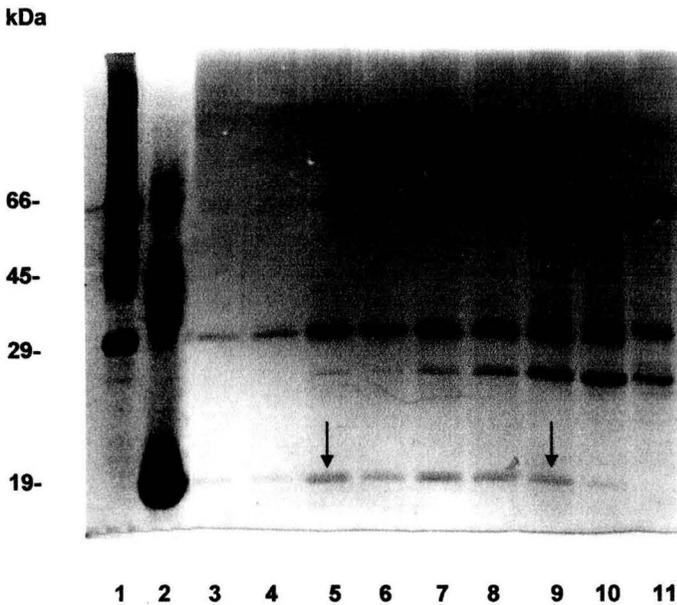


Fig. 2a. El extracto proteico filtrado fue fraccionado por isoelectroenfoque en fase líquida, por sistema preparativo de Rotofor (BioRad), con gradiente de pH de 3-10. El análisis en gel de poliacrilamida –SDS al 13.5 % en tinción con plata muestra 9 de las 20 fracciones obtenidas del isoelectroenfoque. Los carriles 1 y 2, representan a los marcadores de peso molecular, los carriles 5 y 9 muestran las fracciones 4 y 8, donde las flechas señalan a las proteínas de 19 kDa.

Figura 2b

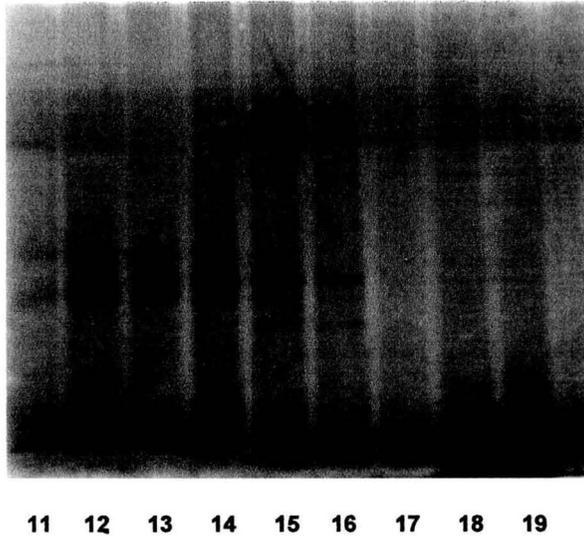


Fig.2b. Fracciones del 11 al 20 de la separación por isoelectroenfoque del extracto protéico filtrado, analizado en gel de poliacrilamida-SDS en tinción en plata. Carriles 1 al 10 fracciones con diferente punto isoeléctrico.

7.4 Purificación por cromatografía de las fracciones 4 y 8 obtenidas del isoelectroenfoque preparativo en fase líquida.

Las fracciones 4 y 8 del isoelectroenfoque, libres de anfolitos, fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular para purificar las proteínas de 19 kDa. En la figura 3 carril 3 se muestra la proteína con punto isoeléctrico de 4.5, y en la figura 4 carril 1 se observa la proteína

con punto isoeléctrico 6.0, ambas proteínas se observan sustancialmente puras.

Figura 3

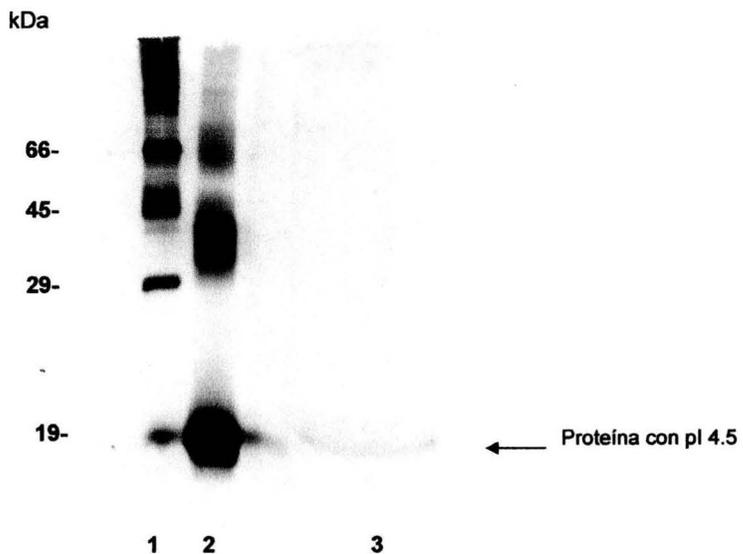


Fig. 3. La proteína de 19 kDa de la fracción 4, con pl 4.5, fue purificada por cromatografía de exclusión molecular. El gel de poliacrilamida-SDS con tinción en plata, muestra en el carril 1 y 2 marcadores de peso molecular, y carril 3 muestra la proteína pura de 19 kDa.

Figura 4.

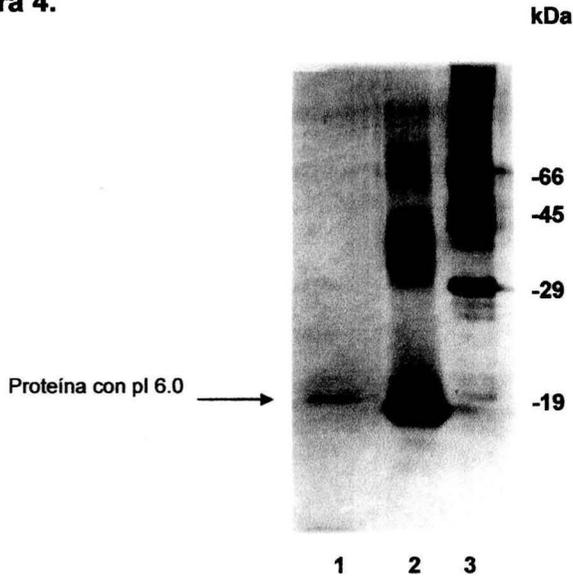


Fig. 4. La proteína de 19 kDa de la fracción 8, con pI 6.0, fue purificada por cromatografía de exclusión molecular. El gel de poliacrilamida-SDS con tinción en plata, muestra en el carril 1 la proteína pura de 19 kDa, carril 2 y 3 marcadores de peso molecular.

7.5 Análisis de la secuencia del amino terminal

Cada una de las dos proteínas puras fueron secuenciadas, en su extremo amino terminal, empleando la degradación automática de Edman. Las secuencias resultantes fueron analizadas en el sitio web New Blast Pro Dom-CG . En la tabla 1, parte A, se muestran los primeros 26 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína

con punto isoeléctrico de 4.5, y en la parte B se muestra la secuencia de la proteína con punto isoeléctrico de 6.0

Tabla 1

A
¹ Ser ² Pro ³ Val ⁴ Asp ⁵ Ala ⁶ Val ⁷ Ile ⁸ Asn ⁹ Thr ¹⁰ Thr ¹¹ Tyr ¹² Asn ¹³ Tyr ¹⁴ Gly ¹⁵ Gln ¹⁶ Val ¹⁷ Val ¹⁸ Ala ¹⁹ Ala ²⁰ Leu ²¹ Asn ²² Ala ²³ Thr ²⁴ Asp ²⁵ Pro ²⁶ Gly
B
¹ Gly ² Asp ³ Leu ⁴ Val ⁵ Gly ⁶ Pro ⁷ Gly ⁸ Cys ⁹ Ala ¹⁰ Glu ¹¹ Tyr ¹² Ala ¹³ Ala ¹⁴ Ala ¹⁵ Asn ¹⁶ Pro ¹⁷ Thr ¹⁸ Gly ¹⁹ Pro ²⁰ Ala ²¹ Ser ²² Val ²³ Gln ²⁴ Gly ²⁵ Met

Tabla 1 La tabla muestra la secuencia de los primeros 26 aminoácidos del amino terminal obtenida por la degradación automatizada de Edman. En la sección A se muestra la secuencia de la proteína de punto isoeléctrico 4.5, que corresponde a la proteína hipotética Rv-1174c de *Mycobacterium tuberculosis*. La sección B muestra la secuencia de la proteína de punto isoeléctrico de 6.0.

Las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas fueron analizadas en el banco de datos del Instituto Sanger. Este análisis mostró que la secuencia de la proteína con punto isoeléctrico de 6.0 mostró 100% de homología con la proteína MPB70/80; y la de la proteína con punto isoelectrico de 4.5, fué 100% idéntica a la proteína hipotética producto del gen Rv1174c de *M. bovis*.

Figura 5

1 29
MRLSLTALSAGVGAVAMSLTVGAGVASADPVDAVINT

54
TCNYGQVVAALNATDPGAAAQFNASPVAQSYLRNFLA

110
APPPQRAAMAAQLQAVPGAAQYIGLVESVAGSCNNY

Fig. 5. Análisis de la secuencia del amino terminal de la proteína con pl 4.5, con el banco de datos del Centro Sanger, mostró 100% de homología con la proteína hipotética del gen Rv1174c. La secuencia subrayada representa a la secuencia que obtuvimos.

7.6 Análisis de carbohidratos presentes por tratamiento con endoglicosidasa

Para analizar la presencia de carbohidratos en la proteína con punto isoeléctrico de 4.5, ésta se trató con endoglicosidasa-F, enzima específica para carbohidratos con enlace N-glucosídico. La figura 6 muestra el producto de esta digestión. En el carril 2 se observa una ligera disminución en su peso molecular, y la generación de dos bandas de menor peso molecular posterior al tratamiento enzimático, en el carril 3 se muestra a la proteína sin tratamiento enzimático.

Figura 6

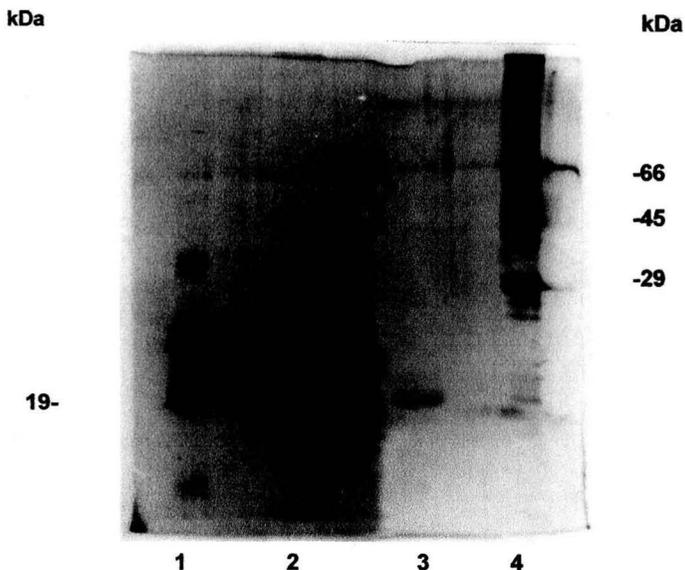


Fig. 6. Proteína con pl 4.5 tratada con endoglicosidasa F. El gel de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras, con tinción en plata, muestra en el carril 2 la generación de una banda de menor peso molecular al ser incubada con endoglicosidasa F; en el carril 3 proteína pura se muestra la proteína pura, y en el carril 1 y 4 marcadores de peso molecular.

VIII. DISCUSIÓN

Actualmente, la vacuna disponible para prevenir la tuberculosis es la denominada BCG que emplea una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuado en cultivo por Calmette y Guerin . Basados en los resultados de su aplicación en la población abierta de muchos países en desarrollo, se ha reportado que la eficacia de la vacuna BCG para inducir una inmunidad protectora varía entre el 0 y el 80% (7). Además del amplio espectro descrito en cuanto a su eficacia como vacuna protectora, BCG, siendo una vacuna atenuada, potencialmente puede causar la enfermedad en personas inmunosuprimidas. Por lo que es evidente la necesidad de una vacuna más segura y efectiva.

El desarrollo de una vacuna basada en antígenos definidos de *Mycobacterium tuberculosis* es un área de gran interés. Estudios previos han demostrado que la protección efectiva contra el reto con *Mycobacterium tuberculosis* ocurre después de la inmunización con cepas de micobacterias atenuadas (BCG, R1RV, o *Mycobacterium microti*). Sin embargo cuando la misma micobacteria es muerta con calor y es inyectada en presencia o ausencia de adyuvante no se observa una respuesta protectora contra un reto del microorganismo virulento (7). Por otra parte existen estudios en que se ha reportado un incremento en la resistencia contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en varios modelos animales de esta enfermedad posterior a la vacunación con diferentes subfracciones o con proteínas de cultivo filtrado (39).

El estudio de los mecanismos por los cuales los componentes micobacterianos individuales interactúan con el sistema inmune del

hospedero es de gran importancia para identificar moléculas que pueden ser candidatas para ser incluidas en el diseño de nuevas vacunas de subunidades o para ser utilizadas como reactivos en pruebas de diagnóstico. Varios estudios en modelos murinos indican que el sistema inmune reconoce diferentes clases de antígenos micobacterianos y que tal reconocimiento ocurre de una manera secuencial. Los antígenos secretados son importantes moléculas blanco en los primeros estadios de la infección, mientras que en fases posteriores, debido a la respuesta inmune del hospedero, el bacilo es destruido y los antígenos somáticos son liberados y se vuelven disponibles para su reconocimiento. Así, las vacunas basadas en antígenos presentes en los cultivos filtrados podrían ser particularmente efectivas en inducir células de memoria para necesarias para una adecuada vigilancia inmunológica de las primeras fases de la infección, mientras que los antígenos somáticos pudieran ser importantes para controlar estadios tardíos de la enfermedad o bien propiciar una respuesta de inmunidad retardada con el consiguiente daño tisular.

El objetivo de este trabajo fue la purificación y caracterización de una glucoproteína de secreción con un peso molecular aparente de 19 kDa en su estado nativo, proveniente de *Mycobacterium bovis*, distinta a otras glucoproteínas previamente reportadas, que presentan un peso molecular semejante y se consideran isoformas del antígeno conocido como MPB70/ Nuestros resultados muestran la purificación y caracterización parcial de dos proteínas, a partir del medio de cultivo filtrado de *M. bovis*, ambas con un peso molecular aparente de 19

kDa, pero con distinto punto isoeléctrico, una de 4.5 y otro de 6.0. Mediante el análisis de la secuencia amino terminal, una de estas proteínas mostró una homología al 100% con MPB70, mientras que la otra proteína, correspondió a una proteína hipotética traducida a partir del gen denominado Rv-1174c de *M. tuberculosis* que no se había descrito para *M. bovis* y que había sido caracterizada a partir de su clonación pero no había sido aislada de los cultivos de *M. bovis*, de hecho la secuencia aminoterminal que nosotros realizamos inicia justo en el sitio en que se predice la terminación del llamado “péptido señal” lo cual apoya el dato de ser una proteína destinada a ser secretada por la micobacteria (la aislamos a partir de un medio de cultivo líquido y no mediante ruptura de la bacteria), y no un producto liberado por muerte bacteriana durante el proceso de cultivo *in vitro*. Esta proteína no presenta homología con ninguna otra proteína reportada en los bancos de secuencias tanto genómica como de proteínas. Esto nos lleva a suponer que muy probablemente sea específica del género *Mycobacterium* y por lo tanto pudiera estar relacionada con alguna de las características exclusivas del mismo como, su gruesa pared lipídica, la capacidad de vivir dentro de los fagosomas de los macrófagos o el fenómeno de dormancia o latencia.

Las proteínas del extracto obtenidas a partir del filtrado del medio de cultivo, que se observan en la separación electroforética en una dimensión, muestra muchas bandas. De acuerdo a la información proporcionada por la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* llevada a cabo por los científicos del Instituto Sanger, éste contiene aproximadamente 4000 diferentes marcos de lectura

abiertos, los cuales potencialmente codifican el mismo número de proteínas (76). La secuencia completa del genoma representa un considerable avance en el conocimiento de potenciales antígenos, el progreso acerca de la información de la traducción de este genoma en proteínas (proteoma) ha resultado en mapas que comprenden más de 1500 proteínas en electroforesis de doble dimensión, y hasta el momento, la identificación de varios cientos de estas proteínas (77).

Entre las proteínas mostradas en la figura 1C, se observa una banda ancha en la región correspondiente a un peso de 19 kDa, al separar las proteínas del medio de cultivo filtrado de acuerdo a su punto isoelectrico en un gradiente de pH de 3 a 10, obtuvimos varias bandas en la región de 19 kDa distribuidas en 8 fracciones, como se puede observar en la figura 2a; la distribución de estas proteínas es heterogénea, es decir, la concentración de la proteína varia entre carril y carril, lo cual nos podría hacer suponer que se trata de la misma proteína con multiples puntos isoelectricos, sin embargo trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que cuando se separaba el extracto protéico bajo las mismas condiciones experimentales, las proteínas obtenidas tenían una capacidad distinta para estimular la producción de INF- γ por células mononucleares de sangre periférica de bovinos sanos y tuberculosos, lo cual nos llevó a pensar en la posibilidad de que estas proteínas distribuidas en diversos puntos isoelectricos no eran isoformas de una misma proteína.

Las fracciones 4 y 8, figura 2a, mostraron una mayor diferencia en la capacidad de inducir la producción de interferón gama. Los primeros

26 residuos de aminoácidos de la proteína con punto isoeléctrico 4.5, son 100% idénticos con la proteína madura hipotética del gen RV-1174c de *M. tuberculosis*.

La proteína con punto isoeléctrico de 6.0 mostró una secuencia aminoterminal con un 100% de homología con la proteína de secreción MPB70, esta proteína ha sido aislada en base a sus propiedades fisicoquímicas como su hidrofobicidad y su contenido de carbohidratos (78), Se ha observado que presenta múltiples formas debido a modificaciones postraduccionales. Harboe (63), demostró que MPB70 y MPB80 son producto del mismo gen, otros autores también la han caracterizado como dos proteínas con pesos moleculares de 22 y 25 kDa que corresponden a dos formas glucosiladas de MPB70 (2). Aún cuando no se conoce con precisión el mecanismo de glucosilación en procariontes, la asociación de carbohidratos con proteínas micobacterianas ha sido reportada previamente (56,80,81), de hecho MPB70 es una de estas glucoproteínas que han sido purificadas a través de su afinidad por la lectina concanavalina A (2).

La posibilidad de que la proteína que reportamos aquí, sea otra isoforma de MPB70 queda totalmente descartada, ya que el análisis de la secuencia aminoterminal es completamente distinto. Por otra parte el tratamiento de esta nueva proteína con endoglucosidasa F (figura 6), en presencia de un agente reductor de puentes disulfuro, generó dos bandas de peso molecular de 10 y 8 kDa (figura 6B), lo cual nos hace suponer que esta proteína es en su forma nativa homodimérica, y que la diferencia en el peso molecular de cada

subunidad monomérica, aun cuando presenta la misma secuencia en el amino terminal, se debe a la presencia de azúcares asociados solo a uno de los monómeros. Recientemente se ha demostrado mediante la técnica de expresión genómica en *Streptomyces lividans* que este tipo de comportamiento existe para otras glucoproteínas de *Mycobacterium tuberculosis* como la glucoproteína 45/47 kDa (Rv1860). Una observación interesante descrita en este trabajo es que el suero de los pacientes con tuberculosis reconocieron preferencialmente los residuos de carbohidrato de la molécula glucosilada (81).

El peso de 8kDa coincide con la predicción de la secuencia genómica del gen hasta hoy putativo Rv1174c, si consideramos la pérdida de la secuencia que codifica el llamado péptido señal; consideramos que al igual que en el trabajo citado en el párrafo anterior la diferencia de peso entre los dos monómeros (8kDa vs. 10kDa) es debida a los carbohidratos asociados con la proteína de mayor peso molecular.

Resulta importante resaltar que la digestión con Endoglucosidasa F es específica para el enlace N-glicosídico esto es, la unión del carbohidrato con el aminoterminal de un residuo de asparagina debido a que este tipo de unión en eucariontes es mediada por glucosiltransferasas, se aporta un dato mas de que las micobacterias son realmente capaces de glucosilar proteínas.

Por otra parte el comportamiento electroforético posterior al tratamiento con endoglucosidasa F observado para la otra glucoproteína asilada en este trabajo que correspondió a MPB70 es muy diferente pues en lugar de generarse polipéptidos de menor peso

molecular se genera una banda protéica con un aparente peso molecular mayor, dicho comportamiento ha sido reportado por otros autores como Wiker (64), quien demostró que esta proteína tiene diferentes moviidades en geles de poliacrilamida-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras. Esto se debe a que en la proteína MPB70 existen cisteínas que forman un puente disulfuro, cuando la proteína es tratada con SDS no es desdoblada totalmente, lo que le permite conservar una forma parcialmente globular y migrar más rápido en geles de poliacrilamida-SDS que el polipéptido totalmente linearizado después del tratamiento con agentes reductores como DTT o mercaptoetanol.

Desde el punto de vista inmunológico en base a un trabajo previo (4), en el que se valoró la capacidad de cada una de las 20 fracciones obtenidas por isoelectroenfoque en solución del extracto protéico soluble de *M. Tuberculosis*, para estimular la producción de INF- γ en células mononucleares de sangre periférica de bovinos PPD positivos, con grandes lesiones, se observó que la fracción que contenía la proteína MPB70 presentó una mayor capacidad de estimulación que la fracción rica en esta nueva proteína, por lo que podemos inferir que estas dos proteínas tiene diferente capacidad de interactuar con el sistema inmune del hospedero. Nosotros no medimos la respuesta inmune humoral hacia estos antígenos, lo que resultaría interesante dados los últimos hallazgos descritos por Espitia y Cols (81).

La proteína caracterizada en el presente trabajo no había sido previamente aislada en *M. bovis*, los datos de los bancos genómicos corresponden a *M. tuberculosis*. Sin embargo la secuencia

aminoterminal SPVDAVINNTTYNYGQVVAALNATDPG, ha sido previamente descrita por Coler (7) para una proteína recombinante, (mas no aislada de medios de cultivo como lo hicimos en este trabajo) de 8.4kDa, de manera interesante la proteína reportada por Coler induce altos niveles de interferon gama, a diferencia de lo que nosotros observamos lo que nos permite suponer que las modificaciones postraduccionales podrían ser relevantes para la tanto para estructura y función de los antígenos micobacterianos dentro del metabolismo de la bacteria como en su interacción con el sistema inmune del hospedero.

El estudio de las glucoproteínas en procariontes es un tema de reciente desarrollo, hasta hace poco tiempo se consideraba que las eubacterias eran incapaces de realizar este tipo de modificaciones postraduccionales debido a que carecen de los organelos especializados presentes en las células eucariontes y se creía que también carecían de la maquinaria enzimática necesaria para realizarlas.

La función de los carbohidratos en las glucoproteínas no está comprendida del todo, sin embargo sabemos que los carbohidratos asociados a las glucoproteínas tanto de eucariontes como de bacterias, son útiles para mantener la conformación de estas proteínas, incrementar su estabilidad, incrementar la resistencia a la degradación proteolítica, sirven además como moléculas de reconocimiento de superficie, adhesión celular o evasión de la respuesta inmune. Aún cuando la evidencia experimental es escasa, la función de las moléculas de carbohidrato de las glucoproteínas

bacterianas podrían dividirse en dos grupos: uno en el cual los carbohidratos modifican directamente la función de la proteína, tal es el caso de las interacciones y el ensamblaje de subunidades de los flagelos o pili en *Campylobacter* y *Neisseria*, y la adherencia a las células del hospedero como *Chlamydia* y *E. coli*; el segundo grupo en el cual la glucosilación influye en la interacción con el sistema inmune del hospedero, como ha sido reportado en la inducción de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado que esta asociada al grado de glucosilación en el complejo 45/47 kDa de *M. tuberculosis* (82), o del bloqueo de la lisis mediada por complemento por anticuerpos humanos anti-Gal en *N. meningitidis*. La importancia de las interacciones en las que participan de una manera central los carbohidratos es reconocida cada vez más en el complejo patógeno-hospedero (82).

La relevancia de los carbohidratos para la función de la proteína que aquí reportamos (Rv1174c) y de esta proteína *per se* en el metabolismo de la micobacteria es aún desconocida como mencionamos anteriormente, esta glucoproteína podría jugar un papel importante en la interacción con el sistema inmune del hospedero, o tener alguna función en la integridad o fisiología *sui generis* de la misma micobacteria dado que al hacer el análisis en diferentes bases de datos no encontramos homología alguna con proteínas de otra especie tanto en procariontes como en eucariontes, por lo que pesamos que esta proteína interviene en funciones características de las micobacterias que no se llevan a cabo en otras bacterias u organismos eucariontes. Resultados preliminares que hemos obtenido

en un trabajo colateral al presente, nos pueden arrojar nuevas luces con respecto al posible papel que juegan las glucoproteínas en el metabolismo de las micobacterias.

Sembramos *Mycobacterium bovis* en medio líquido sintético de Proskauer Beck y Youmans en presencia de concentraciones crecientes de tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación,. el crecimiento de las micobacterias se detuvo bajo esta condición, a concentraciones elevadas de tunicamicina prácticamente no se observó ningún crecimiento celular durante 12 semanas, sin embargo al resembrar las pocas bacterias presentes en el medio de cultivo (tal vez no más que las presentes en el inóculo inicial) después de ser lavadas para eliminar la tunicamicina las micobacterias volvieron nuevamente a crecer, de una manera normal si se siembra en un medio enriquecido como Lowenstein Jensen y de una forma aberrante si se les crece nuevamente en PB. Y. Si las micobacterias crecen en PB. Y en presencia de tunicamicina y glucoproteínas exógenas aisladas de un cultivo normal de *M. bovis*, simultáneamente se puede observar nuevamente un crecimiento aberrante, esto es la presencia de glucoproteínas exógenas compensa de manera parcial la inhibición en el crecimiento producida por la tunicamicina.

Los resultados de este trabajo nos hacen suponer que: las glucoproteínas que hasta la fecha han sido reportadas en procariontes, son glucosiladas, de una manera semejante a la que se lleva a cabo en eucariontes al menos en lo que respecta al tipo de unión generada por las glucosiltransferasas de éstos últimos.; Además creemos que la presencia de carbohidratos conjugados a proteínas

tienen una función clave en la fisiología propia de la micobacteria. No sabemos si la inhibición de la glucosilación pudiera estar relacionada con el proceso de dormancia de la micobacteria, como se ha demostrado en un modelo *in vitro* del crecimiento de *Mycobacterium* en condiciones limitadas de oxígeno (83) y en condiciones limitadas de carbono (84); se requieren más estudios para afirmar o negar esta posibilidad, aunque no deja de llamar la atención que la adición de glucoproteínas exógenas, previamente formadas recupere al menos en forma parcial la capacidad de crecimiento de las micobacterias en presencia de tunicamicina. En un trabajo previo logramos purificar 11 glucoproteínas del extracto proteico filtrado del medio de cultivo, empleando el marcaje de las moléculas de carbohidratos con biotina hidracida. Por lo que podemos decir que las micobacterias al menos presentan 11 proteínas con azúcares asociados.

Los avances en la genética molecular micobacteriana, los cuales han culminado con el establecimiento de la secuencia del genoma completo de *Mycobacterium tuberculosis*, hacen posible el desarrollo de candidatos para vacunas. En los momentos actuales dos estrategias pueden ser concebidas para desarrollar productos con capacidad protectora. Una es seguir el paradigma de la vacuna BCG, esto es, construir vacunas con cepas vivas atenuadas con el objetivo de presentar al sistema inmune un reto tan parecido como sea posible a una infección natural sin que este asociado a la virulencia de la bacteria con capacidad de producir secuelas patológicas. Aunque la vacuna BCG surge como el resultado de deleciones espontáneas de fragmentos del genoma micobacteriano, actualmente es posible

producir estas deleciones con el uso de herramientas como la sustitución de genes y la mutagénesis dirigida. Otra estrategia es tratar de generar la respuesta inmune empleando determinantes antigénicos específicos en forma de vacunas de subunidades (85). Aun cuando se ha logrado en gran avance a nivel molecular, es de suma importancia conocer como se traducen todos esos genes potenciales y el papel que los productos protéicos de cada uno de ellos juegan tanto en el metabolismo propio de la micobacteria como en su compleja interacción con su hospedero .

IX. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar una proteína de secreción de *Mycobacterium bovis* distinta a MPB70 que presenta una diferente inmunoreactividad. De acuerdo a los resultados demostramos que:

Existe una proteína que no había sido aislada previamente del medio de cultivo de *Mycobacterium bovis* cuyo peso molecular aparente es semejante al de la proteína MPB70, pero presenta diferente punto isoeléctrico.

Esta nueva proteína de secreción, es en realidad un homodímero, que corresponde a la proteína madura hipotética producto del gen micobacteriano Rv1174c. Una cadena se encuentra glucosilada mientras que la otra no lo está.

Esta proteína parece ser específica del género *Mycobacterium* pues al ser comparada su secuencia aminoterminal contra diferentes bases de datos, no se encontró homología con ninguna otra proteína hasta ahora reportada ni de procariontes ni de eucariontes. El comportamiento inmunológico de la proteína caracterizada en el presente trabajo es distinto a la proteína MPB70.

Debido a su especificidad nosotros creemos que esta proteína podría ser útil para el diagnóstico de la tuberculosis.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Harboe M., Nagai S., Wiker H.G., Sletten K., and Haga S. 1995. Scand. J. Immunol. 42, 46-51.
- 2.- Fifis T., Costopoulos C., Radford A.J., Bacic A., and Wood P.R. 1991. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. Infect. Immun. 59: 800-807.
- 3.-Sugden E.A., Well K.S., Watson D.C., Rohonczy E.B., and Martineau P. 1996. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 541-546.
- 4.-Díaz, F., Massó F., Páez A., Varela E., Suárez-Guemes F., Montaña L F. 1999 Secretion of INF- γ by bovine peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Mycobacterium bovis* protein fractions obtained by isoelectric-focusing. Veter. Immunol. Immunopat. 67: 203-212.
- 5.-Ginsberg, A. M. 2000 A proposed national strategy for tuberculosis vaccine development. Clin. Infect. Dis. 30(suppl 3): s233-242.
- 6.-Andersen. P., et al. 2001 TB vaccines: progress and problems. Trends Immunol. 22:160-168.
- 7.- Coler R.N., Skeiky Y.A., Vedvick T., Bement T., Owendale P., Campos-Neto A., Alderson M.R and Reed S.G.. 1998. Molecular cloning and immunologic reactivity of a novel low molecular mass antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Immunol. 161: 2356-2364

- 8.- Bloom, B.R., and Fine P E M.1994. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In B.R. Bloom (ed) Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. USA:
- 9.- Fine, P.E.M., and Rodrigues L.C. 1990. Modern vaccines: mycobacterial diseases. *Lancet*. 335: 1016-1020.
- 10.- Brewer, T.F., and Colditz G.A. 1995. Relationship between bacille Calmette-Guérin (BCG) strains and efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 20: 126-35.
- 11.- Shinnick, T.M., and Jonas V. 1994. Molecular approaches to the diagnosis of tuberculosis. In B.R. Bloom (ed) Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. USA.
- 12.- Bates, J.P.J., Brennan G.W., Douglas J.C., Feeley J., Glassroth D.E., Kohne W.J., Martin L.G., Wayne and Zeiss C.R . 1986. Subcommittee report on improvements in the diagnosis of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134(suppl): 415-417.
- 13.- American thoracic society and centers for disease control. 1990. Diagnostic standars and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 725-735.
- 14.- Palmer C.F., and Edwards L.B. 1967. Tuberculin test in retrospect and prospect. *Arch. Environ. Health.* 15: 792-808.
- 15.- Gennaro, M.L. 2000. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin. Immunol. Dis. (suppl 3)* 30: s243-s246.

- 16.- Huebner, R.E., Good R.C., and Tokars J.I. 1993^a. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of state public health laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 31: 771-775.
- 17.- Pierre, D. 1991. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J. Clin. Microbiol.* 29: 712-717.
- 18.- Soini, H., Skurnik M., Lioppo E., Tala E., and Viljanen M.K. 1992. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-kilodalton protein. *J.Clin. Microbiol.* 30: 2025-2028.
- 19.- Vlaspolder F., Singer P., and Roggerveen C. 1995. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2699-2703.
- 20.- Kissane, J. M., *Anderson's pathology*. Vol. 1 St. Louis M. 1990
- 21.- Wayne, G.L., 1994 Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* research purposes. In Bloom B.R. (ed) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. N Y.
- 22.- Wayne, L.G., and Hayes L.G. 1996 An in vitro model for sequential study of shift down of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. *Infect. Immun.* 64: 2062-2069.
- 23.- Lim, A., Eleuterio M., Hutter B., Murugasu-Oei B., and Dick T. 1999 Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 181: 2252-2256.

- 24.- Brennan, P. 1989 Structure of mycobacteria. Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* 2 (suppl. 2): 420-430.
- 25.- Lee, R.F., 1996 *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. In Shinnick (ed) *Tuberculosis*.
- 26.- Fréhel, C., et al. 1988 Do test tube grown pathogenic mycobacteria possess a protective capsule?. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 225-230.
- 27.- Russell, D.G., Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P., Chakrabarty P., et al. 1994. Lack of acidification of mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678-681.
- 28.- Barclay, R., et al. 1989 Metabolism of mycobacteria in tissues. In Ratledge, C. et al. (eds). *The biology of mycobacteria*. Academic, London. Vol. 3.
- 29.- Barry, C.E., et al. 1998 Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid. Res.* 37: 143-179.
- 30.- Daffe, M., and Draper P. 1998 The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 59: 131-203.
- 31.- Jarlier, V., and Nikaido H. 1990 Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* 172: 1418-1423.

- 32.- Trias, J. and Benz E. 1994 Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 14: 283-290.
- 33.- Goren, M.B., and Cernich M., Brokl O. 1978 Some observations on mycobacterial acid-fastness. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118: 151-154.
- 34.- Behling, C.A., Bennett B., Takayama K., and Hunter R.L. 1993 Development of a trehalose 6,6-dimicolate model which explains cord formation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 61: 2296-2303.
- 35.- Schabbing, R.W., García A., Hunter R.L. 1994 Characterization of the trehalosa 6,6-dymicolate surface monolayer by scanning tunneling microscopy. *Infect. Immun.* 62: 754-756.
- 36.- Liu, J., Rosenberg E.Y., and Nikaido H. 1995 Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 11254-11258.
- 37.- Barry, C.E., 2001 Interpreting cell wall "virulence factors" of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol.* 9: 237-241.
- 38.- Batoni G., Esin S, Pardini M., Bottai D., Senesi S., Wigzell H., and Campa M. 2000 Identification of distinct lymphocyte subsets responding to subcellular fractions of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG). *Clin. Exp. Immunol.* 119: 270-279.
- 39.- Andersen A.B., and Brennan P. 1994. Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. In Bloom B.R. (ed) *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. N.Y

- 40.- Seibert, F.B., and Munday B. 1932. The chemical compositions of the active principles of tuberculin. XV. A precipitated purified tuberculin protein suitable for the preparation of a standar tuberculin. Am. Rev. Tuberc. 25: 724-737.
- 41.- Wright G.L., and Roberts D.B. 1974. Two-dimensional immunoelectrophoresis of micobacterial antigens. Comparison with a reference system. Am. Rev. Respir. 109:306-310
- 42.- Young, R.A. and Bloom B.R., Grossinky C.M., Ivany J., Thomas D., and Davis R.w. 1985a. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Pro. Natl. Acad. Sci. 82: 2583-2587
- 43.- Nagai S., Wiker H.G., Harboe M., and Kinimoto M. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 59: 372-382.
- 44.- Thole, J.E.R., Dauwersw H.G., Das P.k., Groothuis D.G., Schouls L.M., and van Embden J.D.A. 1985 Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG. DNA and _expression of antigens in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 50: 800-806.
- 45.- Cover B.A., Spencer J.S., Orme I.M., and Belisle J.T. 2001. The application of proteomics in defining the cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Proteomics. 4:574-586.
- 46.- Abou-Zeid C., Smit I., Grange J.M., Ratliff T.L., Steele J., and Rook G.A.W. 1988b The secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their relationship to those recognized by the available antibodies. J. Gen Microbiol. 134: 531-538.

- 47.- Rambukkana, A.P.K., Das P.K, Chand A., Bass J.G., Groothuis D.G., and Kolk A.H.J. 1991. Subcellular distribution of monoclonal antibody defined epitopes on immunodominant. *Mycobacterium tuberculosis* proteins in the 30-kDa region identification and localization of 29/33-kDa doublet proteins on mycobacterial cell wall. *Scand, J. Immunol.* 33: 765-775.
- 48.- Huygen, K.J.P., et al 1988b. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 27: 187-194.
- 49.- Harboe, M., Oettinger T., Wiker H.G., Rosenkrands I., and Andersen P. 1996 Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 64: 16-22.
- 50.- Sorensen, A.L., 1995 Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63: 11710-1717.
- 51.- Berthet, F.X., et al. 1981 *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CPF-10). *Microbiology.* 144: 3195-3203.
- 52.- Arend S.M., Andersen P., van Meijgaarden K.E., Skjot R.L., et al. 2000 Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 181: 1850-1854.

- 53.- Messner, P., 1997 Bacterial glycoproteins. *J. Glycoconjugate*. 14: 3-11.
- 54.- Daniel, T.M., and Wishieski J.J. 1970 The reaction of concanavalina A with mycobacterial culture filtrate. *Am. Rev. Respir. Dis.* 101: 762-770.
- 55.- Montaña, L.F., Massó F., Páez A., Sandoval S., Vazquez L., Sánchez L., Fournet B., and Zenteno E. 1994 Isolation of a 32 kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein by lectin affinity chromatography. *Com. Biochem. Physiol.* 108:265-272.
- 56.- Espitia, C., and Mancilla R. 1989 Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 77: 378-383.
- 57.- Garbe T., Harris D., Vordermeier M., Lathigra R., et al. 1993 Expression of the 19-kilodalton antigen *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect. Immun.* 61: 260-267.
- 58.- Harboe M., and Wiker H.G. 1992 The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A review. *J. Infect. Dis.* 166: 874-884.
- 59.- Dobos K.M., Swiderek K., Khoo K.H., Brennan P.J., and Belisle J.T. 1995. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. 63: 2846-2853.
- 60.- Espitia C., Espinosa R., Saavedra R., Mancilla R., et al., 1995 Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium*

tuberculosis 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47- kilodalton antigens. *Infect. Immun.* 63: 580-584.

61.- Massó F.A., Varela E., Páez A., Zenteno E., and Montaña L.F. 1998 Identification of major glycoconjugates from *Mycobacterium bovis* culture filtrate by biotin-hidrazyde labeling. *J. Glycoconjugate.* 15: 843-846.

62.- Nagai S.J., Matsumoto J., and Nagasuga T. 1981 Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 31: 1152-1160.

63.- Harboe M., Nagai S., Patarroyo M.E., et al. 1986 Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 52: 293-302.

64.- Wiker H.G., Konstantin P., Lyashchenko A., et al 1998 Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 66: 1445-1452.

65.- Horboe, M.H. G., Wiker H.G., Duncan J.R., García M.M., Dukes T.W., Brooks B.W., Turcotte C., and Nagai S. 1990 Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 913-921.

66.- Roche, P.W., Triccas J.A., Avery D.T., Fifis T., Billman-Jacobe H., and Britton W.J. 1994 Differential T cell responses to mycobacteria-secreted proteins distinguish vaccination with bacille Calmette-Guérin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 170: 1326-1330.

67.- Stenger S., and Modlin R.L. 1999 T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:89-93.

68.- Orme, I.M., Andersen A.P., and Boom H. 1993 T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Infect. Dis.* 167: 1481-1497.

69.- Orme I. M., and Cooper A.M. 1999 Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol.* 20:307-311.

70.- Barnes, P. F., Modlin R.L., and Ellner J.J. 1994 T cell responses and cytokines. In Bloom, B. R. (ed). *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.*

71.- Smith S.M., Klein M.R., Malin A.S., Sillah J., Huygen K., Andersen P., McAdam P.W.J., and Dockrell H.M. 2000 Human CD8 T cells specific for *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in the Gambia. *Infect. Immun.* 68: 7144-7148.

72.- Seibert F. B., and Glenn, J.T. 1941. Tuberculin purified protein derivative. Preparation and analyses of a large quantity for standard. *Am. Rev. Tuberc.* 44: 9-25.

73.- Fifis T., Rothel J.S., and Wood P.R. 1994. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation. *Veter. Microbiol.* 40: 65-81.

74.- De Kator, I.N., and Ritacco, V. 1994. *Vet. Microbiol.* 40: 5-14.

75.- Youmans, G. P. 1997 *Tuberculosis.* The W.B. Saunders Co., Philadelphia.

76.-Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., et al 1998 Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393 :537-544.

77.- Jungblut, P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., et al. 1999 Comparative proteoma analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.* 33: 1103-1117.

78.- Sugden E.A., Stilwell K., Watson D.C., Rohonczy E.B., and Martineau P. 1996 Purification of *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo antigens by chromatofocusing, lectin-affinity chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3: 438-443.

79.- Daniel, T.M., and Andersen P.A. 1978 The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117: 533-539.

80.- Yano, O. T., Fukuda T., Abe H., and Sudo T.1984 Purification and characterization of a tuberculin-active substance from *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Biochem.* 96: 523-531

81.-Lara M, Servin-Gonzalez L, Singh M, Moreno C, Cohen I, Nimtz M, Espitia C. 2004 Expression, secretion, and glycosylation of the 45- and 47-kDa glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* *Appl Environ Microbiol.* 70:679-85

- 82.- Benz I., and Schmidt. 2002. Never say never again: protein glycotilation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 45;2:267-276.
- 83.- Wayne, L.G. 1994 Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13; 11: 908-914.
- 84.- Smeulders M. J. 1999. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.* 181: 270-283.
- 85.- Young, D.B., 2000 Current tuberculosis vaccine development. *Clin. Infect. Dis.* 30 (suppl3): s254-s256.