

172
2c



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION DE GLICOCONJUGADOS A
PARTIR DEL EXTRACTO PROTEICO DEL
MEDIO DE CULTIVO DE *Mycobacterium bovis*

T E S I S
Que para obtener el titulo de
B I O L O G O
p r e s e n t a
ELVIRA VARELA LOPEZ

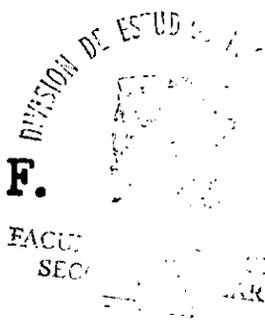


Director de Tesis: DR. FELIPE ALONSO MASSO ROJAS

México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



257830



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Purificación de Glicoconjugados a Partir del Extracto Proteico
del Medio de Cultivo de Mycobacterium bovis

realizado por Varela López Elvira

con número de cuenta 8955308-0, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Felipe Alonso Massó Rojas

Propietario

Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

Propietario

Dr. Raúl Chaves Sanchez

Suplente

Dr. Fernando Díaz Otero

Suplente

M.C. Araceli Páez Arenas

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO DE
DE BIOLOGIA

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

A mi madre quiero brindarle con todo mi cariño este trabajo, como un legado a su fuerza, valor y ejemplo para seguir adelante, a todo su esfuerzo y dedicación por darnos un mejor futuro que hoy se refleja en la razón de estas palabras. Gracias por entregarnos parte de tu vida.

A mis hermanas Cristina, Eva y Gige por su cariño, por los momentos difíciles y gratos que hemos vivido juntas, por creer siempre en mí, por su apoyo y por que son parte muy importante de mi vida. A mis hermanos Gerardo, Raymundo por lo que he aprendido de ellos.

A la memoria de mi abuelito Antonio que fué pilar y guía en mi vida, quien me inculcó con su ejemplo el apego al trabajo, a la familia, y al esfuerzo constante en lograr mis aspiraciones y mantener las alcanzadas.

Mi más profundo agradecimiento a tres personas muy importantes no solo para la realización de este trabajo, sino también por sus enseñanzas, su tiempo y su trabajo que han compartido conmigo, y que a través de sus actos y sus consejos han estimulado en mí el espíritu de crecer tanto en el aspecto académico como personal.

Al Dr. Luis Felipe Montaña

Al Dr. Felipe Massó

A la M.C. Araceli Páez

Al Dr. Fernando por el apoyo brindado y a sus
acertados comentarios en la revisión al manuscrito

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Mario,
Guadalupe, Emma, Roxana, Maite, Vicente, Vero,
Aide, y Gilberto, por su apoyo y compañerismo.

CONTENIDO

I INTRODUCCION

1. Historia
2. Que es la tuberculosis
3. Epidemiología de la tuberculosis
4. Transmisión de la tuberculosis
5. Patogénesis de la tuberculosis
6. Características de la micobacteria
7. Antígenos micobacterianos
8. Glicoproteínas
9. Detección de glicoproteínas

II. ANTECEDENTES

III. HIPOTESIS

IV. OBJETIVOS

V. MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo micobacteriano
2. Electroforésis en geles de poliacrilamida con

dodecil sulfato de sodio

3. Marcaje de proteínas en aminos con biotina
4. Marcaje de glicoproteínas con biotina
5. Purificación de glicoproteínas
6. Tratamiento con endoglicosidasa a las glicoproteínas biotiniladas
7. Digestión proteolítica

VI. RESULTADOS

VII. DISCUSION

VIII. CONCLUSIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

1. HISTORIA

La tuberculosis ha sido la principal causa de muerte en Europa y en el el resto del mundo a través de la historia. La tuberculosis, también conocida como consunción, fué común en ciudades de Europa durante la primer mitad del siglo XIX llegando a convertirse en una gran epidemia (La gran plaga blanca), donde una de cada cuatro muertes se debía a tuberculosis⁽¹⁾; con esta incidencia tan alta los europeos trajeron al bacilo de la tuberculosis a Norte América lo que ocasionó una mortalidad tan elevado como 650/100 000 habitantes⁽²⁾; sin embargo se ha encontrado que el bacilo ya estaba presente en América desde tiempo atrás, este fué hallado en pulmones de momias del sur de Perú, que datan de hace casi 700 años d. C., y casos similares se han descrito en otras momias de Sudamerica⁽³⁾. Deformidades en esqueletos sugieren que la enfermedad de Pott que datan de 160 a. C. han sido encontradas en Peru, también un gran número de figuras y dibujos prehistóricos representando a la enfermedad de Pott (tuberculosis ósea)⁽⁴⁾. Existen diferentes cuadros clínicos de la tuberculosis, por lo que a través de la historia ésta ha recibido diferentes nombres, así la tuberculosis pulmonar se conoció desde tiempos de Hipócrates como tisis, la tuberculosis de la piel fué clasificada como lupus vulgaris y la de los huesos como enfermedad de Pott, esta última caracterizada por la fusión de las vertebrae y la deformación de la espina dorsal, lo que ha facilitado a los historiadores reconocer la existencia de la

tuberculosis en momias que datan de 2000 a 4000 años a de C; esto la convierte en una de las enfermedades documentadas más antiguas a la que se ha enfrentado el hombre⁽⁵⁾

Desde la medicina hipocrática se consideraba a la tuberculosis como un tipo especial de hemorragia pulmonar; Galeno consideró a esta hemorragia como el resultado de una ruptura vascular, que produce una ulceración local originando tisis o tuberculosis⁽⁶⁾; Frascatoro, (1546), sospechó el carácter contagioso de la enfermedad, hecho que fué demostrado por el veterinario francés Jean Antoine Villemin (1865) cuando inyectó conejos con material caseoso proveniente de lesiones tuberculosas de humanos y de esta manera logró transmitirles la enfermedad⁽⁷⁾.

En Marzo de 1882 Roberto Koch hace una presentación en la Sociedad Fisiológica de Berlín, la cual cambia el concepto acerca de la tuberculosis y las enfermedades infecciosas. Koch describe al bacilo causante de la tuberculosis, (Mycobacterium tuberculosis), desarrolla técnicas de tinción para poderlo observar y fué el primero en emplear medios de cultivo sólidos. Los criterios que utilizó para probar que el organismo que descubrió, causaba la tuberculosis han sido ampliamente adoptados y actualmente se conocen como postulados de Koch, el más importante: "fué necesario aislar el bacilo del cuerpo, para crecerlo en cultivo puro ...; y, administrar el bacilo aislado a animales, para reproducir la misma condición de morbilidad..."⁽⁸⁾

Para 1932, Koch anuncia que el cultivo filtrado cura la enfermedad, afirmación que fué inmediatamente controversial y desacreditada⁽⁵⁾. No obstante, esos filtrados, más tarde

parcialmente purificados, se volvieron el principal medio para establecer la presencia de infección en un individuo, actualmente se conoce como prueba de PPD (derivado proteico purificado)

Para 1919, Albert Calmette y Camille Guérin logran atenuar cepa de M. bovis después de 230 subcultivos, logrando obtener una vacuna, la cual ha sido aplicada en el hombre desde 1921, a pesar que a lo largo de su historia se ha puesto en tela de juicio la eficacia del bacilo de Calmette-Guérin (BCG) aun es usado ampliamente en el mundo ⁽⁹⁾.

Posterior al descubrimiento del agente etiológico, el estudio de la tuberculosis se inclinó más hacia la investigación inmunológica. Chase y Landsteiner demostraron que la respuesta de hipersensibilidad retardada a la tuberculina podía ser transferida a animales no sensibilizados con células de animales inmunizados. Después Lefford comprobó que en esta respuesta estaban involucradas las células del sistema inmune, particularmente linfocitos T⁽¹⁰⁾. Hoy se conoce que el sistema inmune responde a proteínas antigénicas de la micobacteria mediante la secreción de citocinas, incluyendo notablemente interleucinas 1 y 2 (IL-1, IL-2), interferón gamma (INF- γ), y factor de necrosis tumoral (TNF- α) los cuales son los principales mediadores de la respuesta inmune de protección en tuberculosis⁽⁹⁾

En la actualidad la utilización de técnicas modernas, como la producción de anticuerpos monoclonales y la introducción de la biología molecular ha permitido la clonación y expresión de algunos genes que codifican para proteínas con actividad

inmunológica⁽¹¹⁾, asimismo se continúan usando otros procedimientos bioquímicos y fisicoquímicos buscando aquellas moléculas del bacilo, para las cuales la respuesta inmunitaria sea predominante, específica y eficaz.

2. QUE ES LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es considerada como una enfermedad transmisible crónica, causada primordialmente por Mycobacterium tuberculosis⁽¹²⁾, esta enfermedad se caracteriza por causar lesiones granulomatosas de evolución lenta que originan gran destrucción de los tejidos; aunque M. tuberculosis es la principal especie patógena para el hombre además de M. bovis, M. microti, M. africanum, M. bovis BCG, miembros del complejo M. tuberculosis; existen otras especies de micobacterias que han demostrado ser también patógenas para otras especies como: M. kansasii, M. simiae, M. marinum, M. scrofulaceum, M. avium-intracellulare, M. fortuitum-chelonei, M. ulcerans, M. bovis y M. balnei^(13,14,15).

En el hombre los órganos principalmente afectados son los pulmones⁽¹⁶⁾, aunque pueden ser dañados casi todos los tejidos del cuerpo; las formas extrapulmonares se ponen de manifiesto como tuberculosis de peritoneo, de huesos y articulaciones, del sistema genitourinario, de las meninges y del sistema nervioso central. Cuando la sangre llega a ser invadida por la bacteria a través de erosiones de la pared vascular en el foco de infección, esta se disemina por todo el organismo dando lugar a la tuberculosis generalizada o miliar aguda⁽¹⁷⁾.

3. EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS

Hoy, a más de cien años del descubrimiento del bacilo de Koch (1882), la tuberculosis todavía es un gran problema de salud pública en las naciones subdesarrolladas de Asia, Africa, y América ⁽¹¹⁾. Según los datos aportados recientemente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 8 millones de nuevos casos se presentan globalmente cada año; 2.9 millones mueren por su causa, y alrededor de un tercio de la población mundial, aproximadamente 1700 millones de personas han sido infectadas por M. tuberculosis; la gran mayoría de las personas infectadas viven en países en desarrollo. En países industrializados, 80% de las personas infectadas son mayores de 50 años mientras que en países en desarrollo 75% de personas infectadas son menores de 50 años de edad ⁽¹⁸⁾

Esta enfermedad tiene un devastador efecto en los países en desarrollo, en donde ocurren el 95% de los casos. Ochenta por ciento de estos casos ocurren en personas en edad productiva (15 a 59 años). De acuerdo al reporte de la OMS de 1989, 1.3 millones de casos y 45000 muertes por tuberculosis ocurrieron en menores de 15 años en países en desarrollo (OMS,1989).

La tuberculosis es una enfermedad que se relaciona con el hacinamiento y la sobrepoblación, situaciones que aumentan la oportunidad de transmisión. Aun cuando la infección es controlada en la mayoría de los casos por una respuesta inmune eficaz, la enfermedad clínica solo se manifiesta en una pequeña porción de las personas infectadas, existe un incremento en la morbilidad de este padecimiento, sobre todo en personas

coinfectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La infección con VIH es el factor de riesgo más alto que se conoce actualmente para desarrollar la enfermedad, usualmente se asume que la tuberculosis postprimaria es seguida de la reactivación de la infección latente⁽¹⁹⁾, lo cual ilustra el importante papel que juega el sistema inmune en la restricción de esta enfermedad. Por otro lado existen varios factores que pueden hacer que la respuesta inmune sea ineficiente. Entre estos factores se encuentran: la desnutrición, infecciones intercurrentes, fatiga crónica⁽¹⁷⁾, condiciones de inmunosupresión debida a fármacos, etc.; por otra parte también se ha observado que hay mayor susceptibilidad en determinadas etnias, así los africanos, indígenas americanos, negros, y esquimales son más vulnerables a desarrollar la enfermedad que los judíos, caucásicos y mongólicos; aunado a esto la resistencia contra la tuberculosis disminuye por ciertas enfermedades como la diabetes mellitus y la silicosis. Actualmente existe una gran preocupación en el mundo por las variaciones epidemiológicas que se han producido, debido a que, como habíamos mencionado, la tuberculosis es una enfermedad oportunista humana, especialmente en países desarrollados, así como la aparición de cepas multirresistentes a fármacos antituberculosos⁽²⁰⁾.

4. TRANSMISION DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis suele contagiarse de una persona a otra por inhalación de bacilos transportados por el aire, expulsados al

toser o estornudar, también pueden transmitirse por las heces de pacientes con lesiones gastrointestinales u orina de personas con infección del aparato urinario. Los bacilos son muy resistentes a la desecación, por lo que pueden permanecer viables varios meses en el polvo o en artículos de uso diario⁽²¹⁾ .

El bacilo cuenta con cuatro vías de entrada al cuerpo: 1) aparato respiratorio, 2) tejido linfoide bucofaringeo, 3) intestino, y 4) piel (poco frecuente por contaminación de una herida)⁽²¹⁾. De entre estas vías, la aerógena es la que causa un mayor numero de infecciones clínicas, la infección se inicia mediante la inhalación de pequeñas gotas, con diámetro menor de 100 μm , el término medio es de 10 μm conteniendo de 3 a 10 bacilos aproximadamente⁽²²⁾, las cuales son transportadas por el aire, las partículas lo suficientemente pequeñas, que corresponden a solo el 6% del total inhalado⁽²³⁾, logran traspasar las barreras mucosas y ciliares de la nariz, boca y faringe, los bacilos llegan a los alveolos, ahí se adhieren a las mucosas⁽¹¹⁾ y son fagocitadas por macrófagos alveolares. Las otras vías de diseminación son: a) por ingesta de alimentos contaminados, principalmente leche, esta vía ha disminuido con la pasterización y b) la vía cutánea la menos frecuente y que es el producto de abrasiones, traumatismos ó inoculación accidental con objetos contaminados⁽¹⁰⁾ .

5. PATOGENESIS DE LA TUBERCULOSIS

La patogénesis de la tuberculosis involucra un gran número de interacciones entre el microorganismo y su hospedero, pero se pueden agrupar en 4 puntos principales: 1) la virulencia de la micobacteria, 2) el papel de la hipersensibilidad, 3) el papel de la inmunidad o resistencia, y 4) la eficiencia de la formación del granuloma, reacción característica de la tuberculosis.

La virulencia de la micobacteria está dada por una serie de moléculas antigénicas de las cuales trataremos más adelante .

Las reacciones de hipersensibilidad debidas al bacilo de la tuberculosis juegan un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad ⁽²¹⁾. Esta hipersensibilidad es de tipo retardado, y es el producto de una reacción exagerada del sistema inmun ⁽²⁴⁾ en un intento por modificar el curso de la enfermedad; esta respuesta destruye macrófagos no activados dentro de los cuales el bacilo se multiplica ⁽²⁵⁾. Cuando una persona tiene contacto por primera vez con M.tuberculosis, no se produce un cambio visible pero su respuesta inmune es claramente alterada. Esta respuesta se manifiesta de manera diferente en una segunda exposición con la bacteria ⁽²⁴⁾ en donde la patogenicidad de la bacteria no resulta de una toxicidad inherente a la misma, sino a su capacidad para producir hipersensibilidad en el huésped, la cual puede ser medida a través de la prueba de tuberculina. El estímulo de esta prueba evoca una reacción local que produce un área de induración de unos 5 mm de diámetro en 48-72 horas. Si se ha desarrollado una hipersensibilidad muy marcada o si existe una infección activa el diámetro de la lesión puede ser

de 40 a 70 mm. e incluso el centro del sitio de inoculación puede volverse necrótico. Debido a que esto ocurre en casos extremos una respuesta moderada positiva al PPD solo significa infección, pero no necesariamente enfermedad, y cuando una persona llega a ser PPD positivo, usualmente permanece así toda su vida, debido a que el bacilo persiste en forma latente o bien por la existencia de linfocitos T de memoria producidos cuando se vacuna con el bacilo de Calmette Guérin (BCG)⁽²¹⁾

En cuanto al aspecto inmunológico de resistencia, en la etapa inicial de la infección, el bacilo es inhalado hasta los alveolos donde se desencadena una respuesta inflamatoria inespecífica, con un infiltrado básicamente compuesto por neutrófilos y macrófagos⁽²⁴⁾. Durante este período, las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos alveolares, dichas células no son capaces de destruir a los bacilos, éstos persisten y pueden multiplicarse sin restricción⁽²¹⁾, o permanecer en un estado de latencia, la destrucción depende del poder microbicida de los macrófagos alveolares y la virulencia del bacilo ingerido⁽²⁵⁾.

Cuando el bacilo se multiplica hasta que el macrófago estalla, la carga bacilar es ingerida por otros macrófagos alveolares activados y por macrófagos no activados, atraídos al sitio de la lesión por la misma liberación bacilar, restos celulares y una variedad de factores quimioattractantes. En los macrófagos inmaduros el bacilo se multiplica logarítmicamente hasta que es detenido por el proceso de necrosis caseosa, en la cual el hospedero destruye localmente su propio tejido para controlar la multiplicación intracelular del bacilo⁽²⁵⁾, en este tejido destruido con apariencia de queso (caseum) es capaz de

mantenerse en estado de letargo por grandes períodos de tiempo, de esta forma la enfermedad permanece latente⁽²⁶⁾. Sin embargo, aun si la inmunidad celular es fuerte, la enfermedad puede progresar, de tal manera que el caseum sufre licuefacción por mecanismos poco entendidos dando paso a la formación de cavidades. Este material en licuefacción es un excelente medio de crecimiento para el bacilo, donde se multiplica extracelularmente, con frecuencia en grandes cantidades, lo que trae como consecuencia que las paredes bronquiales cercanas lleguen a necrosarse y romperse y formar una cavidad, entonces el bacilo junto con el material en licuefacción son descargados desde las vías aéreas inferiores hacia otras partes del pulmón y al exterior⁽²⁵⁾ (Fig. 1)

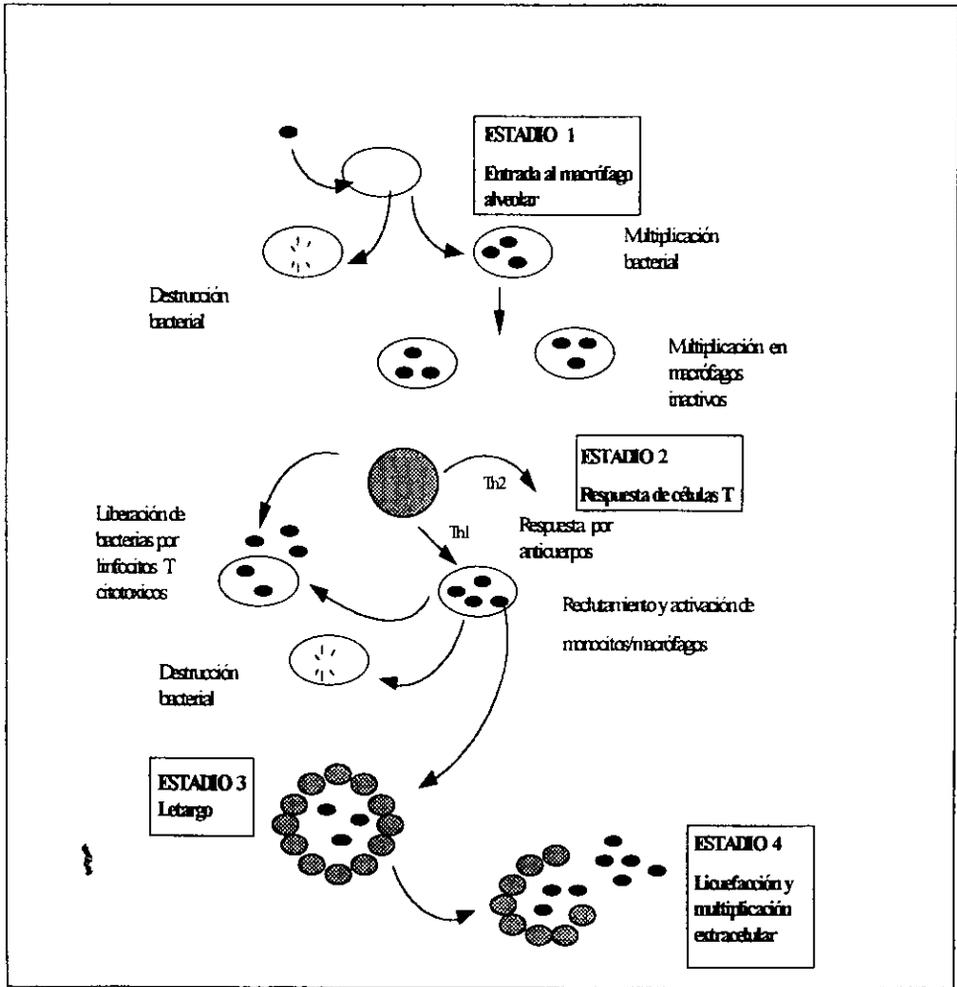


Figura 1 Patogénesis de la tuberculosis. (Ann. Rev. Microbiol. 1995 : 644)

Si la respuesta inmune es mejor que en el caso anterior pero no del todo eficiente se puede generar la presencia crónica del bacilo lo que puede dar lugar a una respuesta de hipersensibilidad retardada con la formación de uno o varios granulomas, esta lesión se caracteriza por un acúmulo de células, con un centro de macrófagos y células epitelioides las cuales son derivadas de macrófagos activados, bajo la estimulación crónica mediada por citocinas; estos macrófagos secretan continuamente TNF, lo que potencia la inflamación; algunas veces pueden estar presentes células gigantes, referidas como células de Langerhans, formadas por la coalescencia y fusión de células epitelioides. En la zona central puede llegar a observarse una zona de necrosis, alrededor del núcleo de macrófagos y células epitelioides se localizan tanto linfocitos T como fibroblastos⁽²¹⁾.

La eficiencia de la formación del granuloma reacción característica de la tuberculosis, depende de dos tipos de células que son cruciales para el desarrollo de la hipersensibilidad retardada: macrófagos y linfocitos T⁽²⁴⁾; cuando los macrófagos alveolares presentan el antígeno a través de moléculas de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a los linfocitos T⁽²⁷⁾, liberan un gran número de citocinas proinflamatorias las cuales atraen y activan a macrófagos. Estas incluyen INF- α linfotoxinas, e interleucinas. Los macrófagos activados de esta manera se convierten en la principal fuente de TNF- α , esto lleva al desarrollo del granuloma por autoamplificación, con diferenciación de macrófagos en células epitelioides⁽²¹⁾.

Durante la migración de los monocitos de los vasos sanguíneos al sitio de la infección, estas células liberan hidrolasas lisosomales que atacan y destruyen a la pared vascular y el tejido adyacente, además contribuyen a este daño otras moléculas como el INF- γ , linfoquinas y otros factores liberados por los linfocitos estimulados⁽²⁷⁾

Aunado a estos eventos ocurren diversos fenómenos estrechamente relacionados como la producción de anticuerpos, efectos de inmunosupresión y autoinmunidad, además existe una actividad adyuvante inespecífica de la respuesta inmune. Todo esto pone de manifiesto la complejidad de la relación huésped-parásito en esta infección⁽¹¹⁾.

6. CARACTERÍSTICAS DE LA MICOBACTERIA

M. tuberculosis difiere de la mayoría de bacterias, y aun de otras micobacterias, en ser un patógeno que puede multiplicarse dentro de las células fagocíticas de su hospedero, haciendo de la interacción entre bacteria y hospedero un evento de gran importancia.

A diferencia de la mayor parte de las otras bacterias patógenas que son aerobias y anaerobias facultativas, el bacilo de la tuberculosis es un aerobio estricto, su dependencia al oxígeno molecular probablemente explica en parte su tendencia a crecer principalmente en el pulmón⁽¹¹⁾. El bacilo causante de la tuberculosis presenta como rasgos característicos el ser curvado o recto y a veces filamentosos, no móvil, de 1 a 4 μm de

longitud por 0.2 a 0.5 μm de ancho⁽²⁸⁾. Se caracteriza por ser ácido-alcohol resistente, por lo que únicamente se logra observar con la tinción de Ziehl Neelsen, (carbolfucsina y azul de Loeffler) o la de Kinoyoun (fucsina-fenol-alcohol-agua y azul de Loeffler) o bien tinciones con colorantes fluorescentes tales como la auramina-rodamina^(29,30).

Su crecimiento en los medios de cultivo es típicamente lento, el tiempo de duplicación más corto observado en medios ricos es de 12 horas⁽²⁸⁾. La bacteria muestra generalmente una sensible preferencia nutricional por los lípidos, la yema de huevo ha sido un constituyente de los medios enriquecidos para su aislamiento; puede ser crecido en los medios líquidos sintéticos⁽²⁸⁾ como compuestos de glicerina, solución de oligoelementos y suero de buey (Youmans), con albúmina bovina (caldo Dubos Middlebrook 7H9), desarrollo en el fondo del tubo a los 6 días, con formación de un velo en la superficie a las 3 semanas. Los bacilos adoptan una disposición serpenteante, como si fueran cuerdas, carácter que guarda relación con la virulencia⁽²⁹⁾.

La característica química más importante de las micobacterias es su alto contenido en lípidos, con una proporción que oscila entre el 20 y 60% de su peso seco.

La sorprendente abundancia de lípidos en la pared celular explica el carácter hidrófobo de los organismos, que se muestra por su tendencia a adherirse unos a otros durante su crecimiento en medios acuosos y a flotar en la superficie. La riqueza de lípidos en la pared pueden explicar algunas de las peculiaridades de las micobacterias, por ejemplo la relativa impermeabilidad a los colorantes, la resistencia a la acción de

los ácidos, álcalis y la resistencia a la acción de los anticuepos, junto con el complemento.

Entre los lípidos que forman la pared celular de las micobacterias se hallan las ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes), la naturaleza y localización de dichos compuestos son los responsables de las reacciones de la tinción ácido-alcohólica de las micobacterias. Entre los glucolípidos esta el micósido denominado factor cuerda, es un componente de superficie asociado con la virulencia y el crecimiento en forma de cordones. Diferentes pruebas relacionan este factor con la virulencia: 1) esta sustancia inhibe la migración de leucocitos polimorfonucleares normales in vitro, 2) es más abundante en las cepas virulentas, 3) su extracción vuelve a las bacterias no virulentas, 4) el bacilo obtenido tras pases repetidos en animales o de cultivos jóvenes es más virulento y posee mayor contenido en factor cuerda que las cepas de cultivo viejos. Sin embargo este no es el único componente determinante del grado de virulencia. Otro micósido de interés es la cera D (ácidos micólicos y un glucopéptido) que se extrae a partir de la capa basal de la pared. En emulsión (adyuvante de Freund), esta fracción se semeja a la micobacteria total, ya que estimula la inmunogenicidad contra diferentes antígenos al mezclarse con ellos. Más aún, una mezcla de cera D y proteínas del bacilo induce una hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina⁽²⁸⁾. Los sulfolípidos, son potentes inhibidores de la fusión fago-lisosoma; la capacidad de sobrevivencia en los macrófagos puede ser explicada parcialmente debida al fallo de esta fusión⁽²⁹⁾.

Los polisacáridos constituyen uno de los componentes más abundantes en los filtrados y extractos de micobacterias; gran parte se hallan unidos químicamente con los lípidos presentes en la pared celular. La fracción polisacárida contiene glucano, manano, arabinomanano y arabinogalactano, y se ha sugerido que parte de la pared celular y la cera D estarían formados por un complejo ácido micólico-arabinogalactán⁽²⁸⁾.

Otras moléculas de gran importancia, sino es que las más importantes en la patogenia de la micobacteria, son las proteínas, ya que son las responsables de las reacciones tanto de protección como de hipersensibilidad retardada y constituyen los antígenos principales que generan la producción de anticuerpos.

7. ANTIGENOS MICOBACTERIANOS

Como adelantamos en el apartado anterior la micobacteria es desde el punto de vista inmunológico, un organismo complejo en muchos aspectos, debido a la multiplicidad de antígenos de diversa naturaleza química que lo conforman, los cuales poseen diversos grados de inmunogenicidad y algunos de ellos presentan capacidad para inducir múltiples alteraciones en el sistema inmunológico del huésped.

Desde que Koch utilizó el material flotante de M. tuberculosis (tuberculina vieja) para medir la respuesta inmune del huésped en pruebas cutáneas, se han hecho una gran cantidad de intentos subsecuentes para identificar los componentes activos presentes en este material^(31,32).

Desde el año de 1978, en que Daniel y Janicki proponen un sistema de referencia para antígenos micobacterianos basándose en su reactividad con antisueros hiperinmunes en un sistema de inmunoelectroforésis, ayudados por estudios de fraccionamiento bioquímico^(32,33), hasta la actualidad se han logrado definir más de 50 antígenos; algunos de estos han sido aislados de filtrados de cultivo micobacteriano⁽³⁴⁾.

En esta última década se han hecho grandes avances en el conocimiento de la estructura antigénica de M. tuberculosis y M. bovis, ambas micobacterias son organismos estrechamente relacionados, y están referidos como miembros del denominado "complejo tuberculosis", en el que están también incluidos el bacilo de Calmette-Guerín, M. microti y M. africanum, gracias al avance en las técnicas de purificación por métodos bioquímicos y fisicoquímicos, inmunoelectroforesis, producción de anticuerpos monoclonales, así como por el advenimiento de las nuevas técnicas de biología molecular como el sistema de ADN recombinante, demostrando que ambas especies comparten la mayoría de proteínas antigénicas⁽³⁵⁾.

El número de antígenos proteicos que hasta ahora se han logrado caracterizar tanto en su secuencia y como en su función son alrededor de 10⁽³²⁾, grupo al cual pertenece la proteína de 38 kDa, importante antígeno de M. tuberculosis que induce una respuesta inmune tanto de tipo celular como de tipo humoral; se ha observado que existe una alta concentración de anticuerpos contra esta proteína en pacientes con tuberculosis; estos anticuerpos tienen alta especificidad contra M. tuberculosis como se ha demostrado mediante una prueba de inhibición empleando anticuerpos monoclonales, por lo que se considera

como un candidato para el desarrollo de un nuevo sistema de diagnóstico para tuberculosis⁽³⁶⁾.

Doce proteínas más han sido reportadas, de las cuáles únicamente se conoce su secuencia, entre ellas se encuentran las proteínas de 30-31 y 58-60 kDa de M. tuberculosis que presentan afinidad por fibronectina y se cree tengan que ver con mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Existen otros antígenos no bien caracterizados que se hallan actualmente bajo investigación activa, estos son alrededor de 21; se han reportado otros 14 antígenos distintos de los anteriores pero estos últimos solo han sido identificados por su secuencia amino terminal. ⁽³²⁾.

Entre las proteínas que se han logrado purificar y caracterizar se encuentran algunas que contienen residuos de azúcares, por mencionar algunas tenemos el antígeno de 38 kDa de M. tuberculosis purificado, por primera vez, por Daniel y Wisniewski en 1970, utilizando cromatografía de afinidad con concanavalina A ⁽³⁷⁾, posteriormente, Espitia y Mancilla confirmaron esta observación, en 1989, logrando aislar la proteína ^(38,39). Esta misma autora ha identificado otras proteínas con residuos de carbohidratos en el complejo de 45 a 47 kDa del medio del cultivo de M. bovis⁽⁴⁰⁾ que presenta reactividad cruzada con antígenos de 50 a 55 kDa de M. tuberculosis⁽⁴¹⁾ considerados ambos como glicoproteínas. Recientemente, Montañó y colaboradores, lograron aislar y caracterizar una proteína de 32 kDa de M. tuberculosis por cromatografía de afinidad con otra lectina obtenida de Lens culinaris; en donde muestran, por cromatografía de gas, que dicha proteína contiene residuos de galactosa, manosa, xilosa,

NacGlc, así como la reactividad de un anticuerpo monoclonal contra esta proteína ⁽⁴²⁾.

8. GLICOSILACION

El hallazgo de los glicoconjugados mencionados anteriormente ha sido de gran interés para algunos investigadores no solo con respecto al proceso de glicosilación en procariotes sino a su papel en la relación hospedero-bacteria, ya que se ha demostrado que proteínas glicosiladas involucradas en las interacciones con moléculas de CMH pueden inhibir la presentación de péptidos determinantes para el reconocimiento por células T⁽⁴³⁾.

Muchos de los procariotes que se sospecha que poseen glicoproteínas pertenecen a las arqueobacterias, y se ha demostrado en estos microorganismos la presencia de una verdadera glicoproteína en la superficie celular⁽⁴⁴⁾. Se han propuesto algunas hipótesis acerca de la capacidad de glicosilar por parte de algunos otros microorganismos, como Neisseria meningitis, en donde la glicosilación del pili afecta su adherencia a las células endoteliales⁽⁴⁵⁾; o la N-glicosilación de la proteína de Staphylococcus sanguis asociada a la agregación plaquetaria, con lo que puede aumentar su colonización en el endocardio⁽⁴⁶⁾. Sin embargo son pocas las glicoproteínas bacterianas solubles que han sido encontradas, como las de Cellulomonas fimi⁽⁴⁷⁾, Streptococcus faecium⁽⁴⁸⁾ y Streptomyces spp⁽⁴⁹⁾, M tuberculosis y M bovis ^(39, 50, 51.).

No obstante de la existencia de antecedentes en la capacidad de algunas bacterias para realizar el proceso de glicosilación, en general se considera que este fenómeno es prácticamente exclusivo de los eucariontes dado que en un concepto mas puro la glicosilación se define como la unión covalente de un carbohidrato a una cadena polipeptídica, mediante el uso de un complejo sistema enzimático específico; ésta acción generalmente se lleva a cabo en el complejo o aparato de Golgi (AG) y el retículo endoplásmico rugoso (RER), organelos que no se encuentran presentes en las bacterias por lo tanto hasta la fecha se desconocen los mecanismos y los sitios en los cuales las micobacterias logran conjugar los carbohidratos a las proteínas y si ésto corresponde a una glicosilación verdadera⁽³⁶⁾.

La glicosilación en eucariontes puede ser de tres tipos: N-glicosídica, cuando el oligosacárido (azúcar), en este caso la N-acetilglucosamina, está ligada al nitrógeno del grupo amino de un resto de Asparagina que siempre se encuentra en una secuencia de Asp-X-Ser o bien Asp-X-Thr (donde la X es cualquier aminoácido excepto prolina)⁽⁵²⁾; O-glicosídico, cuando el enlace está entre la N-acetilgalactosamina y el oxígeno del grupo hidroxilo de un residuo de Serina o Treonina; y por último, cuando el oligosacárido, galactosa, se halla unido al hidroxilo de la hidroxilisina como en la colágena⁽⁵³⁾.

Muchas proteínas de eucariotes tanto de membrana como de secreción contienen una o más cadenas de carbohidratos, siendo la glicosilación la principal modificación química postraduccional que sufren estas proteínas. Algunas reacciones de glicosilación ocurren en el lumen del retículo endoplásmico

rugoso, y otras en el lumen de las vesículas cis, media, y trans del complejo de Golgi⁽⁵²⁾, (fig. 2)

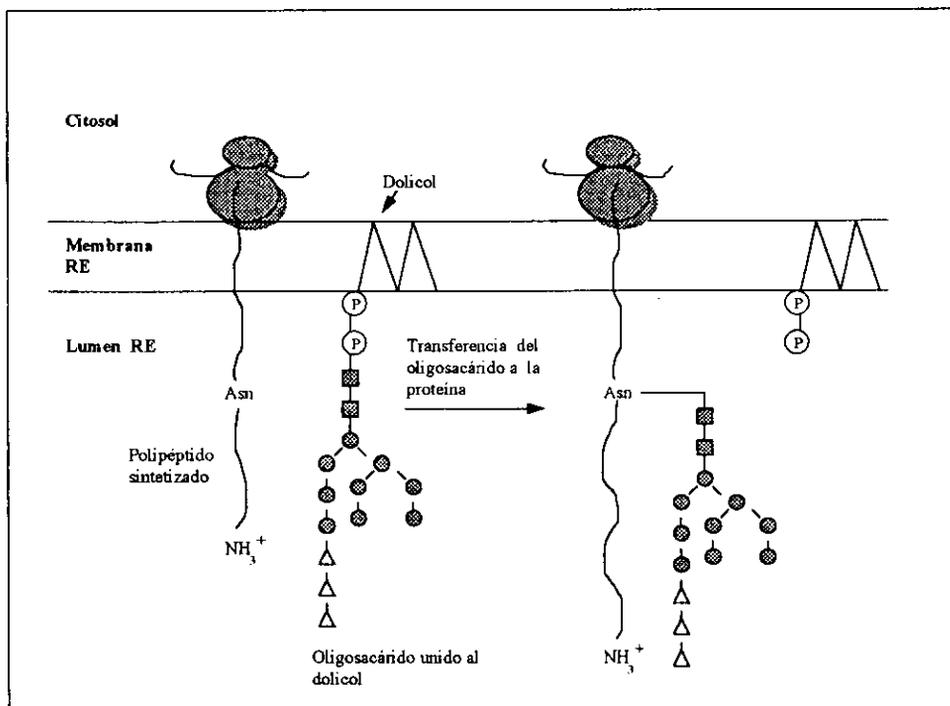


Figura 2. Glicosilación de proteínas en células eucariotes. (Capítulo 16, Molecular Cell Biology, 3d de., pag.706)

Existen diferencias en la biosíntesis de los oligosacáridos O-glicosídicos y N-glicosídicos, para el primer caso cada azúcar transferido es catalizado por un diferente tipo de

glicosiltransferasa, mientras que todos los oligosacáridos N-glicosídicos tienen en común un oligosacárido central, preformado en el retículo endoplasmático compuesto por dos residuos de N-acetilglucosamina, por nueve residuos de manosa y tres de glucosa, el cual es transferido en bloque una asparagina del polipéptido a través de un enzima proteína-oligosacárido transferasa, ésta unión puede ser bloqueada por tunicamicina; de acuerdo a lo anterior en RE y en AG, ciertos residuos son removidos y otros son adicionados a través de la acción de enzimas específicas⁽⁵²⁾.

Como el sustrato de nucleótidos de azúcar para la síntesis de oligosacáridos se encuentran en el citosol, la membrana del RE contiene transportadores específicos para UDP-N-acetilgalactosamina (nucleótido uridin difosfato), y en las membranas de Golgi contiene transportadores específicos para diferentes nucleótidos de azúcar incluyendo CMP-ácido-N-acetilneuramínico (citidina mono fosfato) y UDP-galactosa. Estos transportadores específicos traslocan al oligosacárido a la parte luminal en donde son transferidos catalíticamente del transportador al residuo susceptible de la proteína naciente; producida la unión glicosídica se comienzan a remover algunos azúcares por acción de enzimas específicas; posteriormente la modificación final de la proteína glicosilada se realiza en el complejo de Golgi, en donde diferentes enzimas localizadas en las vesículas cis, media y trans y actúan secuencialmente de acuerdo al movimiento de la proteína a través de este complejo hacia el exterior de la célula⁽⁵²⁾. También existe otra manera no enzimática de glicosilación, esto es, cuando la proteína sufre una modificación postraduccional en donde el azúcar reacciona

directamente con los grupos amino^(54,55,56). En este caso se forma una unión covalente sin acción enzimática alguna⁽⁵⁶⁾ entre un aldehído y un amino para formar una aldimina (Base de Schiff)

9. DETECCION DE GLICOPROTEINAS

Existe una variedad de métodos sensibles y específicos confiables para el análisis de oligosacáridos unidos a proteínas. Entre estos se encuentran la espectroscopía de masas, la cromatografía de gas y recientemente, cromatografía líquida de alta definición; si bien estos métodos son cuantitativos en los que se requiere mínima cantidad de muestra, únicamente son utilizados por especialistas. Sin embargo existen otros métodos menos sofisticados donde la cantidad de glicoproteína no es limitante, entre ellos tenemos la electroforésis en geles de poliacrilamida seguida por una tinción específica, en la cual para la detección de polipéptidos que contienen oligosacáridos se realiza la oxidación de éstos con peryodato seguido por tinción con reactivo de Schiff que es relativamente confiable; este método es sensible aproximadamente para 3 μg de glicoproteína⁽⁵⁷⁾.

Actualmente se utiliza otra técnica para poner en evidencia a los carbohidratos presentes en los glicoconjugados, esta técnica consta en el marcaje específico de los mismos con biotina⁽⁵⁶⁾. La biotina es una vitamina con gran afinidad por la estreptavidina y avidina; cuando se unen biotina-avidina o estreptavidina lo hacen por una interacción muy fuerte de tipo no covalente, muy rápida, que una vez formada es poco afectada

por cambios de pH, solventes orgánicos y otros agentes desnaturizantes⁽⁵⁸⁾. Este complejo biotina avidina/estreptavidina puede resistir concentraciones superiores de hasta 3 M de Guanidina-HCl, (la biotina puede liberarse por Guanidina-HCl 8 M y pH 1.5)⁽⁵⁹⁾. La avidina es en su forma nativa un tetrámero, la forma monomérica de la misma, conserva una alta especificidad, pero reduce su afinidad permitiendo su uso para purificaciones sencillas mediante columna de afinidad.

Para el marcaje de carbohidratos y otros grupos funcionales de las proteínas, así como de ácidos nucleicos se han sintetizado una gran variedad de derivados de la biotina⁽⁵⁶⁾. Para la biotilación de azúcares se utiliza la biotina hidrazida; en este sistema los carbohidratos son previamente oxidados, para generar aldehídos reactivos, la biotina hidrazida se acopla entonces a través del grupo -NHNH₂ al carbono del aldehído formando uniones hidrazona estables⁽⁶⁰⁾.

Por otra parte, la biotilación de los grupos amino se realiza con otro derivado, la biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida). La unión se lleva a cabo en las aminas primarias en forma desprotonada y el éster de N-hidroxisuccinimida a pH neutro; la amina es capaz de reaccionar con el éster por ataque nucleofílico, la N-hidroxisuccinimida entonces es liberada⁽⁶¹⁾.

De acuerdo a lo mencionado existe en general al menos dos maneras por la cual una proteína puede sufrir una glicosilación.

La forma de hacer un análisis cualitativo para conocer el tipo de unión glicosídica es mediante la utilización de enzimas específicas, que son capaces de actuar en el exterior o el

interior de los oligosacáridos: las exoglicosidasas y las endoglicosidasas.

Las exoglicosidasas como las neuraminidasas y las Galactosidasas remueven los residuos de ácido neuramínico terminal y galactosa subterminal respectivamente. Mientras que las endoglicosidasas rompen la unión glicosídica de los oligosacáridos N-acetilglucosamina específicos cercanos al esqueleto polipeptídico, cuando se tiene una unión N-glicosídica, es decir cuando hay unión entre el oligosacárido y una asparagina.⁽⁶²⁾

Actualmente se sabe que los glicoconjugados están implicados en un gran número de eventos o procesos que mantienen la integridad de un organismo, así como lo importantes que son para su funcionamiento. Existen ciertos oligosacáridos que pueden actuar como receptores altamente específicos para virus, parásitos y bacterias, además de servir como antígenos para reacciones autoinmunes. Tenemos como ejemplo las hemaglutininas de Hemophilus influenza que reconocen específicamente un tipo de ácido síalico, otro caso es el de las glicoproteínas de superficie de Trypanosoma spp. que son esenciales para la infectividad y sobrevivencia del parásito⁽⁶³⁾.

Por esta razón, para conocer el papel que juegan estas moléculas en la respuesta inmune contra la tuberculosis consideramos que es necesario identificar las "glicoproteínas" presentes en el medio de cultivo de M. bovis para que, posteriormente se pueda probar su antigenicidad, y con esto ampliar el conocimiento de los mecanismos por los cuales la micobacteria produce la enfermedad, y así diseñar estrategias racionales que conduzcan al desarrollo de pruebas de

diagnóstico más rápidas y precisas así como la producción de alguna posible vacuna contra la tuberculosis.

ANTECEDENTES

Las proteínas del agente causante de la tuberculosis a sido un tópico importante de investigación, basicamente con dos objetivos principales: 1) entender la interacción de los componentes micobacterianos, tanto individuales como en conjunto, con el sistema inmune del hombre y de modelos animales, y 2) el conocimiento de la fisiología de la bacteria, identificar vías metabólicas y sistemas enzimáticos, etc. La existencia de proteínas glicosiladas tanto en Micobacterium tuberculosis como en M. bovis ha sido reportado, en donde la función de algunas de ellas logra encajar en alguno de los dos objetivos, sin embargo actualmente no hay mucha información disponible en la función biológica de los sacáridos de las proteínas bacterianas. Por l anto este trabajo se desprende de la necesidad de evaluar nuevas estrategias para el control de la tuberculosis, asi como mejorar los métodos de diagnóstico para que éstos sean mas rápidos y confiables, para lo cual es necesario la función de sus componentes en la biología de la micobacteria y su interacción con el hospedero.

HIPOTESIS

De acuerdo a estos antecedentes, proponemos que las micobacterias tienen la capacidad de producir y secretar al medio de cultivo glicoconjugados, específicamente glicoproteínas.

OBJETIVOS

Aislar los glicoconjugados presentes en el extracto proteico filtrado del medio de cultivo de Mycobacterium bovis

Caracterizar parcialmente los glicoconjugados aislados

MATERIAL Y METODO

1. CULTIVO MICOBACTERIANO.

Las micobacterias que se emplearon en este trabajo fueron de la especie Mycobacterium bovis AN5, estas se cultivaron por 10 semanas en medio sintético de Proskauer-Beck-Youmans (PBY)⁽⁶⁴⁾. El medio de cultivo se separó de la masa bacteriana por filtración, primero a través de papel filtro Whatman No. 3 y posteriormente por filtros (Millipore Corp., Bedford, Mass) con tamaño de poro de 1.2, 0.45 y de 0.22mm consecutivamente. Las proteínas del medio de cultivo filtrado se obtuvieron a través de su precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 80%, el cual se agregó lentamente, con agitación constante a 4°C, por 24 horas; al término de este tiempo, la solución se centrifugó a 4°C por 60 minutos a 10 000 rpm en un rotor JA-21.

El precipitado fué resuspendido en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH 7.2, y se dializó contra PBS con membranas de un poro de 12 000 a 14 000 daltons, a 4°C aproximadamente por 36 horas, con varios cambios; el volumen de diálisis para cada cambio fué de 2 litros. Para saber que la muestra de proteínas ya no contenía sulfato de amonio se agregó cloruro de bario al líquido de diálisis al no observarse la formación de precipitado con el sulfato de amonio se dió por terminada la diálisis.

2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS).

Posterior a la diálisis, se cuantificó la concentración de proteína del material precipitado por el método de Bradford⁽⁶⁵⁾ con la ayuda de una curva patrón de albúmina, las proteínas presentes en el extracto se separaron mediante electroforésis, en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS), bajo condiciones reductoras de acuerdo al método descrito por Laemli⁽⁶⁶⁾ la separación se llevó a cabo en geles de acrilamida al 15%, tris-HCL 1.5 M pH 8.8 y SDS al 10% para el gel separador y para el gel concentrador acrilamida al 4%, tris-HCL 0.5 M, pH 6.8, SDS al 10% y como polimerizadores persulfato de amonio al 10% y temed. A las muestras se les adicionó "coctel" de electroforésis (tris-HCL 5 mM, pH 6.8 y SDS al 10%, glicerol 0.1% y azul de bromofenol al 0.02%); el amortiguador de corrida contenía glicina 2 M, tris base 250 mM y 3.5 mM de SDS. La electroforésis se corrió a 200 V constante hasta que el colorante migró al frente del gel. Las proteínas se evidenciaron por tinción de plata.⁽⁶⁷⁾

3. MARCAJE DE PROTEINAS EN AMINAS CON BIOTINA.

De las proteínas precipitadas del medio de cultivo, se tomo una alicuota de 2 mg/ml que fué puesta a dializar contra amortiguador de carbonatos 0.05 M, pH 8.6 con varios cambios por toda la noche; de una solución de 1 mg/ml de biotina N-hidroxisuccinimida (NHS) (PIERCE) en dimetil sulfóxido se

añadió 100 μ l a la muestra, y se incubó por 2 horas a 4°C durante 30 min. a temperatura ambiente, con agitación constante, transcurrido este tiempo, se dializó contra PBS toda la noche.

Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% y se electrotransfirió por 1 hora a papel de nitrocelulosa (tamaño de poro 0.45 μ , BIO-RAD) según el método descrito por Towbin y col.⁽⁶⁸⁾. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con gelatina de cerdo al 0.01% en PBS-Tween 20 al 0.1% durante 15 min.; luego se lavó con PBS-Tween 20 tres veces y con PBS también tres veces, la membrana se incubó con extravidina marcada con peroxidasa (SIGMA) a una dilución de 1:8000 en PBS-Tween, por 45 minutos. Pasado este tiempo se lavó nuevamente, y se reveló con 4-cloro 1-naftol/H₂O₂/metanol/PBS y 3,3-diaminobenzidina/H₂O₂/PBS. Por último la membrana se secó y se le realizó el análisis densitométrico en un densitómetro de imagen modelo GS-670 (BIO-RAD) con ayuda del programa de análisis molecular integrado al densitómetro, los pesos moleculares de cada una de las glicoproteínas se calcularon a partir de marcadores de peso molecular biotinilados y separados en el mismo gel.

4. MARCAJE DE GLICOPROTEINAS CON BIOTINA.

De las proteínas precipitadas del medio de cultivo se tomó una alícuota con 1.62 mg de proteína, la cual se llevo a un volumen de 1000 μ l con amortiguador de acetatos, 0.1 M, pH 5.5 y se dializo contra él mismo durante toda la noche, posteriormente

los azúcares se oxidaron con metaperyodato de sodio de 5mM, a 0° C por 30 min. en agitación constante, después se dializó contra amortiguador de acetatos 0.1 M, pH 5.5 durante toda la noche para sacar el exceso de metaperyodato. Se agregó la solución de biotina hidrazida (PIERCE) 5 mM a la muestra de proteínas y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, la reacción se detuvo cuando se adicionó Tris 0.1 M pH 7.5, posteriormente se dializó contra PBS para sacar la biotina sin reaccionar. El éxito del marcaje de las glicoproteínas fué comprobado nuevamente con la transferencia del patron electroforético a membranas de nitrocelulosa como anteriormente ya se mencionó.

5. PURIFICACION DE GLICOPROTEINAS.

Las glicoproteínas conjugadas con biotina fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de avidina monomérica (SIGMA). Primero se activó la columna por medio de una solución de biotina (GIBCO BRL) en una concentración 1 mg/ml en PBS pH 7.2. A continuación se lavó con 10 volúmenes de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.0 para eliminar la biotina que se encontrara pegada; después se reequilibró la resina con 4 volúmenes de PBS. Una vez activada la columna, 300 µl de muestra de glicoproteínas biotiniladas, se pasaron por la columna con un flujo lento. Se lavó la columna con 4 volúmenes de PBS; procediendose después a eluir con 2 volúmenes de biotina 1 mg/ml en PBS, las fracciones fueron monitoreadas por el método de Bradford (curva de elución), y se diálicaron

contra PBS por 48 horas .La pureza de los proteínas fué comprobada, mediante electroforésis, de cada fracción se tomaron alicuotas de 15 μ l y se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 15% transfiriendose a papel de nitocelulosa, y posteriormente se procesaron para detectar las gliproteínas por densitométria.

6. TRATAMIENTO CON ENDOGLICOSIDASA A LAS GLICOPROTEINAS BIOTINILADAS.

De los antígenos marcados en los residuos de carbohidratos, las fracciones eluidas (1-6) fueron seleccionadas por su concentración y pureza, para el ensayo enzimático con endoglicosidasa. Para lo cual, de cada fracción se tomaron 50 μ l, se agregó una solución de fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas en una concentración de 8.7 mg/ml, y por diálisis se equilibraron con PBS pH 8.6, por toda la noche; posteriormente se agregó la enzima endoglicosidasa F 1 U.I (DuPont Company) y se incubó durante toda la noche a 37°C en baño húmedo

Nuevamente, tanto las muestras tratadas con enzima como las muestras sin tratamiento enzimático, fueron sometidas a electroforésis y electrotransferencia bajo las mismas condiciones en las que se mencionaron anteriormente, la membrana de nitrocelulosa fué sometida a análisis densitométrico.

7. DIGESTION PROTEOLITICA.

Las glicoproteínas marcadas y purificadas (0.5 mg/ml) se digirieron con tripsina (GIBCO BRL) y proteasa XXV a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 hrs a 37° C, la reacción se detuvo, para el caso de la tripsina, añadiendo inhibidor de tripsina de frijol de soya (SIGMA) a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$, el producto de la digestión fué analizado mediante EGPA-SDS al 15%, teñido con plata.

ANALISIS DENSIROMETRICO.

El análisis densitométrico de los resultados se llevó a cabo por el programa Molecular Analyst/PC, para el densitómetro modelo GS-670, Bio-Rad.

RESULTADOS

1. PATRON ELECTROFORETICO PROTEICO DEL MEDIO DE CULTIVO DE M.bovis.

El precipitado obtenido del medio de cultivo filtrado de M. bovis de 10 semanas de crecimiento, tuvo una concentración de proteína (cuantificada por el método de Bradford) de 2.7 mg/ml, posteriormente se analizó una alicuota de precipitado por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 15 %, teñidos con nitrato de plata (Fig.1); lograndose observar a la vista de 22 a 28 bandas, cuyos pesos moleculares oscilaron entre un rango de 18 kDa a 120 kDa, donde la mayoría fueron de bajo peso molecular. Este patrón fué considerado como el total de proteínas contenidas en el medio de cultivo.

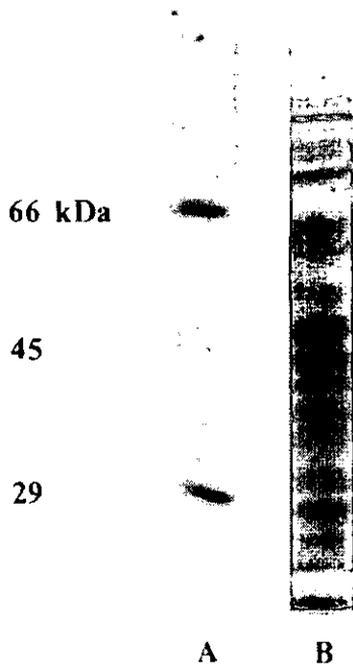


Figura 1. Perfil proteico del medio de cultivo filtrado de M. bovis en EGPA-SDS al 15% con tinción de plata; carril A: marcadores de peso molecular; carril B: patrón proteico del medio de cultivo de M. bovis.

2. IDENTIFICACION DE PROTEINAS MARCADAS EN LOS GRUPOS AMINO

A partir del extracto proteico se realizo el marcaje con biotina N-hidroxisuccinimida de los grupos amino de las proteinas. Dicho marcaje se detecto por electotransfencia en membranas de nitrocelulosa (Figura 2), en el carril A se encuentran los marcadores de peso molecular marcados con biotina (β -galactosidasa 116 kDa, albumina bovina 66 kDa, albumina de huevo 45 kDa, anhidrasa carbonica 29 kDa y α -lactoglobulina 18 kDa), el carril B representa al extracto proteico marcado con biotina, el cual presento un patron semejante al extracto inicial (figura 1), en donde el mayor numero de bandas proteicas presentan pesos moleculares entre 18 kDa a 66 kDa. Posteriormente se realizo el analisis densitometrico; figura 3, tabla 1; registrando 23 bandas proteicas, cuyos pesos moleculares estuvieron entre un rango de 80 kDa a 13 kDa, y solo 4 fueron las mas abundantes.

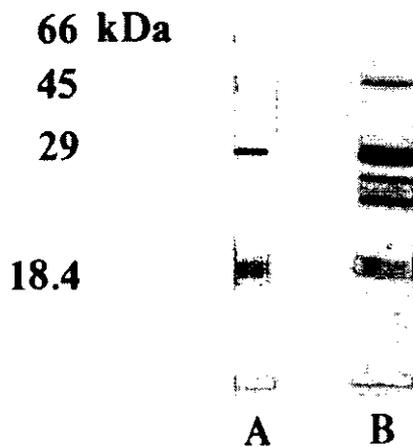


Figura 2. Proteínas marcadas en las aminas con biotina entre un rango de 66 kDa a 16 kDa. transferidas en membranas de nitrocelulosa. Carril A: marcadores de peso molecular con biotina, carril B: extracto proteico de *M. bovis* marcado en aminas con biotina.

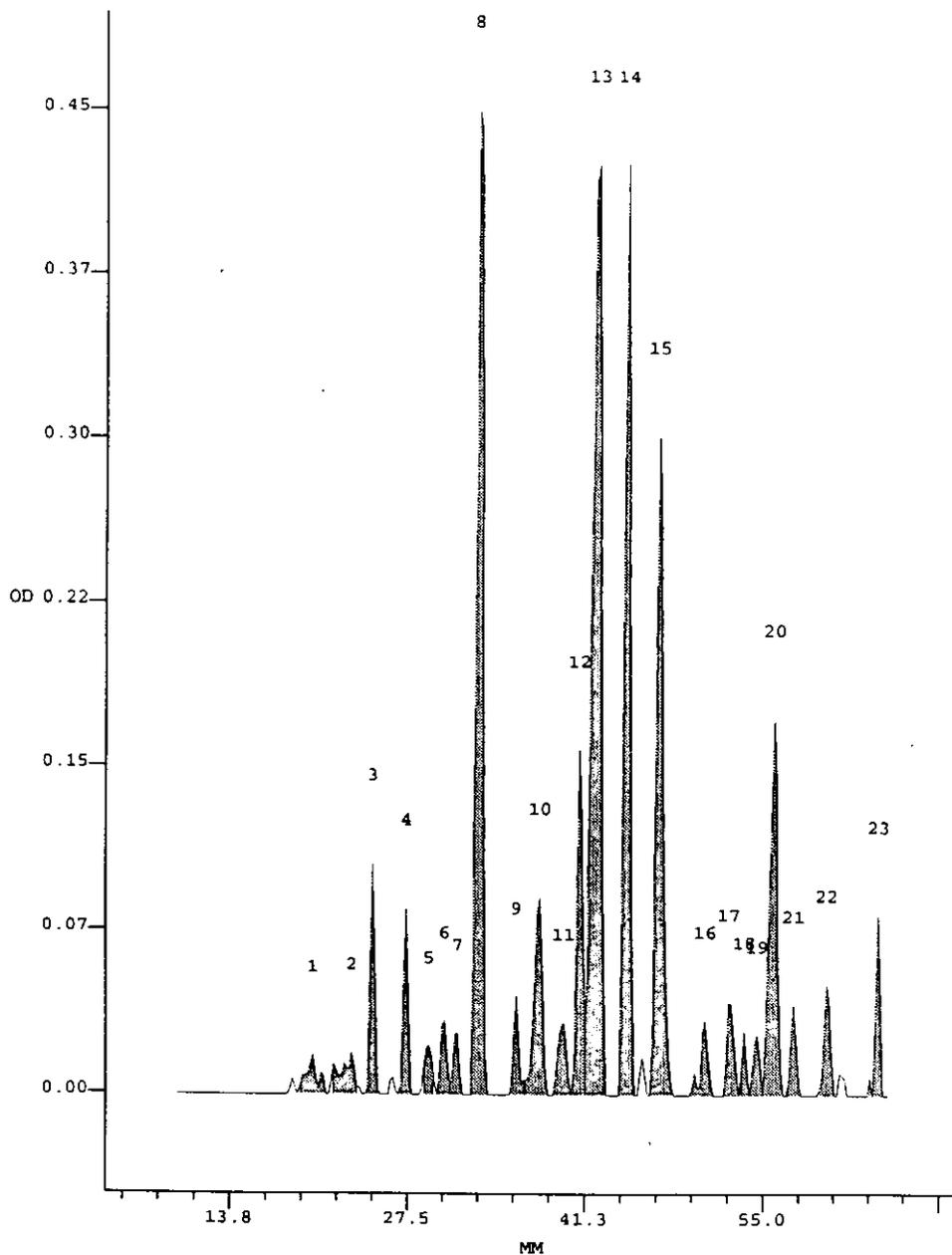


Figura 3. Densitometría de las proteínas marcadas en los grupos amino con biotina, obtenidas a partir del extracto proteico.

Pico N°	Rf	Altura (DO)	Area (DO)	% del total de proteína	Peso Molecular
1	0.19	0.02	0.0163	0.96	87372
2	0.24	0.02	0.0193	1.13	75509
3	0.27	0.10	0.0378	2.22	69855
4	0.32	0.08	0.0294	1.73	61557
5	0.35	0.02	0.0095	0.56	56397
6	0.38	0.03	0.0160	0.94	53199
7	0.39	0.03	0.0126	0.74	50674
8	0.42	0.45	0.2432	14.28	46880
9	0.48	0.04	0.0188	1.11	40515
10	0.51	0.09	0.0606	3.56	37118
11	0.54	0.03	0.0219	1.29	34007
12	0.57	0.16	0.0656	3.85	32079
13	0.59	0.42	0.3117	18.30	29967
14	0.63	0.42	0.1933	11.35	26926
15	0.68	0.30	0.1751	10.28	23959
16	0.74	0.03	0.0200	1.17	20111
17	0.77	0.04	0.0235	1.38	18425
18	0.80	0.03	0.0080	0.47	17380
19	0.81	0.03	0.0131	0.77	16555
20	0.84	0.17	0.1036	6.08	15617
21	0.86	0.04	0.0177	1.04	14447
22	0.91	0.05	0.0269	1.58	12731
23	0.99	0.08	0.0317	1.86	10480

Tabla 1. Análisis densitométrico del perfil proteico del marcaje de grupos amino con biotina

3. IDENTIFICACION DE PROTEINAS MARCADAS EN LOS GRUPOS CARBOHIDRATOS

Para este fin se utilizó la biotina hidrazida que reconoce residuos de carbohidratos. Una vez realizado el marcaje de dichos residuos, el patron del extracto no sufrió ninguna modificación aparente al ser analizado por EGPA-SDS teñido con plata, sin embargo, la electrotransferencia mostró unicamente 11 proteínas que reaccionaron con la biotina hidrazida, mismas que se obtuvieron al realizarseles una cromatografía de afinidad en una columna de avidina monomérica acoplada a agarosa; despues de concentrar la muestra purificada el patrón nuevamente fué consistente al observado en la electrotransferencia en papel de nitrocelulosa; (Figura 4, carril 2), aquí se puede apreciar que las bandas glicoproteicas estaban entre un rango de peso molecular de 70 kDa a 14 kDa, dentro del cual estan presentes 4 bandas mas evidentes.

El análisis densitométrico del patrón electroforético mostró un total de 11 bandas, figura 5. Los pesos moleculares correspondientes a estas glicoproteínas se calcularon a partir de una curva de estándares de pesos molecular previamente biotinilados (albúmina bovina 66 kDa, ovoalbúmina 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa, y β -lactoglobulina 18.4 kDa). En la tabla 2, se encuentran los pesos moleculares de las glicoproteínas correspondientes a 16, 19, 25, 32, 35, 39, 42, 48, 52, 58, y 62 kDa, las cuatro glicoproteínas más abundantes fueron las de 19, 25, 48, y 52 kDa con una representación de el 75% del total del material aislado, de acuerdo a la densitometría, los otros 7 componentes restantes,

tomados individualmente representaron porcentajes de entre el 0.26 y 5.48% del total, no fué posible correlacionar el porcentaje que representa del total del extracto crudo, pues algunos de los componentes aislados por la cromatografía de afinidad, se encuentran enmascarados con otras proteínas presentes en el extracto crudo que poseen pesos moleculares muy semejantes.

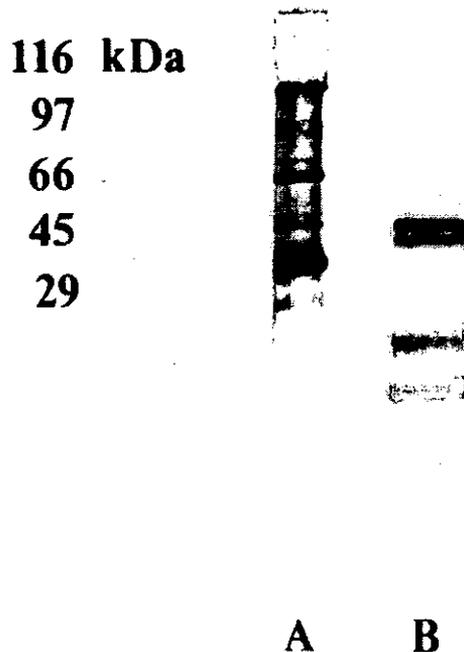


Figura 4. Electrotransferencia de glicoproteínas purificadas por afinidad, marcadas con biotina en grupos carbohidratos carril A: marcadores de peso molecular biotinilados, carril B: glicoproteínas biotiniladas.

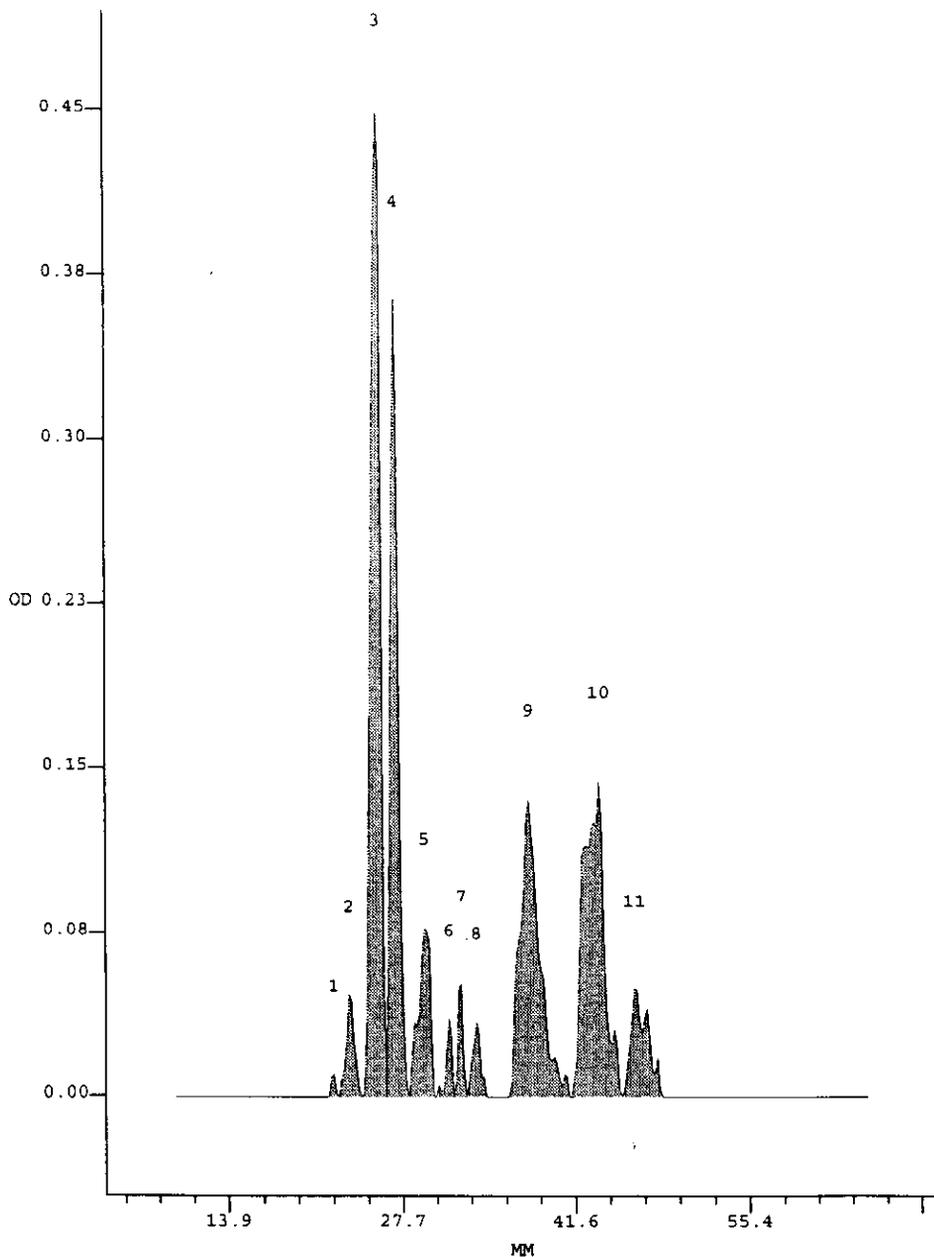


Figura 5. Densitometría de las glicoproteínas marcadas con biotina.

Pico N°	Rf	Altura (DO)	Area(DO)	% del total de proteína	Peso Molecular
1	0.23	0.01	0.0040	0.26	62000
2	0.25	0.05	0.0329	2.17	58000
3	0.29	0.45	0.3880	25.60	52000
4	0.32	0.37	0.2480	16.36	48000
5	0.36	0.08	0.0830	5.48	42000
6	0.39	0.04	0.0161	1.06	39000
7	0.41	0.05	0.0210	1.39	35000
8	0.43	0.03	0.0210	1.38	32000
9	0.51	0.14	0.2434	16.06	25000
10	0.61	0.15	0.2674	17.65	19000
11	0.66	0.05	0.0745	4.91	16000

Tabla 2. Análisis densitométrico de las glicoproteínas marcadas con biotina.

4. TRATAMIENTO CON GLICOSIDASA A LAS PROTEINAS MARCADAS EN CARBOHIDRATOS

El procedimiento seguido para comprobar la existencia de carbohidratos en las proteínas marcadas y purificadas se basó en la digestión de los mismos, por medio de la acción de endoglicosidasa F, de las fracciones más enriquecidas obtenidas de la purificación por la columna de avidina. El patrón electroforetico transferido a papel de nitrocelulosa de la fracción tratada con la enzima que se observa en la figura 6, carril C, muestra un patrón que en este caso fué de 13 bandas, donde la mayoría mostraron modificación en su peso molecular. En las proteínas que estaban mejor representadas 52, 48, y 19 kDa se observó una reducción en su peso de 1 a 3 kDa, mientras que la de 25 kDa no presentó cambio en su migración. En el caso de la banda de 32 kDa desaparece y aparece una nueva de 17 kDa, por otro lado en la región de los 45 kDa aparece otra banda nueva de 43 kDa y una más de 36 kDa. Los cambios sufridos de las bandas protéicas fueron detectadas a través del análisis densitométrico, figura 7, tabla 2.

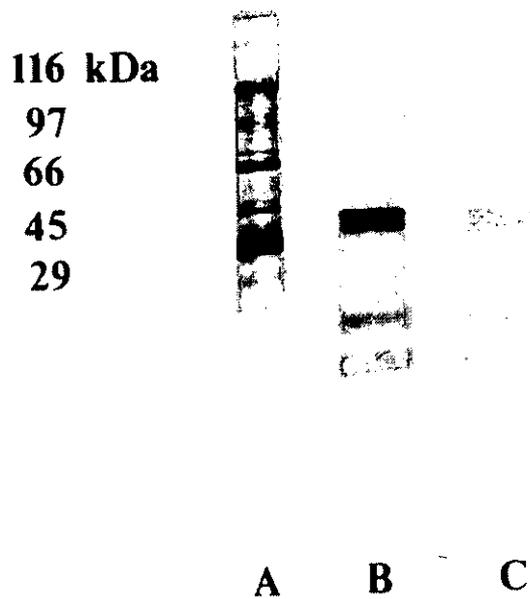


Figura 6. Digestión de carbohidratos biotinilados con endoglicosidasa F; carril A: marcadores de peso molecular, B: glicoproteínas marcadas con biotina, C: digestión de carbohidratos de las glicoproteínas biotiniladas

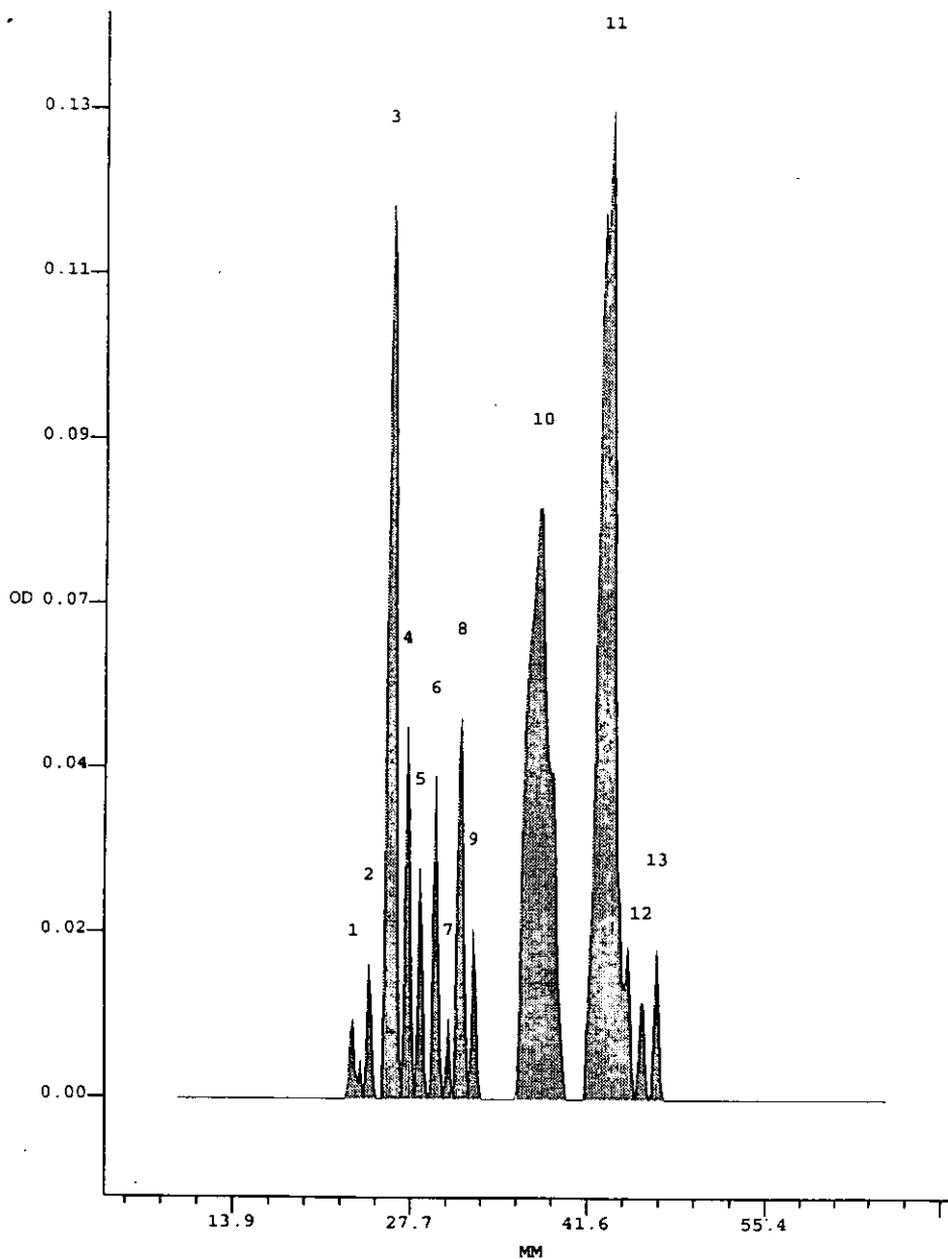


Figura 7. Densitometría de la digestión de carbohidratos de las glicoproteínas biotiniladas.

Pico N°	Rf	Altura (DO)	Area (DO)	% del total de proteína	Peso Molecular
1	0.25	0.01	0.0057	0.093	58000
2	0.27	0.02	0.0066	1.08	54000
3	0.30	0.12	0.0858	13.99	49000
4	0.32	0.05	0.0196	3.19	45000
5	0.34	0.03	0.0116	1.89	43000
6	0.36	0.04	0.0171	2.79	40000
7	0.38	0.01	0.0025	0.40	38000
8	0.40	0.05	0.0274	4.47	36000
9	0.42	0.02	0.0088	1.44	34000
10	0.51	0.08	0.1545	25.20	25000
11	0.61	0.13	0.2112	34.44	18000
12	0.65	0.01	0.0058	0.94	17000
13	0.67	0.02	0.0080	1.30	15000

Tabla 3. Análisis densitométrico de la digestión de carbohidratos de las glicoproteínas biotiniladas

5. DIGESTION CON PROTEASAS

Las glicoproteínas obtenidas de la columna de afinidad fueron también sometidas a digestión proteolítica con proteasa y tripsina de acuerdo a lo descrito en material y método, el producto de la digestión se corrió en gel de poliacrilamida-SDS al 15% teñido con plata, en el cual no fué posible detectar ninguna banda.

DISCUSION

Debido a la alta incidencia de personas infectadas con Mycobacterium tuberculosis, que se ha registrado en los últimos años, los investigadores han hecho intentos por combatir y controlar este padecimiento. Está claro que la interacción parásito-hospedero es sumamente compleja, y que no depende de un solo tipo de molécula, sino que es el resultado de un mecanismo complejo en el que están involucrados todos los componentes estructurales o funcionales del bacilo. A pesar de esta complejidad se han aislado elementos inmunogénicos capaces de inducir fenómenos de inmunosupresión⁽⁶⁹⁾, autoinmunidad⁽⁷⁰⁾, inmunidad celular o inmunidad humoral⁽⁷¹⁾; entre estos elementos se encuentran las proteínas. Evidentemente como cualquier otro organismo, cada proteína de la micobacteria cumple una función distinta y algunas veces indispensable para la integridad del bacilo⁽⁷²⁾, desde el punto de vista inmunológico estas moléculas están estrechamente relacionadas con el desarrollo de hipersensibilidad retardada, y la inmunidad protectora mediada por linfocitos T⁽⁷³⁾.

El objetivo de este trabajo fué el de aislar las glicoproteínas presentes en el extracto protéico del medio de cultivo filtrado de M. bovis, a través del marcaje específico de azúcares por el sistema biotina-avidina⁽⁷⁴⁾.

Logramos identificar 11 glicoproteínas, de las cuales cuatro representaron el 75 % del total de las proteínas aisladas, estas proteínas mostraron pesos moleculares de 52, 48, 25 y

19 kDa, y además de dos glicoproteínas de 39 y 32 kDa estos datos confirman categóricamente previos trabajos realizados en los que se reporta la presencia de glicoproteínas tanto en M. tuberculosis como en M. bovis. Además es importante señalar que de las 11 glicoproteínas que aislamos 5 de ellas no se han reportado como glicoproteínas de M. bovis.

Desde el primer reporte fué difícil de aceptar ⁽⁷⁵⁾ la presencia de glicoproteínas en la superficie de la capa cristalina^(44,76), en procariotes, específicamente en arqueobacterias, sin embargo hoy gracias a las metodologías enzimáticas y químicas, así como a las técnicas analíticas, ha sido posible reconocer a estas moléculas tanto estructurales como de secreción en estos organismos: Neisseria meningitidis⁽⁴⁵⁾, Streptococcus sanguis^(46,77), Bacillus thuringiensis⁽⁷⁸⁾, Clostridium thermohydrosulfuricum⁽⁷⁹⁾, Streptomyces lividans⁽⁴⁷⁾, Mycobacterium tuberculosis^(41,42,50,80) y Mycobacterium bovis⁽⁵¹⁾.

Si bien se han reportado glicoproteínas presentes en M. tuberculosis y M. bovis, estas han sido aisladas principalmente a través de su capacidad de unirse a lectinas, básicamente concanavalina A, ésta lectina reconoce uniones alfa manosa y alfa glucosa; aunque también se han purificado otras glicoproteínas con la lectina de Lens culinaris que reconoce residuos alfa manopiranosos; y debido a que estas lectinas son específicas, únicamente se han llegado a aislar aquellas proteínas con azúcares específicos para las lectinas utilizadas⁽⁶²⁾. Aun cuando Fifi⁽¹⁴⁾ logró identificar y purificar cuatro glicoproteínas del cultivo filtrado de M. bovis por columnas de sefaroza-concanavalina A, nosotros

logramos identificar 11 glicoproteínas con la aplicación del sistema biotina-avidina. Esta técnica nos permitió identificar y aislar las glicoproteínas sin tomar en cuenta la heterogeneidad de los oligosacáridos que pudieran presentar las proteínas, por otro lado la biotina tiene gran afinidad por la avidina y estreptavidina, es una molécula relativamente pequeña, por lo que puede ser conjugada a muchas proteínas sin alterar en muchos casos la actividad biológica de la misma⁽⁸¹⁾; una proteína puede reaccionar con varias moléculas de biotina y cada una se une a uno de los tetrámeros de la avidina o la estreptavidina⁽⁸²⁾.

De estas glicoproteínas las de 52 y 48 kDa, consideramos que son las mismas que las del complejo proteico de 45-47 kDa de M. bovis BCG reportada por Espitia y col.⁽⁵⁰⁾, las cuales reportan que presentan similitudes inmunológicas y bioquímicas con el complejo antigénico de 50-55 kDa de M. tuberculosis. La secuencia N-terminal de la glicoproteína de 45 kDa de M. tuberculosis, reportada por Dobos⁽⁵⁰⁾, demuestra 75% de homología con el complejo proteico de 45-47 kDa de M. bovis. Este último complejo demostró ser reactivo con sueros de animales experimentalmente infectados con micobacterias bovinas viva, y no con muertas⁽⁵⁰⁾. Esto refuerza nuestros resultados al considerar que estas proteínas que obtuvimos son de secreción.

Fifis y col.⁽⁵¹⁾ reporta glicoproteínas de 39, 25, 22, y 19 kDa purificadas y caracterizadas del cultivo filtrado de M. bovis las cuales coinciden con algunas que aislamos, como son de 39, 25 y 19 kDa. La glicoproteína de 39 kDa, Fifis⁽⁵¹⁾, la considera como tal por su propiedad de unirse a concanavalina

A, además hace referencia de la similitud con el antígeno 5 (proteína de 38 kDa de M. tuberculosis), proteína ampliamente estudiada, considerada por algunos grupos como una glicoproteína⁽⁹⁰⁾.

En lo que se refiere a la glicoproteína de 25 kDa, una de las cuatro proteínas más abundantes que logramos purificar, confirma lo ya reportado acerca de que esta proteína, junto con la de 22 kDa, son formas glicosiladas de MPB70, sin embargo la molécula de 22 kDa presenta una cantidad menor de carbohidratos que la de 25 kDa⁽⁵¹⁾, por otro lado se dice que esta proteína es muy abundante en cultivos viejos.

A través de la reacción cruzada por anticuerpos monoclonales se ha demostrado que la proteína de 19 kDa es la misma para M. tuberculosis que para M. bovis. Se ha demostrado la asociación de carbohidratos con el antígeno de 19 kDa de M. bovis por su afinidad a la concanavalina A⁽⁵¹⁾, igualmente Garbe⁽⁸⁰⁾ a través de la tinción con concanavalina A del antígeno recombinante de M. tuberculosis en M. smegmatis reafirma que de el antígeno de 19 kDa es una glicoproteína.

La glicoproteína de 32 kDa, aunque no ha sido reportada como tal en M. bovis, si lo ha sido para M. tuberculosis. Montaña y col.⁽⁴²⁾ lograron aislar esta glicoproteína por una lectina diferente a la concanavalina A, Lens culinaris, sin embargo para hacer la homología entre estas dos glicoproteína se necesita tener su secuencia de aminoácidos N-terminal. Dentro de esta serie de glicoproteínas pudimos comprobar en algunas de ellas la presencia de enlaces covalentes de tipo N-glicosídicos, al tratarlas con endoglicosidasa F. La digestión con esta enzima no produjo cambio en la migración

de 3 bandas protéicas, así como la desaparición de la marca de otra banda, específicamente la de 32 kDa, mientras que el resto de bandas protéicas sufrió una disminución en el peso molecular.

Además pudimos comprobar que estas glicoproteínas presentan uniones covalentes, ya que la acción de la endoglicosidasa F, enzima cuya especificidad son los enlaces N-glicosídico, produjo una reducción en el peso molecular sin la completa eliminación de la marca de biotina en algunas glicoproteínas, lo que nos revela la presencia de residuos de carbohidratos unidos con un diferente tipo de residuos a la N-acetilglucosamina, azúcar específico del enzima; o bien podría representar otro tipo de enlace diferente al N-glicosídico, ya que considerando lo que Dobos⁽⁸³⁾ reportó recientemente acerca de que la proteína de 45 kDa de M. tuberculosis presenta enlaces O-glicosídicos, como la única unión covalente entre el azúcar, en este caso manosa y la proteína. Este autor en otro trabajo previo⁽⁷⁸⁾ reconoció glicopeptidos con O-glicosilación para esta proteína.

Por otro lado pudimos observar que la marca de biotina de una de las proteínas que aislamos, concretamente la proteína de 32 kDa desaparece posterior a la digestión con la enzima, pero también observamos que aparece una banda protéica de 16300 kDa, que tal vez podría tratarse de esta proteína que redujo su peso al rasurar parte de los azúcares, lo cual coincide con el trabajo de Montaña y col.⁽⁴²⁾, en donde demuestra que esta proteína, aislada con la lectina de Lens culinaris, contiene 8% de su peso de carbohidratos y su

análisis demostró residuos de galactosa, manosa, xilosa y N-acetilglucosamina.

Actualmente el tema de las proteínas glicosiladas en procariotes, principalmente en micobacterias, a despertado interes y polémica, desde que Daniel afirmó que los carbohidratos del antígeno 5 eran debido a "una contaminación no descrita, más que una glicosilación específica"⁽⁸⁴⁾, hasta la demostración directa o indirecta de la unión covalente entre una proteína y un sacárido. Nosotros logramos deducir la naturaleza proteica de las moléculas que aislamos a través de la acción enzimática de proteasas como tripsina y pronasa para descartar la posibilidad de que se trataran de moléculas de origen no protéico.

Por lo que se refiere a que si la asociación de carbohidratos-proteína, es una verdadera glicosilación, Montaño y colaboradores probaron con la tunicamicina, un antibiótico inhibitorio de la N-glicosilación, el cual es un análogo de la UDP-acetilglucosamina, que bloquea la adición del sacárido N-acetilglucosamina al lípido acarreador dolicol fosfato, en la primer etapa de formación del oligosacárido^(85,86,87); que el cultivar micobacterias en un período de 8 a 15 semanas en presencia de tunicamicina, el efecto fué de inhibición del crecimiento bacteriano sin llegar a eliminar a las micobacterias, sin embargo cuando estas colonias fueron sembradas en medio sin inhibidor presentaron un patron de crecimiento normal⁽⁴²⁾.

Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la micobacteria tiene la capacidad de glicosilar proteínas. Desconocemos de que manera se lleva a cabo esta modificación

ya que no cuenta con los organelos que realizan este proceso en las células eucariotas

Por mucho tiempo, los carbohidratos fueron considerados como sustancias de reserva como almacenes de energía y estructuras de soporte y considerados como desprovistos de alguna "inteligencia biológica". Pero durante los últimos quince años la química y bioquímica de los glicoconjugados, en los que se incluyen las glicoproteínas, han adquirido una importancia tan grande como las proteínas, y ácidos nucleicos⁽⁸⁸⁾; es claro que el papel biológico de los oligosacáridos tiene un rango desde lo que es trivial hasta aquello que es crítico para el desarrollo, crecimiento, función o sobrevivencia de un organismo, en donde la característica en común de todas esas funciones es el de intervenir en eventos de reconocimiento específico o proporcionar una modulación en procesos biológicos; de hecho ellos ayudan a generar la diversidad funcional que es requerida para la evolución y desarrollo de diferentes tipos de células, tejidos, órganos y especies. Actualmente no hay mucha información disponible acerca de la función biológica de la porción sacárida de glicoproteínas bacterianas. En lo que se refiere a los organismos procariotes se asume que los glicanos cumplen funciones similares sugeridas para glicoconjugados eucariotes⁽⁸⁹⁾. Una función específica en los procariotes que podemos ejemplificar es con la glicoproteína de la capa superficial de la halobacteria concerniente a la determinación de su forma de bastón y que al remover el oligosacárido su forma se vuelve redonda⁽⁷⁶⁾, otro ejemplo es la glicoproteína producida por Bacillus thuringiensis, la

cual es tóxica para larvas de muchas especies de mosquitos, esta toxina se une a través de un receptor de lectinas, localizado en el intestino de la larva⁽⁷⁸⁾. Knowles y col. ha demostrado la toxicidad de una glicoproteína de B. thuringiensis subespecie kurstaki para una línea celular de lepidoptero, la cual es inhibida por preincubación de la toxina con ácido N-acetilgalactosamina y N-acetilneuramínico así como con las lectinas a las cuales se unen estos amino azúcares⁽⁸⁹⁾.

Así como en estos organismos y todas las formas de vida, las glicoproteínas tienen un papel relevante en uno o muchos eventos encaminados todos hacia el mismo fin, que es, el de la vida misma, y debido al poco conocimiento que se tiene acerca de las glicoproteínas en procariotes en cuanto a su biosíntesis, estructura y función, es de suma importancia conocer de que manera pueden influir estas moléculas en la biología de la micobacteria, y su interacción con el huésped y la respuesta de éste, que conlleve a producir la manifestación clínica de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo la finalidad de purificar glicoproteínas del extracto protéico del medio de cultivo filtrado de Mycobacterium bovis, lo cual de acuerdo con nuestros resultados podemos concluir :

- Se lograron purificar 11 glicoproteínas
- De estas 11 glicoproteínas 5 no han sido reportadas anteriormente
- Estas proteínas aparentemente presentan más de un tipo de unión proteína-carbohidrato

La micobacteria tiene la capacidad de producir glicoproteínas, como lo logra no lo sabemos, pero si de alguna manera los organismos procariotes sin tener compartimentos como el núcleo donde se realicen la replicación, o un retículo endoplásmico para la producción de proteínas, un aparato de Golgi o una mitocondria donde se lleven a cabo funciones primordiales para su existencia ; no por nada estos organismos fueron los primeros en aparecer en la tierra y han lograron mantenerse a lo largo de la evolución. Sin embargo queda aun por conocer esos mecanismos por los cuales estos organismos han logrado su lugar dentro de la clasificación de lo vivo, con el sello de "la forma de vida más simple"

BIBLIOGRAFIA

- 1- Waksman S.A. The conquest of tuberculosis. University of California Press, Berkeley. 1964.
- 2.- Grigg E.R. The arcana of tuberculosis. Am. Rev. Tuberc. Respir. Dis. 1958; 78: 151-172, 426-453, 583-603.
- 3.- Allison M.R, Mendoza O, and Pezzia A. Documentation of a case of tuberculosis in pre-columbian America. Am. Rev. Respir. Dis. 1973; 107: 985-991.
- 4.- Ponce Sanguines C. Tunupa y Ekako: Estudio arqueológico acerca de las efigies precolombinas de Dorso Adunco. Los Amigos del Libro, La Paz, Bolivia. 1969.
- 5.- Bloom B.R, Murray J.L.C. Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer. Science. 1992; 257: 1055-1064.
- 6.- Long E.R. A history of pathology. Dover publication. Inc. New York.1965.
- 7.- Marchal, G. El resurgir de la tuberculosis. Mundo Científico. 1993, N°136.
- 8.- Koch R. Die aetiologie der tuberculose. Am. Rev. Tuberc. 1932; 25: 285-323.(Translated from the original 1882 article by Berna Pinner and Max Pinner).
- 9.- Daniel T.M, Bates J.H, and Downes K.A. History of tuberculosis. p 13-24. In Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Editor: Blomm B.R. Howard Hughes Medical Research Institute/ Albert Einstein College of Medicine, New York. 1994.
- 10.- Hernández R. La dinámica de la respuesta inmunológica e inflamatoria pulmonar inducida por antígenos proteícos de

Mycobacterium tuberculosis. Inst. Inv. Biomed. UNAM. Tesis para obtener el grado de doctor. 1993.

11.- Kissaine J.M. Anderson's Pathology. 9^a ed., C.V. Mosby Co. 1990; 1: 939-947.

12.- Koch R. Die aetiologie der tuberculose. Berl. Klir Wochenschr. 1881;19: 221-229.

13.- Tsukamura M., Mizuno S., Toyama H. Taxonomic studies on the Mycobacterium tuberculosis series. Microbiol. Immun. 1985; 29: 285-299.

14.- Tsukamura M. A review of the methods of identification and diferentiation of mycobacteria. Rev.Infect. Dis. 1981; 3: 841-861.

15.- Youmans G.P. Disease due to mycobacteria other than Mycobacterium tuberculosis. In Youmans G.P., Paterson P.Y., Sommers H.M. editors. The biologic and clinical basis of infectious diseases. Philadelphia. 1975.

16.- Rubin E., Farber J. Patología. Ed. Panamericana pp 357-359.

17.- Freeman B.A. Microbiología de Burrows. 22^a ed., Interamericana. pp 691-699.

18.- Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle. 1991; 72: 1-6.

19.- Lucas S., Nelson A.M. Pathogenesis of tuberculosis in human immunodeficiency virus-infect people. Am.Soc.Microbiol. 1994.

20.- Snider D.E.,Raviglione M.Jr., and Kochi A. Global burden or tuberculosis. p 3-11. In Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Editor Bloom B.R. Howard Hughes

Medical Research Institute/ Albert Einstein College of Medicine. New York. 1994

21.- Cotran R., Kumar V., Robbins S. Pathologic basis of disease. 4 th Edition. W.B. Saunders Company E.U. 1989; 374-380.

22.- Riley R.L, Mills C.L, Nyka W., Weinstock N., Storey P.B., Sultan L.K., Riley M.C., and Wells W.F. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two year study of contagion in a tuberculosis ward. Am. J. Hyg. 1959; 70: 185.

23.- Smith P.G, and Moss A.R. Epidemiology of tuberculosis. In Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Editor Bloom B.R. Howard Hughes Medical Research Institute/ Albert Einstein College of Meidcine New York.1994.

24.- Roitt I., Brostoff J., and Male D.. Immunology

25.- Dannenberg A.M., and Rock G.A.W. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue. Damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. Am. Soc.Micro.1994.

26.- Wayne L.G. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. Eur. J. Clin.Microbiol. Infect.Dis. 1994: 908-914.

27.- Klein J.Immunology. Blackwell Scientific. 1990. pp 451-459

28.- Davis B.D., Dolbecco R., Eisen H.N., Ginsberg., H.S., and Wood W.B. Tratado de microbiología. 2ª ed. Salvat. 1978: 868-888.

29.- Pumarola A., Rodríguez A., García J.A., Piedrola G. Microbiología y parasitología médica. 2ª ed. Salvat. 511-533.

- 30.- Josep S.W.. Lack of auramine-rhodamine fluorescence of Runyon group IV mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 1967; 95: 114-122.
- 31.- Koch R. Dtsch Med Wschr. 1890; 46: 1029-1032.
- 32.- Young D.B., Kaufmann S.H.E., Hermans Y., Thole J.E.R. Mycobacterial protein antigens: a compilation. Mol. Microbiol. 1992; 6: 133-145.
- 33.- Janicki B.W., Chaparras S.D., Daniel T.M., Kubica G.P., Wright G.L. Jr., Yee G.S.. A reference system for antigen of Mycobacterium tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. 1971; 104: 602-604.
- 34.- Daniel T.M., Janicki B.W., Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. Microbiol. Rev. 1978; 42: 84-113.
- 35.- Young R.A., Bloom B.R., Grosskinsky C.M., Ivanyi J., and Daves R.W. Dissecting Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 1985; 82: 2583-2587.
- 36.- Harboe M., Wiker H. The 38-kDa protein of Mycobacterium tuberculosis: A review. J. Infect. Dis. 1992; 166: 874-884.
- 37.- Daniel T.M., and Wisnieski J.J. The reaction of concanavalin A with mycobacterial culture filtrates. Am. Rev. Respir. Dis. 1970; 101: 762-770.
- 38.- Daniel T.M., and Andersen P.A. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am. Rev. Respir. Dis. 1978; 117: 533-539.

- 39.- Espitia C., Mancilla R. Identification, isolation, and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoprotein antigens. Clin. Exp. Immunol. 1989; 77: 378-383.
- 40.- Romain F.A., Laqueyrierie P., Militzre P., Pescher P., Chavarot P., Lagranderie M., Auregan G., Gheorghiu M., and Marchal G. Identification of a Mycobacterium bovis BCG 45/47-kilodalton antigen complex and immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. Infect. Immu. 1992; 61: 742-750.
- 41.- Espitia C., Espinosa R., Saavedra R., Mancilla R., Romain R., Laqueyrierie F., and Moreno C. Antigenic and structural similarities between Mycobacterium tuberculosis 50-55 to kilodalton and Mycobacterium bovis BCG 45-47 to kilodalton antigens. Infect. Immu. 1995; 2: 586-589.
- 42.- Montaña, L.F., Massó, F., Páez, A., Sandoval, S., Vázquez, L., Sánchez, L., Fournet, B. and Zenteno, E. Isolation of a 32 kDa Mycobacterium tuberculosis protein by lectin affinity chromatograph. Con. Biochem. Physiol. 1994; 2: 265-272.
- 43.- Ishioka, G. Y., Lamont, A. G., Thomson, D., Bulbow, N., Gaeta, F.C.A., Sette, A., Grey, H.M. MHC interaction and T cell reconognition of carbohydrates and glicopeptides. J. Immunol. 1992; 148: 2446-2451.
- 44.- Lechner, J. Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 1989; 58: 173-194.
- 45.- Virji, M., Saunders, J.R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., and Ferguson, D.J.P. Pilus facilitated adherence of Neisseria meningitidis to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently

with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol. Microbiol.* 1993; 10: 1013-1028.

46.- Erickson, P.R., and Herzberg, M.C. Evidence for covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 23780-23783.

47.- Ong, E., Kilburn, D.G., Miller, R.C. Jr., and Warren, R.A.J. *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* 1994; 176: 999-1008.

48.- Kawamura, T., and Shockman, G.D. Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 9514-9521.

49.- Kluepfel, D.S., Vats-Mehta, F., Aumont, F., Sharek and Morosoli, R. Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *J. Biochem.* 1990; 267: 45-50.

50.- Dobos, K., Swiderek, K., Khoo, K., Brennan, P., Belisle, J. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995; 63: 2846-2853.

51.- Fifiis, T., Costopoulos, C., Radford, A., Bacic, A., and Wood, P. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect. Immun.* 1991; 59: 800-807.

52.- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. *Molecular Cell Biology*. 3^d ed. 1995, 699-709.

- 53.- Lehninger, A. Bioquímica. 2^a ed. Ed. Omega, Barcelona.1987. pp. 280-281.
- 54.- Bunn, H.F., Gabbay, K.H., and Gallop, P.M. Science 1981; 200: 21.
- 55.- Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. in The glycoconjugates. Ed. M.I. Horowitz. Academic Press, N.Y, Vol. 3. p.113.1982.
- 56.- Baynes, J.W., and Thorpe,S.R., Murtiashaw, M. Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin. Methods in Enzymology. 1984. Vol. 106. p.88.
- 57.- Deutscher, M.P. Methods in Enzymology. Guide to protein purification. Academic Press. Vol. 182. 1990.
- 58.- Green, N.M. Avidin. In: Adv. in protein chemistry. Academic Press. pp. 29, 85-133. 1975.
- 59.- Hofmann, K., Wood,S.W., Briton, C.C., Montibeller, J.A. and Finn, F.M. Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980; 77 (8): 4666-4668.
- 60.- O'Shannessy, D.J., Voorstad, P.J., and Quarles, R.H. Quantitation of glycoproteins on electroblots using the biotin-streptavidin complex. Anal. Biochem. 1984; 163: 204-209.
- 61.- Harlow, E. and Lane, D. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory. p 77. 1988.
- 62.- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W. Bioquímica de Harper. 13^a ed. Manual Moderno. p 746. 1994.
- 63.- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology. 1993; 3: 99-129.

- 64.- Youmans G.P. A method for the determination of the culture cycle and the growth rate of virulent human type tubercle bacilli. J. Bacteriol. 1946; 51: 703-710.
- 65.- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
- 66.- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. Nature. 1970; 227: 680-685.
- 67.- Merril C.R, Goldman D, Sedman S.A, Ebert M.H. Science. 1981; 211: 1437.
- 68.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979; 76: 4350-4354.
- 69.- Montaña L.F. Actividad inmunosupresora de un sobrenadante de macrófagos estimulados con proteínas de M. tuberculosis. Tesis para obtener el título de doctor en ciencias biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. 1992.
- 70.- Shoenfel Y., and Isenberg D.A. Mycobacteria and autoimmunity. Immunol. Today. 1988; 9: 178-182.
- 71.- (3)
- 72.- Andersen A., and Brennan P. Proteins and antigens of Mycobacterium tuberculosis. In Bloom B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Asm Press. Washington, 1994.
- 73.- Barnes P.R., Modlin R.L., and Ellner J.J. T-cell responses and cytokines. IN Bloom B.R. Tuberculosis:

pathogenesis, protection and control. Asm Press. Washington, 1994.

74.- Bayer E.A., and Wilcheck M. Protein biotinylation. In Methods in enzymology. 1990; 184: 138-161.

75.- Mescher M.F., Strominger J.L. Purification and characterization of a prokariotic glycoprotein from the cell envelope of Halobacterium salinarum. J. Biol. Chem. 1976; 251: 2005-2014.

76.- Messner P. Minireview. Bacterial glycoproteins. J. Glycoconjugate. 1997; 14: 3-11.

77.- Morris E.J., Ganeshkumar N., Song M., and Mc Bride B.C. identification and preliminary characterization of a Streptococcus sanguis. fibrillar glycoprotein. J. Bacteriol. 1987; 169: 164-171.

78.- Pfannenstiel. M.A., Muthukumar G., Couche G., and Nickerson K.W. Amino sugar in the glycoprotein toxin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. J. Bacteriol. 1987; 160: 796-801.

79.- Messner P., Christian R., Kolbe J., Schulz G., and Sleytr U.B. Analysis of a novel linkaje unit of o-linked carbohydrates from the crystalline surface layer glycoprotein of Clostridium thermohydrosulfuricum S102-70. J. Bacteriol. 1992; 174: 2236-2240.

80.- Garbe T, Harris D, Vordermeier M, Lathigra R, Ivanyi J, Young D. Expression of the Mycobacterium tuberculosis 19 kilodalton antigen in Mycobacterium smegmatis: Immunological analysis and evidence of glycosilation. Infect. Immun. 1993; 61: 260-267.

RECEIVED
SALUBRITY DIVISION
U.S. DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES

81.- Bayer E.A, Wilchek M. Biotin-containing reagents. Methods in enzymology. 1990; 184 :123-138.

82.- Gitlin G., Bayer E.A., and Wilcheck M. Studies of the biotin-binding site of avidin. J. Biochem. 1987; 242: 923-926.

83.- Dobos K.M, Khoo K-H, Swiderek K.M, Brennan P.J, Belisle J.T. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of Mycobacterium tuberculosis. J7.Bacteriol. 1996; 178: 2498-2506.

84.- Daniel T.M. The clinical composition of immunoaffinity-purified Mycobacterium tuberculosis antigen 5. Am. Rev. Respir. Dis. 1989; 139: 1566-1567.

85.- Goodman . Microbiología médica. Ed. Interamericana.

86.- Mahoney W.C, Duksin D. Biological activities of the two major components of tunicamycin. J. Biolo. Chem. 1979; 254: 6572-6576.

87.- Duksin D, Mahoney W.C. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. J.Biol. Chem. 1982; 257: 3105-3109.

88.- Montrevil J. Spatial structures of glycan chains of glycoproteins in relation to metabolism and function, survey of a decade of research. Pure & Appl. Chem. 1984; 56: 859-877.

89.- Montrevil J. Biol. Cell.1984; 51: 115-131.

90.- Espitia C, Mancilla R, Identification, isolation and partial characterization of Mycobacterium tuberculosis glycoproteins antigens. Clin Exp Immunol 1989 ; 77 : 378-83.