

INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis es una de las principales enfermedades causales de muerte en el mundo; se considera que actualmente la tercera parte de la población mundial esta infectada con tuberculosis, que cada año ocurren entre 8 y 9 millones de casos y que causa entre 2 y 3 millones de muertes anualmente (Collins, DM. 1996). En los últimos años se ha reportado un incremento del 0.3% en el número de casos de tuberculosis y en la tasa de incidencia a nivel mundial, excepto en Europa occidental y Norte América (Bodmer *et al.* 2002). Múltiples factores como la pobreza, condiciones socio-sanitarias y de salubridad, la aparición de cepas resistentes a una amplia gama de antibióticos y la carencia de una vacuna que proteja en la edad adulta contra la enfermedad, contribuyen a que la enfermedad persista en la población (Collins, DM. 1996).

El microorganismo implicado en esta enfermedad es la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo Gram positivo que genera una infección asintomática y latente, en donde menos del 7% de la población que enfrenta a la bacteria desarrolla la enfermedad. Una característica importante de la tuberculosis es que puede presentarse de forma latente durante años. En el estado de latencia, la infección se hace progresiva al interior del huésped sin sintomatología alguna, y en cualquier momento este estado puede revertir y reactivar la sintomatología característica de la enfermedad (Burbano,C 2005).

Es poco el conocimiento respecto al estado fisiológico de la bacteria en su estado de latencia dentro del hospedero, al igual que los diferentes mecanismos y formas por los cuales revierte del mismo. Investigaciones realizadas en las dos últimas décadas han postulado que el bacilo enfrenta condiciones desfavorables como privación de oxígeno, descensos bruscos de pH, presencia de radicales tóxicos de

oxígeno y ausencia de nutrientes que afectan el crecimiento celular cuando está al interior del hospedero, lo cual lleva al estado de latencia. (Yuan *et al.* 1996).

El estudio de proteínas que le confieren resistencia al bacilo frente a las condiciones desfavorables mencionadas, prometen ser una herramienta para la identificación y la detección rápida y directa de *Mycobacterium tuberculosis*, permitiendo así desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico.

JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios en *Mycobacterium tuberculosis* realizados por PCR en tiempo real (RTq-PCR) y por microarreglos (Kendall *et al.* 2003, Rodríguez *et al.* 2006,) han demostrado la transcripción diferencial de mRNA del gen *acr* que codifica para la proteína alfa cristalina frente a condiciones de estrés. Este hecho sugiere la hipótesis de que la proteína alfa cristalina se sobre expresa cuando el bacilo se encuentra en condiciones adversas de crecimiento como pH ácido, hipoxia, presencia de radicales tóxicos de oxígeno y diferentes concentraciones de etanol, favoreciendo la adaptabilidad frente a estas condiciones durante el proceso de infección.

Teniendo en cuenta lo anterior, se quiere estudiar si la proteína alfa cristalina 16KDa se sobre expresa bajo condiciones de estrés en cantidades suficientes para ser detectada e identificada mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot usando anticuerpos específicos.

Por esta razón, la sobre expresión y el reconocimiento de la proteína Alfa cristalina promete ser una herramienta muy valiosa para el desarrollo de técnicas de diagnóstico confirmatorias de la tuberculosis.

HIPÓTESIS

La proteína alfa cristalina (*hspX*), se sobre-expresa bajo diferentes condiciones de estrés como hipoxia, descensos de pH, alcohol, presencia de agentes generadores de radicales tóxicos de oxígeno y por lo tanto puede ser detectada por sistemas inmunológicos que usan anticuerpos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la sobreexpresión de la proteína alfa cristalina de *Mycobacterium bovis* BCG mediante diferentes tipos estrés “*in vitro*” para detectarla mediante el uso de anticuerpos.

Objetivos específicos

Establecer un protocolo de lisis celular de *Mycobacterium bovis* BCG para observar el patrón de migración electroforético de las proteínas de la bacteria e identificar dentro del mismo la proteína alfa cristalina.

Establecer un protocolo para inducir el estrés oxidativo, pH ácido, etanol e hipoxia.

Identificar de la proteína alfa cristalina de *Mycobacterium bovis* BCG mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Detectar la proteína alfa cristalina de *Mycobacterium bovis* BCG mediante ensayos de western blot, utilizando anticuerpos policlonales.

MARCO TEÓRICO

Agente Etiológico

Mycobacterium tuberculosis fue identificado como el agente causal de la tuberculosis (TB) en 1882 por Robert Koch, quien logró aislarlo y cultivarlo a partir de pacientes con tuberculosis (Fenton, MJ. *et al.* 1996; Madigan, 2000). Es un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, de carácter intracelular, posee un alto contenido de lípidos y se puede identificar mediante tinción de Ziehl –Neelsen debido a que son ácido alcohol resistentes (Ehlers, MRW., Daffé, M. 1998; Florczyk, MA. *et al.* 2001; Pieters, J. 2001; Salyers, A. *et al.* 2002). Es de crecimiento lento, se multiplica en promedio cada 20 a 22 horas, por lo que se requiere de 4 a 6 semanas para tener poblaciones densas (Cole, ST. *et al.* 1998; Madigan, 2000). Crecen en medios especiales, a temperatura de 37°C y en un rango de pH de 7.0 a 7.2. Las micobacterias son hidrofóbicas, tienden a crecer en agregados, en filamentos o ramificaciones (Shinnick TM, King, CH. *et al.* 1995; Madigan, 2000).

Esta bacteria es un actinomiceto que se encuentra cercanamente relacionada con bacterias saprofíticas como *Mycobacterium smegmatis* (Russell, DG. 2001). Hace parte del complejo *M. tuberculosis* junto con *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. microti* (Collins, DM. 1996, Cole, ST. *et al.* 1998) con los cuales comparte un 99% de similitud a nivel de nucleótidos, poseen secuencias casi idénticas de ARN ribosomal (ARNr) 16S y difieren extensamente, en términos de su tropismo, fenotipos y patogenicidad (Brosch, R. *et al.* 2002).

La constitución química de la pared bacteriana está compuesta por ácidos micólicos, ceras complejas y glicolípidos (Figura 1). Los ácidos micólicos contienen cadenas laterales que se unen a la molécula de ácido murámico del peptidoglicano a través de enlaces fosfodiésteres y a los arabinogalactanos por

uniones de glicolípidos. Otro componente importante son los dimicolatos de trehalosa y los sulfolípidos, los cuales son participes en el proceso de virulencia. Otro constituyente único es el lipo-arabino-manano (L.A.M.) que puede contribuir al daño del hospedero (Valenzuela, M. 2000).

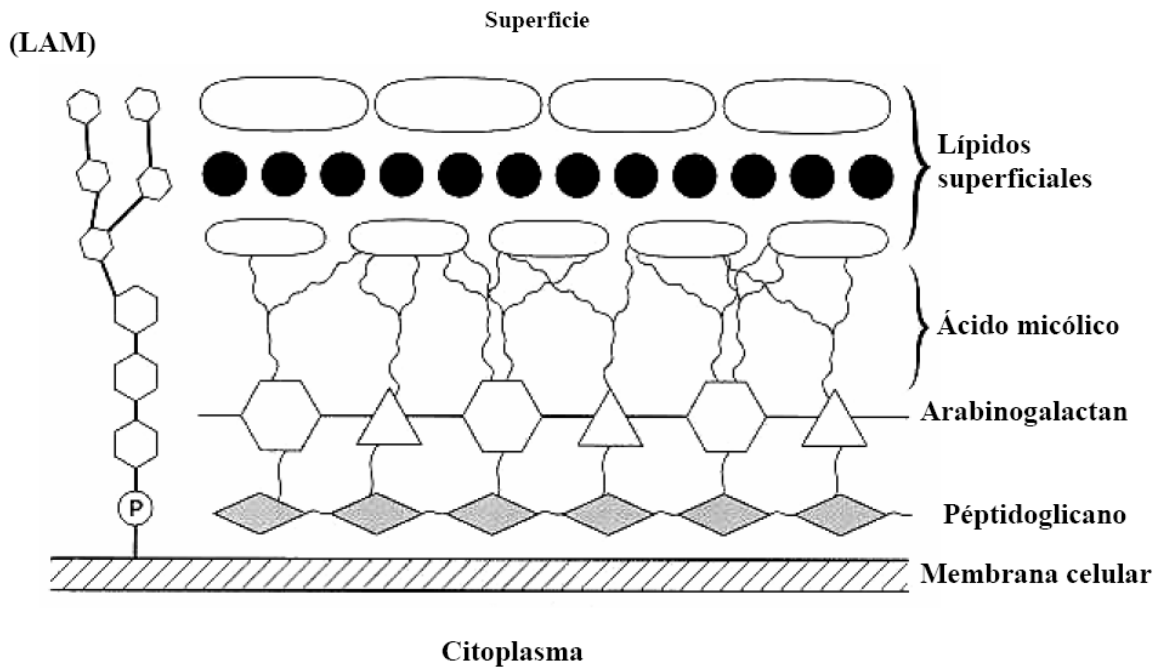


Figura 1. Estructura y composición química de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Valenzuela, M. 2000.

La resistencia al alcohol está dada por la composición química de la pared celular de la bacteria, en especial por los ácidos micólicos presentes, por lo tanto, tienen una tinción específica denominada Ziehl-Neelsen en donde se utiliza fucsina fenicada, alcohol ácido y azul de metileno. El fenol tiene como función permitir la penetración de la fucsina dentro de los lípidos, el alcohol ácido decolora y finalmente el azul de metileno sirve como un colorante de contraste. Las micobacterias se observan de color rojo y el resto de los microorganismos no alcohol resistentes se observan azules (Figura 2) (Madigan *et al.* 2000).



Figura 2. Tinción de Zielhl Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis*.

<http://www.mf.uni-lj.si/imi/images/preparati/mikrobi/mycob01.jpg>

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia) consiste en 4.4×10^6 pares de bases (pb) y contiene aproximadamente 4000 genes (Figura 3). Cerca de 200 genes del genoma de *M. tuberculosis* codifican para proteínas enzimáticas del metabolismo de ácidos grasos, aproximadamente el 6% del total del genoma (Tabla 1). 100 de ellos están fuertemente implicados en la β -oxidación de ácidos grasos [Smith, I. 2003].

Tabla 1. Clasificación general de los genes de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Smith, I 2003

Función	No. De Genes	% del Total	% de capacidad codificante
Metabolismo de lípidos	225	5.7	9.3
Vías de señales	207	5.2	6.1
Procesos celulares y pared celular	517	13.0	15.5
Estabilidad de RNAs	50	1.3	0.2
Elementos IS y bacteriófagos	137	3.4	2.5

Proteínas PE* y PPE**	167	4.2	7.1
Metabolismo intermediario y Resp.	877	22.0	24.6
Proteínas reguladoras	188	4.7	4.0
Virulencia, detoxificación y virulencia	91	2.3	2.4
Funciones hipotéticamente conservadas	911	22.9	18.4
Proteínas de función desconocida	607	15.3	9.9

*, ** Proteínas ácidas ricas en glicina

Tiene un alto contenido de guanina-citocina (G-C), el cual es constante a lo largo de todo su genoma [Smith, I. 2003].

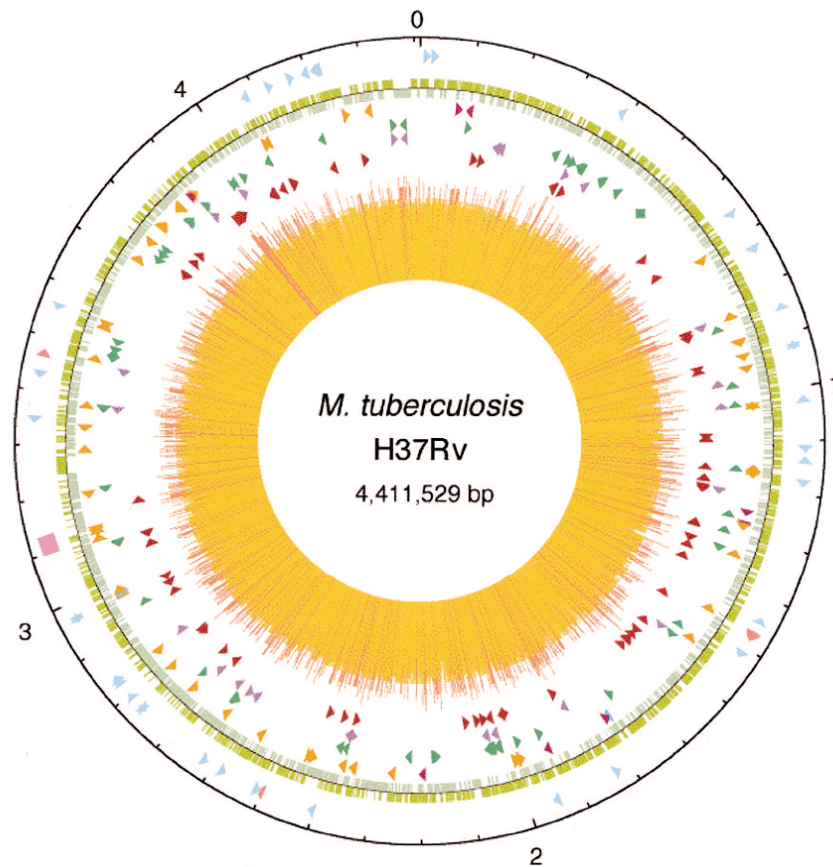


Figura 3. Mapa circular del cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv .

Tomado de Cole, ST. 1998.

PROCESO DE INFECCIÓN

La infección causada por *M. tuberculosis* depende de dos parámetros fundamentales: la virulencia de la bacteria y la resistencia del hospedero frente a la misma (Madigan 2000; Pieters, J. 2001). Hay dos clases de infecciones: primaria y post-primaria (reinfección) (Madigan 2000). Tanto el bacilo como el hospedero participan en una compleja red de interacciones que pueden llevar a la eliminación del patógeno (no infección), permanencia a largo plazo del bacilo (infección latente) o una enfermedad activa (tuberculosis primaria o reactivación) (Wayne, L. 1994; Deretic, V., Fratti, RA. 1999).

El proceso de infección consta de los siguientes pasos: i) transmisión, adherencia e ingestión por los macrófagos, ii) prevención de la acidificación del fagosoma, iii) inhibición de la fusión normal al lisosoma, iv) formación del granuloma, v) diseminación de la infección dentro del hospedero, vi) modulación del sistema inmune del hospedero, y vii) dormancia o latencia y viii) reactivación (Shinnick TM, King, CH. *et al.* 1995; Collins, DM. 1996).

Transmisión, adherencia e ingestión por los macrófagos.

La enfermedad se disemina persona a persona en forma de aerosol, la transmisión ocurre cuando hay un contacto prolongado entre un portador de la bacteria y otra persona susceptible (Salyers, A. *et al.* 2002, Clark-Curtiis, JE. *et al.* 2003). Aproximadamente el 30% de las personas expuestas llegan a ser infectadas; el 60-90% de estas personas tendrán una respuesta inmune efectiva, permitiendo la contención de la enfermedad (Manabe, YC., Bishai, WR. 2000). Una vez inhaladas, menos del 10% de las bacterias llegan a los bronquiolos y alvéolos (órganos diana); la gran mayoría se quedan en el epitelio respiratorio superior en donde son expulsadas por el aparato mucociliar (Fenton, MJ. *et al.* 1996). El aerosol que contiene las micobacterias llega hasta los alvéolos del tracto respiratorio del individuo, allí la bacteria penetra los macrófago alveolares donde la

tiene la habilidad de sobrevivir y multiplicarse. (Salyers, A. *et al.* 2002; Zhart, TC. 2003 ; Clark-Curtiis, JE. *et al.* 2003; Tyagi, JS., Sharma, D. 2004).

Los bacilos entran a los macrófagos por medio de uniones específicas a distintas moléculas de superficie celular (Britton, WJ. *et al.* 1994; Fenton, MJ. *et al.* 1996; Ehlers, MRW., Daffé, M. 1998). Las micobacterias poseen partículas llamadas (opsoninas) que recubren la superficie celular y son de alta afinidad para receptores celulares de los macrófagos. Las micobacterias se pueden unir directamente vía receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4), por medio del receptor de manosa de macrófagos (MMRc) y el receptor de proteína surfactante A (SPA) (Fenton, MJ. *et al.* 1996; Ehlers, MRW., Daffé, M. 1998; Zhart, TC. 2003). Estas también pueden unirse a los macrófagos a través de los receptores de fibronectina y vitronectina (Britton, WJ. *et al.* 1994). *M. tuberculosis* entra a los macrófagos predominantemente vía CR3 (Pieters, J. 2001), este receptor parece ser la vía predilecta para diversos patógenos filogenéticamente no relacionados, lo cual hace pensar que constituye una vía segura para la entrada (Ehlers, MRW., Daffé, M. 1998).

Una vez ocurre la infección de los macrófagos alveolares, la bacteria prolifera intracelularmente dentro de ellos e induce citoquinas que inician la respuesta inflamatoria de los pulmones (Parrish *et al.*, 1998; Flynn *et al.*, 2001; Russell, DG. 2001). Durante la infección, el macrófago juega un papel contradictorio ya que es la unidad primaria celular de defensa y además, el sitio primario de la replicación de la bacteria. Este evento permite inferir que el macrófago alveolar es la primera célula del hospedero que responde a la invasión de la micobacteria y por lo mismo ayuda en su subsiguiente diseminación. (Cosma, *et al.* 2003).

Prevención de la acidificación del fagosoma

Los macrófagos alveolares atizan los bacilos y los encierran en fagosomas. Si los macrófagos se activan, los fagosomas se fusionan con los lisosomas y la bacteria

es eliminada (Clark-Curtiis, JE. *Et al.* 2003); si no están activos, los bacilos sobreviven y crecen en los fagosomas alterando la maduración a fagolisosomas (Parrish *et al.*, 1998; Clark-Curtiis, JE *et al.* 2003).

El crecimiento intracelular de las bacterias depende de su habilidad para evitar la destrucción por parte de las enzimas lisosomales, los intermediarios de oxígeno reactivos (ROIs) y los intermediarios de nitrógeno reactivos (RNIs) (Fenton, MJ. *et al.* 1996); además, ellas deben someterse a un ambiente con un pH ácido (Smith, I. 2003).

Estudios han revelado que las membranas vacuolares que rodean los bacilos no poseen la ATPasa de protones responsable de la acidificación fagosomal (Sturgill-Koszycki, S. *et al.* 1994; Fenton, MJ. *et al.* 1996, Ehlers, MRW., Daffé, M. 1998). Sin embargo, se ha mostrado una heterogeneidad considerable de pH entre las diferentes vesículas, con una disminución inicial de pH, seguida por una recuperación y equilibrio de pH entre 6.3 y 6.5 (Deretic, V., Fratti, RA. 1999; Höner zu Bentrup, K., Russell, DG. 2001). El mantenimiento del pH fagolisosomal alrededor de 6.5 restringe la actividad de la hidrolasa lisosomal, permitiendo la capacidad de supervivencia intracelular del bacilo (Sturgill-Koszycki, S. *et al.* 1994).

Inhibición de la fusión normal con el lisosoma.

Varios patógenos intracelulares han desarrollado y evolucionado mecanismos para evadir el microambiente vacuolar. *Listeria* y *Shigella*, por ejemplo, físicamente escapan del fagosoma y se replican en el citoplasma, mientras que *M. tuberculosis*, al igual que *Legionella*, inhibe la fusión fagosoma-lisosoma (Smith, I. 2003).

Es posible que la micobacteria tenga por lo menos dos tipos de mecanismos adaptativos: a) tener una restricción temprana de la fusión fagolisosomal en la

infección; b) tener una adaptación a la fusión fagolisosomal dentro de los macrófagos activos de los granulomas tardío en la infección (Cosma, et al. 2003).

Formación del granuloma

Cuando la bacteria ya se encuentra en el tejido profundo de los macrófagos y tal vez otras células que han sido fagocíticas, macrófagos adicionales y linfocitos migran hacia el sitio de infección y forman un granuloma (Flynn *et al.*, 2001; Cosma, *et al.* 2003). Se puede decir que un granuloma es una colección organizada de macrófagos diferenciados con una morfología particular, que contiene bacilos fagocitados rodeados por linfocitos (Manabe, YC., Bishai, WR. 2000, Pieters, J. 2001; Cosma, *et al.* 2003; Zahrt, TC. 2003; Flynn, JL., Chan, J. 2005).

Generalmente la formación del granuloma sirve para contener a los patógenos, previniendo su crecimiento continuo y su diseminación al resto del tejido alveolar, del pulmón y otros órganos. Adicional a esto, concentra la respuesta inmune directamente en el sitio de infección (Fenton, MJ. *et al.* 1996; Höner zu Bentrup, K., Russell, DG. 2001; Tyagi, JS., Sharma, D. 2004). El granuloma se mantiene en el hospedero persistentemente infectado, debido a la estimulación crónica de las células inmunes y forma la base de la lesión de la tuberculosis (Flynn *et al.*, 2001). Los granulomas recién formados están compuestos por fagocitos mononucleares inmaduros rodeados de células efectoras linfocíticas como las células T CD4+ y CD8+. Durante el proceso de maduración a granulomas productivos, los fagocitos mononucleares se diferencian en macrófagos y llegan a ser activados, agregándose en células gigantes multinucleares y células “epiteloidales” (Zahrt, TC. 2003) (Figuras 4 y 4B).

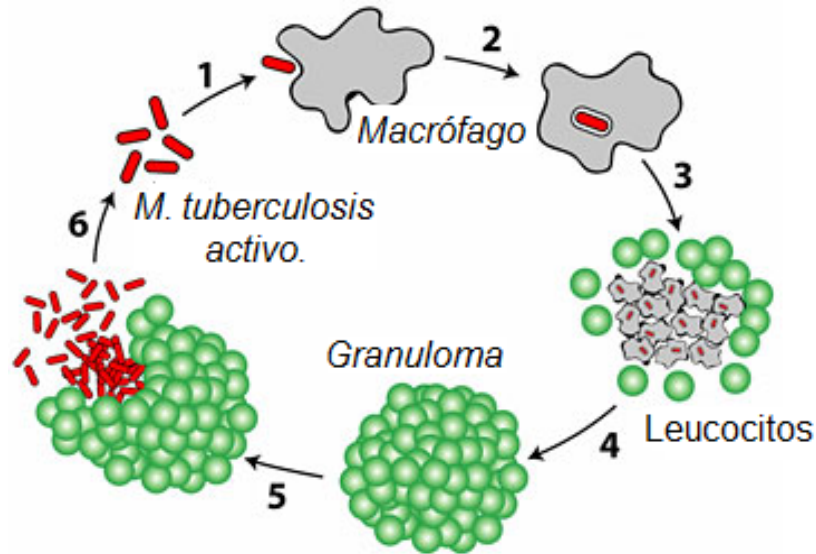


Figura 4A. Formación del Granuloma. Modificado de www.nyas.org/images/mt.
New York Academic of Science.

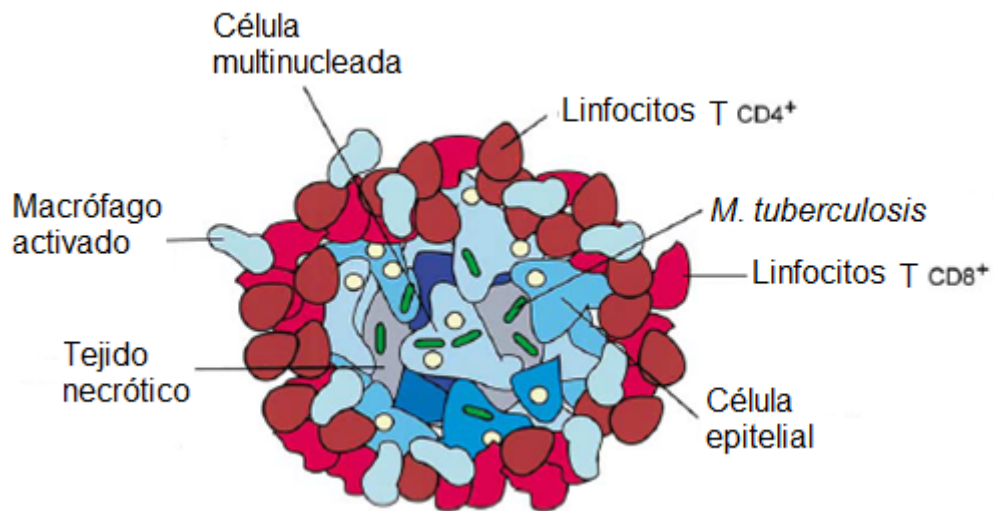


Figura 4B. Composición de un Granuloma maduro. Modificado de Burbano, 2005).

Dentro del granuloma se cree que la micobacteria se adapta a un ambiente hostil y bastante dinámico: la mayoría del tejido alrededor se encuentra calcificado o necrótico; el interior del granuloma se piensa que está desprovisto o contiene

bajos niveles de oxígeno, posee un pH ácido, contienen altas concentraciones de CO₂, posee altos niveles de ácidos orgánicos alifáticos y enzimas hidrolíticas. Además, alrededor del Granuloma existe un gran número de compuestos antimicrobiales liberados por células inmunes que rodean el granuloma como el interferón γ y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Wayne, LG. 1994; Yuan, Y. *et al.* 1996; Cunningham, AE., Spreadbury, CL. 1998; Florczyk, MA. *et al.* 2001; Smith, I. 2003; Zahrt, TC. 2003). Se ha sugerido que el TNF juega un papel crucial en la formación y el mantenimiento del granuloma tanto en ratones como en humanos. Paradójicamente, el TNF también contribuye significativamente al desarrollo de la inmunopatología (Flynn, JL., Chan, J. 2005). Se puede decir que el granuloma se puede ver como un nicho al cual la micobacteria se adapta y sobrevive por los diferentes mecanismos que posee para evadir la respuesta inmune (Flynn, JL., Chan, J. 2005).

Modulación del sistema inmune del Hospedero

A pesar de la fuerte respuesta inmune que involucra células T CD4+ y CD8+, al igual que anticuerpos específicos contra los antígenos micobacterianos, ésta puede controlar más no eliminar la infección, lo cual indica que *M. tuberculosis* ha evolucionado en diferentes mecanismos para modular o evadir los efectos por parte del hospedero (macrófagos que hacen parte del granuloma) (Flynn, JL., Chan, J. 2003).

En resumen, se puede decir que las micobacterias manipulan la respuesta del sistema inmune de la siguiente forma: resistencia a los RNIs; detención de la maduración de los fagosomas a fagolisosomas, lo cual hace que se evadan los efectos antimicrobianos de los lisosomas; inhibición de la presentación de antígenos micobacterianos a las células T, entre otros. Todos estos mecanismos de evasión probablemente y en gran parte promueven la persistencia del patógeno por años dentro del hospedero. De gran importancia son todas las moléculas que

median todas estas estrategias, ya que pueden ser blancos potenciales para agentes terapéuticos contra la micobacteria (Flynn, JL., Chan, J. 2003).

Latencia o Dormancia.

En un estado de dormancia, la actividad metabólica desciende casi hasta niveles basales, allí, las células pueden permanecer por largos periodos de tiempo sin dividirse. Sin embargo, este estado puede revertir a crecimiento activo si se encuentran condiciones favorables: pH 6.8 – 7.0, temperatura de 36°C, presión de oxígeno atmosférico 20% (Kaprelyants, AS. *et al.* 1993; Yuan, Y. *et al.* 1998).

La latencia también se ha descrito como “persistencia no replicativa” (NRP), que puede explicarse por la ausencia de replicación o porque el número bajo y constante de bacterias resulta de la dinámica del equilibrio entre la replicación bacterial y la eliminación de ellas por parte del hospedero (Cosma, *et al.* 2003). La tuberculosis latente es un síndrome clínico que ocurre luego de que un individuo ha sido expuesto a la bacteria, se ha establecido la infección y se ha generado una respuesta inmune para controlar el patógeno que lo lleva a un estado quiescente. Las personas con tuberculosis latente no son contagiosas (Parrish, NM. *et al.* 1998). Se cree que algunos factores que contribuyen al inicio de este estado son la disminución de nutrientes, la disminución en pH, la generación de productos que limitan el crecimiento y el agotamiento de oxígeno (Yuan, Y. *et al.* 1998; Wayne *et al.* 2001; O’Toole, R. *et al.* 2003).

Se han identificado diferentes genes que se inducen durante la latencia, como el gen *acr* que codifica para la proteína alfa cristalina, y el gen *icl* que codifica para la enzima isocitrato liasa que hace parte del ciclo del glioxilato (Parrish *et al.* 1998). Se puede decir entonces que existen dos hipótesis para explicar el proceso de regulación génica que lleva al desarrollo de la latencia. La primera es, que existe un cambio en expresión génica semejante a lo que ocurre cuando las células entran en la fase estacionaria, como resultado de la deprivación de nutrientes y/o

la hipoxia dentro del ambiente granulomatoso. En la segunda hipótesis, se dice que la micobacteria tiene un programa de desarrollo que conduce a la generación de una especie de “espora” específicamente adaptada para la persistencia y resistencia frente a condiciones desfavorables de crecimiento (Young, D. *et al.* 2002).

PRINCIPALES TIPOS DE ESTRÉS QUE ENFRENTA *Mycobacterium tuberculosis* EN EL MOMENTO DE INFECCIÓN

La destreza de microorganismos patógenos para soportar el estrés ambiental tanto fuera como dentro del hospedero, juega un papel crítico para determinar su éxito como patógeno (Bodmer, T. *et al.* 2000). A continuación se presentan los principales tipos de estrés que la micobacteria enfrenta durante la infección.

Exposición a agentes oxidantes

El primer estrés al que se ve enfrentada la bacteria es la exposición a agentes oxidantes. Los macrófagos activos producen intermediarios de nitrógeno (RNI) y de oxígeno reactivos (ROI) (Manganelli, *et al.* 2004). El término RNI se refiere a los estados oxidados y a los productos de nitrógeno de la sintasa de óxido nítrico, que incluyen desde el óxido nítrico (NO) a nitrato (NO₃) y que se encuentran en ambientes fisiológicos. Estos intermediarios incluyen NO-, NO₂, NO₂⁻, N₂O₃, N₂O₄, s-nitrosotioles, peroxinitrito (OONO), y complejos de hierro-dinitrosil. Los ROI son los productos intermediarios de la reducción del O₂ hasta llegar al agua, como son el superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (OH⁻) y productos reactivos de éstos con haluros y aminas (Nathan, C., Silo, MU. 2000). Resistir los efectos del estrés oxidativo y nitrosativo es un proceso crítico para el establecimiento y mantenimiento de la infección por parte de patógenos como *M. tuberculosis*.

Los ROIs y NOIs pueden dañar las bases del ADN, lípidos y varios motivos químicos, tales como los clusters de Fe-S, grupos heme, metales de transición, entre otros (Zahrt, TC., Deretic, V. 2002, Nathan, C., Silo, MU. 2000). El daño provocado por los ROIs y RNIs conlleva a una inhibición general del metabolismo celular, alterando los procesos asociados con el transporte activo dependiente de protones, utilización de oxígeno y de la fosforilación oxidativa (Zahrt, TC., Deretic, V. 2002).

Exposición a pH ácidos

El segundo tipo de estrés es la exposición a pH ácido. El bloqueo que la micobacteria hace a la acidificación del fagosoma no es completo y éstos empiezan a acidificarse rápidamente después de la fagocitosis; por lo tanto, se presenta un descenso en el pH (Manganelli, *et al.* 2004). Si los bacilos están viables, el pH desciende por debajo de 6, aunque luego puede aumentar a 6.5 después de varias horas. Esta acidificación se puede ver como una señal que usa la micobacteria para inducir la expresión de genes que se necesitan para alterar la maduración del fagosoma (Fisher, MA. *et al.* 2002). Sin embargo, un ambiente ácido es una de las condiciones más estresantes que encuentran las células vivientes, ya que para que funcionen normalmente sus proteínas y enzimas, la bacteria debe mantener un pH interno cercano a 7 (Piddington, DL. *et al.* 2000). Los genes que se expresan bajo condiciones ácidas juegan un papel en la patogénesis de la tuberculosis permitiendo su adaptación y supervivencia dentro de fagosomas y en la parte interior de las lesiones granulomatosas, que también pueden tener un pH ácido (Saviola, B. *et al.* 2003).

Las bacterias Gram positivas pueden presentar varios mecanismos de resistencia a pH ácido. Una combinación de estrategias constitutivas e inducibles que resultan en la remoción de protones (H^+), alcalinización del ambiente externo, cambios en la composición de la pared celular, producción de proteínas de choque general y chaperonas, expresión de reguladores transcripcionales, y respuestas a cambios

en la densidad celular, pueden contribuir a la supervivencia (Cotter, PD., Hill, C. 2003).

Alteración en las estructuras de la superficie celular

El tercer tipo de estrés enfrentado es el daño en estructuras de superficie debido a la acción de múltiples respuestas por parte del hospedero (Manganelli, *et al.* 2004). Los macrófagos y las NK, por ejemplo, secretan péptidos tóxicos y proteínas que actúan en la superficie de la micobacteria hidrolizando enlaces de moléculas que permiten la estabilidad de la pared y membrana celular.

Los macrófagos también pueden secretar ácidos grasos libres (AGL) tóxicos para la bacteria dentro del fagosoma y al exterior del mismo (Manganelli, *et al.* 2004). Los AGL cumplen un papel sinérgico con los RNIs en donde los FFA insertan sus motivos no polares en la bicapa lipídica de la membrana celular, causando cambios en la permeabilidad e inactivación de enzimas respiratorias. Los AGL median cambios en las funciones de la membrana, lo cual lleva a una amplificación de la actividad de los RNIs que causan la inactivación de las metaloenzimas bacterianas e inhiben la síntesis de ADN (Akaki, T. *et al.* 2000). Surfactantes alveolares pueden tener un papel de detergentes con actividad antibacteriana (Manganelli, *et al.* 2004). Los linfocitos T V γ 9/V δ 2 pueden destruir eficientemente a las micobacterias intra y extracelularmente por medio de moléculas citotóxicas como la granulicina y las perforinas (Dieli, F. *et al.* 2001).

Hipoxia

El cuarto estrés que experimenta la bacteria dentro del granuloma y fagosoma es la hipoxia. “*In vivo*”, la cantidad de bacilos en una lesión generalmente se correlaciona con el grado de oxígeno presente; esto sugiere que la disponibilidad de oxígeno puede limitar el crecimiento de la micobacteria durante la infección (Park, HD. *et al.* 2003). La disminución de oxígeno es una condición que se cree

puede ser el mejor candidato para la inducción de genes que se expresan en la persistencia de la micobacteria (Manganelli, *et al.* 2004).

La adaptación de la micobacteria frente a la hipoxia dentro del hospedero es un hecho. Dicha adaptación parece ser un paso clave en la persistencia del microorganismo e involucra la acción de varios genes concomitantemente (Mayuri, *et al.* 2002). Esta adaptación es una actividad coordinada a muchos niveles y una rápida alteración puede llevar a la muerte celular.

Bajo condiciones de microaerofilia e hipoxia, la micobacteria sufre cambios a nivel molecular, metabólico, estructural y fisiológico. Uno de ellos es la pérdida de la característica de ser alcohol resistente. Adicionalmente, se produce un engrosamiento de la pared celular, posiblemente este engrosamiento ayude a la micobacteria a sobrevivir bajo condiciones de hipoxia *in vivo*; puede servir como escudo que ofrece protección contra el ambiente hostil y las condiciones tóxicas encontradas en el granuloma (Cunningham AF., Spreadbury, CL. 1998). Las condiciones de hipoxia también alteran la resistencia a medicamentos antituberculosas convencionales y la sensibilidad a metronidazol.

Ausencia de nutrientes

El quinto estrés es la inanición de elementos esenciales (Manganelli, *et al.* 2004). Este se presenta en forma de depleción de aminoácidos, carbohidratos y micronutrientes; Este episodio coincide con la formación de los granulomas (Primm, TP. *et al.* 2000).

Algunas especulaciones han centrado el papel del metabolismo de lípidos en mantener la viabilidad de la micobacteria en la ausencia de un crecimiento robusto por la falta de substrato. Bajo esta aproximación, conocida ésta como la hipótesis lipolítica, se cree que el ambiente caseoso intragranular es rico en lípidos y la micobacteria presenta un conjunto de enzimas para utilizar los lípidos como la fuente primaria de carbono (Cole, ST. *et al.* 1998; Primm, TP. *Et al.* 2000).

Para que la micobacteria se pueda adaptar a la disminución de nutrientes, esta debe utilizar una variedad de mecanismos de control transcripcional. En algunos casos, la expresión de genes específicos es controlada por factores sigma alternativos como *sigF* o *sigB*. Adicional a esto, algunos microorganismos, entre ellos *M. tuberculosis*, traducen la inanición de nutrientes en la acumulación de nucleótidos hiperfosforilados de guanina (p) ppGpp- (Primm, TP. *et al.* 2000). Esto conduce a alteraciones en la expresión de genes que suprimen la síntesis de especies de ARN estables (ARNr, ARNt), induce vías degradativas, activa ciertos genes de fase estacionaria, y modula genes que regulan la replicación del ADN y la tasa de crecimiento (Primm, TP. *et al.* 2000).

GENES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE LATENCIA

Sistema de dos Componentes DosRs

El flujo de señales ó la comunicación entre moléculas intracelulares en las bacterias se lleva a cabo principalmente por la transferencia de un grupo fosforil (fosforilación) entre dominios conservados de proteínas reguladoras de dos componentes: una donadora y la otra receptora (Saini, DK, *et al.* 2004B). En el primer paso, un sensor, que usualmente es una protein-histidin-kinasa se autofosforila en un residuo histidina conservado, en respuesta a cambios ambientales extracelulares como tensión de O₂, temperatura, pH, iones, solventes orgánicos, radicales de O₂ etc. En el segundo paso, este grupo fosforil es transferido a un residuo conservado de ácido aspártico en el dominio N-terminal del regulador de respuesta. La regulación de este sistema ocurre por modulación ya sea de la actividad kinasa o fosfatasa de estas proteínas (Stock, AM. *et al.* 1995).

Los sistemas moleculares de dos componentes se encuentran íntimamente relacionados en la regulación de la expresión génica de la bacteria, desde la toma

de azúcares hasta la virulencia bajo una variedad de cambios de condiciones ambientales (Dasgupta, N. *et al.* 2000). *M. tuberculosis* posee 11 sistemas de dos componentes completos, los cuales se cree que modulan la expresión de múltiples genes que facilitan la adaptación de los bacilos a los cambios ambientales adversos (Saini, DK. *et al.* 2004B), (Rodríguez *et al.* 2007)

Entre estos sistemas se encuentra el regulón *DosRS*. DosR activa la transcripción de 47 genes que promueven la supervivencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el estado no replicativo (Wisedchaisri, G. *et al.* 2005). Los genes *dosR-dosS* codifican un regulador de respuesta (RR, 217 aa) y una proteína histidinkinasa (HPK, 578 aa) respectivamente. Los marcos abiertos de lectura (ORFs) asignados, al igual que la descripción de los genes concuerda con dos de los genes denominados *Rv3133c* y *Rv3132c* respectivamente en el genoma anotado de *M. tuberculosis* H37RV (Dasgupta, N. *et al.* 2000). El locus *dosR-dosS* se encuentra precedido del gen *Rv3134c* que es potencialmente transcrito en la misma dirección del sistema de dos componentes y se predice que codifica una proteína rica en Ala-Val de 28 kDa, de función desconocida (Figura 5.) (Dasgupta, N. *Et al.* 2000; Boon, C., Dick, T. 2002). Cuando se observa la posición de los genes, los ORFs que codifican *DosR* y *DosS* se sobreponen en un nucleótido, y 27 pb separan *Rv3134c* de *dosR*. Puede ser probable que estos dos genes tengan comportamiento polisistrónico. Junto con *Rv3134c* estos tres genes pueden estar formando un operón de transcripción continua (Dasgupta, N. *et al.* 2000).

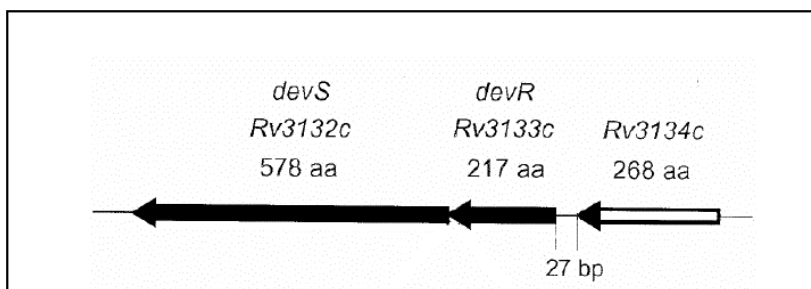


Figura 5. Organización genómica del locus *Rv3134c-dosR-dosS*. Tomado de (Mayuri *et al.* 2002).

El Sistema regulatorio de dos componentes *dosR-dosS* se expresa bajo condiciones de hipoxia u óxido nítrico (NO) al interior de los monocitos, éste evento no se puede interrumpir, lo cual hace pensar que cumple una función esencial en la fisiología del organismo (Dasgupta, N. *et al.* 2000). Sherman *et al.* propone que *dosR-dosS* están involucrados en la adaptación del bacilo frente a tenciones severas de oxígeno al interior del hospedero. *Rv3133c* parece ser que controla genes que también se expresan bajo esta condición como el *acr*, *Rv2623* y *Rv2626c* (Boon, C., Dick, T. 2002). *DosR* se une a una caja especial (*dosR* box) en la región promotora del *acr* (También llamado *hspX*) que codifica para una proteína chaperona alfa cristalina de 16KDa (Wisedchaisri, G. *et al.* 2005). Parece ser que *DosR* se une a un motivo particular de la secuencia corriente arriba de los genes que se expresan bajo condiciones de hipoxia, sin embargo, la unión es necesaria pero no suficiente para la inducción del gen.

La vía de transducción de la señal es mediada por *Rv3132c* y tal vez también por su homóloga *Rv2027c* (*dosT*) (Park, HD. *et al.* 2003) (una proteína de 573 aminoácidos que posee un 62.5% de identidad con *DosS*) (Dasgupta, N. *et al.* 2000). *DosR-DosS* media la adaptación de la bacteria frente a condiciones adversas a través de la transcripción de múltiples genes que conllevan a la síntesis de múltiples proteínas por una cascada de fosforilación y puede ser un paso clave regulatorio que une la limitación de oxígeno y la iniciación de *dosS* *dosR* y/o mantenimiento de la respuesta adaptativa a la hipoxia (Malhorta, V. *et al.* 2004).

Además de la inducción del *dosR-DosS* por hipoxia, a través de microarreglos y RTq-PCR se ha demostrado que éste regulón también se induce bajo otros tipos de estrés como exposición a S-nitrosoglutatona (GSNO), el cual es un donador de NO, rangos de concentración de etanol entre el 5 y 10% v/v, peróxido de hidrógeno H₂O₂ y bajo reposo absoluto ó standing (Kendall, SL. *et al.* 2004).

Proteína Alfa cristalina

La proteína alfa cristalina (α -crystallin), (Hsp 16.3), codificada por el gen *acr* conocido también como *hspX* o *Rv2031c*, pertenece a la familia de proteínas pequeñas de choque térmico (sHSPs), actúa como una chaperona ATP independiente y forma agregados en trímeros de alto peso molecular *in vivo* (Yuan, Y. *et al.* 1996). Sin embargo, esta proteína parece no inducirse por choque térmico (Verbon, A. *et al.* 1992). Homólogos bacterianos de esta proteína se han encontrado en *Bacillus subtilis* y están involucrados en la formación de esporas y como respuesta a varios tipos de estrés enfrentados en otros microorganismos (Yuan, Y. *et al.* 1998).

El gen *acr* se induce en la fase estacionaria de la curva de crecimiento y en cultivos incubados en quietud. Bajo estas condiciones hay cierta disminución de oxígeno en el sedimento bacteriano, lo cual puede explicar su inducción (Yuan, Y. *et al.* 1996; Florczyk, MA. *et al.* 2001).

La proteína se localiza en la membrana celular, en la infraestructura de la pared celular y con menos frecuencia en las regiones periféricas de los bacilos, lo cual sugiere que puede estar asociada con el mantenimiento de la integridad física de la célula; además, se la encuentra formando complejos agregados activos dentro y fuera de la célula (Cunningham AF., Spreadbury, CL. 1998). Al asociar la *alfa cristalina* con un engrosamiento en la pared celular y su importancia para la sobrevivencia del patógeno en macrófagos y granulomas, se puede decir que esta proteína facilita el re-arreglo de la pared celular de la micobacteria cuando se enfrenta a condiciones adversas (O'Toole, R. *et al.* 2003). Esta proteína le otorga un alto grado de resistencia a la célula permitiendo una estabilidad en las proteínas que se requieren para reactivar a las micobacterias cuando están en presencia de ambientes hostiles. La tensión de oxígeno puede servir como una señal para expresar proteínas como la α -cristalina, requerida para la sobrevivencia a largo plazo y la persistencia no replicativa de la bacteria (Yuan, Y. *et al.* 1996).

La inducción del *acr* en estados de hipoxia, su función como chaperona, su ubicación en la pared celular, el efecto negativo de su sobreexpresión en la tasa de crecimiento, y la correlación de su concentración celular con la tolerancia del bacilo a un choque abrupto anaeróbico, sugieren un papel crítico de este producto en la habilidad de la micobacteria para persistir sin replicarse en las regiones hostiles del tejido del hospedero (Garbe, TR. *et al.* 1999; Desjardin, LE. *et al.* 2001; Sherman, DR. *et al.* 2001; Mayuri *et al.* 2002).

Técnicas de Diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*.

El examen microscópico del extendido de esputos teñidos con Ziehl-Nielsen para bacterias ácido-alcohol resistentes, es el método estándar utilizado en el diagnóstico de la tuberculosis. Las ventajas de éste método son, sin duda alguna, los bajos costos variables y su especificidad en áreas de alta prevalencia; sin embargo, dicha técnica tiene serias limitantes que obstaculizan la extensión y la calidad de su aplicación, afectando en últimas, su impacto en el control de TB. Los equipos requeridos son difíciles de mantener en campo; los resultados son muy sensibles a la disposición y el entrenamiento del personal técnico, que se suma a la creciente incidencia de "baciloscopías negativas" en los países donde la infección por VIH es prevalente. Sumado a lo anterior, el tiempo entre la recolección de la muestra y el diagnóstico es muy largo debido a que el procesamiento de la muestra incluye la descontaminación y concentración, el extendido, secado, tinción y observación, además de la necesidad de efectuar los ensayos por duplicado o triplicado. El resultado es un diagnóstico que tarda mucho, con frecuencia inexacto, y finalmente mina la confianza del paciente en los servicios del laboratorio y el sistema de salud en general (Kubica GP. 2001).

Las técnicas que actualmente disponemos para el diagnóstico de las micobacterias son muy numerosas y las podemos englobar en los siguientes apartados:

- a. Observación microscópica de las micobacterias tras tinciones realizadas de extensiones de las muestras clínicas

- b. Diagnóstico de las micobacterias mediante diferentes técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos

- c. Aislamiento de las micobacterias mediante el cultivo diferenciales en medio sólido o líquido

Diversos grupos en el mundo han tratado de utilizar las técnicas inmunológicas para el desarrollo de diagnósticos en TB. Una prueba basada en la reacción antígeno-anticuerpo tal como aglutinación que no requieren alta tecnología serían ideales para el diagnóstico de la bacteria en todos los campos de diagnóstico de enfermedades infecciosas. La mayoría de estas pruebas serológicas utilizan antígenos purificados o mezclas de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* que son luego identificados por anticuerpos presentes en el suero de pacientes tuberculosos. Desafortunadamente, y a pesar de una investigación permanente en este campo, las pruebas desarrolladas no han dado los resultados de especificidad ni sensibilidad que ameriten el reemplazo de la baciloscopia.

Los grandes avances en el conocimiento de Biología molecular en cuanto a técnicas de diagnóstico para enfermedades infecciosas, han permitido conocer las secuencias específicas de DNA o RNA para cada especie de micobacterias, siendo así, la mejor alternativa para lograr una rápida y correcta identificación. Entre estas técnicas se incluyen las sondas de ácidos nucleicos marcadas con isótopos radiactivos, la amplificación de segmentos específicos, la secuenciación del 16S rRNA, el análisis de la restricción de fragmentos polimórficos (RFLP). Actualmente y gracias a la secuencia del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (Cole et al., 1998; Fleishman et al., 2002) y a los avances en los estudios de

proteómica y expresión de proteínas, se abre una nueva posibilidad para el desarrollo de este tipo de diagnósticos basados en el reconocimiento específico de cada uno de las proteínas expresadas

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS BAJO LAS DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis es un método analítico semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por *Tiselius* en el año 1937 (Garcia, H. 2000). Esta técnica se basa en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estos solutos migran hacia el cátodo o ánodo según su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Sirve como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas donde aportan un grado de pureza considerado (Garcia, H. 2000). Es una técnica útil además para determinar el peso molecular y el número de cadenas polipeptídicas de una proteína.

Western blot.

Es un método de transferencia cuantitativa de proteínas ribosomales entre muchas más, las cuales son separadas en primer lugar por electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente son transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular (electroblotting) (Towbin *et al* 1979). Posterior a este proceso, se realiza un enfrentamiento entre un anticuerpo que reconocerá la proteína de interés dentro de todas las proteínas que fueron fijadas a la membrana; seguido de un paso de rebelado como indicador del complejo proteína-anticuerpo.

Formas de abordar el estudio.

Modelos “in vivo” e “in vitro”

Como el proceso de la latencia y persistencia no replicativa en *M. tuberculosis* puede tomar varios años en manifestarse en el hospedero, se han desarrollado varios modelos “*in vitro*” e “*in vivo*” para simular las características y ambientes de una infección latente. Aunque estos modelos son limitados en su capacidad de recapitular completamente las características de la bacteria y el humano, proveen una plataforma útil para poder iniciar estudios que asignan aspectos específicos en el proceso de infección (Zahrt, TC. 2003).

A través de los modelos “*in vitro*”, se puede estudiar la expresión de diferentes genes que codifican para proteínas que le otorgan grados de resistencia frente a condiciones adversas que sufre la bacteria en el hospedero al momento de la infección (Wayne, LG; Sohaskey, CD. 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo.

En este proyecto se utilizó la cepa de *Mycobacterium bovis* BCG donada por la Universidad autónoma de Madrid a la Corporación CorpoGen. Por su alto grado de homología a nivel genético y molecular, *M. bovis* BCG se puede manipular como una cepa avirulenta de *M. tuberculosis* (Sherman, DR. *et al.* 2001).

El medio de cultivo para el crecimiento de las micobacterias fue medio líquido Middlebrook 7H9 cuya composición se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición del Middlebrook 7H9 (Difco laboratories).

Compuesto	Cantidad % (p/v)
Sulfato de amonio	0.05
Ácido glutámico	0.05
Citrato de sodio	0.01
Clorhidrato de piridoxina	$1 \cdot 10^{-4}$
Biotina	$5 \cdot 10^{-5}$
Fosfato dibásico de sodio	0.27
Citrato de hierro (III) y amonio	$4 \cdot 10^{-3}$
Fosfato monobásico de potasio	0.1
Sulfato de magnesio	$5 \cdot 10^{-4}$
Sulfato de zinc	$1 \cdot 10^{-4}$
Cloruro de calcio	$5 \cdot 10^{-5}$
Sulfato de cobre	$1 \cdot 10^{-4}$

Este medio fue suplementado con Tween 80 al 0.05% (v/v) (J.T. Baker), glicerol al 0.2%(v/v) (MolLabs), y ADC (complejo dextrosa albumina) al 10% (v/v) que

contiene albúmina bovina (Sigma), glucosa (Mallincknott) y cloruro de sodio (MolLabs). Se usó igualmente este mismo medio en forma sólida conteniendo agar (Difco laboratories) suplementado con Tween 80 al 0.05% (v/v) (J.T. Baker), glicerol al 0.2% (v/v) (MolLabs), y ADC al 10% (v/v).

Condiciones de crecimiento.

La cepa de *M. bovis* BCG se cultivó por duplicado en frascos Schott tapa rosca de 250 ml con un volumen particular (según la necesidad de cada experimento) de medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco laboratories). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en agitación a 150 rpm en un agitador orbital durante un periodo de 7 días. Al cuarto día de crecimiento (fase exponencial) se realizaron pases a medio de cultivo nuevo y fresco con el fin de trabajar con células en fase exponencial en cada experimento.

Estandarización del lisado de *Mycobacterium bovis* BCG.

Para la lisis de la micobacteria se partió de un volumen de 1.5 ml del cultivo líquido en fase exponencial, se recuperaron las bacterias por centrifugación y se lavaron dos a tres veces con tampón Tris-EDTA 10mM (TE) con el fin de retirar los residuos de medio. Sobre el “pellet” de bacterias lavadas se probaron tres siguientes protocolos:

Protocolo No. 1: Lisis enzimática.

Para la ruptura de la pared celular, se usó lisozima a una concentración de 2.5 mg/ml durante 30 minutos a 37°C, seguido de un paso de lisis bacteriana usando el detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% (p/v) y 85°C de temperatura por 3 minutos.

Protocolo No. 2: Lisis mecánica.

En este caso se usó rompimiento mecánico. Para ello el “pellet” lavado se resuspendió en tampón de lisis TEDP (Tris-HCl 10mM pH 7.4, SDS 1% (p/v), EDTA 1mM, PMSF 0.2mM) y se resuspendió en un volumen equivalente de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro previamente tratadas con ácido clorhídrico 8.4M. La ruptura mecánica se llevó a cabo en un Mini Bead Beater Bio-Spec a máxima velocidad en un solo ciclo de 5 minutos a temperatura ambiente.

Protocolo No. 3 Lisis por ebullición.

En este método, el “pellet” de células lavadas se colocó directamente en tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% (p/v), DDT 0.1 M (p/v), 0.01% (p/v) Azul bromofenol, Glicerol 10% (v/v) y se llevó a ebullición por tres minutos.

Estandarización de las diferentes condiciones de estrés “in vitro” de *Mycobacterium bovis* BCG.

Para cada uno de los métodos de estrés diseñados se establecieron controles negativos que tenían el mismo procedimiento de las muestras estresadas pero sin el agente causal del estrés.

Estrés por pH ácido.

Este tipo de estrés se realizó según los autores mencionados a continuación con algunas modificaciones acordes a las condiciones de trabajo. Se evaluaron diferentes valores de pH (4.5; 5.5; y 6.0) y diferentes tiempos de exposición a los mismos como se describe a continuación:

Para el pH 4.5 los tiempos evaluados fueron 30 y 60 minutos según Yuan *et al.* 1996.

Para el pH 5.5 los tiempos evaluados fueron 30 y 60 minutos según Hu *et al.* 2005.

Para el pH 6.0 los tiempos evaluados fueron 30 y 60 minutos según Fisher *et al.* 2002 y Burbano *et al.* 2005.

A partir de un cultivo líquido de *M Bovis BCG* en fase exponencial, se tomaron alícuotas de 5 ml en tubos de 50 ml, se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y las bacterias fueron re-suspendidas en medio líquido Middlebrook 7H9 (descrito anteriormente) cuyo pH fue ajustado a los valores 4.5, 5.5 y 6.0 por medio de solución amortiguadora de acetato de sodio a una concentración final de 50 mM. Estos se llevaron a incubación a 37°C y 150 rpm durante los tiempos ya mencionados. Transcurrido el tiempo de estrés en pH ácido, el medio acidificado fue retirado por centrifugación y las células se lisaron por el método escogido (método mecánico). El perfil proteico se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

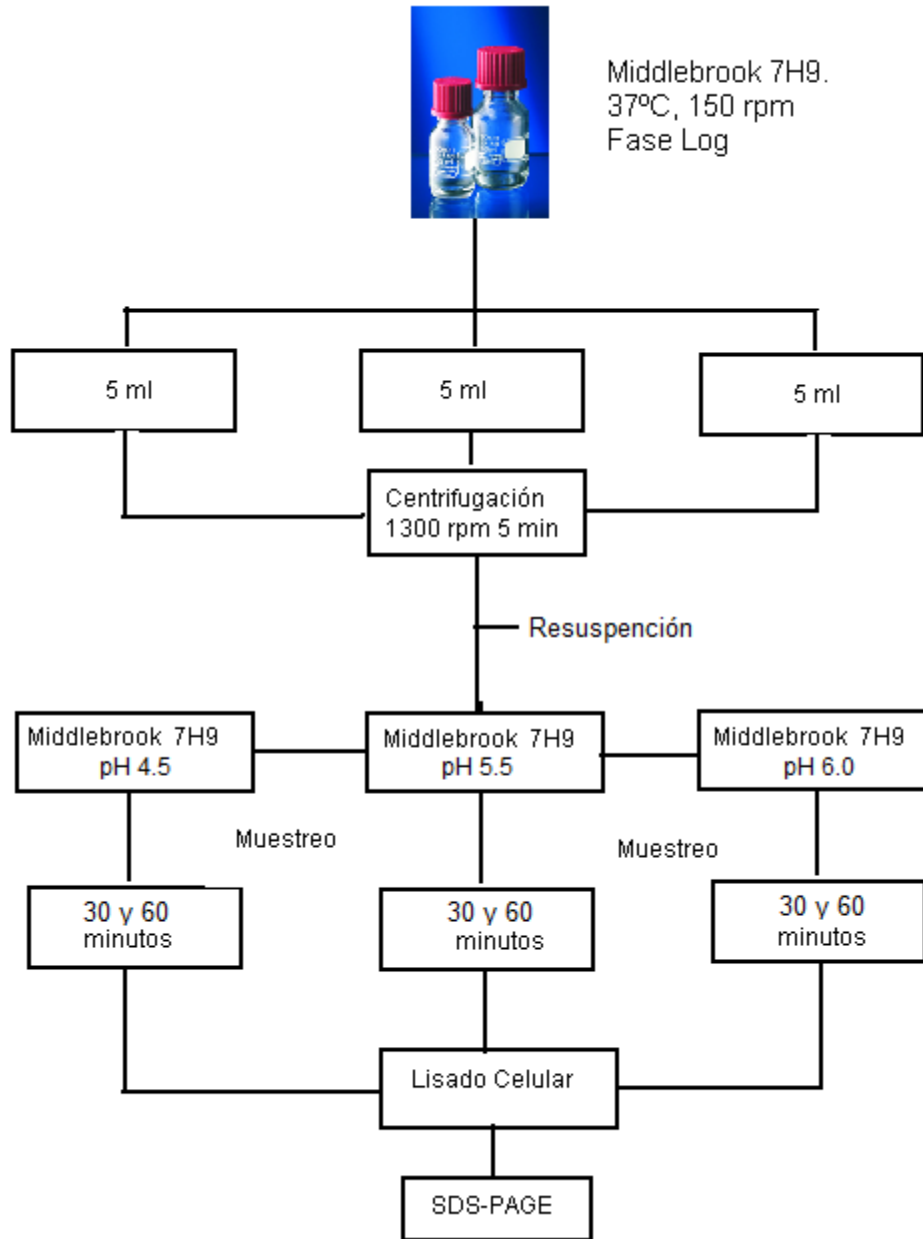


Figura 6. Procedimiento estrés por pH.

Estrés por alcohol (etanol).

Este tipo de estrés se realizó según Kendall *et al.* 2003 y Hu *et al.* 2005 con algunas modificaciones. A partir de un cultivo líquido de *M Bovis BCG* en fase

exponencial, se tomaron alícuotas de 5 ml en tubos de 50 ml, se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y las bacterias fueron resuspendidas en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con etanol a una concentración final de 5, 10 y 15% (v/v) y llevadas a incubación a 37°C y 150rpm. Para cada concentración se evaluaron los tiempos 15, 30 y 60 minutos. Transcurridos los cuales, el medio con etanol fue retirado por centrifugación y las células se lisaron por el método escogido. El perfil proteico fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

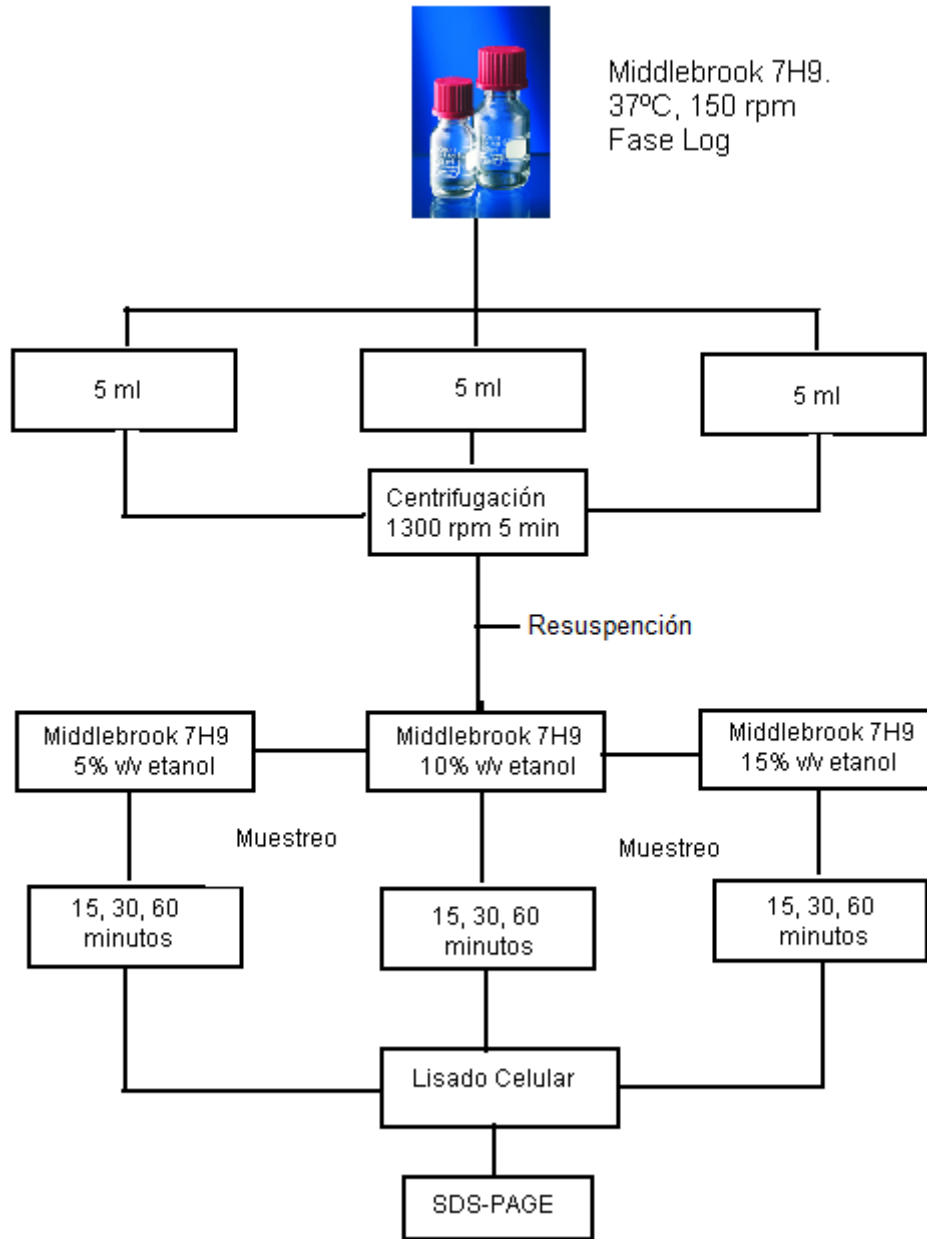


Figura 7. Procedimiento estrés por etanol.

Estrés oxidativo (H₂O₂).

Este tipo de estrés se realizó según lo reportado por Hu *et al.* 2005 y Kendall *et al.* 2003 con algunas modificaciones. A partir de un cultivo líquido de *M Bovis BCG* en fase exponencial, se tomaron alícuotas de 5 ml en tubos de 50 ml, se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y las bacterias fueron re-suspendidas en medio líquido Middlebrook 7H9 suplementado con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como agente oxidante a una concentración final 10, 15 y 20 mM. Los tiempos de exposición evaluados fueron 30, 60 y 90 minutos y 150 rpm para cada una de las concentraciones. Transcurridos los tiempos de estrés, el medio con peróxido se retiró por centrifugación y las células fueron lisadas por el método escogido, luego se evidenció el patrón de migración de las proteínas expresadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

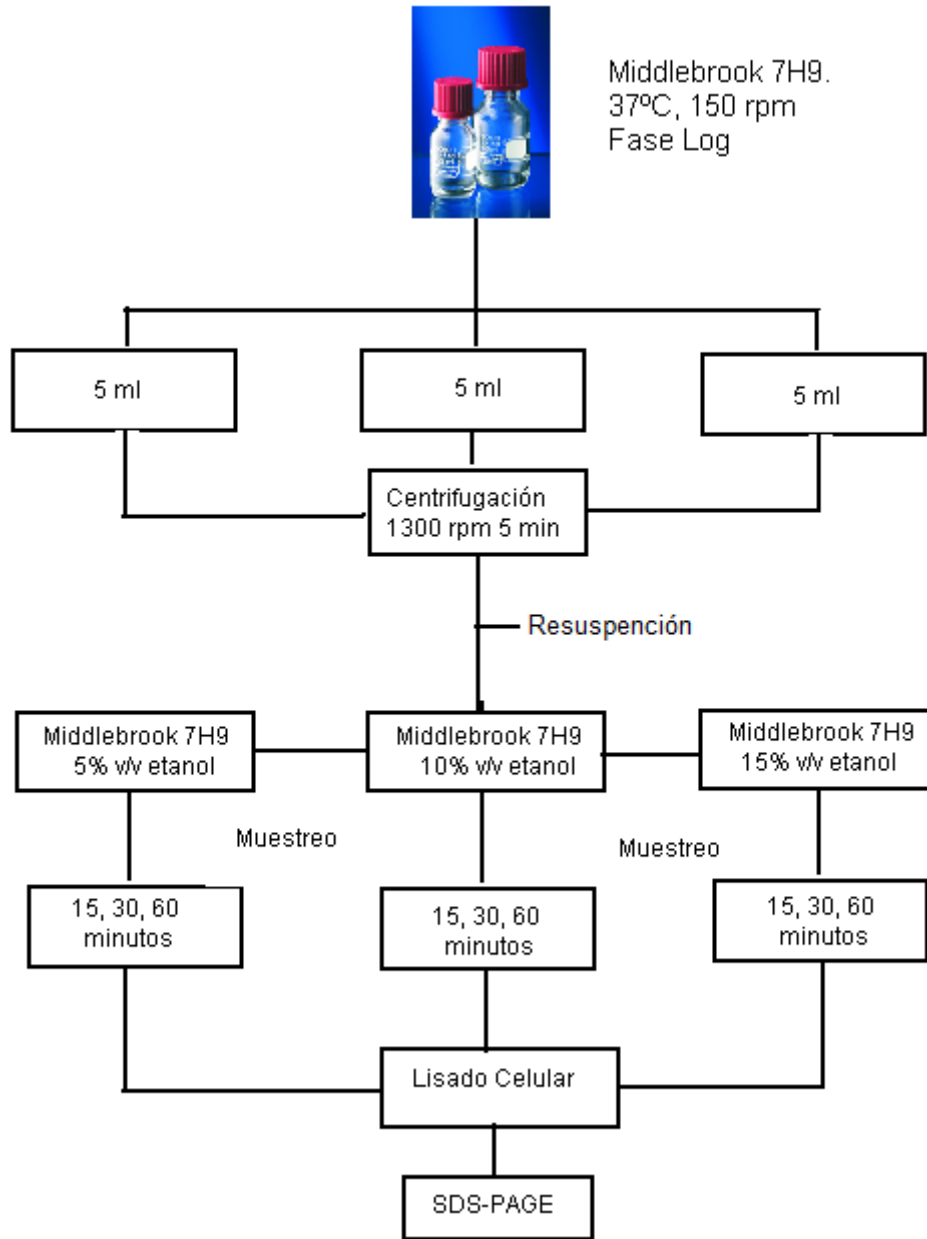


Figura 8. Procedimiento estrés oxidativo.

Estrés por hipoxia.

Este tipo de estrés se realizó según Cunningham *et al.* 1997 con algunas modificaciones. A partir de un cultivo líquido de *M Bovis BCG* en fase exponencial,

se tomaron alícuotas de 5 ml en tubos tapa rosca, se retiró el medio de cultivo por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y las bacterias fueron resuspendidas en medio líquido Middlebrook 7H9 fresco. A cada tubo se le adicionó parafina líquida para generar un ambiente anaeróbico. Los tiempos de evaluación en este ambiente de hipoxia fueron 2, 4 y 7 horas. Transcurrido el tiempo de estrés, se retiró la parafina y el medio de cultivo y las células fueron lisadas por el método escogido. El perfil proteico fue analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

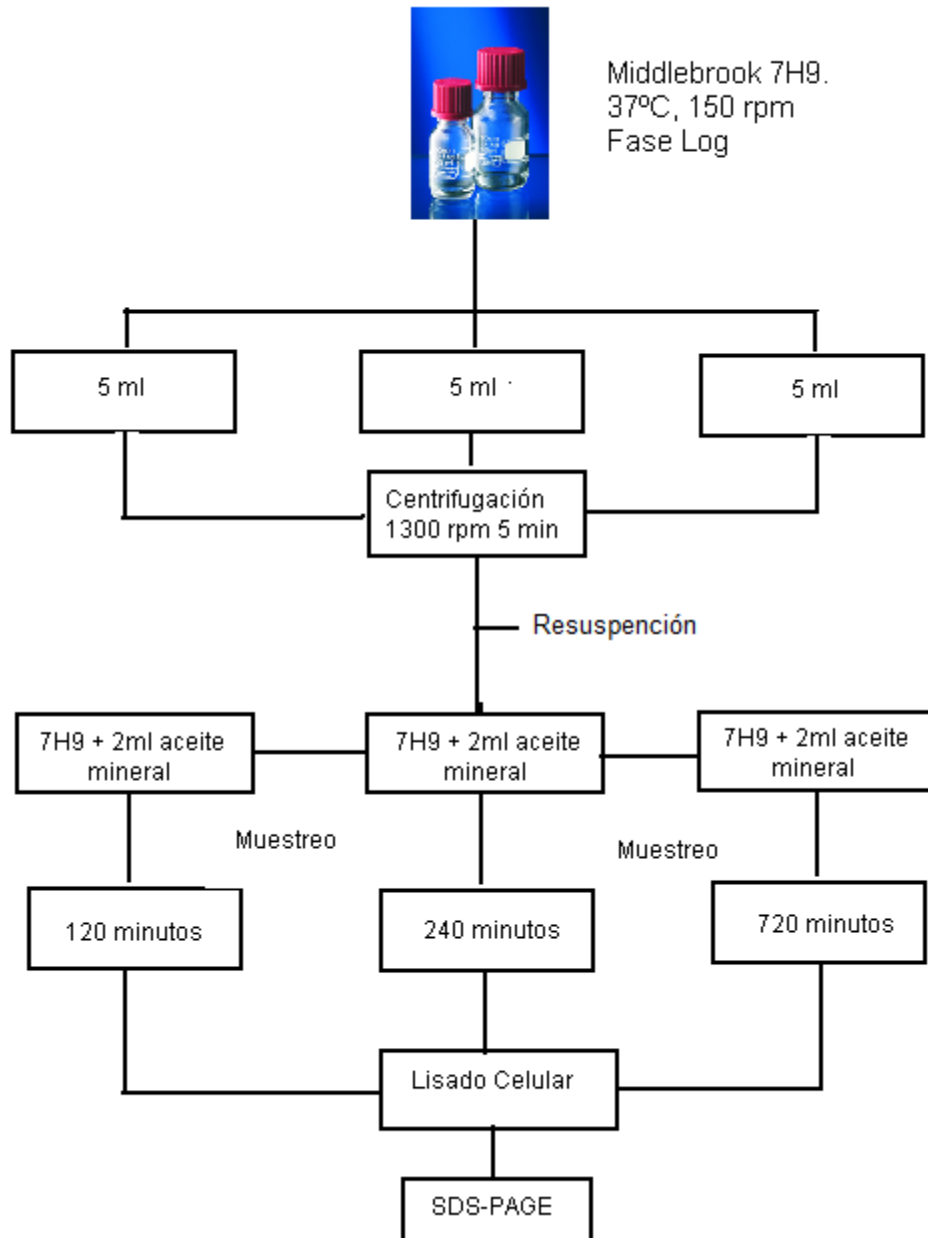


Figura 9. Procedimiento estrés por hipoxia.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ALFA CRISTALINA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS

Cuantificación de proteínas totales a partir de lisados de *Mycobacterium bovis* BCG.

Sobre cada uno de los lisados celulares se determinó la concentración de proteína total por el método de *Bradford M.M 1976* adaptado a microplaca con el fin de determinar las diferencias de este parámetro en los diferentes tratamientos de estrés teniendo como referencia los controles utilizados. Igualmente se usó para colocar cantidades de proteína equivalentes en cada electroforesis. Para cada cuantificación se elaboró una curva de calibración utilizando un patrón de gamaglobulina G entre 80 y 5 µg/ml

Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida (17%T, 3%C) siguiendo el método descrito por *Laemmli* en 1970, usando una cámara Mini-Protean II miniGel BioRad, bajo las indicaciones del fabricante. El corrido electroforético se realizó a voltaje constante (100 V los primeros 15 minutos, 150 V por 2 horas. Los geles fueron teñidos con Azul brillante de Coomassie R-250 y desteñidos en una mezcla metanol 40%(v/v), ácido acético 10%(v/v)..

Para llevar a cabo el análisis de los perfiles proteicos, se corrieron simultáneamente patrones de peso molecular (10-250 KDa Invitrogen) que permitieron evidenciar la posición de la proteína alfa cristalina.

RESULTADOS

Condiciones de crecimiento

La cepa de *Mycobacterium bovis* BCG fue cultivada en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco laboratorios) por duplicado a 37°C en agitación a 150 rpm durante 8 días. Las muestras de los cultivos fueron tomadas al quinto día de crecimiento, (fase exponencial). La densidad óptica (D.O._{.520nm}) de los cultivos correspondiente al día de muestreo osciló entre 0.532 y 0.588nm y se tuvo un recuento de unidades formadoras de colonias entre $6,6 \times 10^5$ y 8.4×10^5 ufc/ml.

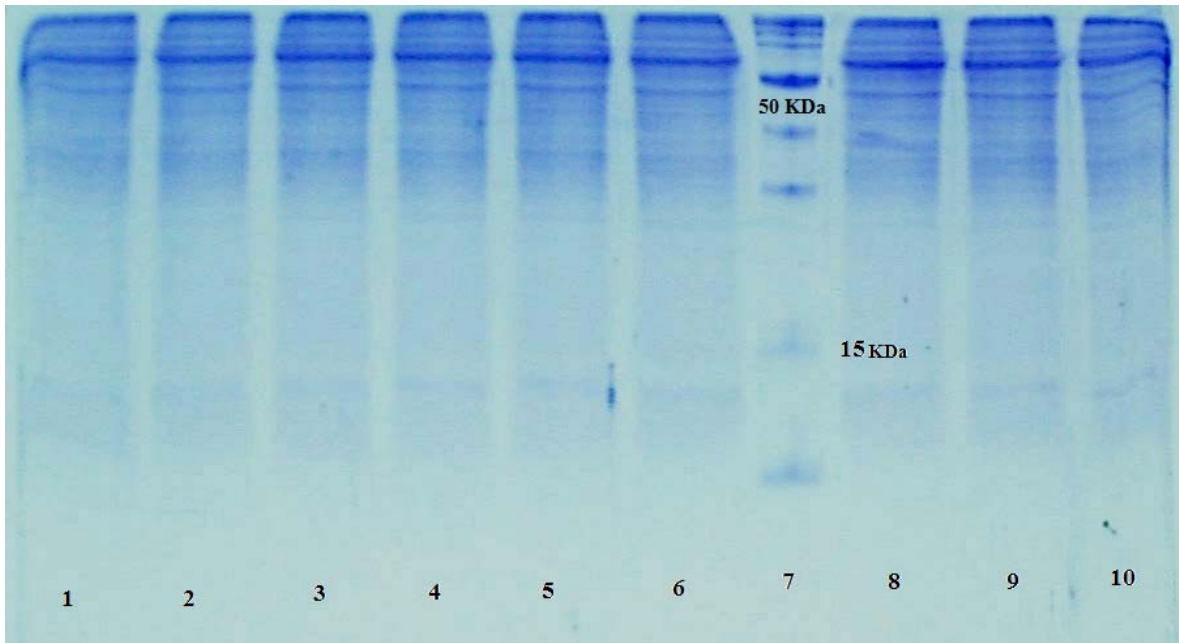
Cuantificación de proteínas totales a partir de lisados de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a diferentes métodos de estrés.

Se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford adaptado a microplaca a partir de lisados celulares sometidos a los diferentes métodos de estrés. Para cada cuantificación se elaboró una curva de calibración utilizando un patrón de gamaglobulina G entre 80 y 5 µg/ml. El coeficiente de correlación de las diferentes curvas de calibración siempre fue mayor de 0.99.

Los datos de proteína total de cada tipo de estrés aparecen más adelante junto a cada una de las electroforesis respectivas.

Estandarización de lisado de *Mycobacterium bovis* BCG.

Se probaron tres protocolos para la lisis de la bacteria: lisis enzimática, lisis mecánica y lisis por ebullición, cada uno por triplicado. El patrón de migración electroforético de las proteínas por SDS-PAGE fue similar entre los tres protocolos (Figura 10). Este experimento no tuvo determinación de proteína total.



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Método de lisis.	Eb.	Eb.	Eb.	Mec.	Mec.	Mec.	M.T	Enz.	Enz.	Enz.

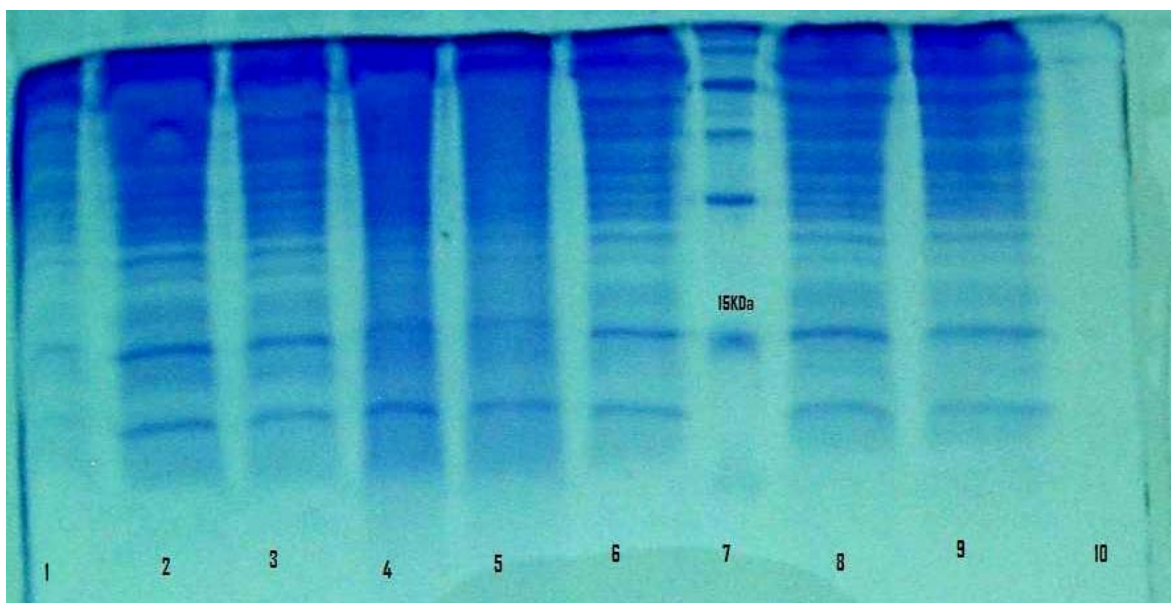
Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG por diferentes métodos: Eb: ebullición; Mec: mecánico; Enz: enzimático; M.T: marcador de talla molecular.

Análisis de la expresión de la proteína Alfa cristalina bajo diferentes condiciones de estrés.

Cultivos de *Mycobacterium bovis* BCG fueron sometidos a diferentes tipos de estrés (pH, Hipoxia, etanol, H₂O₂) probados independientemente y en algunas combinaciones de los mismos para observar bajo cual de todos ellos se sobre-expresaba la proteína Alfa cristalina de 16 KDa. Cada tipo de estrés tuvo dos replicas y su correspondiente control negativo (condiciones normales de crecimiento). Una vez estresadas las bacterias se procedió a lizarlas por el método mecánico. Todos los resultados de los diferentes tipos de estrés fueron analizados por SDS-PAGE.

Estrés por pH

Con el fin de simular las condiciones adversas de crecimiento que enfrenta el bacilo tuberculoso dentro del hospedero, se llevó a cabo un choque ácido *in-vitro* a diferentes pHs. Los cultivos de *Mycobacterium bovis* BCG en fase logarítmica fueron estresados a pH 4.5; 5.5 y 6.0 en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco laboratorios) por 1 día. El patrón de migración electroforético mostró una mayor intensidad en la banda a nivel de 16 KDa (según marcador de talla molecular para proteínas) a pH 5.5 y 6.0 respectivamente, mientras que a pH 4.5 la intensidad de la banda a la altura de 16KDa fue menos intensa (figura 11 siguiente hoja).



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH.	C.N	5.5	5.5	4.5	4.5	6.0	M.T	6.0	6.0	Vacio
Tiempo de estrés (minutos)		30	60	30	30	30		60	60	

Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a estrés por pH. M.T: marcador de talla molecular; C.N: Control negativo

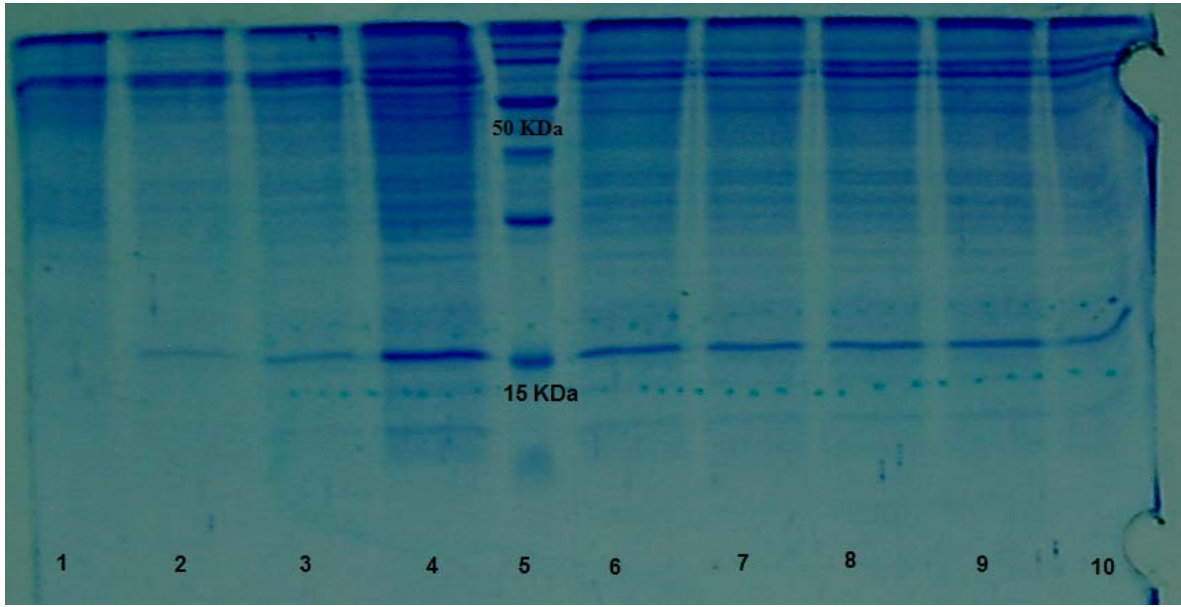
Tabla No 3. Cuantificación de proteínas a partir del estrés por pH.

Estrés	Promedio [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]			
	C.N	4.5	5.5	6.0
pH	6,893	6,923	7,448	7,567
% de expresión	100	100	108	110

C.N: control negativo

Estrés por hipoxia

Con el mismo fin del estrés de pH ácido se realizó el estrés por hipoxia de *Mycobacterium bovis* BCG. Los cultivos se dividieron en alícuotas de 5ml, se agregó azul de metileno como indicador del consumo de oxígeno y parafina líquida para generar el ambiente anaeróbico. Los cultivos fueron evaluados diariamente (cada 24 horas) por un periodo de cuatro días. A partir del primer día de hipoxia (carriles 2 y 3 figura 12 siguiente hoja) se observó una mayor intensidad de la banda a la altura de 16 KDa, que con el transcurso del tiempo (a partir del carril 4) la banda se hace más notoria y constante (carriles 6 al 10). El mayor incremento en la cantidad de proteína total se observó en el transcurso entre el día 1y día dos de estrés (Tabla 4).



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Días de Hipoxia	C.N	1	1	2	M.T	2	3	3	4	4

Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a estrés por hipoxia. M.T: marcador de talla molecular: C.N: Control negativo.

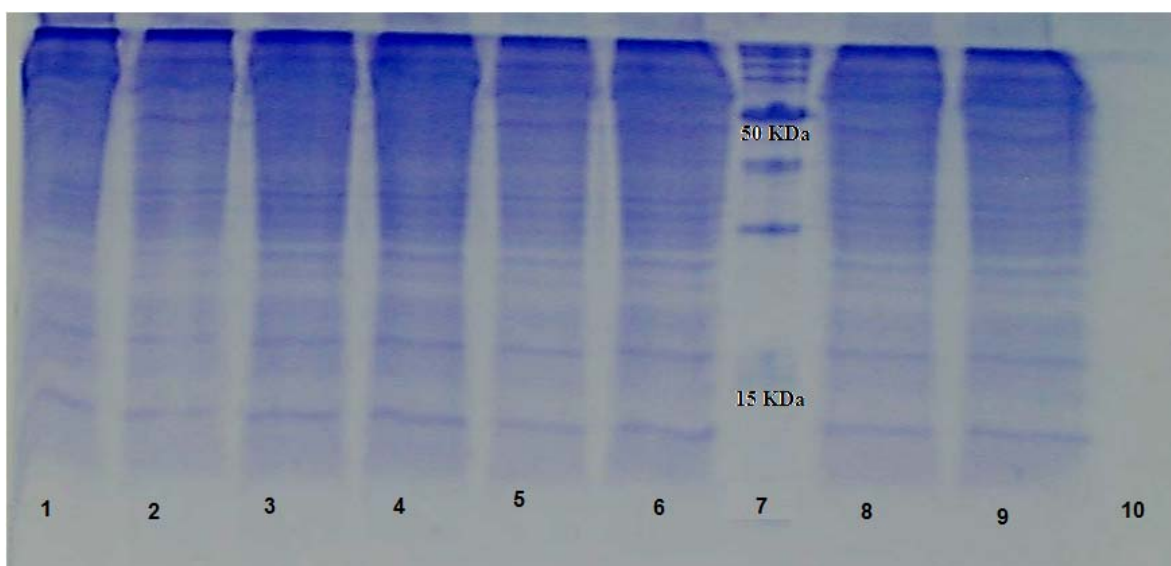
Tabla No 4. Cuantificación de proteínas a partir del estrés por hipoxia.

Estrés	Promedio [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]				
	C.N	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Hipoxia	7,012	7,221	8,332	8,124	8,193
% de expresión	100	103	119	117	117

C.N: control negativo

Estrés por alcohol (etanol).

Cultivos de *Mycobacterium bovis* BCG se dividieron en alícuotas de 5ml y fueron resuspendidos en medio líquido Middlebrook 7H9 (Difco laboratorios) modificado con etanol llegando a una concentración final de 5, 10 y 15% (v/v). Las muestras fueron evaluadas por un periodo de dos días tomando muestras cada día. En el patrón de migración electroforético no se observaron diferencias en la expresión de la banda a la altura de 16KDa entre las diferentes concentraciones de etanol evaluadas (figura13).



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Estrés,		Et	Et	Et	Et	Et	M.T	Et	Et	Vacio
tiempo (días)	C.N									
y		1	2	1	2	3		1	2	
concentración										
% (p/v)		5	5	10	10	10		15	15	

Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a estrés por etanol al 5, 10 y 15% (p/v). M.T: marcador de talla molecular; C.N: Control negativo; Et: etanol.

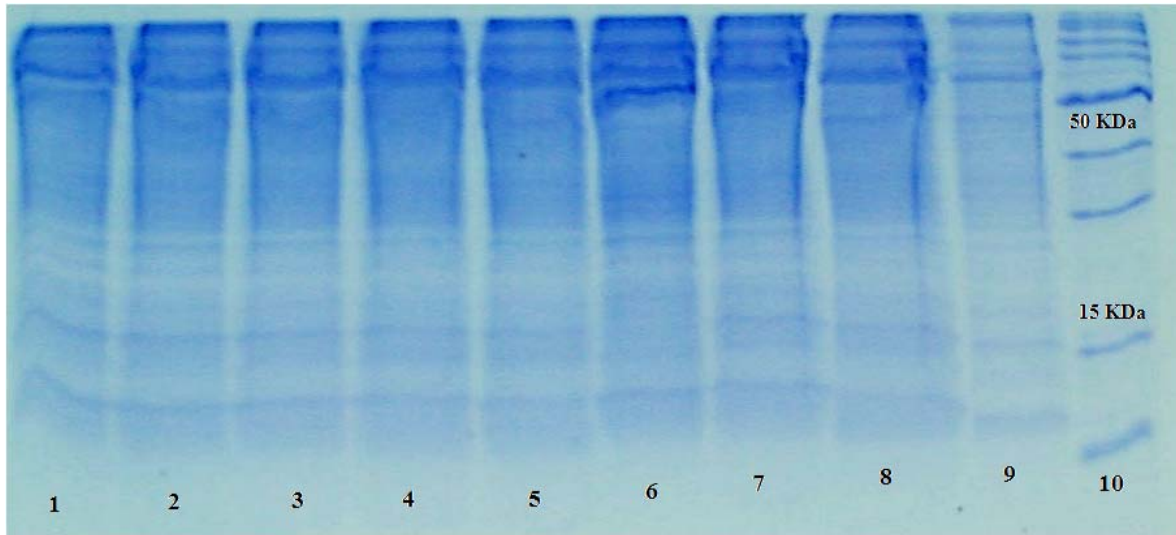
Tabla No 5. Cuantificación de proteínas a partir del estrés por etanol al 5, 10 y 15% (v/v).

Estrés	Promedio [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]			
	C.N	5%	10%	15%
Etanol	5,243	5,256	5,245	5,112
% de expresión	100	100	100	98

C.N: control negativo

Estrés oxidativo H_2O_2

Los cultivos de *Mycobacterium bovis* BCG fueron divididos en alícuotas de 1.5 ml y se resuspendieron en medio líquido Middlebrook 7H9 modificado con peróxido de hidrógeno H_2O_2 a una concentración final de 10, 15 y 20 mM. El estrés se evaluó a los 30, 60 y 90 minutos de estrés. En el patrón de migración electroforético se observó que la expresión de la proteína alfa cristalina 16 KDa es mínima comparada con el control negativo (figura 14 siguiente hoja). No se observaron diferencias entre las concentraciones a los tiempos evaluados.



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[mM] de H ₂ O ₂	10	10	10	15	15	C.N	20	20	20	M.T
Tiempo (minutos)	15	30	60	15	30		15	30	60	

Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a estrés oxidativo por H₂O₂ 10,15 y 20 mM. M.T: marcador de talla molecular; C.N: Control negativo

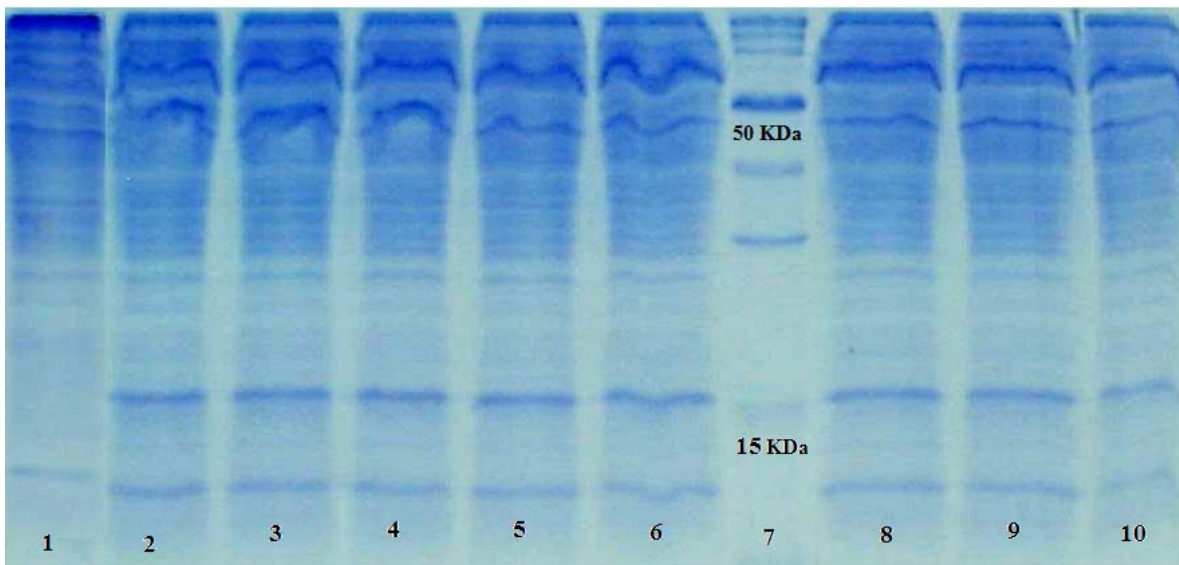
Tabla No 6. Cuantificación de proteínas a partir del estrés por peróxido de hidrógeno 10,15 y 20mM.

Estrés	Promedio [µg/µl]			
	C.N	10mM	15mM	20mM
Peroxido de hidrogeno	6,003	6,022	6,100	6,083
% de expresión	100	100	102	101

C.N: control negativo

Estrés por pH e hipoxia.

A partir del resultado de estrés por pH y por hipoxia, se estableció el pH 5.8 como punto intermedio para estresar las bacterias por tiempos más prolongados (4 días) en estrés por hipoxia. La combinación de los dos métodos de estrés se evaluó tomando muestras cada día. En el patrón de migración electroforético se observa una mayor intensidad de color de la banda a nivel de 16KDa en todos los días de estrés (1,2, 3 y 4 de la figura 15). La intensidad de la banda fue constante durante los días evaluados



Carril	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Días en Hipoxia a pH 5.8	C.N	1	1	2	2	3	M.T	3	4	4

Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida a partir de lisados celulares de *Mycobacterium bovis* BCG sometidos a estrés por pH 5.8 en hipoxia por 4 días. M.T: marcador de talla molecular; C.N: control negativo.

Tabla No 7. Cuantificación de proteínas a partir del estrés por hipoxia a pH 5.5.

Estrés	Promedio [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]				
	C.N	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Hipoxia a pH 5.5	7,129	8,334	8,357	8,391	8,398
% de expresión	100	117	117	118	118

C.N: control negativo

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Mycobacterium tuberculosis enfrenta un ambiente dinámico de estímulos hostiles al interior del hospedero, todos ellos son adversos para su permanencia, crecimiento y desarrollo (Bacon *et al* 2007). Dentro de esos estímulos se encuentra el descenso de pH, hipoxia, inanición, presencia de compuestos tóxicos como el óxido nítrico y peróxido de hidrógeno, siendo todos un conjunto de señales censadas que generan una respuesta transcripcional de muchos genes, otorgándole al bacilo resistencia para la adaptación, sobrevivencia y posterior replicación dentro del hospedero (Madigan *et al.* 2000). Los resultados de los diferentes tipos de estrés evaluados en este trabajo evidenciaron la expresión de la proteína alfa cristalina como respuesta frente al estrés por pH, hipoxia, y combinaciones entre ambos respectivamente. No se evidenció incremento en la expresión de la proteína en etanol al 5 y 10%(p/v) ni en peróxido de hidrógeno 10, 15 y 20 mM.

En el estrés por pH, la proteína de interés Alfa cristalina y el resto de proteínas características del lisado de *Mycobacterium bovis BCG* tuvieron una mejor resolución a pH 4.5, a diferencia de los otros dos pH evaluados 5,5 y 6,0 donde se observó la proteína de 16KDa y un bandeo característico de *Mycobacterium bovis BCG*. Estudios realizados en quimiostato demostraron que *Mycobacterium bovis BCG* puede crecer en un rango de pH entre 5.0 y 6.0, a valores inferiores de pH el bacilo no puede crecer (Bacon *et al* 2007). El choque ácido a pH 4.5 al que fue sometida la bacteria en este experimento fue brusco comparado al que hubiera tenido en un fagosoma infectado (valor máximo de 5.1). A pH 4.5 quizás se denaturaron proteínas de la superficie celular, impidiendo así la homeostasis necesaria para el equilibrio de protones del medio extracelular respecto al intracelular, generando así lisis de la bacteria. Las proteínas del metabolismo celular y la replicación de ácidos nucleicos pueden ser afectadas por los efectos

del pH ácido (denaturación) impidiendo el crecimiento de la bacteria. Lo anterior se puede correlacionar con los resultados obtenidos por (Bacon *et al* 2007) donde evaluó el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en quimiostato a diferentes pH, encontrando que el bacilo tuberculoso puede crecer en un rango de pH entre 5.1 y 6.0; valores inferiores a 5.1 el bacilo no presentó crecimiento.

Shinnik *et al.* en el 2002 y Kendall *et al.* en el 2004 examinaron la respuesta de *Mycobacterium tuberculosis* en medio ácido a través de micro-arreglos encontrando 8 genes involucrados en la biosíntesis de lípidos (mayor componente de la pared celular) y proteínas trans-membranales como la *kdpA*, *kdpB* y *kdpC* que realizan procesos de transferencia de hidrogeno (H^+) y potasio (K^+) (www.tuberculist.com). Siendo la Alfa cristalina una proteína de la pared celular, la síntesis de la misma puede estar influenciada por los efectos del pH ácido mencionado anteriormente. En el pH 5.5 y 6.0 a los 30 y 60 minutos de estímulo la expresión de la proteína Alfa cristalina fue levemente notoria. La cuantificación de proteínas totales en este estrés respaldan esta hipótesis debido a que la expresión de proteínas incrementó en un 8% a pH 5.5 y 10% a pH 6.0 (Tabla No 3) respecto al control negativo después del tratamiento. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Rodríguez *et al* 2005 en donde observaron a través de PCR en tiempo real un incremento en el *hspX*-mRNA y en el mRNA-DosR de 70 veces bajo el estrés por pH durante 30 y 60 minutos (datos por publicar). Según los resultados de Rodríguez *et al* 2005 accepted Tuberculosis, en este experimento se hubiera esperado un mayor incremento en la cantidad de proteína y en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína Alfa cristalina de la que se obtuvo (figura 11). Hu *et al* 1998, a través de Northern blot reportó que el *hspX*-mRNA es una molécula muy inestable debido a su corto tiempo de vida media (2 minutos), por ende se podría sugerir que en el transcurso de la síntesis de *hspX*-mRNA a la traducción a proteína Alfa Cristalina podrían ocurrir un conjunto de eventos que no dejan que todo los *hspX*-mRNA se traduzcan a proteína.

intensidad respecto a los diferentes tipos de estrés probados individualmente (pH, H_2O_2 y etanol). Desde el primer día de hipoxia la proteína fue expresada (figura

12, carriles 2 y 3), la intensidad se incrementó gradualmente a partir del segundo día de estrés (con excepción del carril 3 como consecuencia de una mayor carga de proteína de la muestra 4 respecto a la 3) y se mantuvo constante durante el tiempo experimental, evidenciando así que la alfa cristalina es una proteína estable una vez expresada. Los resultados de la cuantificación de proteínas totales concuerdan con lo anterior ya que se observó un incremento del 3, 19 y 17% en la expresión después del tratamiento hipoxico (Tabla 5) respecto al control negativo.

La estabilidad de esta proteína está relacionada con la función que esta cumple dentro de célula, ya que Lim *et al* 1999, Desjardin *et al* 2001 y Sherman *et al* 2003 reportaron a la alfa cristalina como una proteína que ayuda a conservar la integridad de la célula bajo condiciones hostiles de crecimiento, factor que favorece el estado de latencia del bacilo dentro del hospedero (Bacon *et al* 2007).

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los reportes realizados por Lim *et al* 1999, Desjardin *et al* 2001, donde expresaron la proteína bajo estrés por hipoxia en un transcurso de 8 a 40 días. En este experimento la expresión de la alfa cristal se logró evidenciar a las primeras 48 horas de estrés; la diferencia en cuanto a tiempos de expresión se debe quizás a la relación de volumen del cultivo líquido respecto al recipiente, ya que en este experimento el estrés se realizó en microtubos de 1.5 ml donde el espacio para el oxígeno es mucho mas limitado que en frascos de 1L utilizados por Desjardin *et al* 2001.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a concentraciones 10mM y 20mM, y el etanol al 5,10 y 15% (V/v) no fueron buenos inductores para la expresión de la alfa cristalina, debido a que no se evidenció una mayor intensidad de la banda a la altura de 16KDa en ninguna de las concentraciones y tiempos evaluados (figuras 13 y 14), y no hubo incremento en la concentración de proteínas totales respecto al control negativo después del los tratamientos (tablas 6 y 7). Kendall *et al* 2004 a través de microarreglos, reportó un incremento en la síntesis del mRNA del sistema de dos componentes DosRs de 70 y 6 veces mediante etanol al 5% (v/v) y

H₂O₂ respectivamente. Según los resultados obtenidos por Kendall *et al* 2004 en este experimento se hubiera esperado que la expresión de la alfa cristalina fuese mucho más notoria de lo que se obtuvo, ya que el gen *hspX* está regulado por el DosR. Este hecho hace pensar que al igual que en el estrés por pH, durante el proceso de traducción del mRNA-*hspX* a proteína existe algún evento que no permite la traducción de ese mensajero a proteína en la cantidad esperada.

Debido a que los estreses por pH e hipoxia resultaron en una mayor intensidad de la banda a la altura de 16KDa y con el fin de llevar a cabo una mayor aproximación al ambiente dinámico de eventos que experimenta *Mycobacterium tuberculosis* al interior del granuloma, se realizó la combinación entre estos dos métodos de estrés. El resultado de este experimento (figura 15) mostró que la intensidad de la banda a la altura de 16KDa se incrementó respecto al estrés por pH y fue muy similar al estrés por hipoxia, evidenciando así que la hipoxia es la señal censada por el bacilo tuberculoso que induce en mayor nivel la expresión de la proteína Alfa Cristalina cuando se combinan estos dos métodos de estrés. Los resultados de la cuantificación de proteínas demostraron un incremento del 17-18% en la expresión de proteínas respecto al control negativo después del tratamiento.

Las otras posibles combinaciones de los diferentes métodos de estrés no se llevaron a cabo debido a que los resultados de cada uno de ellos evaluados de forma individual no presentaron intensidades de la banda a la altura de 16KDa ni incremento en los porcentajes de expresión obtenidos a partir de la cuantificación por el método de Bradford. La combinación de todos los métodos de estrés evaluados en este trabajo hubieran reflejado una mayor aproximación al ambiente en el interior del granuloma, pero debido a que los resultados del estrés por H₂O₂ y por etanol evaluados individualmente no fueron satisfactorios, no se llevaron a cabo las posibles combinaciones.

Sherman *et al* 2003 encontró que bajo condiciones de hipoxia el gen *hspX* es el único (dentro de los 47 genes que regula el DosR) que posee dos sitios de

reconocimiento (uno proximal y otro distal) por parte del DosR. De esta forma, bajo condiciones anaeróbicas se potencializa la expresión de la alfa cristalina, razón por la cual, en el estrés por hipoxia la intensidad de la banda es mayor que en los otros métodos de estrés evaluados de forma individual. La hipótesis planteada por Sherman *et al* 2003 coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la banda a la altura de 16 KDa fue de poca intensidad en el estrés por pH y no fue observada en H₂O₂ y etanol, mientras que en la combinación pH-hipoxia, la banda a la altura de 16Kda fue más notoria respecto a los métodos de estrés probados individualmente.

En vista que el experimento para el reconocimiento de la proteína Alfa cristalina utilizando Western blot no se logró ejecutar, debido a que el anticuerpo monoclonal no alcanzó a llegar a tiempo para la finalización de esta tesis y que hubiera sido la prueba confirmatoria para identificar la proteína Alfa cristalina 16KDa, se procedió a realizar una revisión bibliográfica y búsqueda en BoviList Web Server (<http://genolist.pasteur.fr/BoviList/genome.cgi>) para encontrar proteínas con un peso molecular similar al de la Alfa cristalina 16227.24Da, y los factores por los cuales éstas se expresan para tener mayor confiabilidad respecto a la validez de los datos obtenidos. Los resultados de la revisión y la búsqueda (datos no mostrados) indicaron que el proteoma de *Mycobacterium bovis* BCG y *Mycobacterium tuberculosis* posee 16 proteínas entre 15158.92 y 16292.63Da. De las cuales solamente 6 poseen valores muy cercanos al de la Alfa Cristalina (entre 16013.22 y 16292.63Da); de esas 6 proteínas, 4 son proteínas hipotéticas conservadas (se han encontrado en otras cepas pero su función no ha sido determinada) y las otras dos Carboximuconolactona decarboxilasa CMD y Succinato deshidrogenasa están involucradas en el catabolismo de compuestos aromáticos y en el ciclo de ácidos tricarbóxicos respectivamente. Dentro de estas 6 proteínas ninguna se encontró que fuera inducible bajo estrés por hipoxia, pH, peróxido de hidrógeno o etanol, y ninguna de ellas ha sido reportada como proteínas de mantenimiento ni que la expresión de sus correspondientes genes estén regulados bajo el sistema de dos componentes DosR (Sherman *et al* 2003,

<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>)

(<http://www.tigr.org/tigrscripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gmt>).

Los resultados obtenidos a partir de la revisión bibliográfica, la búsqueda en las bases de datos descritas anteriormente, y la cuantificación de proteínas totales, sugieren que el incremento en la intensidad de la banda a la altura de 16KDa de *Mycobacterium bovis* BCG es consecuencia de la expresión de la proteína Alfa cristalina después de someter la bacteria a los diferentes métodos de estrés y no como la sumatoria de las 15 proteínas de pesos similares.

Los resultados de la cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford del estrés por pH, hipoxia y la combinación de ambos, demostraron que la cantidad de proteína total incrementó respecto al control negativo de cada uno, de igual forma, en esos tratamientos se observó mayor intensidad de la banda a la altura de 16KDa, lo cual permite sugerir que el incremento en la cantidad de proteína total encontrada a través de la técnica de Bradford es el resultado de la expresión de la proteína Alfa cristalina como respuesta al mantenimiento celular que requiere el bacilo cuando se encuentra en ambientes hostiles de crecimiento como lo son pHs ácidos e hipoxia.

CONCLUSIONES

Se logró establecer un protocolo para la lisis de *Mycobacterium bovis* BCG a partir del método mecánico, ya que a través de este se observó el mejor bandeo de las proteínas intracelulares; además es un método rápido, eficaz y económico.

Comparando los porcentajes de expresión de proteínas a partir de la cuantificación de cada uno de los métodos de estrés por la técnica de Bradford, y comparando la intensidad de la banda de cada uno, se encontró que el mejor agente inductor fue la combinación entre el estrés por hipoxia y pH 5.5.

A través de resultados cualitativos (SDS-PAGE) y cuantitativos (Bradford) se comprobó que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 10, 15 y 20mM, y el etanol al 5, 10 y 15% (p/v) no son buenos inductores para la expresión de la proteína Alfa cristalina de 16KDa.

TRABAJOS FUTUROS

Realizar el Western blot para la identificación precisa de la proteína Alfa cristalina 16KDa.

Llevar a cabo electroforesis en dos dimensiones (2D- PAGE) para tener una determinación mas específica de la proteína Alfa cristalina de 16KDa.

BIBLIOGRAFIA

Akaki, T., Tomioka, H., Spreadbury, CL. 2000. Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* 121: 302-310.

Betts, JC., Lukey, PT., Adams, SR. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* 43 (3): 717-731.

Bodmer, T., Miltner, E., Gordon, SV., Deretic, V. 2000. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol Lett* 182: 45-49.

Boon C., Dick, T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG Response Regulator Essential for Hypoxic Dormancy. *J Bacteriol* 184 (24): 6760-6767. Britton, WJ; Roche, PW. *et al.* 1994. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol* 2 (8): 284-288.

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

Brosch, R., Gordon, SV., Boyd, AE. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (6): 3684-3689.

Burleson, FG., Chambers, TM., Wiedbrauk, DL. 1992. *Virology A Laboratory Manual.* Academic Press Inc USA: 665 – 698.

Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-*transcription* polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 15 (3):155-166

Burbano, C. Análisis de la expresión de genes potencialmente involucrados en latencia de *Mycobacterium tuberculosis*. 2005 Tesis de Pregrado. Universidad de Los Andes. Bogotá Colombia.

Cardona, P.J., Ruiz-Manzano, J. 2004. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *Eur Respir J* 24: 1044–1051.

Clark-Curtiss, J.E., Haydel, S.E. 2003. Molecular Genetics of *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57:517–49

Cole, S.T. 1999. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett* 452(1-2):7-10

Cole, S.T., Brosch, R., Boyd, A.E. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.

Collins, D.M. 1996. In search of tuberculosis virulence genes. *Trends Microbiol* 4 (11): 426- 430.

Cosma, C.L., Sherman, D.R., Lukey, P.T. 2003. The Secret Lives of the Pathogenic *Mycobacteria*. *Annu Rev Microbiol* 57:641–76

Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (5): 299-304

Cotter, P.D., Hill, C. 2003. Surviving the acid test: response of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (3): 429-453.

Cubitt AB, Heim R., Adams, SR., Boyd, AE., Gross, LA., Tsien, RY. 1995. Understanding improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* 20 (11): 448-455.

Cunningham, AF., Spreadbury, CL. 1998. Mycobacterial Stationary Phase Induced by Low Oxygen Tension: Cell Wall Thickening and Localization of the 16-Kilodalton α -Crystallin Homolog. *J Bacteriol* 180 (4): 801-808.

Dasgupta, N., Kapur, V., Hayes, IG. 2000. Characterization of a two-component system, devRdevS, of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 80 (3): 141–159.

Deretic, V., Fratti, RA. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* 31(6): 1603–1609.

Desjardin, LE., Hayes., Heim R. 2001. Microaerophilic Induction of the Alpha-Crystallin Chaperone Protein Homologue (*hspX*) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 183 (18): 5311-5316.

Dieli, F., Troye-Blomberg, M., Fratti, RA. 2001. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V γ 9/V δ 2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 184: 1082-1085.

Domenech, P., Menéndez, MC., García, MJ. 1994. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes in the differentiation of fast-growing mycobacterial species. *FEMS Microbiol Lett* 116: 19-24.

Ehlers, M., Daffé, M. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial sugars the key? *Trends Microbiol* 6 (8): 328-335.

Fenton, MJ., Vermeulen, MW. 1996. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infect Immun* 64 (3): 683-690.

Fisher, MA., Plikaytis, BB. Ehlers, M. 2002. Microarray Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Transcriptional Response to the Acidic Conditions Found in Phagosomes. *J Bacteriol* 184 (14): 4025-4032.

Florczyk, MA., McCue, LA. Vermeulen, MW. 2001. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding proteins. *Infect Immun* 69 (9): 5777-5785.

Flynn, JL., Chan, J. 2001. Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infect Immun* 69 (7): 4195-4201.

Flynn, JL., Chan, J. 2003. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Microbiol* 15: 450-455.

Flynn, JL. 2004. Mutual attraction: Does it benefit the host or the bug? *Nat Immunol* 5 (8): 778-779.

Flynn, JL., Chan, J. 2005. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol* 13 (3): 98-102.

Futuyma, DJ. Evolutionary Biology 1998. Third Edition. Sinauer Associates Inc. USA.

Garbe, TR., Hibler, NS., Florczyk, MA. 1999. Response to reactive nitrogen intermediates in *Mycobacterium tuberculosis*: induction of the 16-kilodalton α -

crystallin homolog by exposure to nitric oxide donors. *Infect Immun* 67 (1): 460-465.

Gomez M, Doukhan L, Nair G, Smith I. 1998. sigA is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 29(2):617-28.

Gomez JE, Chen JM, Bishai WR. 1997. Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 78(3-4):175-83.

Gonzalez-y-Merchand JA, Colston MJ, Cox RA. 1998. Roles of multiple promoters in transcription of ribosomal DNA: effects of growth conditions on precursor rRNA synthesis in mycobacteria. *J Bacteriol* 180(21):5756-61.

Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ, Cox RA. 1997. Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol* 179(22):6949-58.

Gudkov AT. 1997. The L7/L12 ribosomal domain of the ribosome: structural and functional studies. *FEBS Lett* 5;407(3):253-6.

Höner zu Bentrup, K; Russell, DG. 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol* 9 (12): 597-605.

Hu Y, Coates AR. 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 181(2):469-76.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 7: 1-6.

Inohue, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* 96 (3): 23-28.

Kaprelyants AS, Gottschal JC, Kell DB. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 10 (3-4): 271-85.

Kendall, SL., Rison, SCG, Russell, DG. 2004B. What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? *Trends Microbiol* 12 (12): 537-544.

Kendall, SL., Movahedzadeh, F., Inohue, H., Bishai WR. 2004A. The *Mycobacterium tuberculosis* dosRS two-component system is induced by multiple stresses. *Tuberculosis* 84 (3-4): 247-255.

Kenney TJ, Churchward G. 1996. Genetic analysis of the *Mycobacterium smegmatis* rpsL promoter. *J Bacteriol* 178(12):3564-71.

Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med* 8 (6): 257-260.

Kremer L, Baulard A, Estaquier J, Poulain-Godefroy O, Locht C. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol Microbiol* 17(5): 913-922.

Kusner, DJ. 2005. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin Immunol* 114: 239-247.

Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

López, V., Lorente, A. 2001. Identificación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* que se expresan bajo condiciones de estrés anaeróbico. *Infectio* 5: 213-222.

Manganelli, R., Dubnau, E., Dheda K. 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 31(2): 715–724.

Manganelli, R., Proveddi, R., Dheda K. 2004. σ Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 186 (4): 895-902.

March, JC., Rao, G., Dawes, S., Inohue, H . 2003. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 303-315.

Mayuri., Bagchi, G., Martinko, JM. 2002. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two component system, Rv3134c and chaperone α -crystallin homologues. *FEMS Microbiol Lett* 211: 231-237.

Menendez Mdel C, Rebollo MJ, Nunez Mdel C, Cox RA, Garcia MJ. 2005. Analysis of the precursor rRNA fractions of rapidly growing Mycobacteria: quantification by methods that include the use of a promoter (rrnA P1) as a novel standard. *J Bacteriol* 187(2):534-43.

Nathan, C., Shiloh, MU. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian host and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (16): 8841-8848.

Núñez Serrano C. 2004. Respuesta al estrés en *Mycobacterium fortuitum*: análisis de genes relacionados con el metabolismo oxidativo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid: 67-68.

O'Brien, LM., Gordon, SV. 1996. Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiol Lett* 139: 11-17.

Ohara N, Kimura M, Wada N, Yamada T. 1993. Cloning and sequencing of the gene encoding the ribosomal L7/L12-like protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Nucleic Acids Res* 25;21(15):3579.

O'Toole, R., Smeulders, MJ., Dawes, S., Churchw, M . 2003. A Two-Component Regulator of Universal Stress Protein Expression and Adaptation to Oxygen Starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 185 (5): 1543- 1554.

Parrish, N.M., Dick, JD., Ranmanovich, M., Okur, M. 1998. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 6:107-112.

Park, HD., Guinn, KM., Parker, S., Ewein, P. 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48 (3): 833–843.

Pieters, J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 3: 249–255.

Piddington, DL., Kashkouli, A., Stowiacobichs, P., Hidae, T. 2000. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg²⁺ levels. *Infect Immun* 68 (8): 4518- 4522.

Primm, TP., Andersen, SJ., Loungly, L. 2000. The Stringent Response of *Mycobacterium tuberculosis* is Required for Long-Term Survival. *J Bacteriol* 182 (17): 4889-4898.

Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ. 2005. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(23):8327-32.

Roy S, Ajitkumar P. 2005. Transcriptional analysis of the principal cell division gene, *ftsZ*, of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 187(7):2540-50.

Russell, DG. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: Here Today, And Here Tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 1-9. Saini, DK., Malhotra, V. et al. 2004A. Cross talk between DevS sensor kinase homologue, Rv2027c, and DevR response regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett* 565: 75-80.

Saini, DK., Malhotra, V., Brent, B., Wilkins, D. 2004B. DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. *Microbiology*. 150: 865-875.

Salyers, A. 2002. Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. Second Edition. American Society for Microbiology, USA: 112-116.

Sambrook, J., Russell, DW. 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 823-826.

Saviola, B., Woolwine, SC., Wilkins, D., Bloom BR. 2003. Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based in vivo expression technology. *Infect Immun* 71 (3): 1379-1388.

Sherman, DR., Voskuil, M., Wernisch, L., Timm J. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (13): 7534-7539.

Shinnick, TM; King, CH., Saini, DK. 1995. Molecular biology, virulence and pathogenicity of mycobacteria. *Am J Med Sci* 309: 92-98. Clark

Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev* 16 (3): 463–496

Smith I, Dussurget O, Rodriguez GM, Timm J, Gomez M, Dubnau J, Gold B, Manganelli R. 1998. Extra and intracellular expression of *Mycobacterium tuberculosis* genes. *Tuber Lung Dis* 1998;79 (2):91-7.

Southward, CM., Surette, MG. 2002. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacterial to light. *Mol Microbiol* 45 (5): 1191-1196.

Stewart, GR., Wernisch, L., Dubnau J., Andersen, SJ. 2002. Dissection of the heat-shock response in

Mycobacterium tuberculosis using mutants and microarrays. *Microbiology*. 148: 3129– 3138.

Stock, AM., Robinson, BL., Sharma, D. 1995. Two-component signal transduction systems: structure, function relationships and mechanisms of catalysis. *In Two-Component signal transduction*, Edited by JA Hoch & TJ Silhavy, Washington, DC. American Society for Microbiology. pp. 25-51.

Sturgill-Koszycki, S; Schlesinger, PH., Surette, MG. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 263: 678- 681.

Tatusova, TA., Madden, TL. 1999. BLAST 2 SEQUENCES, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247-250.

Towbin, Harry., Stehealin, Theophil., Gordon, Julian. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 76, No. 9, pp. 4350-4354,

Triccas, JA., Gicquel, B. 2000. Life on the inside: probing *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during infection. *Immunol Cell Biol* 78: 311-317.

Tsien, RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.

Tu, Z., He, G., Li, KX. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electron J. Biotechnol* 8 (1): 114-120

Tyagi, JS., Sharma, D. 2004. Signal transduction systems of mycobacteria with special reference to *M. tuberculosis*. *Curr Sci* 86 (1): 93-102.

Valdivia, RH., Hromocky, AE. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogens interactions. *Gene* 173: 47-52.

Verbon, A., Hartskeerl, RA. 1992. The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystallin family of low-molecular-weight heat shock proteins. *J Bacteriol* 174 (4): 1352-1359.

Verma A, Sampla AK, Tyagi JS. 1999. Mycobacterium tuberculosis rrn promoters: differential usage and growth rate-dependent control. *J Bacteriol* 181(14):4326-33.

Verma, A., Kinger, AK., Tyagi, JS. 1994. Functional analysis of transcription of the *Mycobacterium tuberculosis* 16S rDNA-encoding gene. *Gene* 148: 113-118.

Wayne, LG. 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 (11): 908-914.

Wayne, LG., Sohaskey, CD. 2001. Nonreplicating Persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol* 55:139–63

Wilhelm J, Pingoud A. 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 4(11): 1120-1128.

Worcel, A., Goldman, DS., Sachs, IB. 1968. Properties and fine structure of the ribosomes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 61: 122-129.

Wu S, Howard ST, Lakey DL, Kipnis A, Samten B, Safi H, Gruppo V, Wizel B, Shams H, Basaraba RJ, Orme IM, Barnes PF. 2004. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Mol Microbiol* 51(6):1551-62.

Young, D., Hussell, T., Sampla AK., Deretic, V. 2002. Chronic bacterial infection: living with unwanted guests. *Nat Immunol* 3 (11): 1026-1032.

Yuan, Y., Crane, DD. *et al.* 1996. Stationary Phase-Associated Protein Expression in *Mycobacterium tuberculosis*: Function of the Mycobacterial α -Crystallin Homolog. *J Bacteriol* 178 (15): 4484-4492.

Yuan, Y., Crane, DD., Kingler, AK., Saini, DK. 1998. The 16-kDa α -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9578- 9583.

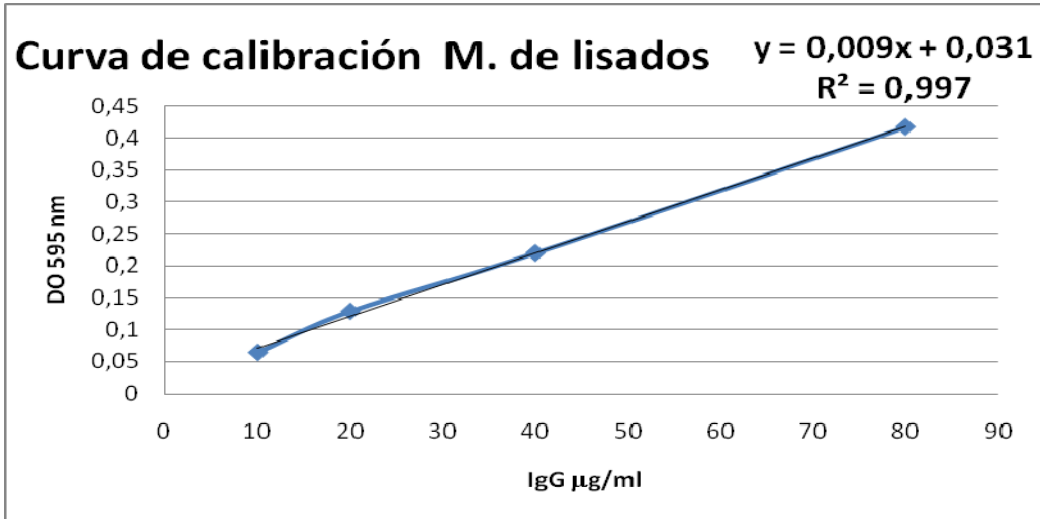
Zahrt, TC., Deretic, V. 2002. Reactive nitrogen and oxygen intermediates and bacterial defenses: unusual adaptations in *Mycobacterium tuberculosis* *Antioxid Redox Signal* 4 (1): 141-159.

Zahrt, TC. 2003. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 5: 159–167

Zahrt, TC., Deretic, V. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (22): 12706–12711.

ANEXO 1

Cuantificación de proteínas a partir del método de Bradford.

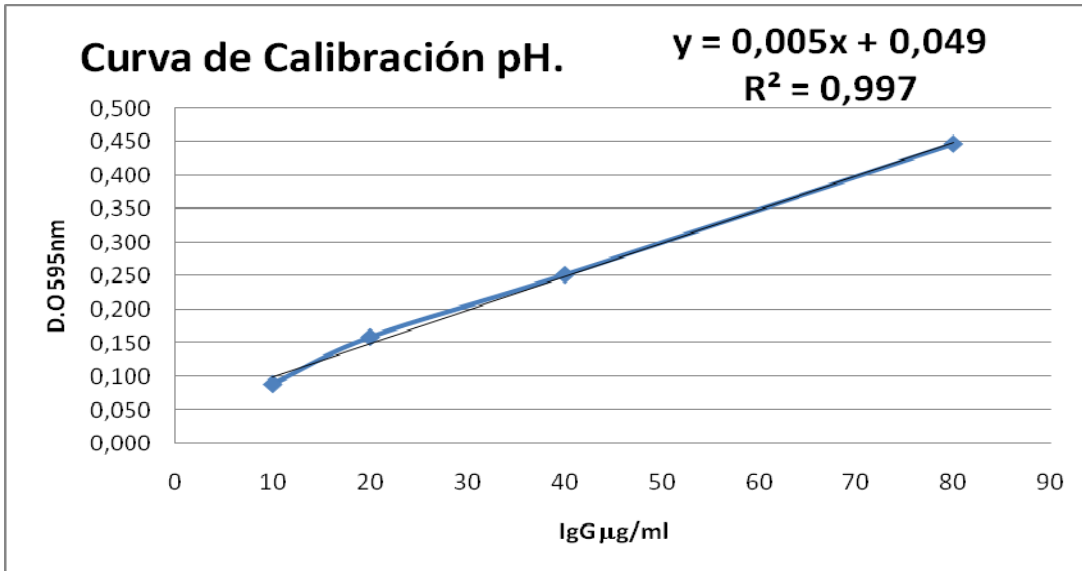


Grafica 1. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir los métodos de lisado celular.

Concentración de proteínas por carril:

$$\frac{10 \mu\text{l (extracto de proteína)}}{12,658 \mu\text{g}/\mu\text{l}} = 8,7 \mu\text{l extracto de proteína/carril.}$$

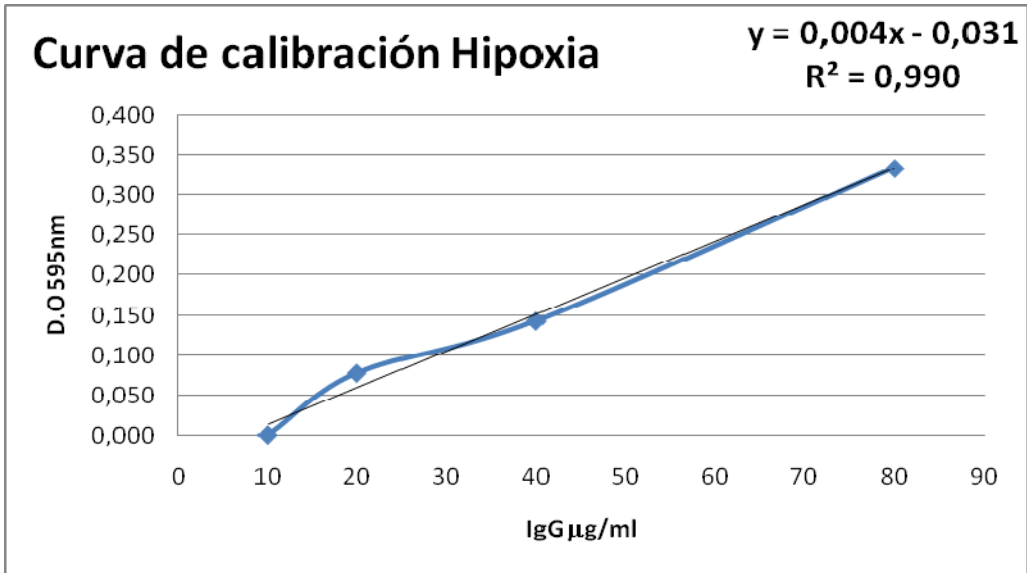
11,112 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.



Grafica 2. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir de muestras sometidas a estrés por pH.

Concentración de proteínas por carril:

$$\frac{10 \mu\text{l (extracto de proteína)}}{8.652 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \cdot 7.002 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 8.1 \mu\text{l extracto de proteína/carril.}$$

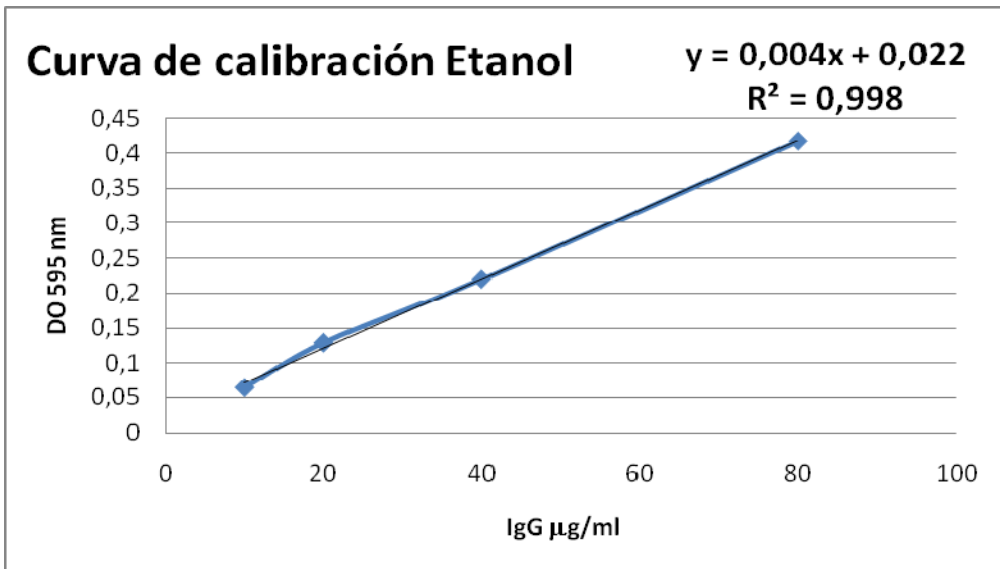


Gracifa 3. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir de muestras sometidas a estrés por hipoxia.

Concentración de proteínas por carril:

$$\frac{10 \mu\text{l (extracto de proteína)}}{7.345 \mu\text{g/} \mu\text{l}} = 8.8 \mu\text{l extracto de proteína/ carril.}$$

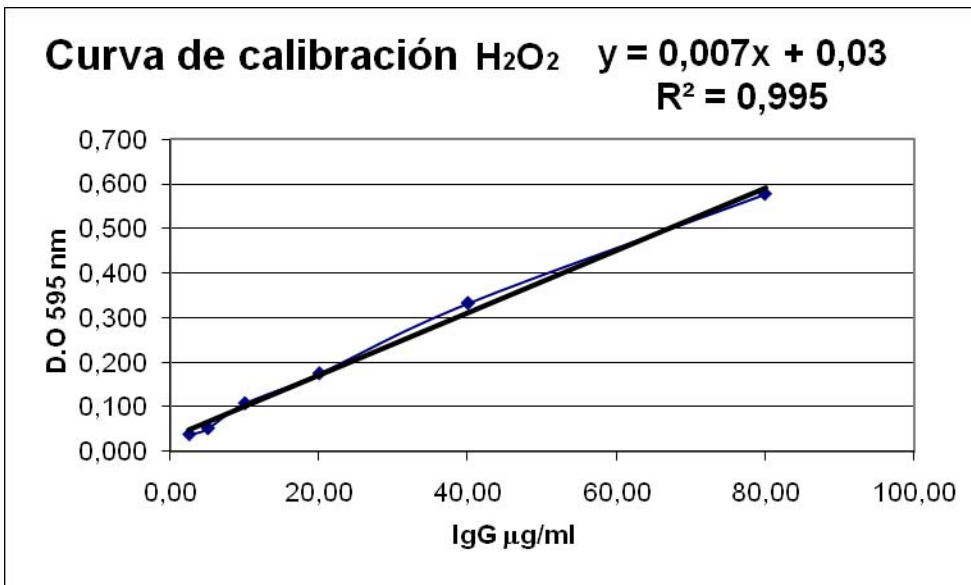
8.324 $\mu\text{g/} \mu\text{l}$



Gracifa 4. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir de muestras sometidas a estrés por etanol.

Concentración de proteínas por carril:

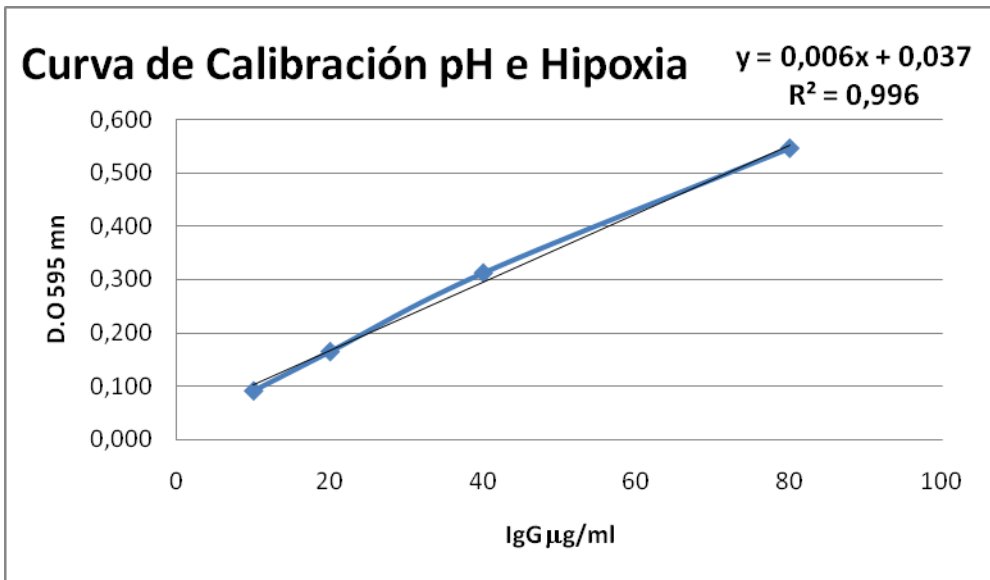
10 μ l (extracto de proteína)	5.887 μ g/ μ l	= 10,4 μ l extracto de proteína/ carril.
5,663 μ g/ μ l		



Gracifa 5. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir de muestras sometidas a estrés oxidativo.

Concentración de proteínas por carril:

10 μ l (extracto de proteína)	6.554 μ g/ μ l	= 8,2 μ l extracto de proteína/ carril.
7.982 μ g/ μ l		



Gracifa 6. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales a partir de muestras sometidas a estrés por pH e Hipoxia.

Concentración de proteínas por carril:

$$\frac{10 \mu\text{l (extracto de proteína)}}{9.445 \mu\text{g}/\mu\text{l}} = 9.221 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 9.7 \mu\text{l extracto de proteína/carril.}$$