



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROTEOMAS DE
MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE
AISLAMIENTOS AMBIENTALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

MARTHA ELVA MERCADO MORALES



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Secretario: Dr. Enrique Ortega Soto

1er Suplente: Dr. Ignacio Camacho Arroyo

2do Suplente: Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Sitio en donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Yolanda López Vidal
Asesor

QFB. Martha E. Mercado Morales
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Yolanda López Vidal por la asesoría y el gran apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo económico otorgado al “Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas” para el Megaproyecto: “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública. Tuberculosis” SDEI.PTiD.05.4

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mi familia, amigos y compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana. Gracias por todo su cariño, su ayuda y el apoyo incondicional que me han brindado siempre.

INDICE

	Pág.
<i>Abreviaturas</i>	<i>vii</i>
<i>Introducción</i>	<i>viii</i>
<i>Resumen</i>	<i>x</i>
I. Antecedentes	
I.1. Micobacterias no tuberculosas (MNT).....	1
I.1.1. Generalidades.....	1
I.1.2. Epidemiología.....	4
I.1.3. Vía de Infección.....	6
I.2. Importancia de las MNT en el control de la Tuberculosis.....	7
I.2.1. Interferencia con la vacuna <i>M. bovis</i> BCG.....	8
I.2.2. Interferencia en el diagnóstico de Tuberculosis.....	13
I.3. Proteómica. Nuevas estrategias para el estudio de las proteínas.....	14
II. Justificación	17
III. Objetivos	18
IV. Hipótesis	19
V. Metodología	
V.1. Selección de cepas de MNT.....	20
V.2. Obtención de cultivos semilla.....	20
V.3. Elaboración de curvas de crecimiento.....	21
V.4. Obtención de proteínas de extracto celular.....	22
V.5. Electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-GE).....	23
V.5.1. Primera dimensión.....	24
V.5.2. Segunda dimensión.....	24
V.6. Análisis de geles bidimensionales.....	25
V.7. Identificación de proteínas.....	25
VI. Resultados	
VI.1. Caracterización macro- y microscópica de las cepas de MNT seleccionadas.....	27
VI.2. Cultivos semilla.....	28
VI.3. Curvas de crecimiento.....	30
VI.4. Proteínas de extracto celular.....	32

VI.5. Electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-GE)	
VI.5.1. Estandarización de las condiciones electroforéticas y de separación.....	40
VI.5.1.1. Intervalo de pH.....	40
VI.5.1.2. Cantidad de proteínas.....	41
VI.5.1.3. Isoelectroenfoque.....	42
VI.5.2. Geles bidimensionales de las cepas de MNT estudiadas.....	43
VI.6. Análisis comparativo de los proteomas de las MNT estudiadas.....	49
VI.7. Identificación de proteínas.....	52
VII. Discusión.....	58
VIII. Conclusiones.....	66
IX. Anexos	
IX.1. Anexo A. Medios de cultivo y soluciones utilizadas.....	67
IX.2. Anexo B. Tinción de Ziehl-Neelsen.....	69
IX.3. Anexo C. Tinción con nitrato de plata.....	70
IX.4. Anexo D. Tinción con Coomassie coloidal (Silver Blue).....	71
IX.5. Anexo 1. SDS-PAGE de proteínas extracto celular de los cultivos independientes.....	72
IX.6. Anexo 2. Identificación de proteínas de extracto celular de las diferentes especies de MNT.....	73
X. Referencias.....	78

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Bacilo Calmette-Guérin.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
IEF	Isoelectroenfoque
LJ	Medio Löwenstein Jensen
M	Molar
MAC	Complejo <i>M. avium-M.intracellulare</i>
MAIS	Complejo <i>M. avium-M. intracellulare-M.scrofulaceum</i>
MNT	Micobacterias no tuberculosas
M7H9	Medio Middlebrook 7H9
M7H10	Medio Middlebrook 7H10
PPD	Derivado Proteico Purificado
RNAr	Ácido Ribonucleico ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ZN	Tinción Ziehl-Neelsen
2D-GE	Electroforesis en gel de dos dimensiones
2D	Dos dimensiones
°C	Grados centígrados
h	Hora
kDa	Kilodaltones
kVh	Kilovolts hora
µg	Microgramos (1×10^{-6} g)
µm	Micrómetros (1×10^{-6} m)
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
V	Volts
Vh	Volts hora

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *M. tuberculosis* y es responsable de la muerte de más de dos millones de personas cada año. Esta situación se agrava debido a la creciente coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* fármaco-resistentes [1].

La tuberculosis se presenta en todo el mundo independientemente de factores geográficos o raciales. Sin embargo, la mayor incidencia se concentra en los países en vías de desarrollo, frecuentemente asociado a las clases socioeconómicas bajas, siendo característicos la desnutrición, el hacinamiento humano y las malas condiciones de higiene en estas regiones [2].

La medida de prevención más importante contra la tuberculosis es la vacunación con una cepa viva atenuada de *M. bovis* comúnmente conocida como BCG (bacilo Calmette-Guérin), la cual, no previene la infección, pero si protege contra las formas graves de la enfermedad (tuberculosis miliar y meníngea) y reduce el riesgo de progresión a tuberculosis pulmonar y de muerte. Sin embargo, los ensayos clínicos controlados realizados en los más de 80 años de uso de la vacuna BCG mostraron que su eficacia protectora no ha sido consistente ya que varía entre 0% y 80% [3]. En México este comportamiento se refleja en la disminución discreta de nuevos casos de tuberculosis.

Actualmente una de las hipótesis más aceptadas sobre la causa de variación en la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG, es la interferencia ocasionada por la previa sensibilización con micobacterias no tuberculosas (MNT) debido a la reacción cruzada que presentan con *M. tuberculosis* y *M. bovis* [4]. Las MNT están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de una amplia variedad de reservorios ambientales, por lo que la exposición a ellas es un evento frecuente [5].

En vista de estas limitaciones, se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevas vacunas y la búsqueda de herramientas diagnósticas específicas. En los últimos años una variedad de novedosas tecnologías han surgido para el estudio de biomoléculas, dentro de este campo se encuentran los mapas de expresión proteica cuyo principio es comparar los espectros de proteínas expresadas bajo ciertas condiciones, con el objetivo de identificar la presencia o ausencia de ciertas proteínas, su expresión diferencial o modificaciones específicas que ocurran en éstas y que permitan desarrollar reactivos diagnósticos y/o determinar posibles blancos terapéuticos.

Con el fin de contribuir al desarrollo de reactivos específicos de diagnósticos, se ha realizado en este trabajo la determinación e identificación de proteínas que estuvieron presentes en todas las cepas de MNT aisladas del agua para uso y consumo humano de la Ciudad de México, con la perspectiva de ser utilizadas como marcadores de exposición únicamente a MNT. Para lograr este objetivo se empleó uno de los métodos más ampliamente usados para el estudio de proteínas, la electroforesis bidimensional, debido a su capacidad de separar miles de proteínas diferentes simultáneamente resultando una técnica muy útil cuando se trata de mezclas complejas de proteínas.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROTEOMAS DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE AISLAMIENTOS AMBIENTALES

Resumen

Las micobacterias no tuberculosas incluyen aquellas especies del género *Mycobacterium* que no son miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* encontrándose ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las MNT son consideradas microorganismos oportunistas afectando principalmente a la población inmunocomprometida, aunque cada vez son más frecuentes las infecciones por MNT en sujetos inmunocompetentes [6]. Hasta el momento no existe evidencia de transmisión de persona a persona, por lo que se sugiere que el vehículo principal de transmisión es el agua.

Adicionalmente, investigaciones recientes señalan a la exposición a MNT como una de las principales causas en la variación de la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG así como de la baja sensibilidad y especificidad de la prueba de intradermorreacción (PPD), debido a la reacción cruzada que presentan antígenos de MNT con *M. bovis* y *M. tuberculosis* [7,8]. Por lo que, la búsqueda de proteínas con potencial para su uso en el desarrollo de vacunas y reactivos de diagnóstico se ha incrementado.

El objetivo de este trabajo es realizar un análisis comparativo de los proteomas de MNT frecuentemente aisladas en agua para uso y consumo humano en la Zona Metropolitana de la

Ciudad de México y determinar cuáles son aquellas proteínas de expresión única y común entre las diferentes cepas de MNT.

Se seleccionaron seis cepas de MNT para este estudio, cuatro fueron aisladas de agua para uso y consumo de la Ciudad de México (*M. nonchromogenicum* tipo I, *M. nonchromogenicum* tipo II, *M. gordonae* y *M. peregrinum*), una recuperada en agua superficial de los Canales de Xochimilco identificada como *M. avium* y por último una cepa de *M. nonchromogenicum* ATCC 19550. A partir de cultivos realizados bajo las mismas condiciones y cosechados en la misma fase de crecimiento, se obtuvieron las proteínas de extracto celular de cada una de las MNT. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-GE) y analizados in silico con el programa PDQUEST 2-D v8.0. Posteriormente, se seleccionaron nueve proteínas detectadas como comunes a todas las cepas de MNT estudiadas y de 4-6 proteínas únicas para identificación por espectrometría de masas.

Al comparar los patrones proteicos obtenidos en los geles de dos dimensiones de las diferentes cepas de MNT estudiadas obtenidos bajo las mismas condiciones, se encontró que el porcentaje de proteínas compartidas entre cepas se correlaciona con su cercanía filogenético, el 80% de las proteínas son de expresión común (en al menos dos cepas de MNT) y el 17-24% de las proteínas restantes son de expresión única para cada una de las cepas. La distribución de las proteínas de extracto celular por masa molecular y punto isoeléctrico fue similar en las cinco cepas de MNT, detectándose un mayor número de proteínas resueltas por 2D-GE para *M. avium* (1,486 proteínas).

En las proteínas comunes seleccionadas para su identificación, se encontró seis proteínas de metabolismo y cuatro proteínas que participan en mecanismos de duplicación,

transcripción y traducción. En cuanto a las proteínas únicas para cada cepa de MNT la mayoría está involucrada principalmente en metabolismo, tres más están asociadas a virulencia y cuatro son reportadas como de función desconocida.

El potencial de las proteínas comunes a las cinco especies de MNT como marcadores de exposición depende no solo de su presencia o ausencia en el proteoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, sino también del reconocimiento inmune en individuos con tuberculosis e individuos sanos. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que cuatro proteínas comunes de las MNT no presentan una secuencia de aminoácidos similar a las reportadas para *M. bovis* BCG o para *M. tuberculosis*, siendo posible su identificación únicamente por la disponibilidad de una secuencia similar en otras micobacterias saprofitas o en otros microorganismos.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROTEOMAS DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS DE AISLAMIENTOS AMBIENTALES

I. ANTECEDENTES

I.1. Micobacterias no tuberculosas (MNT)

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) incluyen aquellas especies del género *Mycobacterium* que no son miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (de ahí el término micobacterias no tuberculosas). Se distinguen de las del complejo, por no ser patógenos obligados y encontrarse ampliamente distribuidas en el ambiente [5].

Desde su identificación se han empleado una gran variedad de términos para describirlas: anónimas, inclasificadas, oportunistas, atípicas, ambientales, no tuberculosas o MOTT (mycobacteria other than tubercle bacilli) por sus siglas en inglés. Aunque todos estos términos son aceptados, la mayoría de los autores emplean el término de atípicas o no tuberculosas [9].

I.1.1. Generalidades

Las micobacterias son microorganismos aeróbicos -con excepción de algunas especies que crecen bajo atmósferas de oxígeno reducido-, crecen más lentamente que otras bacterias, no forman esporas, son inmóviles, no capsuladas y no presentan una agrupación característica.

La morfología colonial de las micobacterias varía entre especies, puede ir de lisa a rugosa y de no pigmentada a pigmentada (amarillas, naranjas o raramente rosas) usualmente debido a la formación de pigmentos carotenoides (figura 1A, tabla 1). Son bacterias pleomórficas (bacilos rectos y/o ligeramente curvos), miden 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10 μm de largo (figura 1B) y exhiben gran variación en la velocidad de crecimiento con tiempos de duplicación de 2 a 48 h. Además, contienen una pared celular gruesa y con un elevado contenido lipídico que le confiere una escasa permeabilidad celular, que es responsable entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como de la característica ácido-alcohol resistencia en determinadas tinciones para su visualización microscópica (figura 1C) [10].

www.pasteur.ac.ir/researchDepartment/Mycobacteriology/Index.htm

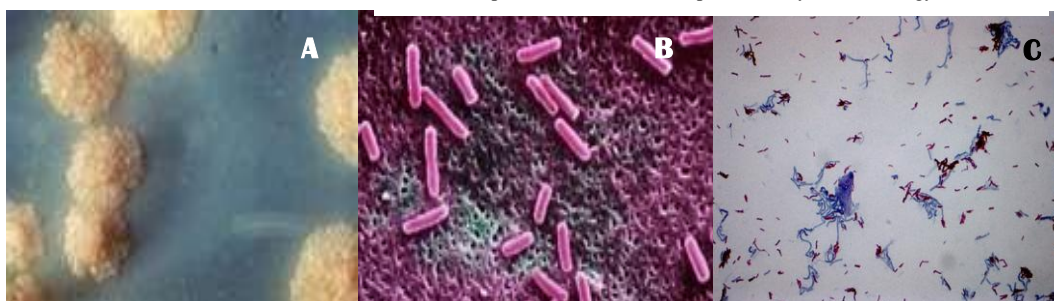


Figura 1. Características macro- y microscópicas del género *Mycobacterium*. (A) Colonias aisladas típicas de *M. tuberculosis* (B) Microscopia electrónica del género *Mycobacterium* (C) Tinción de Ziehl-Neelsen. El colorante primario es la fucsina fenicada (carbolfucsina), el cual penetra al interior de la micobacteria por medio de calor. Una vez dentro, el colorante no puede ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido debido a que los residuos de ácido micólico de la pared celular retienen el colorante primario. Los bacilos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde dependiendo del colorante de contraste utilizado.

El 60% de la pared celular de las micobacterias se encuentra conformada por lípidos diversos. La pared celular peptidoglicolípida contiene ácido meso-diaminopimélico, alanina, ácido glutámico, glucosamina, ácido murámico, arabinosa y galactosa. Los ácidos micólicos

(contienen entre 60 y 90 átomos de carbono) junto con lípidos libres (como 6,6'-dimecolato de trehalosa), le proporcionan una barrera impermeable hidrofóbica (figura 2). Otros ácidos grasos importantes son las ceras, fosfolípidos, ácidos micosericos y ácidos ftienoicos. Diversos ácidos grasos (10-20 átomos de carbono) son encontrados también, incluyendo ácido tuberculosteárico (ácido 10-R-metil octadecanoico), único componente celular para algunos miembros de los Actinomycetales [10].

Su pared bacteriana con alto contenido de lípidos complejos les confiere una alta resistencia a la desecación, al poder bactericida o bacteriostático de álcalis, ácidos y oxidantes haciéndolas capaces de sobrevivir por semanas o hasta meses sobre objetos inanimados (protegidos de la luz solar) [10].

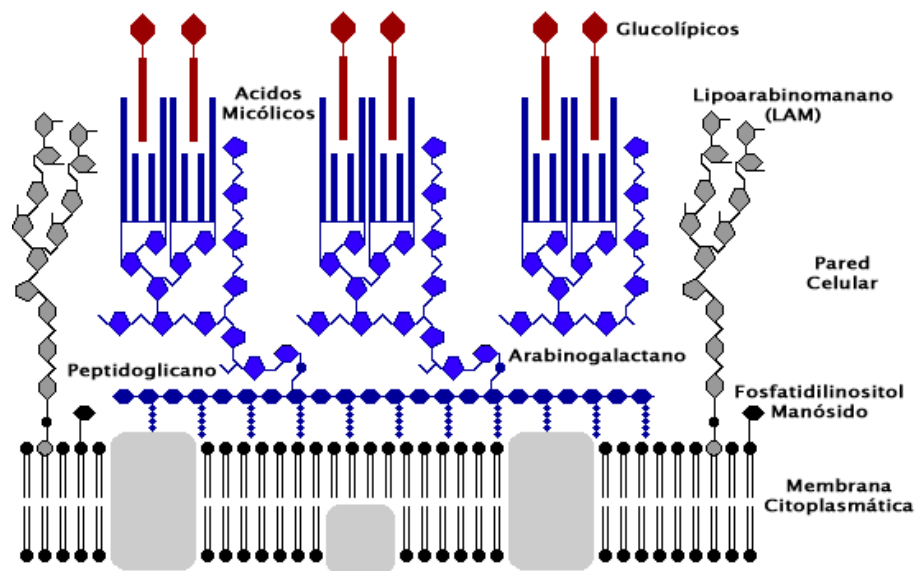


Figura 2. Envoltura celular del género *Mycobacterium*. Tres estructuras mayores la conforman: membrana citoplasmática, pared celular y la capa lipídica externa. La pared celular está compuesta de peptidoglicanos unidos covalentemente a la arabinogalactana y en la porción más distal y externa se hallan esterificadas largas cadenas carbonadas (ácidos micólicos) [14].

Se han aislado MNT de una amplia variedad de reservorios ambientales: agua, suelo, aire, alimentos, protozoarios, plantas, animales y humanos [11-13].

Actualmente se han identificado más de 100 especies diferentes de micobacterias no tuberculosas [15]. Aunque muchas de ellas son saprofitas, algunas son potencialmente patógenas para el hombre (aproximadamente una tercera parte ha sido asociada con enfermedades en humanos), teniendo un impacto significativo en la mortalidad y morbilidad en humanos y un impacto económico importante en la agricultura [16].

I.1.2. Epidemiología

Las enfermedades causadas por MNT tienen diversas manifestaciones clínicas y han sido agrupadas de manera general como micobacteriosis.

Antes del advenimiento del SIDA, las enfermedades predominantes causadas por MNT eran pulmonares, afectando principalmente a hombres de 60 años, con condiciones pulmonares predisponentes o bien, secundarias a funciones laborales, agrícolas o domésticas debidas a la inhalación de humo de carbón o polvo produciendo pneumoconiosis (pulmón negro) [6, 17].

A mediados de la década de 1980, el panorama de las enfermedades por micobacterias no tuberculosas cambió radicalmente en todo el mundo debido a la emergente epidemia del SIDA. Actualmente las MNT han emergido como la principal causa de infecciones oportunistas en individuos con SIDA, por lo que su importancia en la salud pública, aún en países industrializados, se ha incrementado (en Estados Unidos y Europa entre el 25 y 50% de los pacientes con SIDA son infectados con MNT) [6].

Las infecciones por MNT son más frecuentes en pacientes inmunocomprometidos, sin embargo, cada vez se diagnostica un mayor número de infecciones micobacterianas en sujetos inmunocompetentes [18].

La infección causada por MNT puede ser local o sistémica dependiendo de la predisposición local y/o grado de inmunidad. En algunos casos los factores predisponentes son muy obvios como bronquioectasia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, pneumoconiosis, silicosis, fibrosis quística, escoliosis torácica, procedimientos quirúrgicos, inyecciones, ruptura de la superficie de la piel debido a heridas y estados de inmunidad deficiente generalizados (SIDA, uso de agentes inmunosupresores en pacientes con transplantes, alcoholismo crónico). Sin embargo las condiciones predisponentes son menos claras en otros individuos como en la adenitis infantil [16].

En pacientes inmunocompetentes, diferentes MNT pueden causar enfermedad pulmonar localizada, adenitis, infecciones de tejido blando, infecciones de articulaciones/hueso, úlceras de piel; las enfermedades diseminadas se presentan con mayor frecuencia en individuos inmunodeficientes como pacientes transplantados o con leucemia [16, 18].

Las micobacterias no tuberculosas también se han reportado como responsables de infecciones nosocomiales y enfermedades ocupacionales. Las infecciones nosocomiales están frecuentemente asociadas con los distribuidores de agua a hospitales y el equipo de lavado [16]. En cuanto a la salud ocupacional, las MNT son consideradas agentes causales de pneumonitis hipersensible, asma y bronquitis en trabajadores de máquinas expuestos a fluidos metálicos y sus aerosoles, que son usados en la industria metalúrgica para enfriado y lubricación [19-22].

Infecciones en piel, generalmente asociadas con cortes o abrasiones de esta, se han observado en personas que trabajan en la industria pesquera o en aquellas en las que sus labores requieren del contacto constante con agua (albercas, acuarios, turismo acuático, etc), siendo el principal agente causal *M. marinum* [6].

I.1.3. Vía de infección

No se ha confirmado la transmisión de MNT de persona a persona, por lo que se sugiere que la infección ocurre a través de fuentes ambientales siendo el agua el principal vehículo de transmisión [16]. Los humanos son expuestos a las micobacterias presentes en agua por contacto, ingestión e inhalación de aerosoles siendo un ejemplo la linfadenitis cervical en niños, la cual es resultado de la ingestión de micobacterias en el agua para beber y posiblemente de objetos contaminados en el suelo que son llevados a la boca.

La tolerancia de las micobacterias a un intervalo amplio de pH y temperatura, su resistencia a diferentes desinfectantes [10, 23, 24] y su capacidad de crecer en bajas concentraciones de materia orgánica las hacen capaces de sobrevivir, colonizar, persistir, crecer y multiplicarse no solo en las fuentes ambientales sino también en los sistemas de distribución de agua potable [25-30].

Las actividades humanas también influyen en la distribución y prevalencia de micobacterias [5,6]. El tratamiento del agua con cloro u otros desinfectantes como el ozono con el fin de potabilizarla, favorece la persistencia y selección de las micobacterias ambientales altamente resistentes [26-30]. El complejo *M. avium* por ejemplo, exhibe una mayor resistencia

al cloro en comparación a otras especies; *M. aurum*, una de las especies más débiles, es 10 a la 100 veces más tolerante que *E. coli* [5].

I.2. Importancia de las MNT en el control de la Tuberculosis

Un factor adicional de la importancia del estudio de MNT es que son consideradas como una de las posibles causas de la variabilidad en la eficacia protectora de la única vacuna disponible contra la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por *M. tuberculosis* y es responsable de la muerte de más de dos millones de personas cada año [1]. La tuberculosis se presenta en todo el mundo independientemente de factores geográficos o raciales (figura 3). La medida de prevención más importante contra la tuberculosis es la vacunación con una cepa viva atenuada de *M. bovis* comúnmente conocida como BCG (bacilo Calmette-Guérin). Sin embargo, su eficacia protectora no ha sido consistente ya que varía entre 0% y 80%, observándose una mayor protección en niños sobre todo contra las manifestaciones más graves de la enfermedad (meníngea y miliar). De manera generalizada se ha observado que la menor eficacia se presenta en regiones tropicales y subtropicales cercanas al ecuador, donde se concentran los países menos desarrollados [4, 31].

La variación de la eficacia protectora de la vacuna BCG ha sido sujeta a debate desde 1950 y se han propuesto diferentes hipótesis para explicarla: diferencias genéticas en la

susceptibilidad del hospedero, variaciones en las cepas de BCG, la edad de vacunación, las diferencias metodológicas y la exposición a MNT [4, 5, 32].

Estimated TB incidence rates, by country, 2006

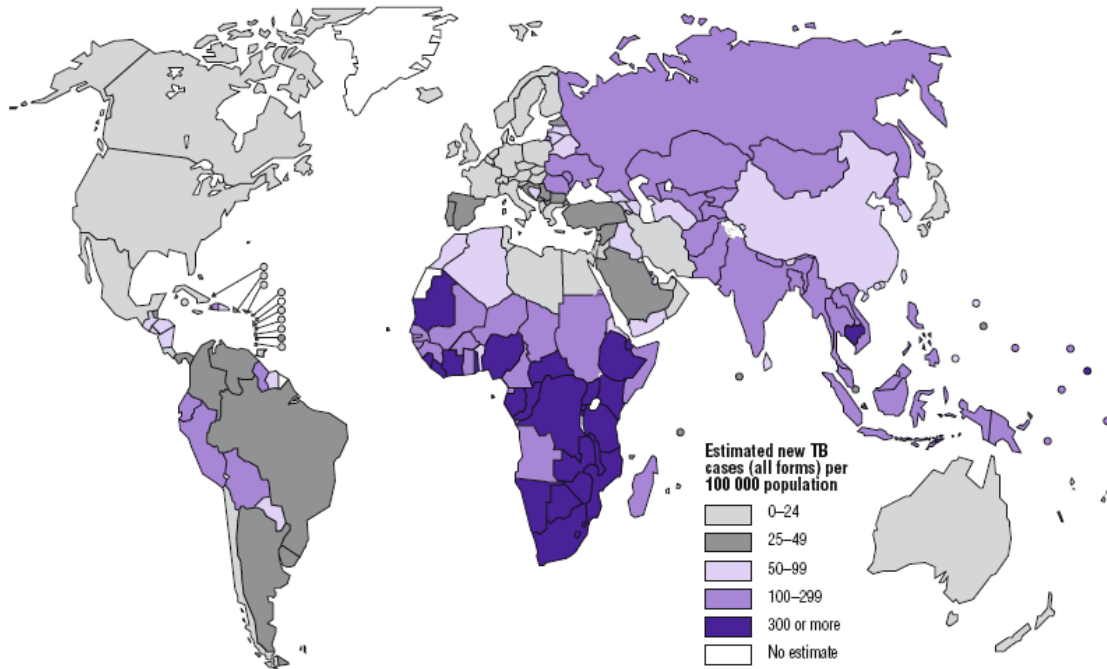


Figura 3. Distribución de la tuberculosis en el mundo en el 2006 [1].

I.2.1. Interferencia con la vacuna *M. bovis* BCG

Actualmente una de las hipótesis más aceptadas es la interferencia ocasionada por la previa sensibilización con MNT. Las micobacterias ambientales, presentan características genotípicas y fenotípicas comunes con *M. tuberculosis* y *M. bovis* que resulta en reactividad cruzada por la presencia de antígenos comunes, incluso con los antígenos más inmunodominantes como el Ag85 [7, 8].

Algunos estudios realizados sugieren que la previa sensibilización a micobacterias ambientales afecta la eficacia de la vacunación con BCG en humanos en algunas áreas. Por ejemplo, la vacuna BCG es eficiente en estudios en los que los donadores que tienen una prueba positiva a la tuberculina previa vacunación no son incluidos y además los criterios de exclusión aplicados entre los distintos estudios son totalmente diferentes. En países desarrollados como Reino Unido, la prueba de la tuberculina se considera positiva cuando la induración es mayor a 5 mm de diámetro, por el contrario, en los trópicos en donde existen niveles de sensibilización elevados a MNT y una baja cobertura en protección de BCG, se necesita un diámetro de 10-15 mm de la induración para considerar la prueba como positiva [8, 33].

En un estudio realizado en Malawi, una de las zonas con mayor incidencia de tuberculosis, se encontró que existe respuesta inmune a antígenos de MNT previa vacunación con *M. bovis* BCG y aún más, esta respuesta se asoció a niveles bajos de respuesta de IFN- γ a BCG en adultos [34-36]. Este efecto podría ser dependiente de la frecuencia de exposición y de las especies encontradas en la región.

En Inglaterra, en donde la protección de BCG contra la tuberculosis pulmonar es del 60-70%, Weir y col. [37] evaluaron la respuesta inmune previa vacunación con BCG en adolescentes (13-15 años de edad) determinando concentraciones de IFN- γ y la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío al PPD con *M. tuberculosis* y MNT. Sus resultados mostraron que aunque existe sensibilización a micobacterias no tuberculosas antes de la vacunación, la respuesta es considerablemente más baja para todas las especies de MNT estudiadas en

comparación con la reportada por Black y col. [35] en Malawi, donde el nivel de protección por la vacuna es bajo.

En Finlandia, en donde la incidencia de tuberculosis es baja, Kröger y col. [38] evaluaron la reactividad a la tuberculina y la sensibilización a MNT en niños de 4-6 años, reevaluándolos 6 años después. Su estudio muestra que tanto la reacción a la tuberculina como la sensibilización a MNT disminuye significativamente con la edad y aún más, se encontró una asociación positiva entre los sujetos que tenían contacto con mascotas o animales de granja y una respuesta elevada en ambas pruebas.

En modelos animales se ha encontrado que las MNT son capaces de alterar la respuesta inmune inducida por vacunación [39]. El mecanismo preciso por el cual ocurre esto no ha sido aclarado, aunque existen algunas propuestas, basadas en la cercanía filogenética de las especies dentro del género *Mycobacterium*.

Una de las hipótesis fue propuesta por Palmer y colaboradores en 1966 y se denominó hipótesis del enmascaramiento. Esta propuesta sugiere que la exposición a micobacterias ambientales ofrece algún nivel de respuesta inmune protectora contra la tuberculosis y el efecto protector adicional que pueda conferir la vacuna BCG sobre la respuesta inmune previamente inducida por las MNT es limitado. Sin embargo, esta hipótesis sugiere que las áreas con altos niveles de sensibilización a las micobacterias ambientales deberían tener incidencias bajas de tuberculosis ya que el nivel respuesta inmune producido por MNT sería igual o mayor al conferido por BCG, lo cual no ocurre [4].

Otra hipótesis propuesta es denominada hipótesis de bloqueo, la cual sugiere que la respuesta inmune pre-existente a los antígenos comunes de las micobacterias ambientales bloquea la replicación de *M. bovis* BCG. La respuesta inmune previa inducida por las MNT es reclutada después la vacunación, controlando la replicación de la cepa vacunal y bloqueando la diseminación de BCG. Los niveles de protección provistos por las MNT no tienen que ser necesariamente elevados, para interferir con la replicación. A diferencia de la hipótesis de enmascaramiento, en la hipótesis de bloqueo, la inmunidad parcial inducida por las micobacterias ambientales tiene una influencia mínima sobre la cepa virulenta *M. tuberculosis* [4].

Las dos hipótesis anteriores no son mutuamente excluyentes y es posible que ambos mecanismos estén involucrados. Sin embargo, existen algunas evidencias que señalan al bloqueo como el mecanismo más probable [7, 8, 40].

Brandt y col. [40] demostraron que la exposición previa a MNT vivas puede resultar en el desarrollo de una respuesta inmune que es rápidamente evocada después de la vacunación con BCG y es capaz de controlar la multiplicación de la cepa vacunal, provocando una respuesta inmune protectora deficiente contra *M. tuberculosis*. En su estudio evaluaron 6 diferentes aislamientos de MNT recuperadas de agua y suelo en el distrito de Karonga (*M. fortuitum*, *M. chelonae* y el complejo *M. avium*), sus resultados muestran que solo las cepas de MNT capaces de multiplicarse en el huésped (*M. avium*) pueden bloquear la actividad de la BCG. Por lo que sugieren que la variación en la protección de la vacuna BCG depende de la virulencia de las cepas de MNT a las que se es expuesto.

Demangel y col. [7] evaluaron el efecto de la sensibilización con tres especies diferentes de MNT (*M. avium*, *M. scrofulaceum* y *M. vaccae*) en la persistencia y eficacia protectora de la cepa BCG en modelo murino. La multiplicación del bacilo *M. bovis* BCG previa exposición a *M. scrofulaceum* o *M. vaccae* fue diferente a la de *M. avium*. La sensibilización con *M. avium* resultó en el aclaramiento de BCG en pulmones y bazo a los 21 días después de la inoculación, mientras que la sensibilización con *M. scrofulaceum* y *M. vaccae* solo elimina al bacilo vacunal en pulmón pero no en bazo, en donde su persistencia no fue modificada. Aún más, los animales expuestos a *M. scrofulaceum* o *M. vaccae* previo a la vacunación con BCG mostraron una protección mayor contra tuberculosis en comparación con los controles no sensibilizados. Por el contrario la sensibilización con *M. avium* disminuyó la eficacia protectora conferida por la vacuna BCG. Demangel y col. atribuyen estas diferencias al tipo de antígenos que comparten las MNT con la vacuna BCG y sugieren que la eficacia protectora de la vacuna BCG varía dependiendo de la especie de micobacterias no tuberculosas a la que se está expuesto.

Actualmente se desconoce la frecuencia y distribución de las MNT en el mundo. Existen algunos reportes en diferentes países de aislamiento e identificación de MNT en muestras ambientales (aguas naturales, suelo, polvo casero) y en agua para uso y consumo humano [26-30]. Aunque una amplia variedad de especies de MNT han sido aisladas de suelo y agua, no se sabe si esta exposición elevada es provocada por las actividades humanas o bien es un reflejo de la diferencia en la fauna microbiana de estas regiones.

I.2.2. Interferencia en el diagnóstico de Tuberculosis

La exposición a micobacterias ambientales también es responsable del escaso valor predictivo de la prueba de PPD o tuberculina. La prueba de PPD o reacción a la tuberculina, mide la respuesta de hipersensibilidad retardada al derivado proteico purificado de *M. tuberculosis* y es hasta el momento la única prueba disponible para el diagnóstico de la infección latente. Idealmente, la prueba de PPD pudiera ser usada como un marcador sugerente de infección, desafortunadamente análisis de ensayos con BCG indican que esta no posee un valor predictivo de protección, aún cuando la hipersensibilidad retardada y la inmunidad protectora emergen a la par después de la primo infección con *M. tuberculosis* [41].

Una de las mayores limitaciones del PPD es el hecho de que es una mezcla cruda de varios antígenos, muchos de los cuales son compartidos entre las diferentes especies de micobacterias. Por lo tanto, un resultado positivo a la prueba puede ser consecuencia de cualquiera de los siguientes eventos: infección con *M. tuberculosis*, vacunación previa con BCG o exposición a MNT. Es muy bien conocido que la prueba de PPD tiene una baja especificidad en poblaciones con un alta cobertura de BCG y alta exposición a MNT [34].

En vista de estas limitaciones, se ha incrementado el interés en la búsqueda de antígenos micobacteriales inmunodominantes para el desarrollo de nuevas vacunas y candidatos a pruebas de inmunodiagnóstico [42] que permitan detectar la respuesta inducida específicamente por *M. tuberculosis* y no por MNT.

El desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas, sencillas y específicas es posible cuando se identifica un epítoto específico e inmunodominante [43]. Una de las técnicas más novedosas

que permiten identificar aquellas proteínas que son expresadas diferencialmente o modificadas de manera específica son los mapas de expresión proteica.

I.3. Proteómica. Nuevas estrategias para el estudio de las proteínas

Los proyectos de secuenciación del genoma han contribuido enormemente al conocimiento de las secuencias de DNA de muchos organismos. Sin embargo, la función de muchos de los nuevos genes identificados es desconocida. Aún en los sistemas mejor estudiados como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, la función específica de la mitad de sus genes es desconocida. Para afrontar este reto, se han desarrollado técnicas experimentales denominadas colectivamente genómica funcional [44].

La proteómica es una rama de la genómica funcional y puede definirse como un estudio a gran escala de las propiedades de las proteínas, sus niveles de expresión, modificaciones post-traduccionales e interacciones con otras moléculas para obtener una visión global e integral del proceso celular a nivel de proteína [44, 45]. La proteómica puede dividirse en dos áreas: los mapas de expresión proteica y los mapas de interacción proteica.

Los mapas de interacción proteína-proteína involucran la determinación de los patrones de interacción de las proteínas de la célula u organismo. Por ejemplo, si una proteína cuya función es desconocida se encuentra interactuando con una serie de proteínas conocidas involucradas en determinado proceso celular, puede inferirse que la proteína desconocida contribuye al mismo proceso. Mientras que los mapas de expresión de proteínas involucran el estudio cuantitativo de los cambios globales en la expresión de proteínas en las células, tejidos o

fluidos corporales usando electroforesis en dos dimensiones acoplado con espectrometría de masas [44].

El principio de los mapas de expresión proteica es comparar los espectros de proteínas expresadas en células o tejidos bajo diferentes condiciones ambientales o de diferentes estados de enfermedad, con el objetivo de identificar proteínas que son expresadas diferencialmente o modificadas de manera específica que permitan desarrollar reactivos diagnósticos y la determinación de posibles blancos terapéuticos.

El estudio de las proteínas se realiza a través de una combinación de técnicas de separación y de identificación. Los ensayos tradicionales para la separación de las proteínas consisten en el uso de un número de pasos de purificación consecutivos, por ejemplo iso-electro enfoque seguido por SDS-PAGE, una separación cromatográfica seguida por otra (intercambio iónico seguido de cromatografía de fase reversa, etc.), una vez realizada la separación, las proteínas pueden ser identificadas directamente a través de secuenciación o espectrometría de masas o indirectamente utilizando ensayos de unión a ligandos o reactivos de afinidad [46].

El método estándar para estudiar el proteoma de una célula, tejido, órgano u organismo es la separación de proteínas en geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-GE) [47]. La electroforesis de dos dimensiones es uno de los métodos más ampliamente usados para analizar mezclas complejas de proteínas obtenidas a partir de células, tejidos u otras muestras biológicas. Esta técnica separa a las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes: su punto isoeléctrico (primera dimensión) y su masa molecular (segunda dimensión) [48]. Su principal ventaja es su capacidad de separar miles de proteínas diferentes simultáneamente

determinando de cada una de ellas su punto isoeléctrico, peso molecular y la cantidad expresada bajo una condición específica.

La electroforesis de dos dimensiones fue introducida por P. H. O'Farrell y J. Klose en 1975 [47], utilizando tubos de vidrio o plástico que contenían una capa delgada de gel de 13 cm de longitud y 2.5 mm de diámetro, urea, detergentes, agentes reductores y anfolitas acarreadoras para formar el gradiente de pH (mezcla de algunos cientos de diferentes amortiguadores anfotéricos). Aunque se reconoció su potencial como una poderosa herramienta de separación bioquímica, la técnica demandaba cierta destreza experimental y los patrones obtenidos no eran muy reproducibles. El desarrollo de otras técnicas como las tiras de gradiente de pH inmovilizado, la automatización del análisis de los geles, espectrometría de masas con pequeñas cantidades de péptidos y proteínas, softwares más poderosos y menos costosos, la disponibilidad de genomas de una mayor número de organismos y la disponibilidad de bases de datos con secuencias de proteicas fue realmente lo que le permitió convertirse en uno de los métodos principales en la proteómica [45, 48].

Actualmente la electroforesis bidimensional ha sido ampliamente utilizada bajo distintas aplicaciones: análisis de proteomas, diferenciación celular, detección de marcadores de enfermedades, monitoreo terapéutico, descubrimiento de nuevos fármacos, cáncer y purificación de proteínas a microescala.

II. JUSTIFICACIÓN

La exposición a MNT es un evento frecuente a nivel mundial sobre todo en países en vías de desarrollo. Las investigaciones recientes señalan que la exposición a MNT es una de las principales causas en la variación de la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG así como de la baja sensibilidad y especificidad de la prueba de intradermoreacción (PPD) debido a la reacción cruzada que presentan antígenos de MNT con *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Por lo tanto, es necesario identificar proteínas con potencial para su uso en el desarrollo de vacunas y reactivos de diagnóstico. La identificación de proteínas comunes entre diferentes especies de MNT permitirá la detección de posibles marcadores de exposición únicamente a éstas, resultando en un diagnóstico específico con un menor número de falsos positivos. Por otro lado, la identificación de proteínas únicas permitirá la búsqueda de posibles candidatos de diagnóstico de infección a nivel de especie por MNT.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un análisis comparativo de los proteomas de Micobacterias no tuberculosas frecuentemente aisladas en agua para uso y consumo humano en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Objetivos particulares

- Elaborar y analizar los mapas de expresión proteica de las especies de MNT aisladas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.
- Determinar cuáles son las proteínas de expresión común entre las diferentes especies de MNT
- Identificar proteínas de expresión única en cada especie de MNT estudiada como posibles marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad causada por estas.

IV. HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los proteomas de las diferentes especies de MNT, siendo mayor el número de las proteínas comunes que el de las únicas.

V. METODOLOGÍA

V.1. Selección de cepas de MNT.

Para la elaboración de los mapas proteómicos se seleccionó un aislamiento de cada una de las cuatro especies encontradas en agua para uso y consumo humano de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (*M. nonchromogenicum* tipo I, *M. nonchromogenicum* tipo II, *M. gordonae* y *M. peregrinum*), un aislamiento recuperado en agua superficial de los Canales de Xochimilco identificado como *M. avium* y una cepa de *M. nonchromogenicum* ATCC 19550.

V.2. Obtención de cultivos semilla.

El uso de medios de cultivo libres de proteínas es recomendable para la elaboración de mapas proteómicos. El medio Sauton (anexo A) es uno de los medios de cultivo para micobacterias más utilizados con este fin, debido a que contiene como única fuente de carbono el glicerol. Todos los aislamientos de MNT en estudio habían sido recuperados, cultivados y conservados en medios enriquecidos por lo que fue necesario realizar precultivos en medio líquido enriquecido y en volúmenes pequeños de medio Sauton antes de poder obtener el cultivo semilla (el cultivo a partir del cual serán obtenidos los cultivos independientes). El procedimiento se describe a continuación:

Cada una de las cepas de MNT fue aislada en placas de Middlebrook 7H10 (anexo A) y una sola colonia fue inoculada en 50 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 (anexo A), el cultivo fue incubado a 37°C y con agitación constante a 150 rpm. Una vez que la D.O._{600nm} del cultivo fue de 0.6, 100 µL de este cultivo fueron inoculados en 50 mL de medio Sauton e incubado bajo las mismas condiciones hasta que su D.O._{600nm} fuera de 0.6. Posteriormente un volumen adecuado (variable para cada una de las cepas) fue inoculado en 250 mL de medio Sauton, incubado a 37°C con agitación constante y cuando la D.O._{600nm} fue de 0.6 se cosechó por centrifugación a 5000x/4°C/20'. Se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen (anexo B) para cada uno de los cultivos para comprobar su pureza. El cultivo fue almacenado en alícuotas de 1 mL en PBS con glicerol al 10% a -70°C A este último cultivo se le denominó cultivo semilla y todos los cultivos posteriores fueron realizados a partir de este.

V.3. Elaboración de curvas de crecimiento.

Se elaboraron curvas de crecimiento por duplicado de cada una de las cepas de MNT para determinar la fase de crecimiento media logarítmica. El inóculo inicial para cada uno de los cultivos fue establecido en base a las características de crecimiento observadas durante la obtención del cultivo semilla. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación constante a 150 rpm y su D. O. (λ 600 nm) fue registrada cada 24 hrs. Se determinaron las UFC de cada una de los cultivos en la fase media logarítmica de crecimiento realizando diluciones seriadas en PBS con tween 80 ($10^0 - 10^9$) e inoculando 10 µL de cada dilución en placas de M7H10 por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y 30% humedad

V.4. Obtención de proteínas de extracto celular.

Se realizaron tres cultivos independientes en medio Sauton de cada una de las cepas de MNT utilizando las condiciones de crecimiento ya estandarizadas. Una vez que los cultivos puros alcanzaron la fase media logarítmica de crecimiento fueron cosechados por centrifugación a 5000 x g durante 20 min. a 4°C. Los paquetes bacterianos obtenidos fueron lavados dos veces con agua desionizada estéril, el paquete celular se resuspendió en agua a razón de 0.1 g por mL (peso húmedo). La lisis de las bacterias se realizó por sonicación (sonicador Vibra Cell con punta de 2 mm de diámetro), en presencia de inhibidores de proteasas: PMSF (concentración final de 10 mM) y EDTA (1mM). Los pulsos fueron aplicados durante 1 min. a 13 watts/ 60 Amplitud con 1 min. de reposo en hielo. Finalmente la fracción soluble que contiene las proteínas del extracto celular se separó por centrifugación a 14000 rpm durante 20 min. a 4°C y se conservó a -70°C.

Para determinar el número de pulsos que debían ser aplicados a las diferentes especies de micobacterias se elaboró una curva de lisis por sonicación tomando muestras de la suspensión celular a los 0, 3, 5, 9, 12, 15, 17 y 20 pulsos. La eficiencia de la lisis fue confirmada por observación al microscopio de las muestras teñidas por la técnica de Ziehl-Neelsen. La concentración de proteína en las muestras a los 12, 15, 17 y 20 pulsos fue determinada por el método de Bradford y se visualizaron las proteínas en geles desnaturalizantes de acrilamida al 12.5% teñidos con plata para determinar las condiciones de obtención de proteínas de cada una de las diferentes especies de MNT.

V.5. Electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-GE)

Las proteínas de extracto celular fueron separadas por electroforesis bi-dimensional. Esta técnica permite separar a las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes: su punto isoeléctrico (primera dimensión) y su masa molecular (segunda dimensión). Para cada una de las especies de MNT incluidas en el estudio se realizaron dos geles de cultivos independientes.

Primero, se estandarizaron las siguientes condiciones de trabajo con proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* ATCC 19550.

- a) Intervalo de pH. Se realizaron geles de dos dimensiones como se describe posteriormente pero con un pH de 3-10 para determinar el intervalo en el cual se distribuye la mayoría de las proteínas. La reducción en el intervalo de pH permite una mayor separación y resolución de los puntos (proteínas) dentro del gel de 2D.
- b) Cantidad de proteína. Geles 2D con 80 y 100 μg de proteína fueron elaborados bajo las mismas condiciones.
- c) Tiempo de isoelectroenfoque. Se probaron dos condiciones diferentes de isoelectroenfoque, en la primera se aplicó un voltaje de 500 V por 1Vh, 2000 V hasta 2499 Vh y 2500 V hasta completar un tiempo total de enfoque de 52 kVh y en la segunda previo a estas condiciones se aplicaron voltajes bajos de 100V por 30 min, seguido de 30 min a 250 V y 500 V por 30 min.

V.5.1. Primera dimensión

Para realizar la primera dimensión se utilizaron tiras de 11 cm con gradiente de pH inmobilizado de 4-7 (tiras IPG pH 4-7Bio-Rad), estas fueron rehidratadas durante 17 h. con 80 µg de proteínas solubilizadas y desnaturalizadas con CHAPS 4%, urea 9 M, DTT 70 mM y buffer IPG al 1%. Posteriormente se realizó el isoelectroenfoque (Multiphor II, Amershan-Pharmacia, UK) a 17°C aplicando un voltaje de 500 V por 1Vh, 2000 V hasta 2499 Vh y 2500 V hasta completar un tiempo total de enfoque de 52 kVh. Una vez concluido el isoelectroenfoque las tiras fueron equilibradas a temperatura ambiente en Tris-HCl pH 8.8 50 mM, SDS 2% (p/v), urea 6 M, glicerol 30% (v/v) con DTT a una concentración de 15 mg/mL por 15 min seguido de 15 min de incubación en Tris-HCl pH 8.8 50mM, SDS 2% (p/v), urea 6M, glicerol 30% (v/v) y 37.5 mg/mL de iodoacetamida.

V.5.2. Segunda dimensión

La segunda dimensión se realizó en geles de acrilamida al 12.5 % de 16 x 18 cm y 1 mm de grosor, en una cámara vertical Hoeffer S600 (Hoeffer Scientific Instruments, USA). El voltaje aplicado se incrementó gradualmente, es decir, 30 min a 50 V seguido de 1 h a 100 V permaneciendo constante a 150 V por 4 horas. Una vez completada la electroforesis, los geles se fijaron en una solución acuosa de etanol 40% y ácido acético 10% a 4°C durante toda la noche. Los geles fueron posteriormente teñidos con nitrato de plata para la visualización de las proteínas (anexo C).

V.6. Análisis de geles bidimensionales

Los geles resultantes fueron digitalizados y analizados in silico con el programa PDQUEST 2-D v8.0 (Bio-Rad, Laboratories, Inc. USA). El análisis consistió primero en la edición de cada una de las imágenes adquiridas de los geles teñidos con plata, en este paso se eliminan todos los artefactos generados durante el proceso de tinción que el programa detecta como un punto (proteína), se indican aquellos puntos que fueron omitidos y se define el diámetro real de cada punto. Posteriormente, se comparan las imágenes y el programa crea una plantilla conocida como gel maestro, la cual conserva la localización del punto en el gel original y obtiene la representación gaussiana de la intensidad de cada punto detectado en las réplicas, esto es, una representación tridimensional de la imagen original. El gel maestro puede incluir solo los puntos comunes entre los duplicados de la muestra o todos los puntos encontrados. Para cada una de las especies se elaboró un gel maestro a partir de los duplicados, conteniendo todas las proteínas de extracto celular que fueron resueltas en cualquiera de los dos geles.

Los geles maestros de las diferentes especies de MNT fueron comparados entre sí para determinar aquellas proteínas de expresión común y aquellas de expresión única para cada especie.

V.7. Identificación de proteínas

Se seleccionaron nueve proteínas de extracto celular detectadas como comunes a todas las cepas de MNT estudiadas y de 4-6 proteínas únicas (4 para *M. nonchormogenicum* tipo I, *M.*

nonchromogenicum tipo II y *M. peregrinum*, 6 para *M. gordonae* y 5 para *M. avium*) para identificación por espectrometría de masas. La selección de los puntos se realizó en base a tres criterios:

1. La proteína debía de observarse como un punto bien definido
2. Las proteínas seleccionadas debían de representar toda el área del gel, es decir, los puntos seleccionados no se encontraban cercanos unos de otros
3. La intensidad del punto debería ser alta (fácilmente visible)

Para la identificación de las proteínas se realizaron geles con una concentración mayor de proteínas de extracto celular de las diferentes especies de MNT con las condiciones establecidas anteriormente. La cantidad de proteína utilizada fue establecida de acuerdo a la concentración de proteína obtenida en el extracto celular de cada cepa, para *M. nonchromogenicum* tipo I se emplearon 100 µg, 90 µg para *M. gordonae*, 150 µg para *M. peregrinum* y 130 µg en *M. nonchromogenicum* tipo II. Los geles fueron teñidos con silver blue durante 16 h (anexo D) y enviados para la identificación de las proteínas de interés.

VI. RESULTADOS

VI.1. Caracterización macro- y microscópica de las cepas de MNT seleccionadas.

Las características morfológicas de las colonias seleccionadas fueron evaluadas mediante el examen visual del desarrollo en placas de agar Middlebrook 7H10. Las colonias fueron caracterizadas de acuerdo a su tamaño, forma, elevación, margen (borde), color, superficie, densidad y consistencia. La morfología colonial observada entre las diferentes cepas de MNT seleccionadas fue distinta, con excepción de *M. nonchromogenicum* tipo I y *M. nonchromogenicum* ATCC 19550, encontrándose colonias diversas principalmente cuanto a color, forma y consistencia (Tabla 1).


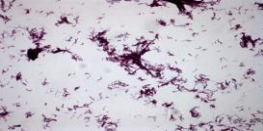
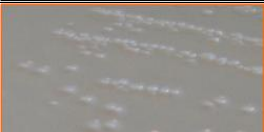
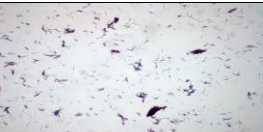

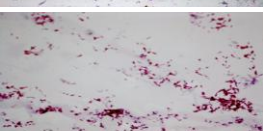

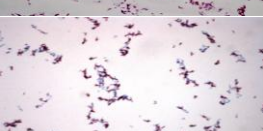

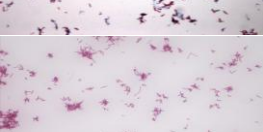

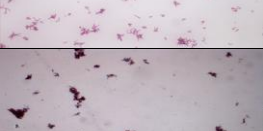
Una característica microscópica común de todo el género *Mycobacterium* es su ácido-alcohol resistencia, todas las cepas de MNT mostraron esta característica al ser teñidas con la técnica de Ziehl-Neelsen confirmando su pertenencia a este género. Se encontró diversidad morfológica entre los distintos aislamientos, con excepción de *M. nonchromogenicum* tipo I y *M. nonchromogenicum* ATCC 19550, observándose con frecuencia bacilos largos con agregación en cúmulos, lo cual es común en el género debido a las características de su pared celular. Algunas diferencias microscópicas pueden orientar de manera presuntiva, la identificación de alguna especie. Por ejemplo, es conocido que *M. tuberculosis* en medio líquido, frecuentemente se observa como serpentina acordonada (factor cordón). El complejo *M. avium* puede distinguirse por la apariencia microscópica de nido de pájaro, lo cual fue observado en el aislamiento de *M. avium* utilizado para este estudio (Tabla 1).

Las diferentes especies de MNT fueron además caracterizadas de acuerdo a su velocidad de crecimiento, la cual se basa en los días de incubación que un subcultivo sólido necesita para la detección de colonias visibles macroscópicamente. Las micobacterias que tardan más de 7 días fueron catalogadas como de crecimiento lento mientras que las que crecen en menos de 7 días como de crecimiento rápido (Tabla 1). Todas las cepas de MNT utilizadas fueron de crecimiento lento excepto *M. peregrinum* que se presentó como especie de rápido crecimiento.

VI.2. Cultivos semilla

Los cultivos semilla fueron obtenidos para cuatro de los cinco aislamientos de MNT provenientes de agua para uso y consumo humano de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y para la cepa ATCC 19530 de *M. nonchromogenicum*. Las condiciones de obtención del cultivo semilla se muestran en la tabla 2. Para las cepas de *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC 19530 y *M. peregrinum* no fue necesario realizar precultivos en medios líquidos enriquecidos (M7H9), sin embargo, para las cepas *M. nonchromogenicum* tipo II y *M. gordonae* la utilización de cultivos previos permite obtener la adaptación de la micobacteria en menor tiempo. Lo anterior se observa en el precultivo de *M. avium*, en donde la ausencia de un cultivo previo en M7H9 prolonga el tiempo de adaptación hasta 140 días, contrario a las cepas cultivadas en medio enriquecido que alcanzan la fase logarítmica ($D.O._{\lambda,600nm} = 0.6$) en 6 a 10 días.

Tabla 1. Características macro y microscópicas de los diferentes aislamientos de MNT estudiadas

Especie	Origen de aislamiento	Velocidad de crecimiento	Morfología colonial	Características macroscópicas	Microscopia	Características microscópicas
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	Texcoco	Lento		Colonias de 1-2 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color blanco, mates, opaca, cremosa		Bacilos largos, delgados, ZN(+), agregados en cúmulos, fuertemente teñidos
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	Texcoco	Lento		Colonias de 1 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color blanco, brillantes, translúcidas, cremosas		Bacilos cortos, rectos, ZN(+), agregados fuertemente en cúmulos
<i>M. gordonae</i>	Xochimilco	Lento		Colonias de 2 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color amarillo naranja, brillante, opaca, cremosa.		Bacilos largos, anchos, aguzados, ZN(+), agregados en cúmulos pequeños
<i>M. peregrinum</i>	México	Rápido		Colonias de 2-3 mm de diámetro, circulares, umbonadas, margen entero, color blanco, mate, opaca, cremosa.		Bacilos largos, delgados, parcialmente ZN+, agregados en cúmulos e hileras
<i>M. avium</i>	Canales de Xochimilco, sitio Fernando Celada*	Lento		Colonias de 2 mm de diámetro, irregulares, elevadas, margen ondulado, color amarillo, mate, opaca, quebradiza.		Bacilos largos, delgados, ligeramente curvos, ZN(+), agregados en cúmulos laxos que asemejan nidos de ave
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19550	Suelo	Lento		Colonias de 1-2 mm de diámetro, circulares, convexas, margen entero, color blanco, mates, opaca, cremosa		Bacilos largos, delgados, ZN(+), agregados en cúmulos, fuertemente teñidos

*Sitio ubicado en la zona de embarcaderos, aledaño a zona urbana

Además el inóculo utilizado para la obtención del cultivo semilla fue distinto para *M. gordonae* y *M. avium* con respecto a las otras cepas, teniéndose que incrementar hasta más de 10 veces para alcanzar una $D.O._{\lambda=600nm} = 0.6$ en un tiempo menor a 30 días.

Tabla 2. Condiciones de obtención de cultivos semilla de las diferentes MNT

ESPECIE DE MNT	Precultivo M7H9 ^a (días)	Precultivo Sauton ^b (días)	Inóculo lote semilla ^c (μL)	Lote Semilla ^d (días)
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	30	---	---	---
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	20	10	500	14
<i>M. gordonae</i>	20	8	1000*	7
<i>M. peregrinum</i>	---	6	500	5
<i>M. avium</i>	---	140	750*	25
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19530	---	12	500	12

^a Tiempo de crecimiento en días en medio Middlebrook 7H9 de cada una de las cepas de MNT ($D.O._{(\lambda=600nm)}=0.602 \pm 0.3$)

^b Tiempo de crecimiento en días en 50 mL de medio Sauton de cada una de las cepa de MNT ($D.O._{(\lambda=600nm)}=0.625 \pm 0.15$)

^c Inóculo utilizado a partir del precultivo en Sauton para obtener una $D.O._{(\lambda=600nm)} \geq 0.6$ en 250 mL de medio Sauton para cada una de las cepas en un tiempo menor a 30 días, (*)el inóculo se encuentra concentrado 10 veces con respecto al precultivo original

^d Tiempo requerido para que la $D.O._{(\lambda=600nm)}$ del cultivo de cada una de las cepas de MNT en 250 mL de medio Sauton sea de 0.69 ± 0.07

El aislamiento de agua identificado como *M. nonchromogenicum* tipo I no pudo ser crecido en medio Sauton por lo que la cepa fue excluida del estudio.

VI.3. Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de los cuatro aislamientos ambientales: *M. nonchromogenicum* tipo I, *M. peregrinum*, *M. avium* y *M. gordonae* y de la cepa ATCC 19530 *M. nonchromogenicum* (Gráfico 1). El inóculo inicial para cada uno de los cultivos fue establecido en base a las características de crecimiento observadas durante la obtención del cultivo semilla.

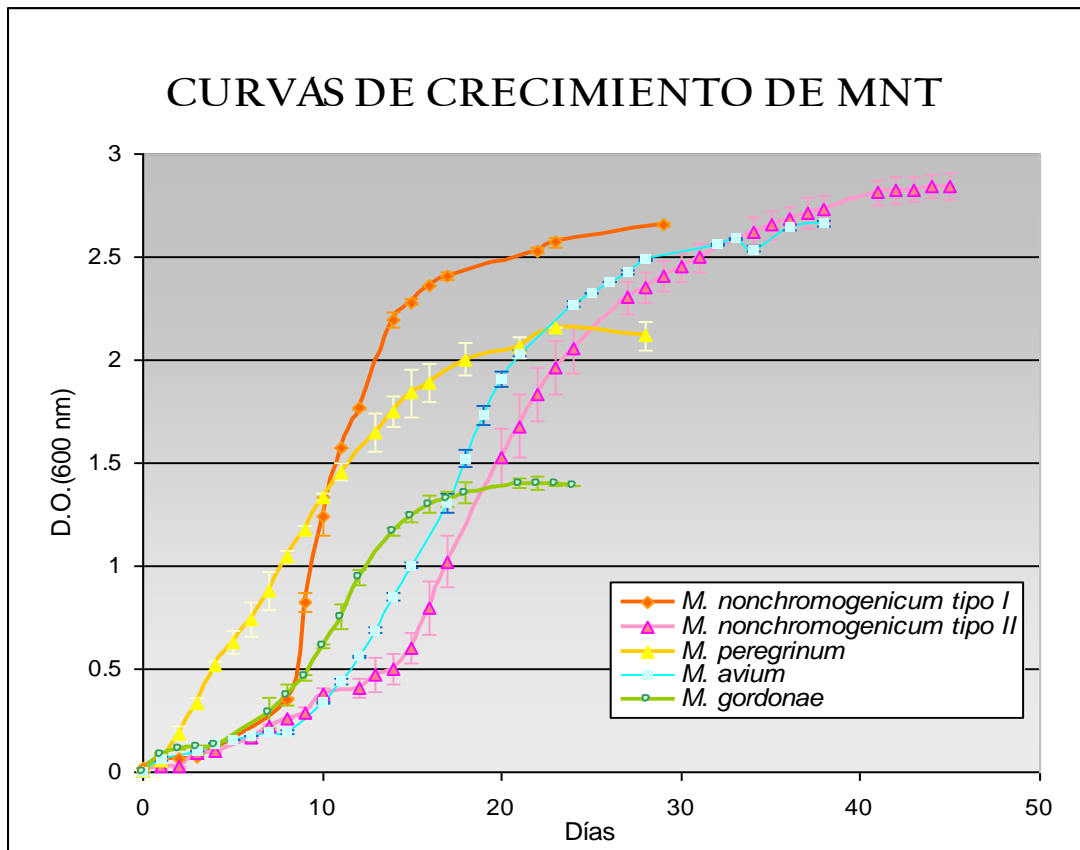


Gráfico 1. Curvas de crecimiento de las diferentes MNT estudiadas. Las curvas fueron realizadas en medio Sauton, determinando el crecimiento por D.O. a λ 600 nm.

La fase logarítmica es iniciada primero por *M. peregrinum*, una especie de rápido crecimiento, para el resto de las cepas, reportadas como especies de lento crecimiento esta fase se presenta posterior al séptimo día. La fase estacionaria se observa primero en *M. nonchromogenicum* tipo I ATTC 19530, seguida de *M. gordonae*, *M. peregrinum*, *M. avium* y finalmente *M. nonchromogenicum* tipo II.

Para asegurar que todas las cepas de MNT se encontraran en una fase metabólicamente activa, se determinó la fase media logarítmica de acuerdo a la curva de crecimiento de cada cepa de MNT. La D.O._(600 nm) y el día en el que se presenta dicha fase se muestran en la tabla 3, así mismo, se presenta las UFC de cada uno de los cultivos en esta fase.

Tabla 3. Caracterización de la fase media logarítmica de crecimiento de las diferentes MNT estudiadas.

Especie	Fase media logarítmica		
	D.O. (600 nm)	Día	UFC/mL
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	0.992	20	3.0x10 ⁷
<i>M. gordonae</i>	0.754	11	2.0x10 ⁶
<i>M. peregrinum</i>	1.033	8	1.4x10 ⁷
<i>M. avium</i>	1.400	17	1.0x10 ⁷
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19550	1.304	10	1.3x10 ⁷

El día en que se presenta la fase media logarítmica es variable, siendo menor para *M. peregrinum* y más tardía para *M. nonchromogenicum* tipo II. Las UFC en esta fueron del mismo orden de magnitud para todas las cepas excepto para *M. gordonae*.

VI.4. Proteínas de extracto celular

Se realizaron cultivos independientes de cada cepa de MNT incluida en el estudio. Todos los cultivos fueron cosechados en la fase media logarítmica. La D.O. (600 nm) y el día en el que fueron cosechados los cultivos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de obtención de los cultivos independientes de las diferentes MNT estudiadas.

Especie	Fase media logarítmica de los cultivos independientes		
	D.O. (600 nm)	Día	UFC/mL
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	1.025±0.02	20	3.4x10 ⁷
<i>M. gordonae</i>	0.844±0.06	11	3.0x10 ⁶
<i>M. peregrinum</i>	0.982±0.1	8	1.3x10 ⁷
<i>M. avium</i>	1.458±0.07	18	1.2x10 ⁷
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19550	1.223±0.1	12	2x10 ⁷

Las proteínas de extracto celular fueron obtenidas a partir del paquete celular por sonicación. Se determinó el número de pulsos requeridos para lisar las bacterias y obtener una concentración mayor a 0.7 µg/µL (concentración mínima necesaria para realizar geles 2D con 80 µg de proteína). Una muestra del extracto celular fue tomada en cada pulso para ser teñida por la técnica de Ziehl-Neelsen (figura 4-8), cuantificadas por Bradford y separada en geles de acrilamida al 12.5%. La concentración de proteína obtenida en cada pulso para cada una de las especies se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de las diferentes MNT estudiadas. Cuantificación de proteínas.

	Concentración de proteínas obtenida en los diferentes pulsos de sonicación				
Pulso	<i>M. gordonae</i> (µg/µL)	<i>M. peregrinum</i> (µg/µL)	<i>M. avium</i> (µg/µL)	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II (µg/µL)	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19550 (µg/µL)
12	0.841	0.54	0.880	0.594	0.32
15	0.830	0.72	1.046	0.634	0.76
17	0.835	1.41	1.179	0.678	1.023
20	0.802	1.50	1.057	0.762	1.026

En las muestras teñidas por Ziehl-Neelsen de cada pulso se observó que al incrementar el número de pulsos, disminuye el número de bacterias y aumenta en número y tamaño los cúmulos de proteína-restos celulares que son teñidos con el colorante de contraste (azul de metileno). Este comportamiento fue observado en todas las cepas de MNT (figura 4-7), excepto en *M. gordonae* en donde después de 12 pulsos no se observó cambio alguno (figura 8).

Las observaciones anteriores se correlacionan con la concentración de proteínas obtenida en los diferentes pulsos, a mayor número de pulsos mayor concentración de proteínas. Sin embargo para *M. goodnae*, la concentración de proteínas permanece constante después del pulso 12 (Tabla 5).

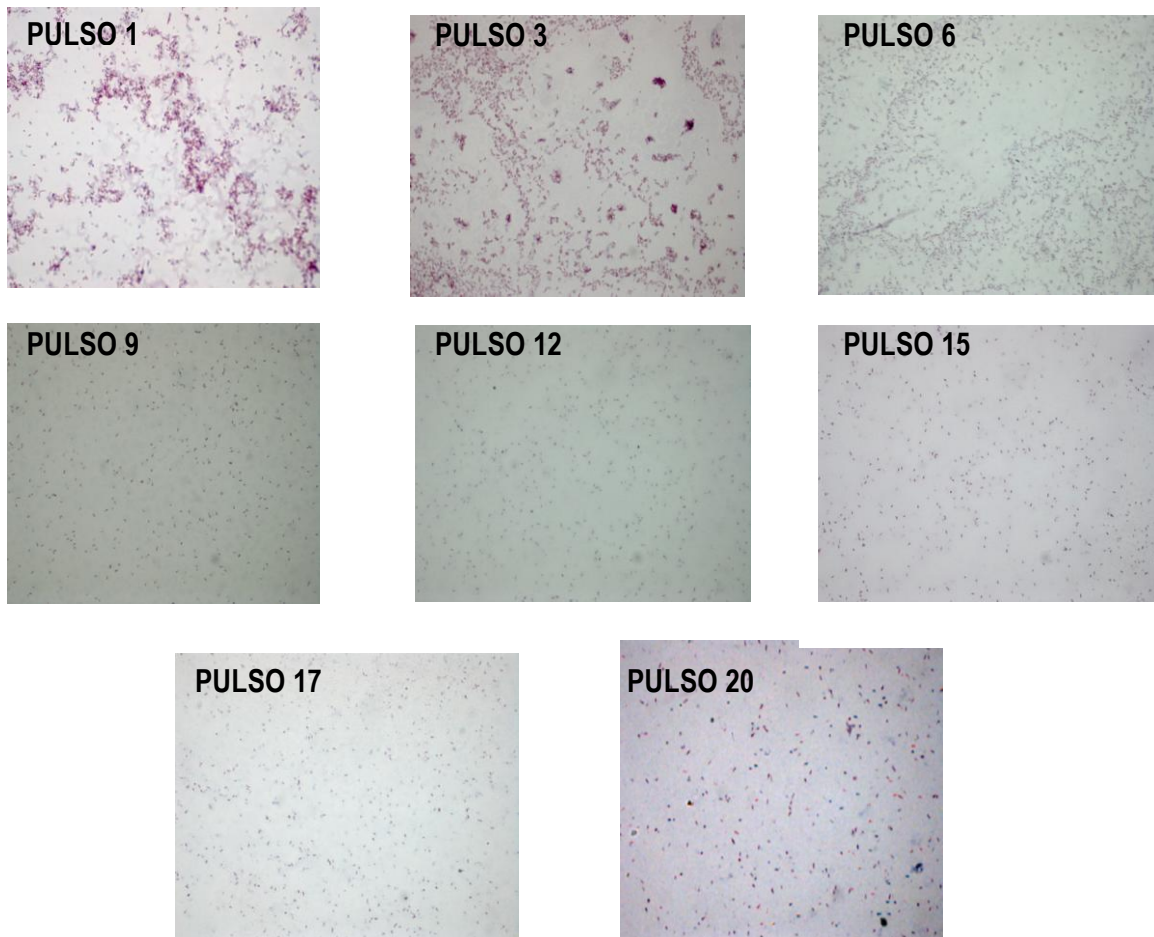


Figura 4. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* ATCC 19530. Muestras de lisado celular obtenido a diferentes pulsos de sonicación y teñidas por Ziehl-Neelsen.

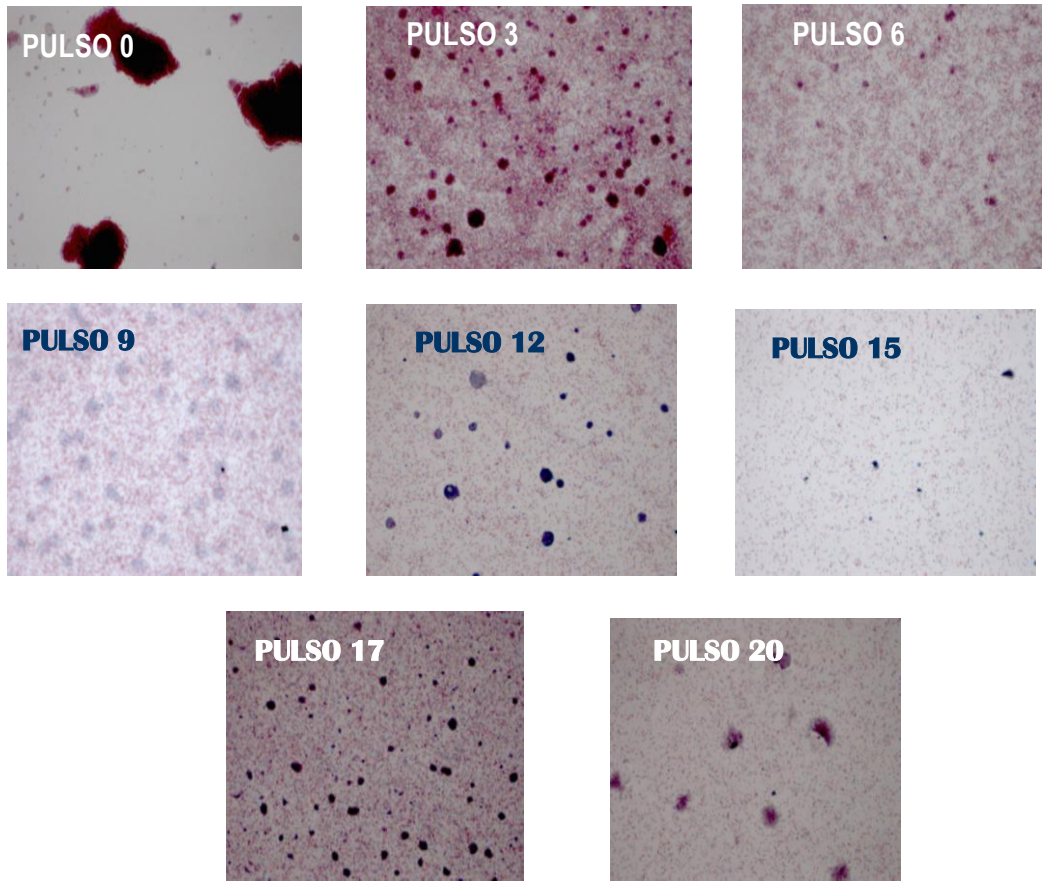


Figura 5. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* tipo II. Muestras de lisado celular obtenido a diferentes pulsos de sonicación y teñidas por Ziehl-Neelsen

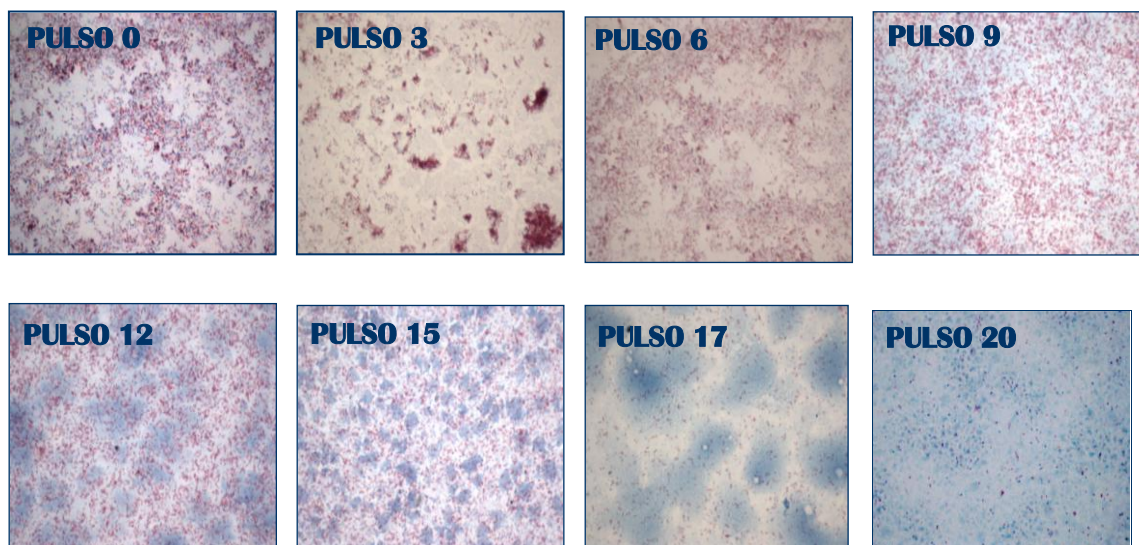


Figura 6. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de *M. peregrinum*. Muestras de lisado celular obtenido a diferentes pulsos de sonicación (0 a 20 pulsos) fueron teñidas por Ziehl-Neelsen.

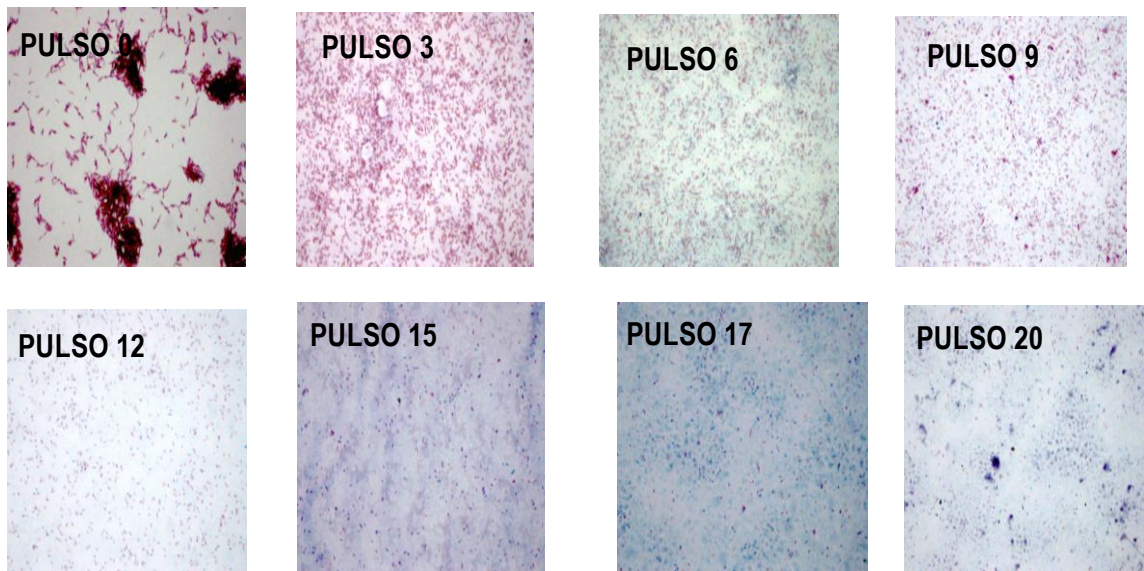


Figura 7. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de *M. avium*. Muestras de lisado celular obtenido a los 0, 3, 6 9 12, 15, 17 y 20 pulsos de sonicación fueron teñidas por la técnica Ziehl-Neelsen.

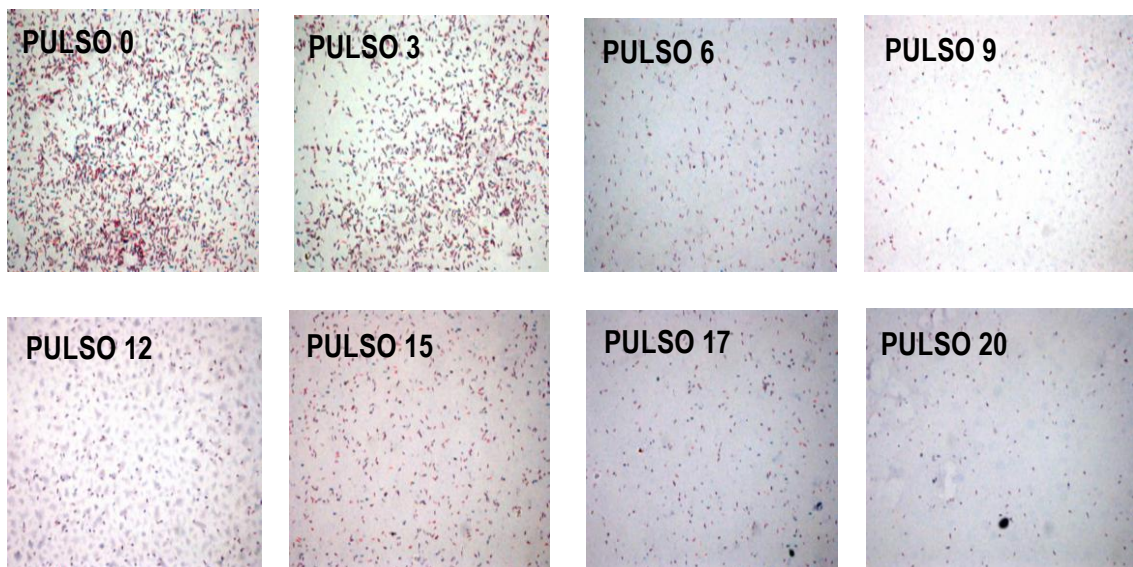


Figura 8. Estandarización de lisis por sonicación para la obtención de proteínas de extracto celular de *M. goodii*. Muestras de lisado celular obtenido a diferentes pulsos de sonicación (0-20 pulsos) fueron teñidas por Ziehl-Neelsen.

Para determinar si el número de pulsos aplicados no afectó la calidad de la proteína obtenida se realizó una electroforesis desnaturalizante en geles de 12.5% de acrilamida teñidos con plata. Las proteínas no fueron degradadas con el incremento en el número de pulsos, observándose bandas bien definidas en cada uno de los diferentes pulsos (figura 9).

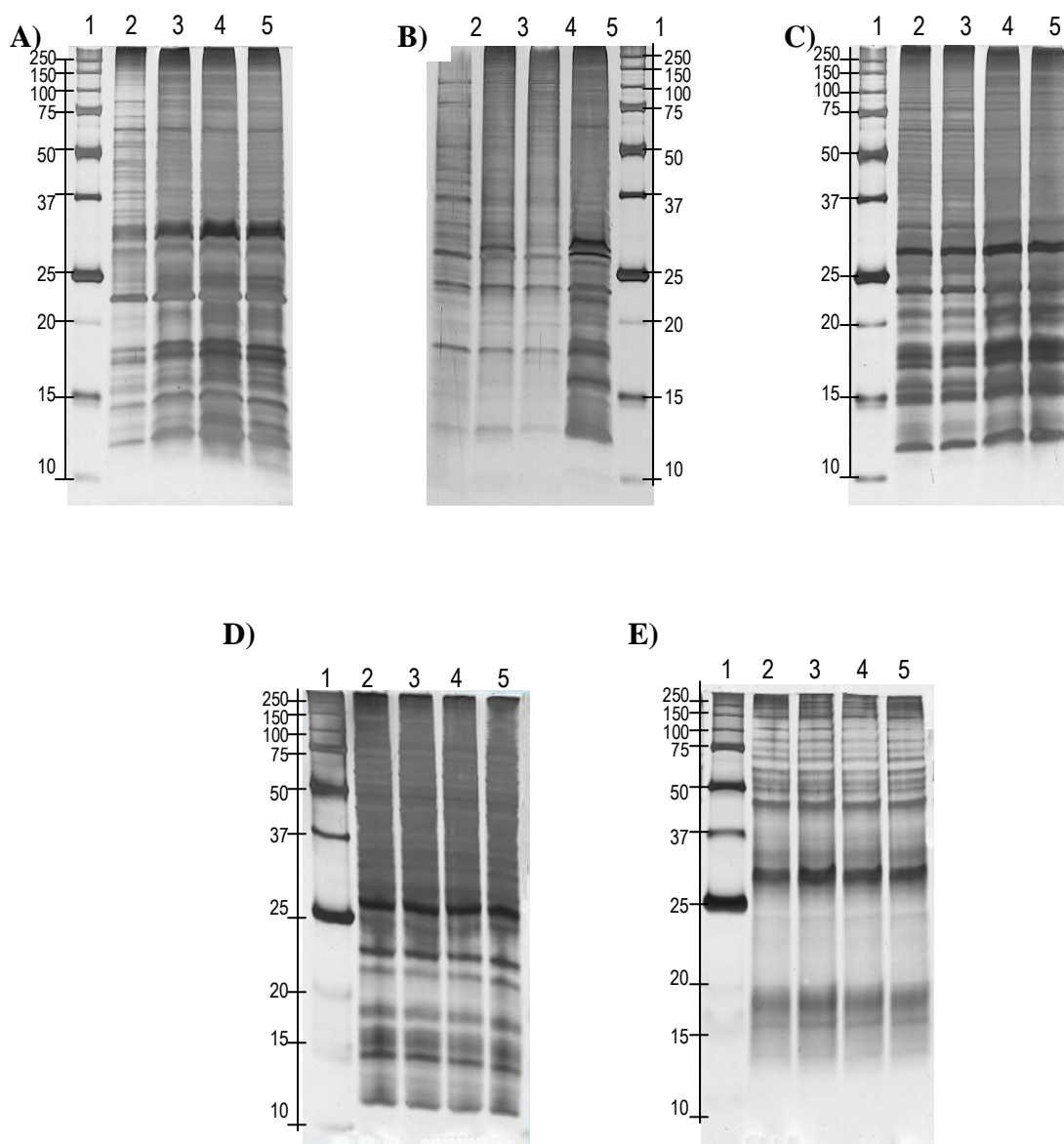


Figura 9. SDS-PAGE de los lisados obtenidos por sonicación de las diferentes MNT estudiadas. A) *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC 19530. B) *M. nonchromogenicum* tipo II. C) *M. peregrinum*. D) *M. avium*. E) *M. gordonae*. Las muestras se corrieron 1:1 con el buffer de corrida en gel de acrilamida al 12.5% y se tiñeron con plata (1) Marcador de peso molecular (2) 12 pulsos, (3) 15 pulsos, (4) 17 pulsos y (5) 20 pulsos.

De acuerdo a los resultados anteriores, se seleccionaron las siguientes condiciones de obtención de proteínas de extracto celular:

- *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC 19530 y *M. avium*: 17 pulsos. Un aumento en el número de pulsos no incrementa significativamente la concentración de proteína (Tabla 5, figura 9A y 9D).
- *M. peregrinum* y *M. nonchromogenicum* tipo II: 20 pulsos. Se obtiene una mayor concentración de proteína y no se observa degradación de las proteínas en estas condiciones. (Tabla 5, figura 9B y 9C).
- *M. gordonae*: 12 pulsos. La concentración de proteínas no se incrementa en los pulsos posteriores. (Figura 8 y 9E, tabla 5)

Las proteínas de extracto celular para los cultivos independientes de cada una de las especies de MNT fueron obtenidas con las condiciones establecidas anteriormente. La concentración de proteína extraída para cada uno de los cultivos de las distintas cepas de MNT fue mayor a 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y no hubo degradación de las proteínas durante el proceso de obtención. (Tabla 6 y anexo I)

Tabla 6. Cuantificación de proteínas de extracto celular obtenidas en los cultivos independientes.

Especie	Peso húmedo paquete celular (g)	Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	0.74 \pm 0.01	0.914 \pm 0.22
<i>M. gordonae</i>	0.83 \pm 0.02	0.735 \pm 0.09
<i>M. new</i>	0.69 \pm 0.02	1.55 \pm 0.20
<i>M. avium</i>	1.96 \pm 0.2	1.16 \pm 0.16
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I ATCC 19550	2.12 \pm 0.02	0.96 \pm 0.06

En la figura 10 se muestran los extractos celulares de cada una de las especies de MNT separadas y visualizadas en un mismo gel de acrilamida al 12.5%. Al comparar el patrón de proteínas se observa similitud entre *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC 19530 y *M. peregrinum* y *M. gordonae* y *M. avium*.

En los extractos celulares de *M. avium* y *M. gordonae* se observan bandas mejor definidas en comparación con los extractos celulares de *M. nonchromogenicum* tipo I y II y *M. peregrinum*, es decir, los extractos celulares obtenidos para estas dos cepas tienen una menor concentración de lípidos, carbohidratos y otros componentes celulares los cuales son considerados como contaminantes ya que disminuyen la resolución de las proteínas en los gels de dos dimensiones.

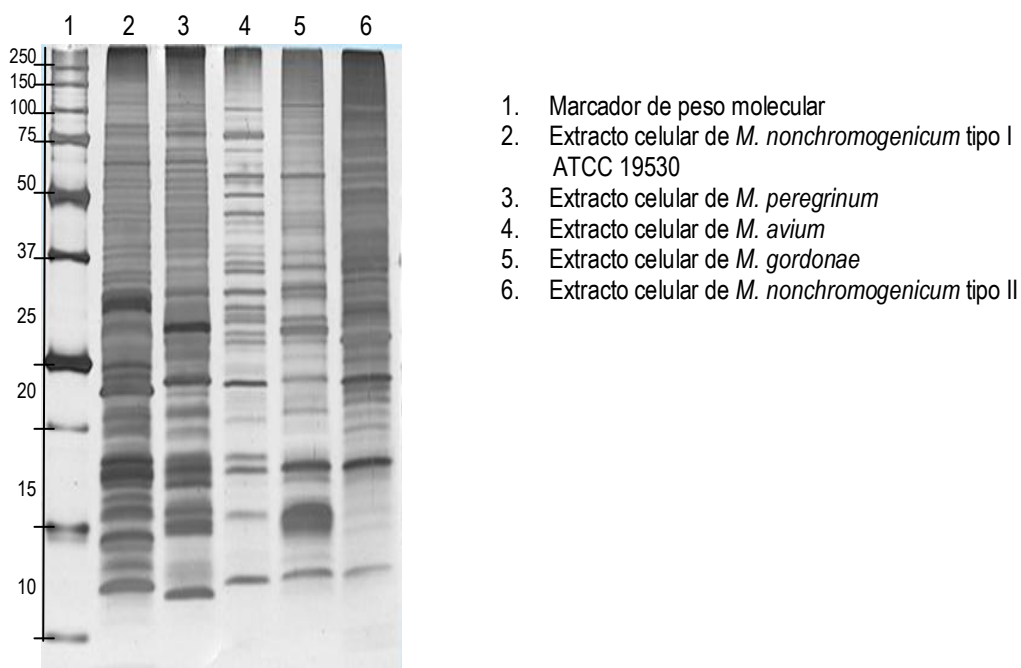


Figura 10. SDS-PAGE de proteínas de extracto celular obtenidos por sonicación de las diferentes MNT estudiadas. 5 µg de proteína de extracto celular fueron separados en un gel de acrilamida al 12.5% teñido con plata.

VI.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE DOS DIMENSIONES (2D-GE)

VI.5.1 Estandarización de las condiciones electroforéticas y de separación.

VI.5.1.1. Intervalo de pH

En el gel 2D de las proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC 19530 con intervalo de pH 3-10 se observa que, al igual que en otras especies de micobacterias, la mayoría de las proteínas se encuentran distribuidas en el intervalo de pH de 4-7 (figura 11), por lo cual se emplearon tiras IPG con ese intervalo de pH para elaborar los proteomas de las diferentes especies de MNT y así obtener una mejor separación de las proteínas.

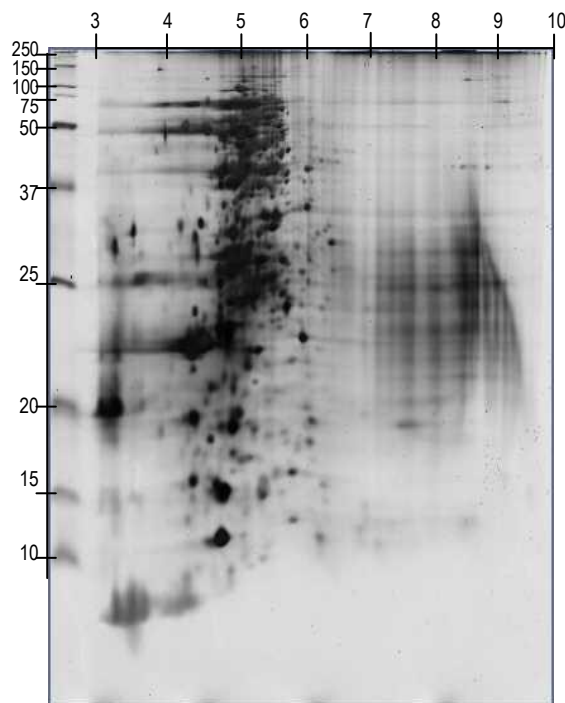


Figura 11. Estandarización de 2D-GE. Las proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* ATCC 19530 fueron separadas en geles bidimensionales con un intervalo de pH de 3-10 y teñidas con plata

VI.5.1.2. Cantidad de proteínas

Se realizaron inicialmente geles 2D con 100 μg de proteína de extracto celular, sin embargo, debido a la abundancia de las proteínas el área del punto se volvía irregular y su posición exacta dentro del gel era difícil de definir. Por lo tanto se disminuyó la cantidad de proteína en los geles a 80 μg mejorando la definición de los puntos sobre todo en el área de mayor peso molecular (figura 12).

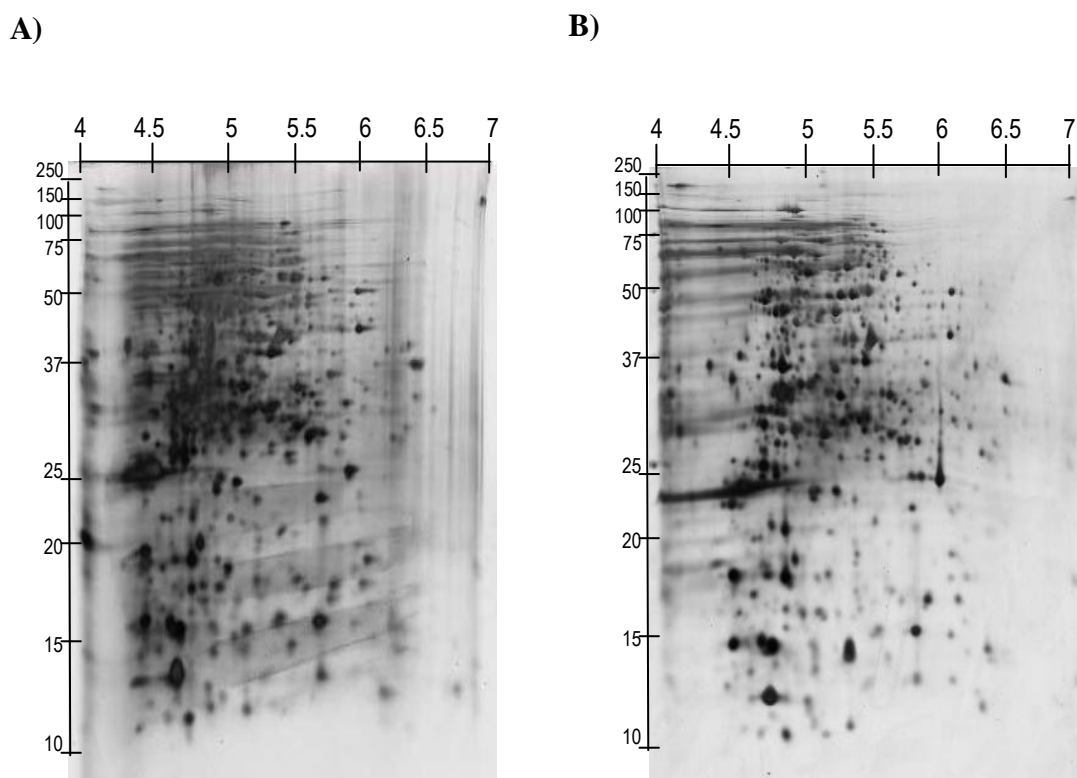


Figura 12. Estandarización de 2D-GE. Geles bidimensionales con un intervalo de pH de 4-7 teñidos con plata (A) 100 μg de proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* ATCC 19530 (B) 80 μg de proteínas de extracto celular de *M. nonchromogenicum* ATCC 19530

VI.5.1.3. ISOELECTROENFOQUE

El voltaje completo aplicado durante el IEF es definido en intervalos de volt-hora (Vh). Se requiere de cargas muy elevadas de Vh para que las proteínas sean isoelectroenfocadas y de cargas aún mayores cuando la muestra contiene proteínas de alta masa molecular o hidrofóbicas. Si el Vh aplicado es insuficiente no todos los puntos serán uniformemente distribuidos y se producirán barridos horizontales.

Para mejorar la resolución de los puntos en los geles de dos dimensiones elaborados se incrementó el tiempo de isoelectroenfoque. Se elaboraron al mismo tiempo dos geles 2D con 80 µg de proteínas de extracto celular de *M. peregrinum* cada uno y fueron trabajados al mismo tiempo bajo las mismas condiciones, con excepción del tiempo de isoelectroenfoque. A uno de los geles se le aplicó un voltaje de 500 V por 1Vh, 2000 V hasta 2499 Vh y 2500 V hasta completar un tiempo total de enfoque de 52 kVh (figura 13A) y en el segundo previo a estas condiciones se aplicaron voltajes bajos de 100V por 30 min, seguido de 30 min a 250 V y 500 V por 30 min (figura 13B).

Los resultados obtenidos con y sin la modificación anterior se muestran en la figura 13, al hacer la comparación visual se observan puntos más definidos y con distribución en toda el área del gel cuando se incrementa el tiempo de isoelectroenfoque.

Las condiciones establecidas para la elaboración de los geles: intervalo de pH, cantidad de proteínas y tiempo de isoelectroenfoque permitieron obtener un mapa proteico de 2D en el cual los puntos estaban bien definidos visualmente, no se encontraban sobrelapados, estaban bien distribuidos en todo el gel y disminución en el fondo de tinción y número de barridos.

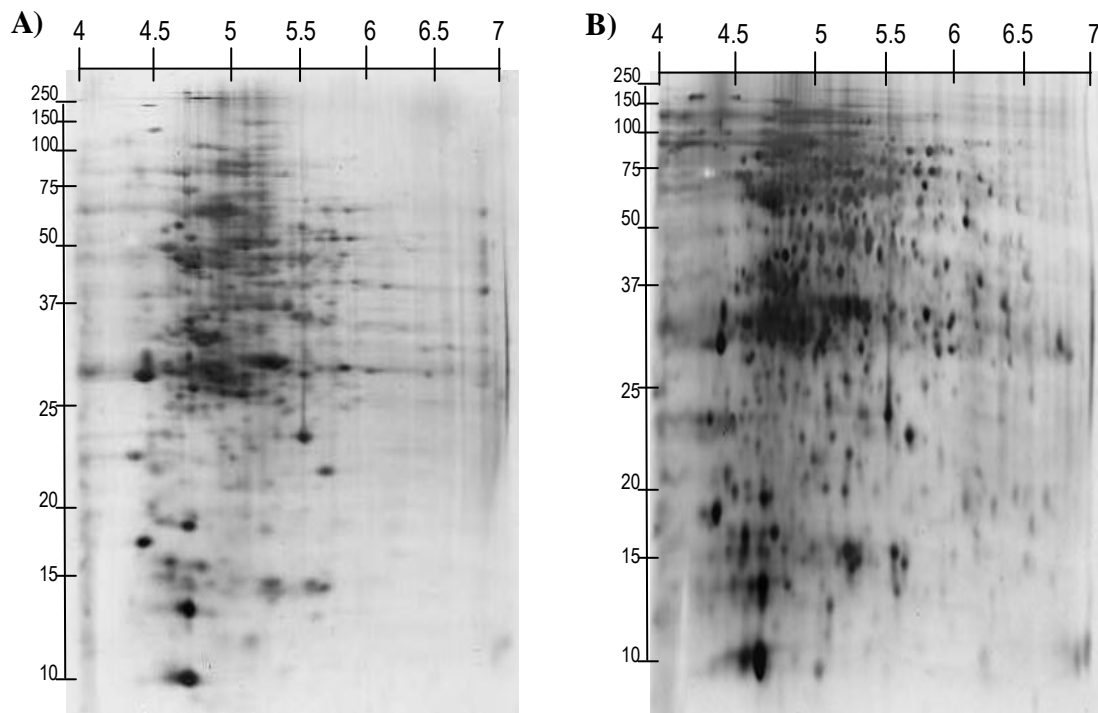


Figura 13. Estandarización de 2D-GE. 80 μ g de proteínas de extracto celular de *M. peregrinum* fueron separadas en ambos geles bidimensionales con un intervalo de pH de 4-7 y teñidos con plata. (A) Tiempo de isoelectroenfoco menor (B) Tiempo de isoelectroenfoco mayor

VI.5.2. Geles bidimensionales de las cepas de MNT estudiadas

Se realizaron dos geles bidimensionales de las cinco cepas de MNT con las condiciones estandarizadas, cada uno a partir de un cultivo independiente. Las proteínas de extracto celular separadas por electroforesis bidimensional en cada uno de los geles fueron utilizadas para la construcción de los geles maestros, los cuales contienen todas las proteínas detectadas en cada cultivo. En las figuras 14-18, se muestra cada uno de los geles individuales y el gel maestro construido a partir de estos. La distribución de las proteínas en los geles 2D y apariencia visual de estos para cada especie es similar.

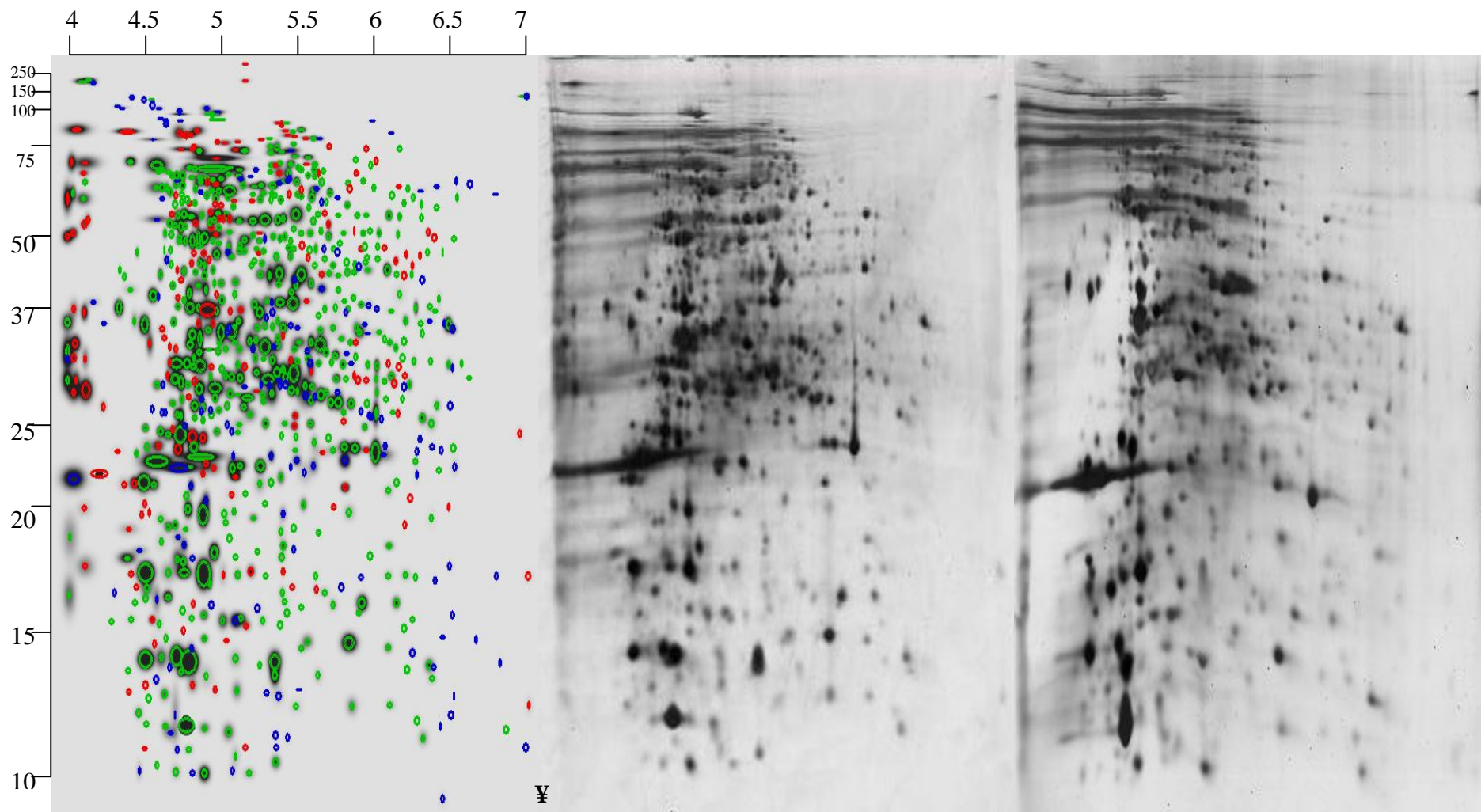


Figura 14. Construcción del gel maestro de *M. nonchromogenicum* tipo I a partir de los geles 2D de cultivos independientes. (¥) Gel maestro mostrando en verde las proteínas presentes en ambas réplicas, en azul y rojo los puntos detectados solo en uno de los geles.

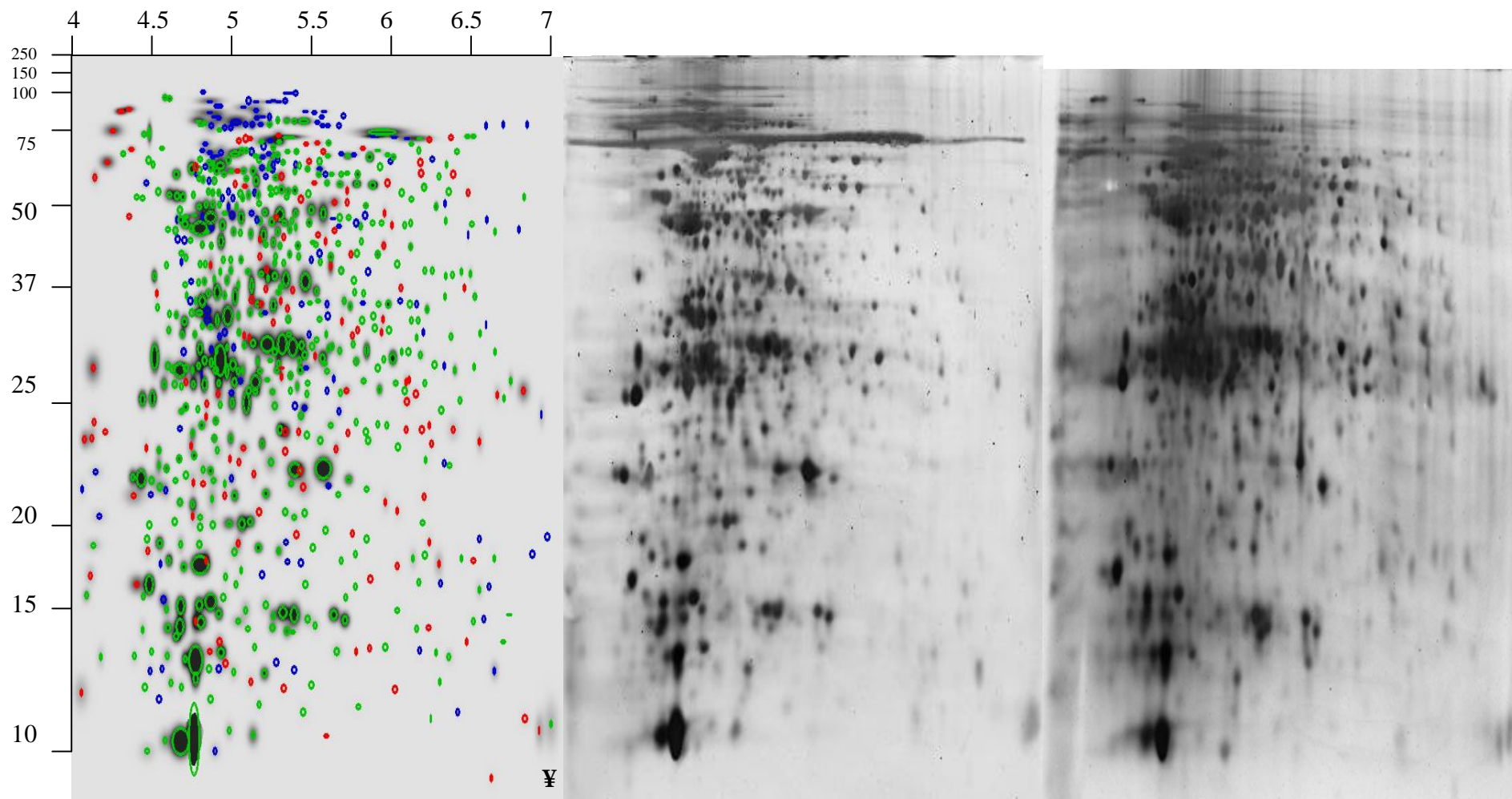


Figura 15. Construcción del gel maestro de *M. peregrinum* a partir de los geles 2D de cultivos independientes. (¥) Gel maestro mostrando en verde las proteínas presentes en ambas réplicas, en azul y rojo los puntos detectados solo en uno de los geles

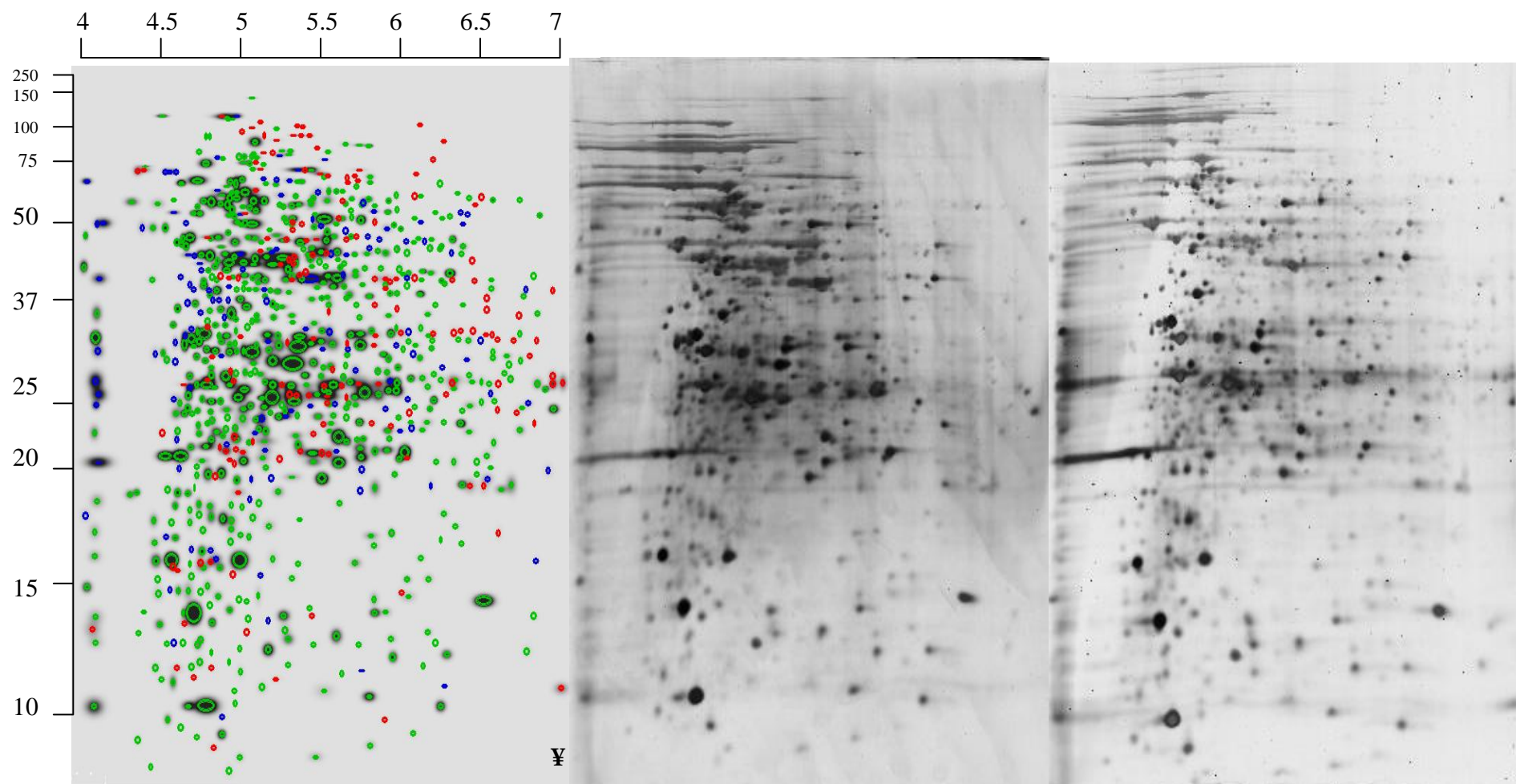


Figura 16. Construcción del gel maestro de *M. nonchromogenicum* tipo II a partir de los geles 2D de cultivos independientes. (¥) Gel maestro mostrando en verde las proteínas presentes en ambas réplicas, en azul y rojo los puntos detectados solo en uno de los geles.

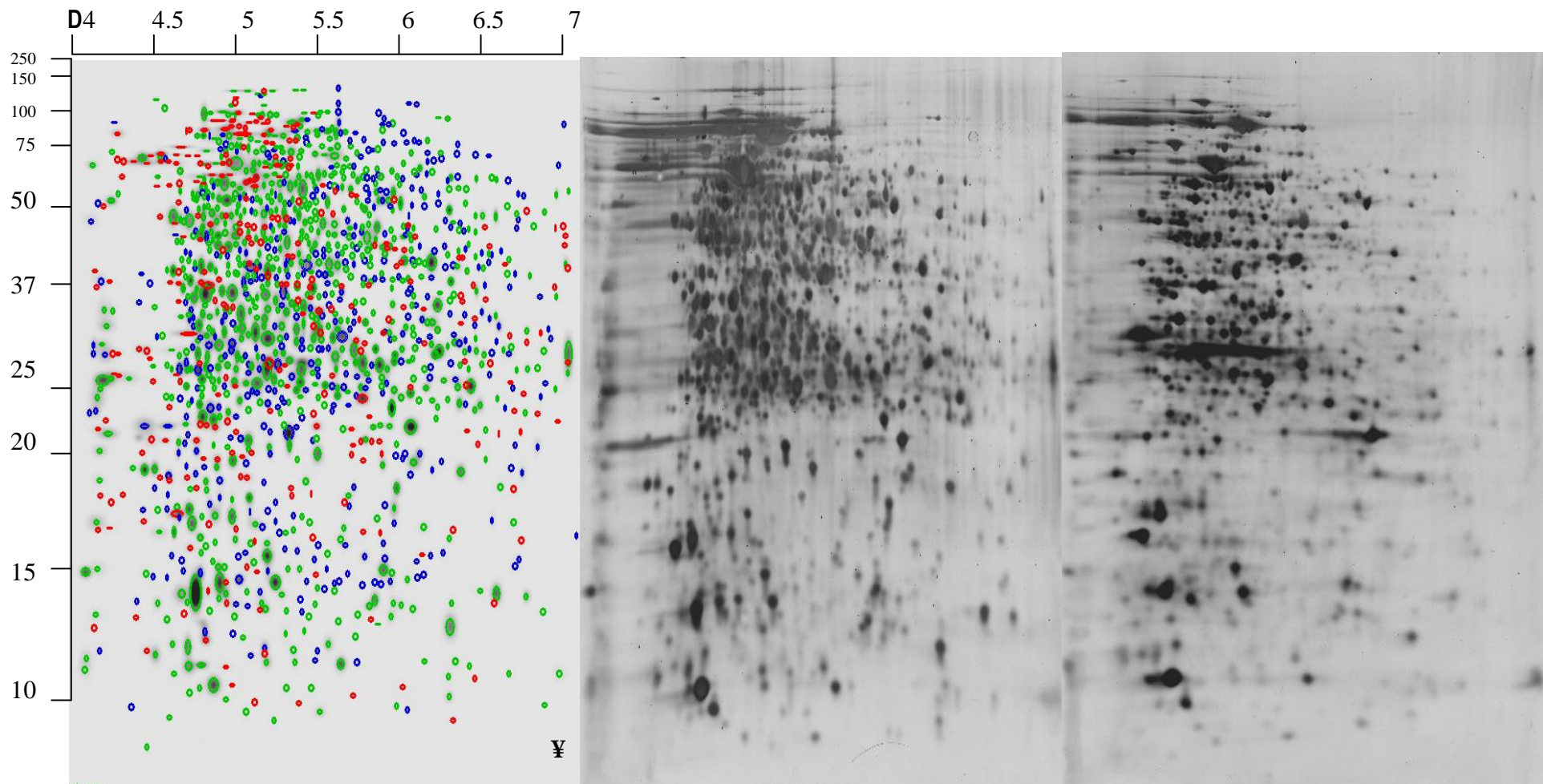


Figura 17. Construcción del gel maestro de *M. avium* a partir de los geles 2D de cultivos independientes. (¥) Gel maestro mostrando en verde las proteínas presentes en ambas réplicas, en azul y rojo los puntos detectados solo en uno de los geles.

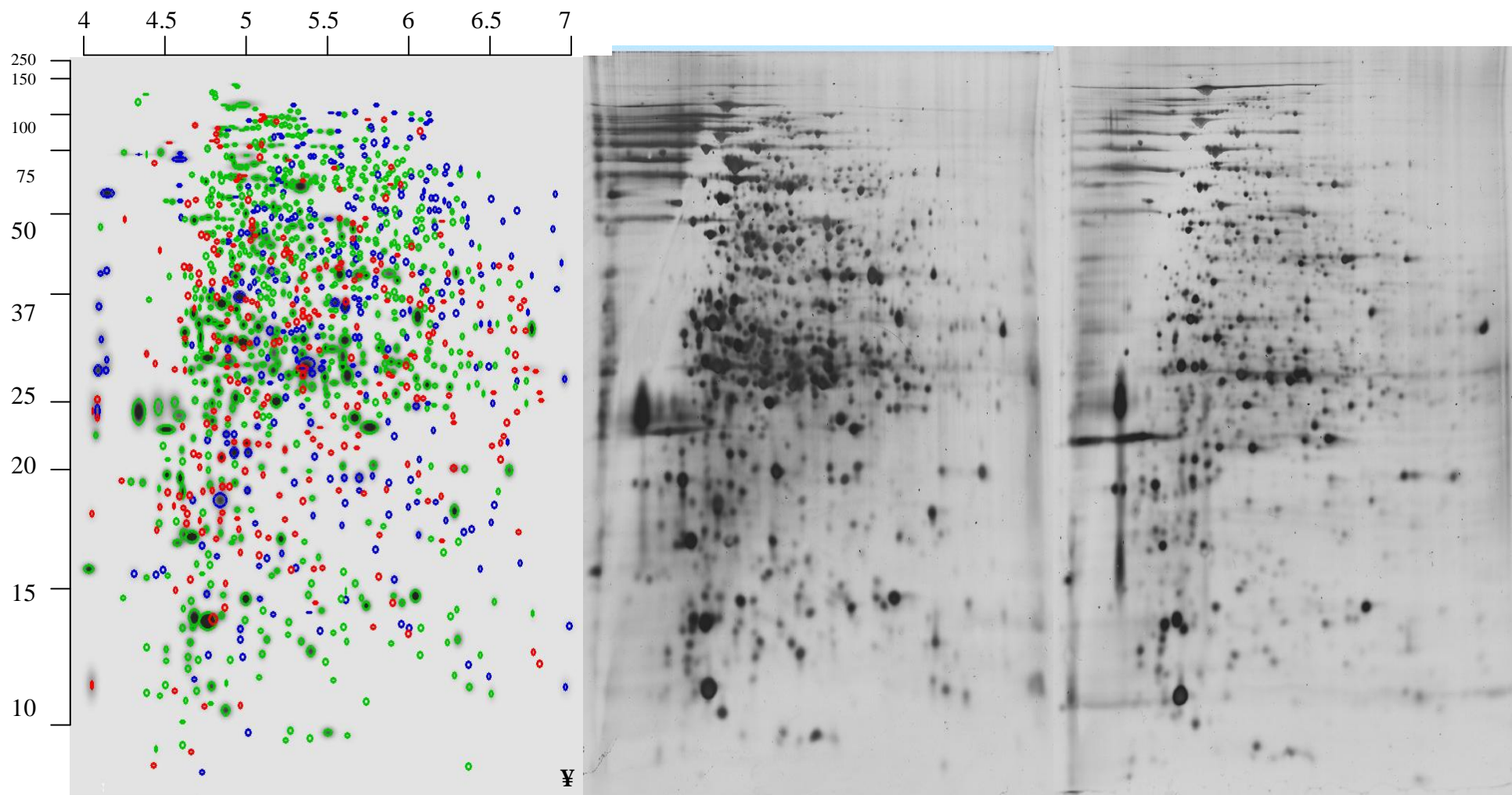


Figura 18. Construcción del gel maestro de *M. gordonae* a partir de los geles 2D de cultivos independientes. (Y) Gel maestro mostrando en verde las proteínas presentes en ambas réplicas, en azul y rojo los puntos detectados solo en uno de los geles.

VI.6. Análisis comparativo de los proteomas de las MNT estudiadas

Los geles fueron analizados con el programa PD Quest v.8.0. El número de puntos detectados en cada uno de los geles realizados a partir de un cultivo independiente se muestra en la siguiente tabla. Las imágenes de los geles obtenidos para cada cepa fueron normalizadas con el mismo programa para construir el gel maestro, este contiene las proteínas presentes en ambos geles y las que fueron detectadas solo en alguna de las réplicas. El número de puntos en el gel maestro se incrementa en un 13 a 22% con respecto al número de puntos detectados en cada una de las réplicas individuales (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de los geles de doble dimensión teñidos con plata mediante el programa PD-QUEST v8.0

No. puntos	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. avium</i>
Gel 1	735	807	667	987	1181
Gel 2	720	778	650	982	1092
Gel maestro	894	935	806	1264	1486
%CV*	5.5	0.07	0.2	0.02	0.01

* El grado de variación técnica entre réplicas fue determinado mediante el cálculo del coeficiente de variación a partir de los datos obtenidos en la normalización por número de pixeles totales.

Se determinó el punto isoeléctrico y la masa molecular de cada uno de los puntos detectados. La distribución de las proteínas fue similar para todas las cepas de MNT, encontrándose la mayoría entre 60-10 kDa y con un punto isoeléctrico de 4.5-6.0. (Gráfico 2 y 3).

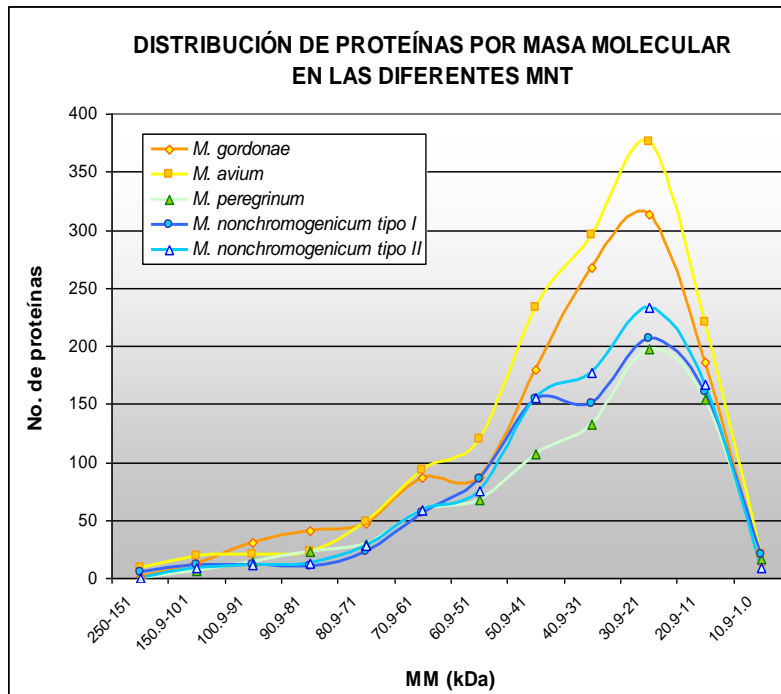


Gráfico 2. Distribución de las proteínas de extracto celular de las diferentes cepas de MNT por masa molecular

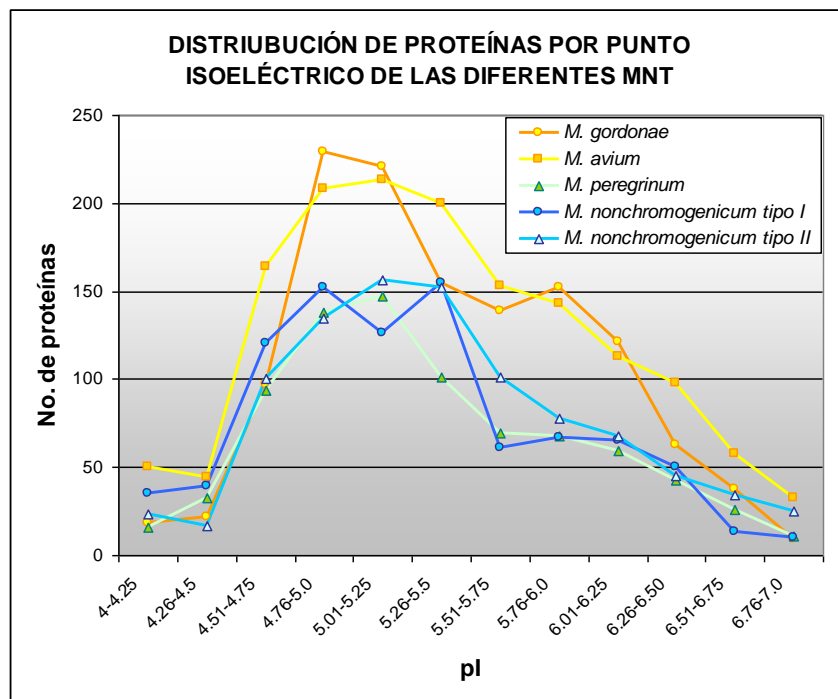


Gráfico 3. Distribución de las proteínas de extracto celular de las diferentes cepas de MNT por punto isoeléctrico

A partir de los geles maestros se realizó el análisis comparativo de las proteomas de extracto celular de las cinco especies. El perfil proteico de cada cepa de MNT fue comparado con el obtenido para cada una de las diferentes especies de MNT, la similitud en la expresión de proteínas de extracto celular de cada cepa bajo las condiciones utilizadas se muestra mediante el porcentaje de proteínas comunes entre las distintas especies de MNT (tabla 8).

Tabla 8. Análisis comparativo de los geles maestros de las diferentes especies de MNT.
Porcentaje de proteínas comunes entre cada una de las especies

Maestros	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	<i>M. gordonae</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. avium</i>
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	100	51.9	49.8	39.1	65.4
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	49.6	100	52.7	36.6	67.5
<i>M. gordonae</i>	35.2	39.0	100	32.6	64.0
<i>M. peregrinum</i>	43.4	42.4	51.1	100	69.1
<i>M. avium</i>	39.4	42.5	54.4	37.5	100

A partir de los geles maestros de cada cepa, se construyó un gel maestro que incluyera todas las proteínas que lograron ser resueltas bajo las condiciones utilizadas independientemente de la especie de MNT, generándose un gel con 2,452 proteínas. Al realizar el análisis, se encontró que 141 proteínas estaban presentes en todas las especies, compartiendo el mismo punto isoeléctrico y masa molecular (figura 19). En la tabla 9 se presenta para cada especie el número de proteínas que fueron detectadas como únicas y el número de proteínas comunes en al menos dos de las especies de MNT estudiadas (figura 20).

Tabla 9. Proteínas únicas y comunes en las diferentes MNT.

MAESTROS	PROTEÍNAS COMUNES	PROTEÍNAS ÚNICAS
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo I	701 (81%)	166 (19%)
<i>M. nonchromogenicum</i> tipo II	723 (81%)	171 (19%)
<i>M. gordonae</i>	963 (76%)	301 (24%)
<i>M. peregrinum</i>	671 (83%)	135 (17)
<i>M. avium</i>	1231 (83%)	255 (17%)
Presentes en las cinco especies	141	

VI.7. Identificación de proteínas

Nueve proteínas de extracto celular detectadas como comunes a todas las cepas de MNT estudiadas y de 4-6 proteínas únicas para cada especie fueron identificadas por espectrometría de masas (figura 20). Los puntos seleccionados se encontraban distribuidos en toda el área del gel con una posición localizada permitiendo realizar la identificación de solo una proteína y no una mezcla.

Cada uno de los péptidos secuenciados se comparó no solo con la base de datos reportada para el complejo *M. tuberculosis* y de proteínas secuencias de otras micobacterias, sino también con la base de datos del reino *Eubacteria*, ya que en algunas proteínas no se encontró similitud entre la secuencia de sus péptidos con las secuencias reportadas para las proteínas del género *Mycobacterium*.

La identificación de las proteínas de extracto celular de las distintas cepas de MNT se muestra en la tabla 10. Algunas proteínas seleccionadas no pudieron ser identificadas debido a que no se encontraban en cantidad suficiente para ser secuenciadas y en dos de las proteínas comunes más de una proteína fue identificada (anexo 2)

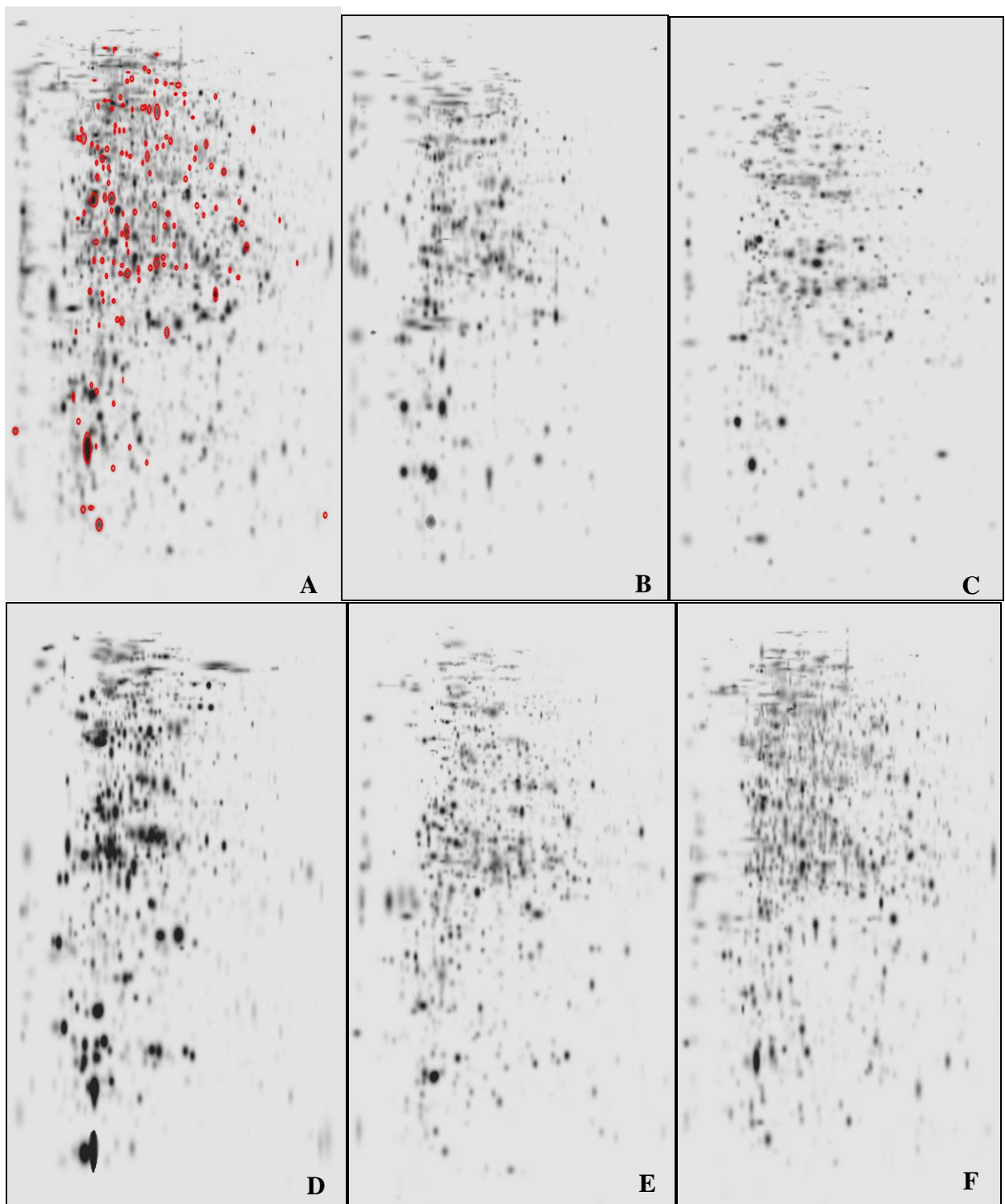


Figura 19. Análisis comparativo de los proteomas de las diferentes especies de MNT. A) Gel maestro construido a partir de todas las proteínas de extracto celular de las diferentes especies de MNT mostrando las proteínas detectadas en todas las cepas. Geles maestros utilizados en el análisis B) *M. nonchromogenicum* tipo I B) *M. nonchromogenicum* tipo II C) *M. peregrinum* D) *M. gordonae* E) *M. avium*.

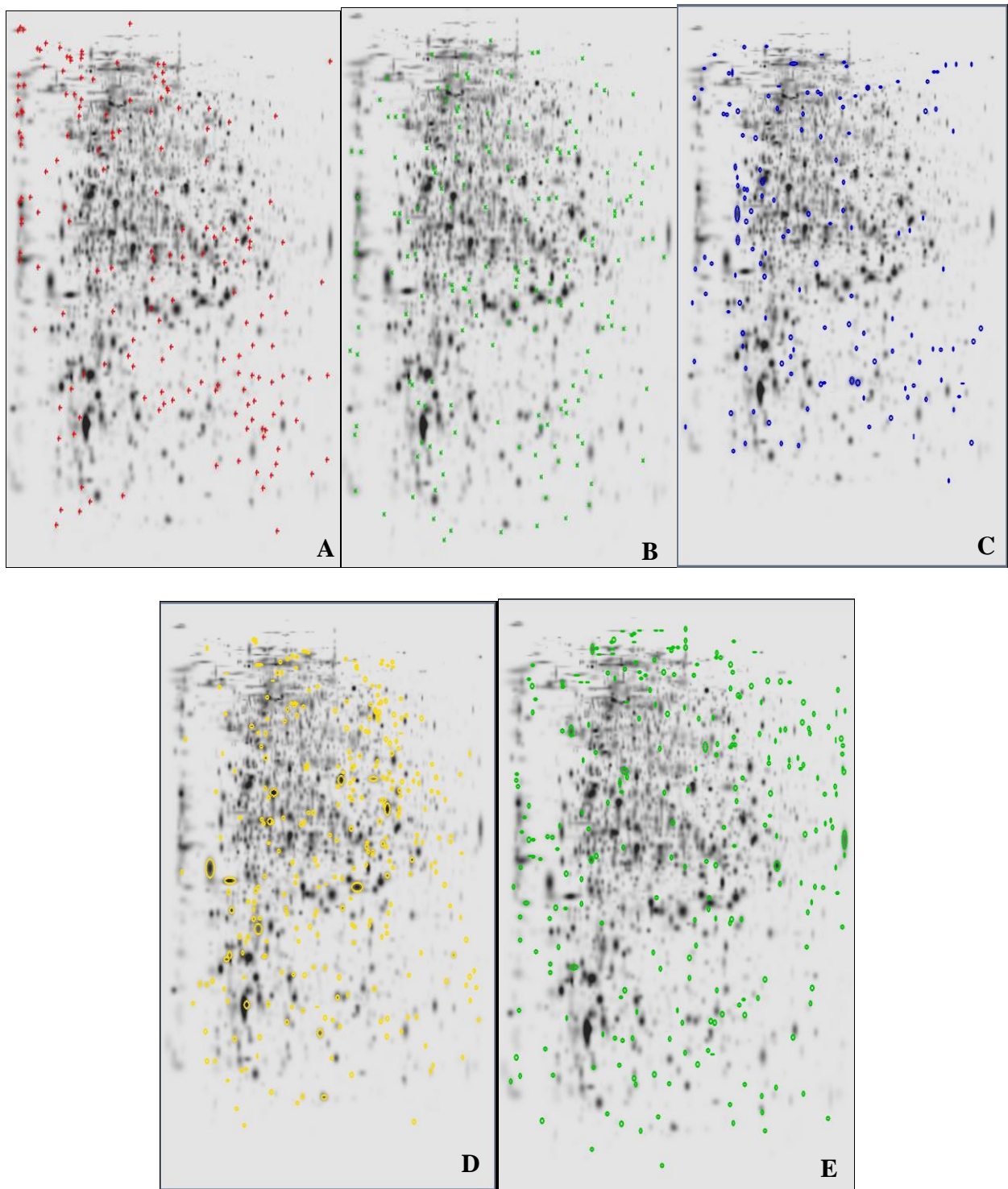


Figura 20. Análisis comparativo de los proteomas de las diferentes especies de MNT. Gel maestro construido a partir de todas las proteínas de extracto celular de las diferentes especies de MNT mostrando las proteínas detectadas como únicas para A) *M. nonchromogenicum* tipo I B) *M. nonchromogenicum* tipo II C) *M. peregrinum* D) *M. gordonae* E) *M. avium*. Las flechas indican las proteínas que fueron seleccionadas para su identificación.

TABLA 10. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE EXTRACTO CELULAR DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE MNT

Punto	Identidad de la proteína	Función	pI	MM	Microorganismo de referencia para identificación
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. nonchromogenicum</i> tipo I					
z-2	Deoxyuridin 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa	Participa en la biosíntesis de timidilato catalizando la formación de dUMP, el precursor inmediato de los nucleótidos de timidina. Actividad catalítica: dUTP + H(2)O= dUMP + Pirofosfato	5.4	18.5	M. gilvum, M. tuberculosis H37Rv M. bovis
z-3	Proteína hipotética Rv0130	Desconocida	5.9	15.8	M. tuberculosis H37Rv, M. bovis
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. nonchromogenicum</i> tipo II					
y-3	Cadena A, estructura y función de Rv0130	Proteína hipotética conservada	5.8	15	<i>M. tuberculosis</i> complex
Y-4	KatG Catalasa peroxidasa	Pertenece al subgrupo de peroxidasas hemo-dependientes que catalizan una reacción oxidativa de pasos múltiples en la que el aceptor de electrones es peróxido de hidrógeno, pudiera participar en la supervivencia intracelular de la micobacteria dentro de los macrófagos. Actividad catalítica: H ₂ O ₂ = O ₂ + 2H ₂ O	5.7	87.3	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. peregrinum</i>					
N-3	Lectina de unión a Manosa		4.5	29	<i>M. smegmatis</i>
N-4	Inositol 5-monofosfato deshidrogenasa	Cataliza la oxidación NAD-dependiente de inosina 5'-monofosfato (IMP) a xantosa 5-monofosfato	5.9	64.3	<i>M. vanbaalenii</i>
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. gordonae</i>					
G-1	Probable proteína de choque frío CSPA	Posiblemente involucrada en el proceso de aclimatación al frío. La producción de la proteína es predominante inducida por las bajas temperaturas	5.5	10.5	M tuberculosis H3Rv.
G-2	Probable precursor de lectina específica de manosa	Tiene un dominio de lisina encontrado en una variedad de enzimas involucradas en la degradación de la pared bacteriana. Este dominio puede tener una función de unión general a peptidoglicano	4.4	25.4	M. abscessus
G-3	Superóxido dismutasa	Cataliza la conversión de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno	5.8	24.5	M. gordonae, (M. asiaticum, M.

		molecular.			tuberculosis H37Rv, M. bovis, M. leprae, M. ulcerans Agy99)
G-4	Malato deshidrogenasa	Involucrada en la conversión de malato a oxaloacetato [Actividad catalítica: (S)-malato + NAD ⁺ = oxaloacetato + NADH].	5.0	36.1	M. marinum M. leprae
G-5	Proteína tipo luciferasa	Producción y conversión de energía. Cataliza la reducción de N5, N10-metilenetetrahidrometanopterina con coenzima F420 reducida a N5-metiltetrahidrometanopterina y coenzima F420 oxidada	5.6	39.3	Mycobacterium sp.
G-5	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa F420-dependiente	Cataliza la oxidación de Glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona usando coenzima F420 (un derivado de 6-hidroxi-5-deazaflavina) como aceptor de electrones.	5.6	39.3	M. avium (M. ulcerans, M. marinum, M. chelonae, un péptido es compartido con M. tuberculosis)
G-6	Proteína hipotética SKA58_12772	Predicha como fosfohidrolasa de función general	6.1	34	Sphingomonas sp. SKA58
PROTEÍNAS COMUNES					
G-A	Subunidad beta de la RNA polimerasa	La RNA polimerasa cataliza la polimerización de RNA dependiente de DNA. Cataliza la transcripción de DNA en RNA usando cuatro ribonucleótidos trifosfatos como sustrato Actividad catalítica: nucleósido trifosfato = N difosfato + RNA(N)	4.9	11	M. tuberculosis
G-B	Proteína ribosomal 50S L7/L12 RPLL (SA1)	Involucrada en los mecanismos de traducción, es el sitio de unión para varios de los factores involucrados en la síntesis de proteínas y parece ser esencial para la traducción exacta.	4.85	14	Mycobacterium sp. (M. smegmatis, M. vanbaalenii)
G-C	Adenilato cinasa	Cataliza la transferencia reversible de fosfato a partir de ATP a AMP y ADP. Esta pequeña enzima ubiquitina es esencial en el metabolismo intracelular de nucleótidos. Además actúa como una nucleósido mono y di-fosfato cinasa sugiriendo que esta puede tener un papel en la biosíntesis de RNA Y DNA [Actividad catalítica: ATP + AMP = ADP + ADP].	5.0	24.5	M. leprae (M. avium subsp paratuberculosis, M. smegmatis, M. ulcerans, M. abscessus)
G-D	SDR deshidrogenasa/reductasa de cadena corta	Función desconocida; supuestamente involucrada en el metabolismo celular.	5.9	25	Mycobacterium sp (M. smegmatis, M. vanbaalenii, M. gilvum)
N-E	Diguanilato ciclasa	--	6.0	37	Pseudoalteromonas atlantica
G-F	Proteína hipotética conservada WAG 31	Proteína de inicio de la división celular, función desconocida	4.75	37	M. tuberculosis H37Rv (M. Vanbaalenii, M. Gilvum, M. smegmatis) M. avium subsp. Paratuberculosis K-10 (M. avium 104, M. ulcerans Agy99)

G-F	Proteína hipotética Rv3075c	Citrato liasa subunidad beta. Interconversión de citrato a acetato y oxaloacetato. [Actividad catalítica: Citrato = Acetato + Oxaloacetato].	4.75	37	M. tuberculosis H37Rv (M. bovis, M. ulcerans, M. marinum)
Z-H	Probable aldehído deshidrogenasa	Esta deshidrogenasa actúa sobre aldehídos. usando NADP como cofactor. Actividad catalítica: Aldehído + NAD ⁺ + H ₂ O = Acido + NADH].	5.3	55	M. tuberculosis (M. bovis, M. leprae)
Z-I	Fosfopiruvato hidratasa	Enolasa que cataliza la deshidratación reversible del 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato como parte de la vía glucolítica y gluconeogénica. La reacción es facilitada por la presencia de iones metálicos. Actividad catalítica: 2-fosfo-D-glicerato = fosfoenolpiruvato + H ₂ O	4.8	45	M. bovis AF2122/97
Z-I	Dna N (DNA nucleotidil transferasa) DNA polimerasa III (cadena beta)	La DNA polimerasa III es un complejo enzimático responsable de la mayoría de la síntesis replicativa en las bacterias, exhibe actividad exonucleasa 3' a 5' y es requerida para la iniciación de la replicación. Una vez sujeta al DNA, se desliza libremente (bidireccional y ATP-independiente) a lo largo del DNA duplex. Actividad catalítica: deoxinucleósido trifosfato = N difosfato + {DNA}N].	4.8	45	<i>M. tuberculosis</i>

VII. DISCUSIÓN

El grupo de micobacterias denominado como micobacterias no tuberculosas (MNT) [9] comprende a las más de 100 especies de micobacterias que se encuentran distribuidas en el ambiente [10,15]. Aunque la mayoría de ellas son saprófitas, algunas especies son patógenos oportunistas causantes de patología en humanos o animales, siendo de mayor importancia clínica en la población inmunocomprometida y en los países desarrollados [6, 12, 13, 16, 17, 25]. A pesar de ello, la principal razón del estudio de las MNT es que son consideradas como una de las posibles causas en la variación de la eficacia protectora de la única vacuna disponible contra la tuberculosis, la vacuna *M. bovis* BCG.

La exposición a MNT es un evento frecuente a nivel mundial sobretodo en países en vías de desarrollo donde la vacuna confiere niveles bajos de protección contra la enfermedad [33, 34, 40, 41]. Se ha propuesto que, la previa sensibilización con MNT ocasiona interferencia en la respuesta inmune desarrollada por la vacuna debido a la reacción cruzada que presentan antígenos de MNT con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* [4, 8, 39].

Actualmente se desconoce la frecuencia y distribución de las MNT en el mundo. En algunos países como Estados Unidos [13], Francia [26], Finlandia [27], India [28], sur de África [30] y Korea [49], se han realizado estudios de aislamiento de MNT en los sistemas de distribución de agua para uso y consumo humano, en casi todos ellos al menos una tercera parte de los aislamientos no pudo ser identificada y la mayoría de las especies corresponden a especies saprófitas o consideradas como oportunistas menores (algunos sitios de Estados Unidos, París y la India fueron recuperadas especies potencialmente patógenas como *M. kansasii* y miembros del complejo MAIS, siendo este último el más frecuente en la India).

Aún más, la exposición a micobacterias ambientales también es responsable del escaso valor predictivo de la prueba de hipersensibilidad retardada al PPD [1, 41]. Una de las mayores limitaciones del PPD es el hecho de que es una mezcla cruda de varios antígenos, muchos de los cuales son compartidos entre las diferentes especies de micobacterias. Por lo que el interés en la búsqueda de antígenos inmunodominantes únicos de *M. tuberculosis* para el desarrollo de nuevas vacunas o candidatos a pruebas de inmunodiagnóstico se ha incrementado. Con este fin, en este estudio se realizó un análisis comparativo de los proteomas de las especies frecuentemente aisladas en el agua de uso y consumo humano de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

En la zona metropolitana de la Ciudad de México, las especies de MNT recuperadas en muestras de agua para uso y consumo humano fueron *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum* tipo II, *M. nonchromogenicum* tipo I y *M. gordonae*, siendo esta última una de las especies más frecuentemente aislada en la mayoría de los estudios de aislamiento de MNT realizados.

Se consideraron inicialmente 6 aislamientos de MNT para este estudio, un aislamiento control que corresponde a una cepa ATCC identificada como *M. nonchromogenicum* tipo I, los cuatro aislamientos recuperados de agua para uso y consumo humano identificados como *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum* tipo I y tipo II, *M. gordonae*; y una cepa identificada como *M. avium* aislada de agua de los Canales de Xochimilco.

Para la elaboración de los proteomas se utilizó un medio de cultivo pobre libre de proteínas conocido como Sauton, el cual tiene como única fuente de carbono el glicerol. Las micobacterias se conocen como microorganismos “fastidiosos” debido a que son de difícil

recuperación, necesitan de medios sumamente enriquecidos para su crecimiento en ocasiones hasta de ciertos suplementos adicionales y crecen significativamente más lento que otras bacterias [10,50]. El tipo de medio de cultivo utilizado para crecer las cepas de MNT incluidas en este estudio, prolongó el tiempo necesario para la obtención de los cultivos, tomando meses determinar las condiciones óptimas de crecimiento (precultivos en medios enriquecidos, inóculo, volumen de medio) y obtención de los cultivos para la elaboración de los proteomas. Uno de los aislamientos seleccionados para este estudio, proveniente de agua para uso y consumo humano, *M. nonchromogenicum* tipo I, no pudo obtenerse en la suficiente cantidad para realizar el proteoma (después de 6 meses su D.O. fue de 0.215 en 50 mL de medio Sauton), por lo que se decidió excluir esta cepa del estudio y considerar a la cepa *M. nonchromogenicum* tipo I ATCC dentro del análisis y no solo utilizarla como control.

Se ha reportado que las micobacterias son capaces de secretar y expresar antígenos inmunodominantes cuando se encuentran en una etapa metabólicamente activa, debido a esto, se realizaron curvas de crecimiento para cada una de las cepas de MNT estudiadas y se determinó la fase media logarítmica [50-52]. En esta etapa los cultivos fueron cosechados, asegurando así que estos estuvieran conformados por bacilos vivos y con una expresión activa de proteínas. Aún cuando la densidad óptica (λ_{600nm}) de los cultivos en esta fase fue variable entre las diferentes micobacterias, desde 1.4 hasta 0.75, las unidades formadoras de colonia para todas las cepas con excepción de *M. gordonae* (10^6 UFC/mL), fueron del orden de 10^7 , lo cual indica que todas las cepas se encontraban en condiciones similares de crecimiento al tiempo de cosecha y por lo tanto las poblaciones celulares obtenidas fueron más homogéneas. (Tabla 3, Gráfico 1)

Una vez obtenidos los cultivos independientes, las bacterias fueron lisadas por sonicación para obtener las proteínas de extracto celular. El número de pulsos aplicados necesario para la lisis y obtención de proteínas fue distinto dependiendo de las características de la pared celular de la cepa y de la facilidad con que esta forma agregados, por ejemplo, mientras que para *M. gordonae* doce pulsos fueron suficientes para la extracción de las proteínas para *M. nonchromogenicum* tipo II fue necesario aplicar 8 pulsos más. La disminución de agregados y la pérdida de integridad de la pared bacteriana se observó en las preparaciones tomadas durante la aplicación de cada uno de los pulsos (Figura 4-8).

Las proteínas de extracto celular de cada una de las cepas fueron separadas por electroforesis bidimensional. El número de proteínas resueltas en estos geles fue mayor para *M. avium* con 1,486 proteínas seguida de *M. gordonae* con 1,264, en el caso de *M. peregrinum*, *M. nonchromogenicum* tipo II y *M. nonchromogenicum* tipo I el número de proteínas obtenidas fue similar encontrándose entre 800 y 900 proteínas.

La distribución de las proteínas de extracto celular por masa molecular y punto isoeléctrico fue similar en las cinco cepas de MNT. La mayoría de las proteínas se encuentran en un intervalo de 60-10 kDa y con un punto isoeléctrico de 4.5-6.0 (Gráfico 2 y 3), estos resultados concuerdan con los obtenidos por Urquhart y col. [32] en donde los perfiles proteicos de lisados de *M. tuberculosis* obtenidos en geles de dos dimensiones con intervalo de pH 2.3-11 y masa molecular de 5 a 200 kDa muestran la misma distribución de proteínas obtenidas en las cepas de MNT, esta distribución corresponde con la predicha por la secuencia genómica de *M. tuberculosis*.

Los perfiles proteicos obtenidos para cada una de las cepas de MNT fueron comparados. En *M. avium* el mayor porcentaje de proteínas comunes obtenido se encontró con *M. gordonae* (54.4%), seguido de *M. nonchromogenicum* tipo II (42.5%), *M. nonchromogenicum* tipo I (39.4%) y, con el menor porcentaje *M. peregrinum* (37.5%). Este mismo comportamiento se observa para *M. gordonae*. Estas dos especies, *M. avium* y *M. gordonae*, se consideran dentro del grupo II de acuerdo a la clasificación de Runyon, son micobacterias de crecimiento lento y formadoras de pigmento en presencia o ausencia de luz. En el caso *M. nonchromogenicum* tipo I, fue mayor la similitud en sus proteínas con *M. nonchromogenicum* tipo II (exceptuando *M. avium*) que con cualquiera de las otras especies, lo cual era de esperarse ya que se trata de la misma especie aunque se clasifica de un subtipo diferente debido a que muestra un patrón electroforético distinto del gen *hsp 65*. Probablemente esta diferencia explique por qué *M. nonchromogenicum* tipo II mostró mayor similitud con *M. gordonae* que con *M. nonchromogenicum* tipo I. *M. peregrinum* es la única especie de rápido crecimiento incluida en el estudio, la similitud en su perfil proteico encontrada con respecto a las otras especies fue la misma. (Tabla 8)

Los resultados obtenidos se relacionan con la cercanía filogénica de las cepas encontrada de acuerdo a un árbol filogenético construido por el método de distancia Neighbour-joining (NJ) con la secuencia del gen *hsp 65* utilizando un alineamiento de 399 nucleótidos (133 aminoácidos) y el modelo evolutivo Tamura-Nei con soporte estadístico de 1000 bootstraps. De acuerdo a esta construcción, los aislamientos pueden ser separados en dos grupos: en uno *M. avium* y *M. gordonae* y en otro *M. nonchromogenicum* tipo I, *M. nonchromogenicum* tipo II y *M. peregrinum*, siendo más cercanas las dos primeras. *M. nonchromogenicum* tipo II se encuentra entre *M. nonchromogenicum* tipo I y *M. peregrinum*.

Al comparar los patrones proteicos obtenidos en los geles de dos dimensiones de las diferentes cepas de MNT estudiadas obtenidos bajo las mismas condiciones, se encontró que el 80% de las proteínas son de expresión común, el 17-24% de las proteínas restantes no fueron encontradas en ninguna otra especie de MNT estudiada (Tabla 9). Se seleccionaron algunas proteínas de expresión común y de expresión única de cada una de las especies de MNT estudiadas.

Las proteínas secuenciadas encontradas como únicas están involucradas principalmente en metabolismo, perteneciendo a esta categoría deoxyuridin 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa, la proteína hipotética Rv0130, inositol 5-monofosfato deshidrogenada, malato deshidrogenada y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa F420-dependiente, anhidrasas carbónicas, GTPasa EngC S-adenosil-L-homocistein hidrolasa. Estas proteínas han sido descritas por Sassetti y col. [53] como proteínas necesarias para el crecimiento del género *Mycobacterium*, lo cual las hace buenos candidatos para el desarrollo de agentes antimicobacterianos. Aunque actualmente se cuenta con un tratamiento efectivo contra la tuberculosis, este requiere de varios fármacos y meses de terapia lo cual dificulta el cumplimiento de dicho tratamiento por parte de los pacientes, y esto resulta en un control poco efectivo de la enfermedad. De las proteínas restantes, tres de las proteínas están asociadas a virulencia, la proteína katG (catalasa/peroxidasa), la superóxido dismutasa y la proteína de choque frío CSPa y cuatro aún no se ha reportado una función conocida: la proteína hipotética MAP330 9c, lectina de unión a manosa, proteína tipo luciferasa, proteína hipotética SKA 58_12772 (secuencia de la proteína similar encontrada únicamente en *Sphingomonas* sp.). (Figura 19, tabla 10)

Para evaluar el potencial de las proteínas únicas como posibles candidatos a reactivos de diagnóstico, debe determinarse la presencia de estas proteínas en otras especies de

micobacterias u otras especies que no fueron incluidas en este estudio. La mayoría de las proteínas identificadas participan en el metabolismo celular, vías que son consideradas como universales y conservadas en diferentes organismos y microorganismos, sin embargo, la estructura de la proteína no es idéntica y su relevancia no es la misma entre los diferentes organismos [32, 53], por lo que su potencial como blancos terapéuticos o reactivos diagnósticos aún está por definirse.

En cuanto a las proteínas comunes, cuatro proteínas están involucradas en mecanismos de duplicación, transcripción y traducción: DNA nucleotidil transferasa, wag 31, Proteína ribosomal 50S L7/L12 RPLL (SA1), Subunidad beta de la RNA polimerasa y seis pertenecen a proteínas de metabolismo SDR deshidrogenasa/reductasa, adenilato cinasa, diguanilato ciclasa, citrato liasa, aldehído deshidrogenasa, fosfopiruvato hidratasa. (Tabla 10).

El valor de las proteínas identificadas comunes entre las diferentes especies de MNT como marcadores de exposición depende no solo de su presencia o ausencia en el proteoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, sino también del reconocimiento inmune. Aunque en este estudio no se realizó la comparación con los perfiles proteicos de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, cuatro proteínas comunes de las MNT no presentan una secuencia de aminoácidos similar a las reportadas en *M. bovis* BCG o en *M. tuberculosis*, siendo posible su identificación por la disponibilidad de la secuencia en otras micobacterias o en otros microorganismos (ej. la proteína diguanilato ciclasa identificada en *Pseudoalteromonas atlantica*).

Se han realizado diversos estudios en modelo murino con el fin de determinar el efecto de la exposición a MNT previa a la vacunación en la eficacia protectora de la vacuna BCG, encontrando una respuesta variable. Mientras que algunas especies son capaces de bloquear la

actividad de la BCG, otras parecen no tener efecto alguno o por el contrario confieren un nivel de protección mayor al de la vacuna sola [4, 7, 8, 39, 40]. Estos resultados podrían sugerir que la eficacia protectora de la vacuna BCG varía dependiendo de la especie de MNT a la que se está expuesto.

Aún más, es interesante notar que aunque las especies de MNT más frecuentes recuperadas en los diferentes sitios fueron las mismas, el orden de frecuencia es distinto siendo mucho mayor en los países donde la vacuna BCG muestra bajos niveles de protección, por ejemplo de 1-50 UFC/L en Estados Unidos, París y Finlandia a $10\text{-}3 \times 10^8$ UFC/mL en África e India.

La causa de la interferencia de las MNT en la protección de la única vacuna contra la tuberculosis y su relevancia aún está siendo definida, mientras tanto, la búsqueda de nuevas vacunas y herramientas diagnósticas que permitan un control efectivo de la enfermedad sigue siendo una necesidad apremiante.

VIII. CONCLUSIONES

- El 80% de las proteínas de extracto celular de MNT de aislamientos ambientales son de expresión común.
- El número de proteínas detectadas por 2D-GE fue mayor para *M. avium* que para las otras especies de micobacterias estudiadas.
- Se encontraron proteínas únicas asociadas a metabolismo, virulencia y algunas reportadas con función desconocida en las diferentes MNT estudiadas.
- Cuatro proteínas comunes entre las distintas MNT son únicas para las MNT, presentando una secuencia de aminoácidos distinta a las reportadas para *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis*.

IX. ANEXOS

Anexo A

Middlebrook 7H10 Agar Base (Sigma)

Componentes (g/L)

Sulfato de amonio, 0.50
Acido L-Glutámico, 0.50
Fosfato de potasio monobásico, 1.50
Fosfato de sodio dibásico, 1.50
Citrato de sodio, 0.40
Citrato de amonio férrico, 0.04
Sulfato de magnesio, 0.025
Cloruro de calcio, 0.0005
Sulfato de zinc, 0.001
Sulfato de cobre, 0.001
Piridoxina, 0.001
Biotina, 0.0005
Vede de malalquita, 0.00025
Agar, 15.00

Middlebrook OADC Growth Supplement (Sigma)

Componentes: (por vial)

Albúmina Bovina Fracción V 2.50 g
Dextrosa 1.00 g
Catalasa 0.002 g
Acido Oleico 0.025 g
Cloruro de sodio 0.425 g
Agua destilada 50 mL

Middlebrook ADC Growth Supplement (Sigma)

Componentes: (por vial)

Albúmina Bovina Fraction V 2.5 g
Dextrosa 1.0 g
Catalasa 0.0015 g
Agua destilada 50 mL

Middlebrook 7H9 Broth Base (Sigma)
Componentes (g/L)

Sulfato de amonio, 0.50
Fosfato dibásico de sodio, 2.50
Fosfato monobásico de potasio, 1.00
Cloruro de sodio, 0.10
Sulfato de magnesio, 0.05
Cloruro de calcio, 0.0005
Sulfato de zinc, 0.001
Sulfato de cobre, 0.001
Citrato de amonio férrico, 0.04
Acido L-Glutámico, 0.50
Piridoxina, 0.001
Biotina, 0.0005

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato monobásico de potasio	0.2g
Fosfato dibásico de sodio	2.9g
Cloruro de potasio	0.2g
Agua desionizada	c.b.p. 1000 mL
Tween 80	0.5g
Ajustar pH a 7.4	

Anexo B

TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Una vez realizado el frotis, se cubre el portaobjetos con fucsina fenicada y se calienta a emisión de vapores durante 5 min. Se lava con agua corriente y se decolora con alcohol ácido durante 1 min. Se realiza otro lavado con agua corriente y se cubre el portaobjetos con solución de azul de metileno por 1 min. Finalmente se lava con agua y se deja secar al aire.

Preparación de reactivos

Carbol fucsina

Fucsina básica.....	0.3 g
Alcohol etílico 95%.....	10.0 mL
Fenol (cristales derretidos).....	5.0 g
Agua destilada.....	90.0 mL

Alcohol ácido

Alcohol etílico.....	97.0 mL
Acido clorhídrico concentrado.....	3.0 mL

Azul de metileno

Azul de metileno.....	0.3 g
Agua destilada.....	100.0 mL

Anexo C

Tinción con nitrato de plata

Soluciones:

Fijación	40% Etanol/10% Ácido acético
Lavado	30% Etanol.
Pre-tratamiento	Tiosulfato de sodio pentahidratado
Impregnación	Nitrato de plata (2 g/L)/0.75 mL Formaldehído 37%
Revelado	Carbonato de sodio (60 g/L)/0.5 mL Formaldehído 37%/ Tiosulfato de sodio pentahidratado (4 mg/L)
Paro	5% Ácido acético.

El gel es sumergido en solución de fijación durante al menos una hora en agitación leve, concluido el tiempo se realizan tres lavados de 20 min cada con solución de lavado. Posteriormente se realiza una incubación de 1 min en la solución de pretratamiento y al terminar se realizan tres lavados de 20 seg. cada uno con agua destilada para después adicionar la solución de impregnación dejando en agitación leve por 20 min. Al finalizar se realizan dos lavados de 20 seg. con agua destilada y se adiciona solución de revelado agitando hasta la aparición total de los puntos. La solución de paro es adicionada una vez que se haya logrado la imagen deseada.

Anexo D

Tinción con Coomasie coloidal (Silver Blue)

Ácido fosfórico 10%

Sulfato de amonio 10%

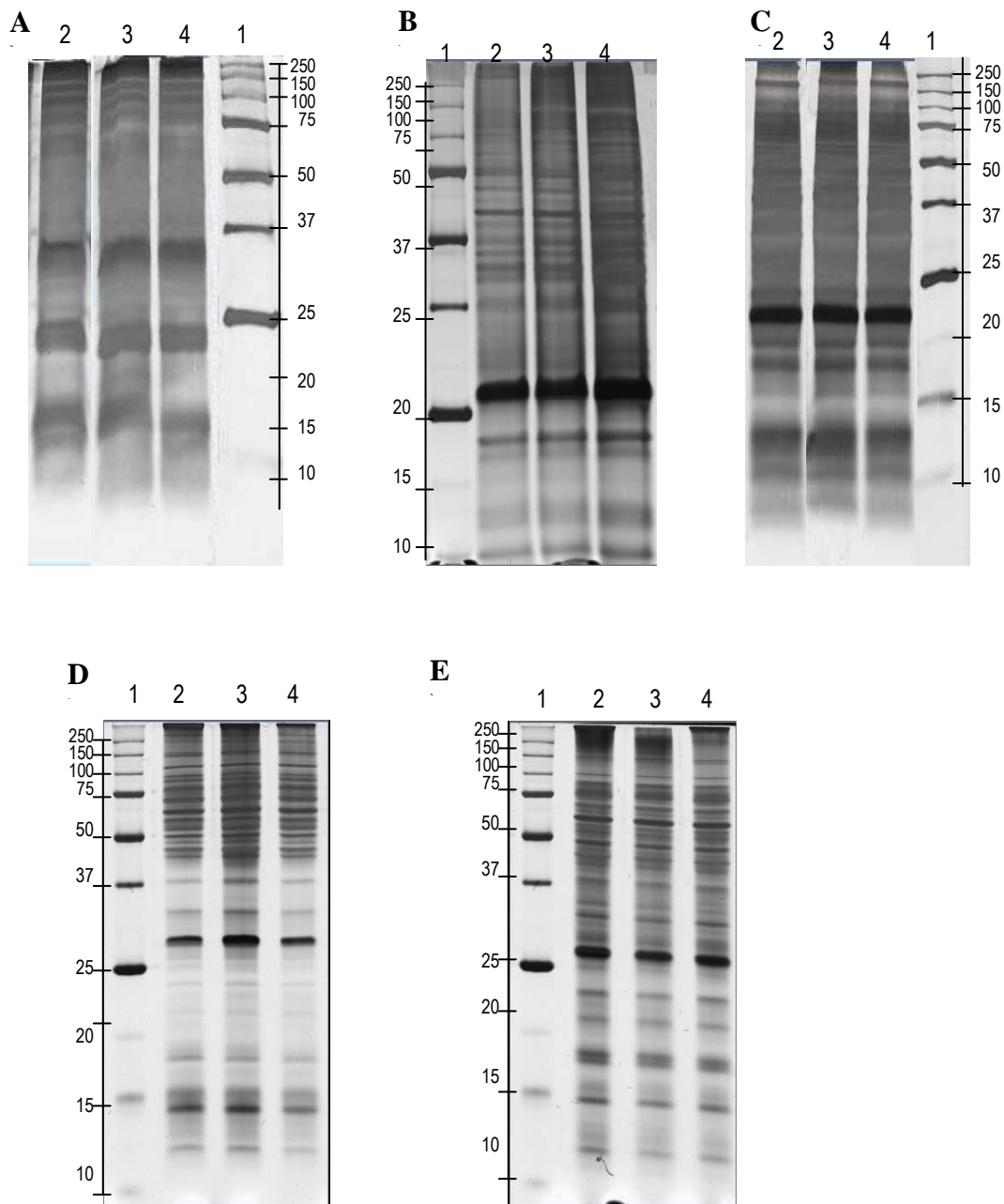
Metanol anhidro 20%

CBB-G250 0.12%

Al 12% del volumen de agua desionizada tota se adiciona el ácido fosfórico, en esta solución se disuelve poco a poco el sulfato de amonio, mantener en agitación hasta que todo se hay disuelto y filtrar. Se adiciona el coomasie y se mantiene nuevamente en agitación y cuando todos los sólidos se hayan disuelto se adiciona el volumen de agua desionizada restante. A esta solución bajo agitación, se le añade el metanol anhidro.

La solución se conserva en frasco ámbar a temperatura ambiente y es estable por más de 6 meses.

Anexo 1



SDS-PAGE de proteínas extracto celular de tres cultivos independientes de (A) *M. nonchromogenicum* tipo I (B) *M. nonchromogenicum* tipo II (C) *M. peregrinum* (D) *M. gordonae* (E) *M. avium* obtenidos por sonicación, 5 µg de proteína fueron cargadas en geles de acrilamida al 12.5% y se tiñeron con plata.

Anexo 2

Clave del spot	Nombre	Función	# de péptidos ID	Score	% secuencia	Microorganismo referencia	Experimental		Teórico		CF
							pI	MM kDa	pI	MM kDa	
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. nonchromogenicum</i> tipo I											
z-1	---	---	--	--	--	--	4.5	9.8	--	--	--
z-2	Deoxyuridin 5'-trifosfato nucleotidohidrolasa	Participa en la biosíntesis de timidilato, catalizando la formación de dUMP, el precursor inmediato de los nucleótidos de timidina Actividad catalítica: dUTP + H(2)O= dUMP + Pirofosfato	2	109 (54/55)	11	<i>M. gilvum</i>	5.4	18.5	4.77	15808	7
			2	54	11	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i>	5.4	18.5	5.66 5.99	15793 15770.87	7
z-3	Proteína hipotética	Desconocida	3	65 (65/46/15)	23	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. bovis</i>	5.9	15.8	5.76 6.09	15997 16007.14	7
Z-4	--	----	--	--	--	--	4.1	148.8	--	--	--
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. nonchromogenicum</i> tipo II											
Y-1	--	--	--	--	--	--	6.2	11	--	--	--
Y-2	--	--	--	--	--	--	5.7	11.4	--	--	--
Y-3	Cadena A, estructura y función de Rv0130	Proteína hipotética conservada	4	33 (33/14/6/6)	27	<i>M. tuberculosis</i> complex	5.8	15	5.49 6.09	15937 16007.2	7
Y-4	Catalasa peroxidasa .	Pertenece al subgrupo de peroxidasas hemo-dependientes que catalizan una reacción oxidativa multipasos en los que el peróxido de hidrógeno es el aceptor de electrones. La proteína homóloga en <i>M. tuberculosis</i> exhibe actividad de catalasa, peroxidasa de	4	115 (30/34/32/21)	6	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	5.7	87.3	4.95 4.87	81700 80572.6	0

		amplio espectro y peroxinitritasa, se ha involucrado en la supervivencia intracelular de la micobacteria dentro de los macrófagos; protegiendo contra las especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno producidos por células fagocíticas. Es regulado por SIGB Rv2710 Actividad catalítica: H2O2 = O2 + 2H2O										
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. peregrinum</i>												
N-1	--	--	--	--	-	--	5.8	14.2				
N-2	--	--	--	--	-	-	5.7	14.4				
N-3	Lectina de unión a Manosa		4	114 (42/53/41/ 31)	30	<i>M. smegmatis</i>	4.5	29	4.54	21909		
N-4	Inositol 5-monofosfat o deshidrogenasa	Cataliza la oxidación NAD-dependiente de inosine 5'-monofosfato (IMP) a xantosina 5'monofosfato	3	125 (26/44/56)	6	<i>M. vanbaalenii</i>	5.9	64.3	5.79	53454	7	
N-E	Diguanilato ciclasa	--	1	52	2	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	6.0	37	6.27	43736		
PRTOEÍNAS ÚNICAS EM <i>M. gordonae</i>												
G-1	Probable proteína de choque frío CSPA	Posiblemente involucrada en el proceso de aclimatación al frío. La producción de la proteína es predominante inducida por las bajas temperaturas	1	34	14	<i>M. tuberculosis H3Rv</i>	5.5	10.5	5.17	7366	0	
G-2	Probable precursor de lectina específica de manosa	Tiene un dominio de lisina, encontrado en una variedad de enzimas involucradas en la degradación de la pared bacteriana. Este dominio puede tener una función de unión general a peptidoglicano	2	72 (91/53)	18	<i>M. abscessus</i>	4.4	25.4	3.96	19635		
G-3	Superóxido dismutasa	Cataliza la conversión de radicales superóxido los cuales son normalmente producidos dentro de las	2	81 (44/37)	24	<i>M. gordonae, M. asiaticum</i>	5.8	24.5	5.94	18112		
							5.8	24.5	5.96	23020	0	

		células y son tóxicos para los sistemas biológicos. Actividad catalítica: 2 Radicales peróxido + 2H(+) = O(2)+ H(2)O(2)	1	55	6						
						<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (<i>M.bovis</i> , <i>M. leprae</i> , <i>M. ulcerans</i> Agy99)					
G-4	Malato deshidrogenasa	Involucrada en la conversión de malato a oxaloacetato [Actividad catalítica: (S)-malato + NAD+ = oxaloacetato + NADH].	5	197 (34/43/82/ 37/59)	14	<i>M. marinum</i>	5.0	36.1	4.88	34603	7
			3		9	<i>M. leprae</i>	5.0	36.1	4.96	34466	
				140 (43/78/34)							
G-5	Proteína tipo luciferasa	Producción y conversión de energía. Cataliza la reducción de N5, N10-metilenetetrahidrometanopterin con coenzima F420 reducida a N5-metiltetrahidrometanopterin y coenzima F420 oxidada	3	151 (36/60/56)	9	<i>Mycobacterium</i> sp.	5.6	39.3	5.03	37382	
G-5	Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa F420-dependiente	Cataliza la oxidación de Glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona usando coenzima F420 (un derivado de *-hidroxi-5-deazaflavina) como aceptor de electrones.	3	148 (53/36/60)		<i>M. avium</i> (<i>M. ulcerans</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. chelonae</i> un péptido es compartido con <i>M. tuberculosis</i>)	5.6	39.3	5.13	37320	7
G-6	Proteína hipotética SKA58_12 772	Predicha como fosfohidrolasa de función general	1	52	3	<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58	6.1	34	7.94	33040	
PROTEÍNAS COMUNES EN TODAS LAS ESPECIES DE MNTae											
G-A	Subunidad beta de la RNA polimerasa	La RNA polimerasa cataliza la polimerización de RNA dependiente de DNA. Cataliza la transcripción de DNA en RNA usando cuatro ribonucleótidos trifosfatos como sustrato. Los procariones contienen una sola RNA polimerasa Actividad catalítica: nucleósido trifosfato = N difosfato + RNA(N)	2	30 (27/33)	72	<i>M. tuberculosis</i>	4.9	11	10.77 4.67	5586 129217. 80	2

G-B	Proteína ribosomal 50S L7/L12	Involucrada en los mecanismos de traducción, es el sitio de union para varios de los factores involucrados en la síntesis de proteínas y parece ser esencial para la traducción exacta.	2	115 (56/65)	35	<i>Mycobacterium sp. (M. smegmatis, M. vanbaalenii)</i>	4.85	14	4.52	13451	2
G-C	Adenilato cinasa	Cataliza la transferencia reversible de fosfato a partir de ATP a AMP y ADP Esta pequeña enzima ubiquitinada es esencial en el metabolismo intracelular de nucleótidos. Además actúa como una nucleósido mono y difosfato cinasa sugiriendo que esta puede tener un papel en la biosíntesis de RNA Y DNA [Actividad catalítica: ATP + AMP = ADP + ADP].	1	53	6	<i>M. leprae (M. avium subsp paratuberculosis, M. smegmatis, M. ulcerans, M. abscessus).</i>	5.0	24.5	5.48	20184	7
G-D	SDR deshidrogenasa/reductasa de cadena corta	Función desconocida; supuestamente involucrada en el metabolismo celular.	1	47	3	<i>Mycobacterium sp (M. smegmatis, M. vanbaalenii, M. gilvum)</i>	5.9	25	5.20 6.55	26318 25787.6 8	7
G-F	Proteína hipotética conservada WAG 31	Proteína de inicio de la división celular Función desconocida	2	113 (57/58)	8	<i>M. tuberculosis H37Rv (M. Vanbaalenii, M. Gilvum, M. smegmatis)</i>	4.75	37	4.8	28260	10
			3		12		4.75				
				112 (57/58/81)		<i>M. avium subsp. paratuberculosis K-10 (M. avium 104, M. ulcerans Agy99)</i>					
G-F	Proteína hipotética Rv3075c	Citrato liasa subunidad beta. Interconversión de citrato a acetato y oxaloacetato. [Actividad catalítica: Citrato = Acetato + Oxaloacetato].	2	65 (46/19)	4	<i>M. tuberculosis H37Rv (M. bovis, M. ulcerans, M. marinum)</i>	4.75	37	4.73	33080	7

Z-H	Probable aldehído deshidrogenasa	Esta familia de deshidrogenasa actúa sobre sustratos con aldehídos. Sus miembros usan NADP como cofactor. Interconversión aldehído y ácido Actividad catalítica: Aldehído + NAD ⁺ + H ₂ O = Ácido + NADH].	2	41 (41/57)	4		<i>M. tuberculosis</i> (<i>M. bovis</i> , <i>M. leprae</i>)	5.3	55	5.09	54540	7.0
Z-I	Fosfopiruvato hidratasa	Enolasa que catalizan la deshidratación reversible del 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato como parte de la vía glucolítica y gluconeogénica. La reacción es facilitada por la presencia de iones metálicos. Actividad catalítica: 2-fosfo-D-glicerato = fosfoenolpiruvato + H ₂ O	4	77 (35/45/70/14)	10		<i>M. bovis</i> AF2122/97	4.8	45	4.47	44835	7
Z-I	Dna N (DNA nucleotidil transferasa) DNA polimerasa III (cadena beta)	DNA polimerasa III, subunidad beta. La DNA polimerasa III es un complejo enzimático responsable de la mayoría de la síntesis replicativa en las bacterias, exhibe actividad exonucleasa 3' a 5'. La cadena beta es requerida para la iniciación de la replicación, una vez que está anclada sobre el DNA se desliza libremente (bidireccional y ATP-independiente) a lo largo del DNA duplex. Actividad catalítica: deoxinucleosido trifosfato = N difosfato + {DNA}N].		44 (44/62/5)	11		<i>M. tuberculosis</i>	4.8	45	4.76	42101	2

X. REFERENCIAS

- [1] Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning and Financing. WHO Report. 2008. World Health Organization.
- [2] Raviglione MC. 2003. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* **83**:4-14.
- [3] Fine PEM, LC Rodríguez. 1990. Modern Vaccines. Mycobacterial diseases. *Lancet* **335**:1016–1020.
- [4] Rook G. A., K. Dheda and A. Zumla. 2005. Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nature Rev. Immunol.* **5**:661-667.
- [5] Primm T. P., Lucero C. A., Falkinham III J.O. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **17**:98-106.
- [6] Falkinham, J. O., III. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:177-215.
- [7] Demangel C. T. Garnier, I. Rosenkrands, S. T. Cole. 2005. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun.* **73**:2190-2196.
- [8] Andersen P., T. M. Doherty. 2005. The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Rev Microbiol.* **3**:665-662.
- [9] Dawson, D. J. 2000. Mycobacterial terminology. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3913.
- [10] Pfyffer, E. G., Brown-Elliott A. B., Wallace R. Jr. *Mycobacterium: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures*, 2003. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th edition, United States of America, ASM Press, pag 532-552.
- [11] Eaton, T., J. O. Falkinham 3rd, and C. F. von Reyn, 1995. Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2757-2758.
- [12] Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiol. Reviews.* **16**:319-354.
- [13] Brown-Elliott B., R. J. Jr. Wallace. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Reviews.* **15**:716-746.
- [14] Fenton M. J. and M. W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. *Infection and Immunity.* **64**:683-690.
- [15] J. P. Euzéby's List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>).
- [16] Katoch V. M. 2004. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J. Med. Res.* **120**:290-304.
- [17] Zakowski, P., S. Fligiel, G. W. Berlin, and L. Johnson, Jr. 1982. Disseminated *Mycobacterium avium*-intracellulare infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *JAMA* **248**:2980-2982.
- [18] Lumb R., R. Stapledon, A. Scroop, P. Bond, D. Cunliffe, A. Goodwin, R. Doyle, I. Bastian. 2004. Investigation of spa pools associated with lung disorders caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompetent adults. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4906-4910.

- [19] Freeman, A., J. Lockey, P. Hawley, P. Biddinger, and D. Trout. 1998. Hypersensitivity pneumonitis in a machinist. *Am. J. Ind. Med.* **34**:387-392.
- [20] Lummus, Z. L., J. E. Lockey, and I. L. Bernstein. 1998. Microbial flora of metalworking fluids associated with occupational respiratory disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1**:166.
- [21] Muilenberg, M. L., H. A. Berge, and T. Sweet. 1993. Hypersensitivity penumonitis and exposure to acid-fast bacilli in coolant aerosols. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**:311.
- [22] Shelton, G. B., W. D. Flanders, and K. G. Morris. 1999. Mycobacterium sp. As a possible cause of hypersensitivity pneumonitis in machine workers. *Emerg. Infect. Dis.* **5**:270-273.
- [23] Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou, and V. Vincent. 2002. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1025-1032.
- [24] Taylor R. H., J. O. III Falkinham, C. D. Norton, Chevallier M. W. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of Mycobacterium avium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1702-170.
- [25] Falkinham J. O. III. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerging Infecious Diseases.* **9**:763-767.
- [26] Le Dantec C, Duguet J. P., Montiel A., Dumoutier N., Dubrou S. And Vincent V. 2002. Occurrence of Mycobacteria in Water Treatment Lines and in Water Distribution Systems. *Appl Environ Microbiol* **68**:5318-5325.
- [27] Torvinen E, S. Suomalainen, M. Lehtola, I. T. Miettinen, O. Zacheus, I. Paulin, M. L. Katila. 2004. Micobacteria in Water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl Environ Microbiol* **70**:1973-1981.
- [28] Kamala T, C. N. Paramasivan, D. Herbert, P. Venkatesan, R. Prabhakar. 1994. Isolation and identification of environmental micobacteria in the Mycobacterium bovis BCG Tial Area of South India. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2180-2183.
- [29] Covert, T. C., M. R. Rodger, A. L. Reyes, G. N. Jr. Stelma. 1999. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* **65**:2492-2496.
- [30] von Reyn, C.F., R. D. Waddell, T. Eaton, R. Arbeit, J. N. Maslow, T. W. Barber, R. J. Brindle, C.F. Gilks, J. Lumio, J. Lahdevirta, A. Ranki, D. Dawson, and J. O. Falkinham III. 1993. Isolation of Mycobacteria avium complex from water in the United States, Finland, Zaire and Kenya. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3227-3230.
- [31] Behr M.A. 2001. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand. J. Infect. Dis.* **33**:249-252.
- [32] Urquhart , B. L., Cordwell, S.J., Humphery-Smith, I. 1998. Comparison of predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**:70-79.
- [33] Leung C. C., W. W. Yew, C. M. Tam, C. K. Chan, W. S. Law, S. N. Lee, M. Y. Wong and K. F. Au. 2006. Tuberculin response in BCG vaccinated schoolchildren and the estimation of annual risk of infection in Hong Kong. *Thorax* **60**:124-129.
- [34] Black, G. F., H. M. Dockrell, A. C. Crampin, S. Floyd, R. E. Weir, L. Bliss, L. Sichali, L. Mwaungulu, H. Kanyongoloka, B. Ngwira, D. Warndorff and P. E. Fine. 2001. Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. *J. Infect. Dis.* **184**:322-329.

- [35] Black, G. F., R. E. Weir, S. Floyd, L. Bliss, D. K. Warndorff, A. C. Crampin, B. Ngwira, L. Sichali, B. Nazareth, J. M. Blackwell, K. Branson, S. D. Chaguluka, L. Donovan, E. Jarman, E. King, P. E. Fine and H. M. Dockrell. 2002. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomized controlled studies. *Lancet* **359**:1393-1401.
- [36] Black G. F., Weir R. E., Chaguluka S. D., Warndorff D., Crampin A. C., Mwaungulu L., Sichali L, Floyd S., Bliss L., Jarman E., Donovan L., Andersen P., Bitton W., Hewinson G., Huygen K., Paulsen J., Singh M., Prestidge R., Fine P. E. M., Dockrell H. M. Gamma Interferon Responses Induced by a Panel of Recombinant and Purified Mycobacterial Antigens in Healthy, Non-*Mycobacterium bovis* BCG-Vaccinated Malawian Young Adults. 2003. *Clin Diagn Lab Immunol.* **10**:602-6110.
- [37] Weir R. E., Fine P. E. M., Nazareth B., Floyd S., Black G. F., King E., Stanley C., Bliss L., Branson K., Dockrell H. M. 2003. Interferon- γ and skin test responses of schoolchildren in southeast England to purified protein derivatives from *Mycobacterium tuberculosis* and other species of mycobacteria. *Clin. Exp. Immunol.* **134**:285-294.
- [38] Kröger L, Korppi M, Pelkonen J, Pietikäinen M, Katila ML. Development of tuberculin reactivity and sensitization to *M. scrofulaceum* and *M. fortuitum* in children BCG-vaccinated at birth. 2000. *Eur Respir J.* **15**(2):382-7.
- [39] Hernandez-Pando, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina and G. Rook. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect. Immun.* **65**:3317-3327.
- [40] Brandt L., J. F. Cunha, A. W. Olsen, B. Chilima, P. Hirsch, R. Appelberg and P. Andersen. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* **70**:672-678.
- [41] Pai M. 2005. Alternatives to the tuberculin skin test: interferon- γ assays in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J. Med. Microbiol.* **23**:151-158.
- [42] Castañón-Arreola M. and Y. López-Vidal. 2004. A second-generation anti tb vaccine is long overdue. *Ann Clin Microbiol Antimicrobials.* **3**:10-21.
- [43] Koo H. C., Y. H. Park, J. Ahn, W. R. Waters, M. J. Hamilton, G. Barrington, A. A. Mosaad, M. V. Palmer, S. Shin and W. C. Davis. 2004. New latex bead agglutination assay for differential diagnosis of cattle infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* **11**:1070-1074.
- [44] Palzkill Timothy. Proteomics. Cap. I, pág. 1-10.
- [45] Graves P. R., T. A. J. Haystead. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Molec Biol Rev.* **66**:39-63.
- [46] Soloviev M., Finch P. 2005. Peptidomics, current status. *Journal of Chromatography B,* **815**:11-24.
- [47] López J.L. 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J Chromatogr B.* **849**:190-202.
- [48] Berkelman T, Stenstedt T. 1998. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods.
- [49] Lee ES, Lee MY, Han SH, Ka JO. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. 2008. *J. Microbiol Biotechnol.* **18**(7):1207-15.

- [50] Betts J. C., P. T. Lukey, L. C. Robb, R. A. McAdam, K. Duncan. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology* **43**(3), 717–731.
- [51] Blokpoel M. C. J., M. J. Smeulders, J. A. M. Hubbard, J. Keer, H. D. Williams. 2005. Global Analysis of Proteins Synthesized by *Mycobacterium smegmatis* Provides Direct Evidence for Physiological Heterogeneity in Stationary-Phase Cultures. *J. Bacteriology* **187**:6691-6700.
- [52] Gupta S., S. B. Pandit, N. Srinivasan, D. Chatterji. 2002. Proteomics analysis of carbon-starved *Mycobacterium smegmatis* : induction of Dps-like protein. *Protein Eng.* **15**: 503-12.
- [53] Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. 2003. *Mol Microbiol.* **48**:77-84.