



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA FRACCIÓN CELULAR DE  
*MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG Y *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
EN CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

**MAURICIO RODRÍGUEZ ÁLVAREZ**

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Yolanda López Vidal**

Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Sergio Encarnación Guevara**

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

**Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes**

Facultad de Química, UNAM

**Dr. Otto Geiger**

Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

**Dr. Julio César Carrero**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2021



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

- Dra. Yolanda López Vidal, facultad de Medicina, UNAM.
- Dr. Guillermo Mendoza Hernández (*qepd*), Facultad de Medicina, UNAM.
- Dra. Estela Sánchez Quintanar, Facultad de Química, UNAM.
- Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, Facultad de Química, UNAM.
- Dr. Sergio Encarnación Guevara, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.
- Dr. Julio César Carrero Sánchez, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Dr. Otto Geiger, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM.

Durante el desarrollo del proyecto se recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la beca número 177326 y apoyo a proyecto número 5803700-2-VII-96. También se recibió apoyo de la UNAM, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (proyecto número IN209708) y de la Secretaría de Desarrollo Institucional (proyecto número SDEI.PTID.05.4).

El jurado de examen de doctorado estuvo constituido por:

Presidente	Rodríguez Sotres Rogelio	
Vocal	Trujillo Roldán Mauricio	
Vocal	Oropeza Navarro Ricardo	
Vocal	Castillo Rodal María Antonia	
Secretaria	Pérez Montfort Ruy	

## DEDICATORIA

A mi madre, Mercedes Álvarez Béjar (*qepd*), por su fuerza, su ejemplo, su generosidad y todo el amor que me dio siempre.

A mi padre, Carlos José Rodríguez Ajenjo (*qepd*), por su presencia, su sabiduría y el infinito legado que dejó.

A Cecilia Loría Saviñón (*qepd*) y Francisco Gama Medina, por ensanchar las familias con su amor a mi papá y a mi mamá.

A Roxana Suaste Villanueva, porque día a día procura que la magia se conserve y crezca en nuestro hogar.

A Simón Rodríguez Suaste, mi hijo, por su capacidad de descubrir, asombrarse y crear, y por la fuerza del amor que lo rodea.

A mis hermanos Carlos, Cecilia, Gabriel y Jesús, por el amor que nos une.

A mis tíos Román y Alejandro Álvarez Béjar, por su infinita ayuda, ejemplo y complicidad.

## AGRADECIMIENTOS

A la doctora López Vidal, por el generoso apoyo que me ha dado en todo momento desde el inicio de este proyecto.

A los doctores Gonzalo Castillo Rojas, María Antonia Castillo Rodal, Patricia Orduña Estrada, Hugo Esquivel Solís, Mauricio Castañón Arreola, Guillermo Mendoza Hernández (qepd) y Marco Antonio Cerbón Cervantes por su asesoría y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Rosa Isabel Amieva, Karina Adames, Martha Mercado, Teresa Flores, Adriana Vega, Jaqueline Larracilla, Gustavo Olvera, Iliana Palomec, Carol Martínez, *Don Richard* y Fernando Vargas

A todos con quienes gracias a este proyecto coincidimos y hemos conservado las colaboraciones o la amistad, especialmente Adrián Vázquez Pérez y Alejandro Ortiz Stern.

Al doctor Samuel Ponce de León Rosales, por su confianza y ayuda para mi desarrollo profesional.

Al doctor José Mercado Verdín, porque en su diván y sus palabras encontré brújula y balanza.

## RESUMEN

La tuberculosis es una inmunopatología causada por bacterias del género *Mycobacterium*, con un importante impacto a nivel mundial. La prevención de las formas graves de tuberculosis (meníngea y miliar) se realiza con la vacuna del Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), cuya variabilidad microbiológica, genética y de eficacia protectora ha sido documentada. Un estudio que evaluó la protección individual de 10 subcepas BCG en modelo murino de tuberculosis pulmonar confirmó la heterogeneidad de la protección en los animales contra el reto con *M. tuberculosis*, y permitió identificar subcepas que confieren protección alta (Phipps), intermedia (Glaxo-Dinamarca) y baja (Tice). En el presente trabajo se analizaron y compararon los proteomas de la fracción celular en condiciones de cultivo estándar de cinco subcepas BCG (Glaxo-Dinamarca, México-1931, México-1997, Phipps y Tice) y *M. tuberculosis* (cepa H37Rv y dos muestras clínicas) por electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE) y espectrometría de masas (MS). Posteriormente se llevó a cabo un análisis comparativo específico entre las subcepas Phipps y Glaxo-Dinamarca por la capacidad protectora que habían mostrado en el modelo murino. Se identificaron 17 proteínas con mayor intensidad en BCG Phipps (vs. BCG Glaxo-Dinamarca): cinco antigénicas, cuatro relacionadas con respuesta a estrés y ocho de metabolismo celular; así como cuatro proteínas que tuvieron mayor intensidad en BCG Glaxo-Dinamarca: una relacionada con respuesta a estrés y tres con metabolismo celular. Los proteomas de las cepas virulentas mostraron 158 proteínas comunes entre *M. tuberculosis* H37Rv y los aislamientos clínicos, entre las que se encontraban cinco proteínas relacionadas con respuesta a estrés o antígenos inmunodominantes; además al comparar la cepa virulenta (*M. tuberculosis* H37Rv) con la atenuada BCG México-1931, se identificaron cinco proteínas con expresión incrementada en la primera, todas ellas relacionadas con respuesta a estrés o antígenos inmunodominantes y tres de metabolismo celular incrementadas en la segunda. En conclusión, en este trabajo se estandarizaron las metodologías para el análisis proteómico de micobacterias y aporta conocimiento sobre proteínas potencialmente relevantes que, aún en condiciones de cultivo estándar, se encuentran con mayor intensidad en las subcepas BCG relacionadas con mayor protección o en las cepas virulentas de *M. tuberculosis*. Estas proteínas podrían ser consideradas como candidatos vacunales, componentes de reactivos para diagnóstico o incluso blanco de nuevos tratamientos para combatir esta importante enfermedad.

**ABSTRACT**

Tuberculosis is an immunopathology caused by bacteria of the genus *Mycobacterium*, with a significant impact worldwide. The prevention of severe forms of tuberculosis (meningeal and miliary) is achieved with the Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine, whose microbiological, genetic and protective efficacy variability has been documented. A study that evaluated the individual protection of 10 BCG substrains in a murine model of pulmonary tuberculosis confirmed the heterogeneity of the protection in animals against the challenge with *M. tuberculosis* and allowed to identify substrains that confer high (Phipps), intermediate (Glaxo- Denmark) and low (Tice) protection. In the present work, the proteomes of the cell fraction under standard culture conditions of five BCG substrains (Glaxo-Denmark, México-1931, Mexico-1997, Phipps and Tice) and *M. tuberculosis* (strain H37Rv and two clinical samples) were analyzed and compared by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and mass spectrometry (MS). Subsequently, a specific comparative analysis was carried out between the Phipps and Glaxo-Denmark substrains based on the protective capacity that they had shown in the murine model. Seventeen proteins with higher intensity in BCG Phipps (vs. BCG Glaxo-Denmark) were identified: five antigenic, four related to stress response and eight to cellular metabolism; as well as four proteins with higher intensity in BCG Glaxo-Denmark: one related to stress response and three to cellular metabolism. The proteomes of the virulent strains showed 158 proteins common between *M. tuberculosis* H37Rv and the clinical isolates, among which were five proteins related to stress response or immunodominant antigens; furthermore, when comparing the virulent strain (*M. tuberculosis* H37Rv) with the attenuated BCG México-1931, five proteins with increased expression were identified in the former, all of them related to stress response or immunodominant antigens and three to increased cellular metabolism in the latter. In conclusion, in this work the methodologies for the proteomic analysis of mycobacteria were standardized and provides knowledge on potentially relevant proteins that, even under standard culture conditions, are found with greater intensity in the BCG substrains related to greater protection or in virulent strains of *M. tuberculosis*. These proteins could be considered as vaccine candidates, components of diagnostic reagents or even targets for new treatments to fight this important disease.

# **ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA FRACCIÓN CELULAR DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* Y *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG EN CONDICIONES DE CULTIVO ESTÁNDAR**

## **CONTENIDO**

RECONOCIMIENTOS	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
General	32
Específicos	32
DISEÑO DEL ESTUDIO	33
METODOLOGÍAS	35
RESULTADOS.	42
METAS ALCANZADAS	67



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS	84
ANEXOS	101
ANEXO I. MEDIOS Y SOLUCIONES	101
ANEXO II. TÉCNICAS DE LABORATORIO	103
ANEXO III. PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS Y DISTINCIONES	106
ANEXO IV. DISTINCIONES	108
ANEXO V. ARTÍCULOS PUBLICADOS	109

## ABREVIATURAS

2D-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones ( <i>2D-polyacrilamide gel electrophoresis</i> , en inglés)
ADC	Albúmina-dextrosa-catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> , en inglés)
BAAR	Bacilo ácido-alcohol-resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
bp	Pares de bases ( <i>base pair</i> , en inglés)
BSA	Albúmina sérica bovina ( <i>bovine serum albumin</i> , en inglés)
CFP	Proteína del Filtrado de Cultivo ( <i>Culture Filtrate Protein</i> , en inglés).
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) ( <i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i> , en inglés)
cm	Centímetros
dH <sub>2</sub> Oe	Agua desionizada estéril
DTH	Hipersensibilidad retardada ( <i>delayed-type hypersensitivity</i> , en inglés)
DTT	DL-Ditioteitol.
ESAT-6	Antígeno Blanco de Secreción Temprana de 6 kDa ( <i>Early Secretory Antigen Target 6 kDa</i> , en inglés)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , en inglés)
H <sub>2</sub> Od	Agua destilada
HCl	Ácido clorhídrico
IAA	Iodoacetamida
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
IPG	Gradiente inmovilizado de pH ( <i>immobilized pH gradient</i> , en inglés)
IS	Secuencia de inserción ( <i>insertion sequence</i> , en inglés)
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LC-NS-MS/MS	Cromatografía líquida-nano electrospray acoplada a tándem de espectrometría de masas ( <i>liquid chromatography-nanoelectrospray-tandem mass spectrometry</i> , en inglés)
MPIIB	Instituto Max Planck para la Biología de las Infecciones ( <i>Max Planck Institute for Infection Biology</i> , en inglés)
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>

MDR-TB	Tuberculosis multifármacorresistente ( <i>multidrug-resistant tuberculosis</i> , en inglés)
MNTs	Micobacterias no tuberculosas
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Concentración Normal
nm	Nanómetro
OADC	Ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa ( <i>oleic acid-albumin-dextrose-catalase</i> , en inglés)
OMS	Organización mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> , en inglés)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> , en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> , en inglés)
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PSA	Persulfato de amonio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio ( <i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i> , en inglés)
RD	Región diferencial ( <i>region of difference</i> , en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate, en inglés)
SS	Secretaría de Salud Federal de México
SSI	Solución salina isotónica
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TB	tuberculosis
TDM	trehalosa 6, 6'-dimicolato
UFC	Unidad formadora de colonia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina
Th	Subpoblación de linfocitos T cooperadores (T-helper cells, en inglés)
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> , en inglés)
Vh	Volt hora
v/v	volumen / volumen
XDR-TB	tuberculosis con fármacorresistencia extendida ( <i>extensively drug-resistant tuberculosis</i> , en inglés)
w/v	peso / volumen ( <i>weight / volume</i> , en inglés)

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genomas completos de bacterias del género <i>Mycobacterium</i> con secuencias accesibles a través del portal del <i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i> . .....	21
<b>Tabla 2.</b> Subcepas incluidas en este estudio.....	42
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de proteínas en los geles de cada subcepa BCG. ....	44
<b>Tabla 4.</b> Descripción del análisis de los proteomas de las subcepas BCG Glaxo-Dinamarca y Phipps de acuerdo con los cambios en la intensidad de las proteínas en los 2D-PAGE. ....	45
<b>Tabla 5.</b> Características electroforéticas y cambios en la intensidad de los puntos seleccionados de los geles (marcados en la Figura 6). ....	46
<b>Tabla 6.</b> Resumen de la distribución de las proteínas identificadas en BCG Phipps y Glaxo-Dinamarca, de acuerdo con su función agrupada.....	48
<b>Tabla 7.</b> Proteínas con incremento en la expresión en <i>M. bovis</i> BCG Phipps, con respecto a <i>M. bovis</i> BCG Glaxo-Dinamarca, identificadas por espectrometría de masas.....	49
<b>Tabla 8.</b> Proteínas con incremento en la expresión en <i>M. bovis</i> BCG Glaxo-Dinamarca con respecto a <i>M. bovis</i> BCG Phipps.....	51
<b>Tabla 9.</b> Intensidad en la base de datos del MPIIB <sup>73</sup> de los puntos correspondientes a las proteínas analizadas en este estudio. ....	52
<b>Tabla 10.</b> Proteínas identificadas en el presente trabajo, involucradas en diversos procesos biológicos relevantes para la infección por micobacterias. ....	53
<b>Tabla 11.</b> Conteo de puntos en proteomas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y BCG México-1931.....	54
<b>Tabla 12.</b> Proteínas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (A) y BCG México-1931 (B) identificadas por LC/NSI-MS/MS.....	58
<b>Tabla 13.</b> Resumen de la distribución de las proteínas identificadas en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y en BCG México-1931, de acuerdo con su función agrupada. ....	59
<b>Tabla 14.</b> Rendimiento de proteínas de los experimentos de extracción de micobacterias de los pulmones de ratones infectados.....	60
<b>Tabla 15.</b> Descripción numérica de los proteomas de <i>M. tuberculosis</i> de muestras clínicas <i>in vitro</i> . .....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Genealogía refinada de las subcepas BCG. ....	23
<b>Figura 2.</b> Esquema de trabajo para el análisis proteómico basado en geles. ....	25
<b>Figura 3.</b> Diagrama general de la estrategia metodológica general de este estudio. ....	36
<b>Figura 4.</b> Diagrama de las metodologías estandarizadas que se utilizaron para el análisis proteómico correspondiente a los tres objetivos descritos. ....	41
<b>Figura 5.</b> Medición de la absorbancia durante el cultivo en medio líquido de las subcepas BCG en condiciones estándar. ....	43
<b>Figura 6.</b> 2D-PAGE representativos de las proteínas (80 µg) del extracto celular de <i>M. bovis</i> BCG Glaxo-Dinamarca (A) y Phipps (B). ....	47
<b>Figura 7.</b> 2D-PAGE representativos de las proteínas (80 µg) del extracto celular de BCG México-1931 (A) y <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (B) ....	55
<b>Figura 8.</b> 2D-PAGE representativos de las proteínas (80 µg) del extracto celular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (A) y <i>M. bovis</i> BCG México-1931 (B).....	57
<b>Figura 9.</b> Imágenes representativas de las muestras con bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) obtenidos de los pulmones de ratones infectados.....	60
<b>Figura 10.</b> Microfotografía de la suspensión final de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv obtenidas de pulmones de ratones, posterior a la inmunoseparación magnética. ....	61
<b>Figura 11.</b> 2D-PAGE de las proteínas (80 µg) del extracto celular de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis</i> cultivados <i>in vitro</i> . ....	63
<b>Figura 12.</b> Comparación de los proteomas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, y de dos muestras clínicas de <i>M. tuberculosis in vitro</i> . ....	64
<b>Figura 13.</b> 2D-PAGE de las proteínas (40 µg) del extracto celular de aislamientos clínicos de <i>M. tuberculosis in vivo</i> .....	66

## ANTECEDENTES

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, principalmente crónica, causada por bacterias intracelulares del género *Mycobacterium*. En el ser humano, el principal agente etiológico de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*; aunque la forma clínica más frecuente es la tuberculosis pulmonar, los bacilos pueden infectar cualquier órgano o tejido del cuerpo y provocar enfermedad. Además de *M. tuberculosis*, muchas otras especies de micobacterias pueden causar una enfermedad semejante a la tuberculosis no sólo en el ser humano, sino en muchos otros animales.<sup>1</sup>

Desde hace más de cien años la tuberculosis en humanos representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, principalmente debido a que la población más afectada es la comprendida entre los 15 y 60 años de edad, el periodo de mayor productividad y actividad económica de las personas.<sup>2</sup> Las características de *M. tuberculosis* y su papel como agente causal de la tuberculosis en humanos fueron descritos en marzo de 1882 por Robert Koch, y durante los primeros años del siglo 20 se realizaron un sin número de estudios encaminados a dilucidar la biología de este microorganismo que culminaron con el descubrimiento de un tratamiento efectivo y una vacuna capaz de proteger contra la enfermedad.<sup>3</sup> Las medidas de control de la tuberculosis implementadas durante el siglo 20, principalmente la vacunación con una cepa viva y atenuada de *Mycobacterium bovis*, denominada Bacilo de Calmette y Guérin (BCG), en la década de 1930, y la introducción del primer medicamento con efecto antimicobacteriano en 1944, la estreptomina, lograron una disminución global en la incidencia de esta enfermedad.<sup>4</sup>

A pesar de los esfuerzos realizados, a partir de 1980 la incidencia de tuberculosis en todo el mundo incrementó de forma importante, y en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró estado de emergencia global contra la tuberculosis, urgiendo con esto a sus países

afiliados a redoblar esfuerzos encaminados a mejorar la detección, el tratamiento y la prevención de esta importante enfermedad.<sup>5</sup>

En los últimos 20 años, la aparición de cepas resistentes a los fármacos antifímicos,<sup>6, 7</sup> la diseminación de cepas de *M. tuberculosis* hipervirulentas como las del genotipo Beijing,<sup>8, 9</sup> la asociación de la tuberculosis con algún estado de inmunocompromiso -principalmente el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)<sup>10</sup>- o condiciones que facilitan la infección y la enfermedad (tabaquismo,<sup>11</sup> diabetes mellitus,<sup>12</sup> insuficiencia renal,<sup>13</sup> entre otras) y la movilización de personas infectadas o enfermas en viajes o migraciones causaron un resurgimiento de la pandemia. A la par se han intensificado los esfuerzos en la búsqueda de nuevos tratamientos, reactivos diagnósticos y una mejor vacuna que la actual BCG.<sup>14</sup>

## **Epidemiología**

El impacto epidemiológico de la tuberculosis en humanos es muy importante a nivel mundial;<sup>15</sup> de acuerdo con el Reporte Global de Tuberculosis 2020 de la OMS, que presenta los datos a nivel global de 198 países durante 2019, la incidencia estimada a nivel mundial de todas las formas clínicas de tuberculosis fue de 10.0 (8.9–11.0) millones de casos nuevos. Respecto a la mortalidad, se estima que ese mismo año hubo 1.2 (1.1–1.3) millones de muertes relacionadas con tuberculosis en personas negativas para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y 208,000 (177,000–242,000) muertes adicionales en personas positivas al VIH. Aún cuando la enfermedad puede afectar a ambos sexos en todos los grupos de edad, a nivel global en el año 2019 el mayor impacto fue en hombres de 15 años o más, quienes representaron el 56% del total de los casos, seguido por mujeres de 15 años o más (32%) e infantes menores de 15 años (ambos sexos) (12%).<sup>2</sup>

En México, hasta finales de 2020 (semana epidemiológica número 52) se reportaron un total acumulado de 34,578 casos probables de tuberculosis en todas sus formas; la tuberculosis pulmonar fue la más frecuente, con 31,590 casos (91.4); seguida por otras formas de tuberculosis

(no pulmonar, no meníngea) con 2,704 casos (7.8%) y la tuberculosis meníngea con 279 casos (0.8%).<sup>16</sup> En 2019 nuestro país registró una baja incidencia (por 100,000 habitantes) de tuberculosis respiratoria (15.64) a nivel nacional, sin embargo, en el interior del país la incidencia es altamente variable ya que hay Estados con incidencia alta (Baja California: 60.2, Sonora: 37.36; Tamaulipas: 33.31, Baja California Sur 31.59, Guerrero: 31.45, Tabasco: 30.22 y Sinaloa: 30.12, y Estados con incidencia baja (Tlaxcala: 2.42, Aguascalientes: 2.9, Estado de México: 3.26 y Zacatecas: 3.69); la mayor incidencia de todas las formas de tuberculosis en nuestro país se reporta en hombres de 20 años o mayores.<sup>17</sup>

## **El género *Mycobacterium***

### **Generalidades**

Las bacterias del género *Mycobacterium* pertenecen a la clase Actinobacteria, orden Actinomycetales y familia *Mycobacteriaceae*. Las principales características que distinguen a las micobacterias de otras bacterias son la presencia de ácidos micólicos en su pared celular, la resistencia al alcohol-ácido de la tinción de Ziehl-Neelsen y la alta proporción de guanina y citosina (G+C) en su DNA genómico.<sup>18, 19</sup>

El género incluye cerca de 188 especies, sin embargo, no todas son de importancia clínica para el ser humano. Las seis especies con mayor relevancia epidemiológica han sido agrupadas en el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* y *M. canettii*. Se ha documentado que los genomas de estas seis micobacterias tienen regiones ausentes o duplicadas, así como secuencias de inserción específicas en cada especie. Sus características genéticas las sitúan dentro del clado *Tuberculosis-Simiae*,<sup>20</sup> sin embargo, la clasificación del Complejo se ha basado principalmente en criterios epidemiológicos más que en aspectos moleculares.<sup>21-23</sup>

El principal agente causal de tuberculosis en humanos a nivel global es *M. tuberculosis*; mientras que *M. africanum* es responsable de un gran número de casos de tuberculosis en África



tropical. *M. canettii* es agente causal de linfadenitis en niños y tuberculosis generalizada en personas HIV-positivas. *Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en bovinos y humanos, y *M. microti* infecta roedores de campo, gatos, cobayos y otros animales de sangre caliente. A pesar de ser una especie vacunal, atenuada a partir de una cepa virulenta de *M. bovis*, la cepa *M. bovis* BCG se ha asociado con linfadenitis o diseminación secundarias a la aplicación de la vacuna por vía intradérmica, o intravesical para el tratamiento de cáncer de vejiga, respectivamente, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos.<sup>18</sup>

### **Microbiología**

Las micobacterias son microorganismos aeróbicos, no formadores de esporas, no móviles, de forma bacilar y ligeramente curvos o rectos de 0.2 – 0.6 µm por 1 – 10 µm. La morfología colonial varía dependiendo la especie, y puede ser desde lisa hasta rugosa y de pigmentada a no pigmentada. Algunas especies forman colonias de color debido a la presencia de carotenos, y pueden ser amarillas, anaranjadas o rosas. Su tiempo de generación es de 16-20 h y dependiendo de la especie el crecimiento de las colonias en medios óptimos puede ocurrir desde en pocos días hasta seis semanas de cultivo. Además de su clasificación taxonómica, las micobacterias se clasifican por su velocidad de su crecimiento: las de rápido crecimiento son aquellas especies que se desarrollan en menos de siete días al ser cultivadas en medio sólido (Löwenstein-Jensen) a partir de un inóculo diluido y bajo condiciones óptimas de cultivo (temperatura, CO<sub>2</sub>, humedad). Las especies de lento crecimiento son las que, bajo esas mismas condiciones, se desarrollan en más de siete días. Muchas especies se adaptan a sustratos relativamente simples, y el CO<sub>2</sub> y los ácidos grasos favorecen su crecimiento. Las temperaturas en las cuales pueden crecer van de 30 °C a 45 °C, dependiendo de la especie de micobacteria.<sup>18</sup>

19

Una de las características distintivas de las micobacterias es su pared celular, la cual posee un alto contenido de péptido-glicolípidos (entre los que se encuentran los ácidos meso-

diaminopimélico, glutámico y murámico) así como alanina, glucosamina, arabinosa y galactosa)<sup>18</sup>; además, contiene también ácidos micólicos, que se caracterizan por tener entre 60 y 90 átomos de carbono y, junto con los lípidos libres (como la trealosa-6'6'-dimicolato), representan una barrera hidrofóbica muy resistente tanto a agentes físicos como químicos, gracias a lo cual algunas especies de micobacterias pueden sobrevivir a condiciones extremas de desecación, radiación, pH e incluso los desinfectantes convencionales.<sup>18, 24, 25</sup> Las características de la pared son también relevantes para la interacción con el hospedero pues hacen a la bacteria resistente a los mecanismos de eliminación de patógenos del sistema inmune tales como la fagocitosis, la opsonización por anticuerpos y el sistema de complemento.<sup>26, 27</sup> Adicionalmente, la pared de las micobacterias tiene baja permeabilidad a los antibióticos convencionales que se utilizan para el tratamiento de la tuberculosis, lo que favorece la selección de cepas resistentes y dificulta la eliminación y el control de la tuberculosis.<sup>28</sup>

Debido a la gran cantidad de lípidos en su pared, las micobacterias son impermeables a la mayoría de las tinciones basadas en anilina. Aún cuando la tinción de Gram no es el método óptimo para teñirlas, las micobacterias pueden comportarse como microorganismos positivos a esa tinción. La principal técnica de tinción para visualizar micobacterias es la tinción de Ziehl-Neelsen, la cual se basa en la introducción de un colorante liposoluble (carbol-fucsina en etanol y fenol) por medio de la dilatación por calor de la pared bacteriana, seguido de una decoloración con alcohol-ácido clorhídrico y una contra-tinción con azul de metileno; los bacilos que resisten esta tinción aparecen teñidos de rojo. Las micobacterias, junto con otros actinomicetos son los únicos microorganismos que resisten esta tinción, por los que se les denomina bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Además de esta tinción, para la identificación de micobacterias se emplean también métodos basados en fluorescencia como: la tinción con Naranja de Acridina y con Auramina-Rodamina; y diversos métodos de tinción por medio de anticuerpos.<sup>29</sup>

## **Inmunopatología de la Tuberculosis**

En la infección pulmonar, la respuesta inmune contra la micobacteria se compone de dos fases: la primera se distingue por la respuesta innata del huésped al primer contacto con la bacteria y consta del reconocimiento, fagocitosis y lisis de las micobacterias –no de todas- por parte de macrófagos alveolares y células dendríticas pulmonares. En la segunda etapa, los macrófagos presentan los antígenos de la micobacteria a nivel ganglionar a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II [MHC-II] y producen interleucina (IL)-2 e IL-12, con lo que se estimulan los linfocitos T y las células NK, respectivamente. En esta etapa las células dendríticas inducen la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia una respuesta TH1, la cual provoca migración celular al sitio de la infección y la activación de macrófagos y monocitos para fusionar los lisosomas con los fagosomas y migrar al sitio de la infección, respectivamente. Al haber migración de linfocitos y macrófagos al sitio de la infección, estos se agrupan de tal manera que conforman un granuloma, el cual se distingue por tener células gigantes multinucleadas - macrófagos fusionados- con micobacterias fagocitadas en su interior, rodeados por linfocitos T y B y fibroblastos, con lo cual se favorece la contención de la infección y se evita la diseminación de los bacilos. Dentro del granuloma, la producción de interferón gama (IFN- $\gamma$ ), por parte de los linfocitos T activados y las células NK, estimula la activación de macrófagos para promover la destrucción de las micobacterias fagocitadas. De manera concomitante, en los nódulos linfáticos, los linfocitos T CD4+ estimulan la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, que reconocerán a la bacteria en un contexto extracelular.<sup>30, 31</sup>

## **Diagnóstico**

Aún cuando la tuberculosis puede presentarse en cualquier órgano o sistema, la presentación clínica más frecuente es la pulmonar. Dependiendo del órgano afectado, las manifestaciones clínicas varían y los signos y síntomas muchas veces reflejan la localización y la gravedad de la enfermedad. Algunas de las manifestaciones generales de la tuberculosis incluyen fiebre con

sudoración (predominantemente nocturna), pérdida de peso y linfadenopatías regionales.<sup>32</sup> En la tuberculosis pulmonar, la presencia de tos con flemas con sangre se asocia con estadios avanzados de la enfermedad. En todos los casos, el diagnóstico definitivo de la tuberculosis se hace por medio de la observación de BAAR en muestras clínicas, seguida del aislamiento y la identificación por cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*. El principal estudio de gabinete con el que se puede apoyar un diagnóstico clínico de tuberculosis pulmonar es la radiografía de tórax y, dentro de los estudios de laboratorio, se encuentran la identificación por medio de amplificación por PCR de genes de *M. tuberculosis* en muestras clínicas, así como la evaluación de la reactividad al derivado purificado de proteínas de *M. tuberculosis* (PPD) y la medición de la producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos de sangre periférica, estas últimas dos metodologías se basan en la administración de antígenos micobacterianos de naturaleza proteica y la cuantificación de la magnitud de la respuesta inmune adaptativa.<sup>33, 34</sup>

## **Tratamiento**

El tratamiento de la tuberculosis es farmacológico. Los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* deben ser analizados para determinar la susceptibilidad a medicamentos antimicobacterianos y, de acuerdo con los resultados, se determina el nivel de resistencia. Las bacterias pueden ser resistentes únicamente a rifampicina (RR-TB), o presentar resistencia a este antibiótico y además a isoniazida (multi-drogo resistentes (MDR-TB)); si, además de ser resistentes a estos dos medicamentos, también lo son a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos un fármaco parenteral de segunda línea (kanamicina, amikacina, capreomicina u ofloxacina), entonces se denomina tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB).<sup>35</sup>

Si no hay sospecha, ni se documenta resistencia bacteriana a algún medicamento, el esquema de tratamiento de la tuberculosis consiste en la combinación de cuatro fármacos (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) por 2 meses, seguido de la administración de dos medicamentos (isoniazida y rifampicina) por cuatro meses adicionales, o por seis meses en

caso de que la presentación clínica del paciente lo amerite (gran cantidad de bacterias en la baciloscopía y cavitaciones pulmonares).<sup>36</sup>

En los últimos años, el surgimiento de cepas resistentes a uno o más fármacos se ha incrementado, lo que obliga a modificar los esquemas o la duración de los tratamientos, con el riesgo consecuente de mayor toxicidad o falla terapéutica. Se estima que en 2019 alrededor de medio millón de personas a nivel global desarrolló RR-TB, de los cuales 78% tuvieron MDR-TB.<sup>2</sup>

Los avances terapéuticos de los últimos años contra la tuberculosis han resultado en el desarrollo de varios fármacos que son de utilidad para el tratamiento de la tuberculosis resistente; entre ellos se encuentran la diarilquinolina (inhibidor de la ATP sintetasa micobacteriana), el delamanid y el proteomanid (nitroimidazoles que inhiben la síntesis de ácido micólico), el linezolid y el sutezolid (oxazolidinonas que inhiben la síntesis proteica), la clofazimina (inhibidor de la síntesis de ADN micobacteriano) y varios carbapenémicos con actividad antimicobacteriana (imipenem-cilastatina, meropenem, que inhiben la síntesis de la pared bacteriana).<sup>36</sup>

### **Genómica micobacteriana**

A partir de la secuenciación del genoma completo de la cepa de laboratorio *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en 1998 se comenzaron a dilucidar muchas de las características de esta bacteria en cuanto a evolución, virulencia, metabolismo y muchas otras funciones celulares.<sup>22</sup> En la actualidad hay 877 genomas completos de especies de *Mycobacterium* secuenciados<sup>37</sup>, la mayoría de ellas patógenas o potencialmente patógenas para el ser humano (Tabla 1). Los genomas son muy similares entre sí; y aunque el número de nucleótidos oscila entre 3.27 y 6.99 millones de pares de bases (Mpb), el tamaño de los genomas de todas las cepas de *M. tuberculosis* (incluida la cepa atenuada H37Ra) se mantiene en alrededor de 4.4 Mpb; y en el caso de *M. bovis* y *M. bovis* BCG son 4.35 y 4.38 Mpb, respectivamente. La diferencia más marcada la constituye *M. leprae*, con el genoma más pequeño del género (3.3 Mpb), con el menor número de genes (2,770) y el mayor número de pseudogenes (1,115).<sup>38, 39</sup>

**Tabla 1.** Genomas completos de bacterias del género *Mycobacterium* con secuencias accesibles a través del portal del *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

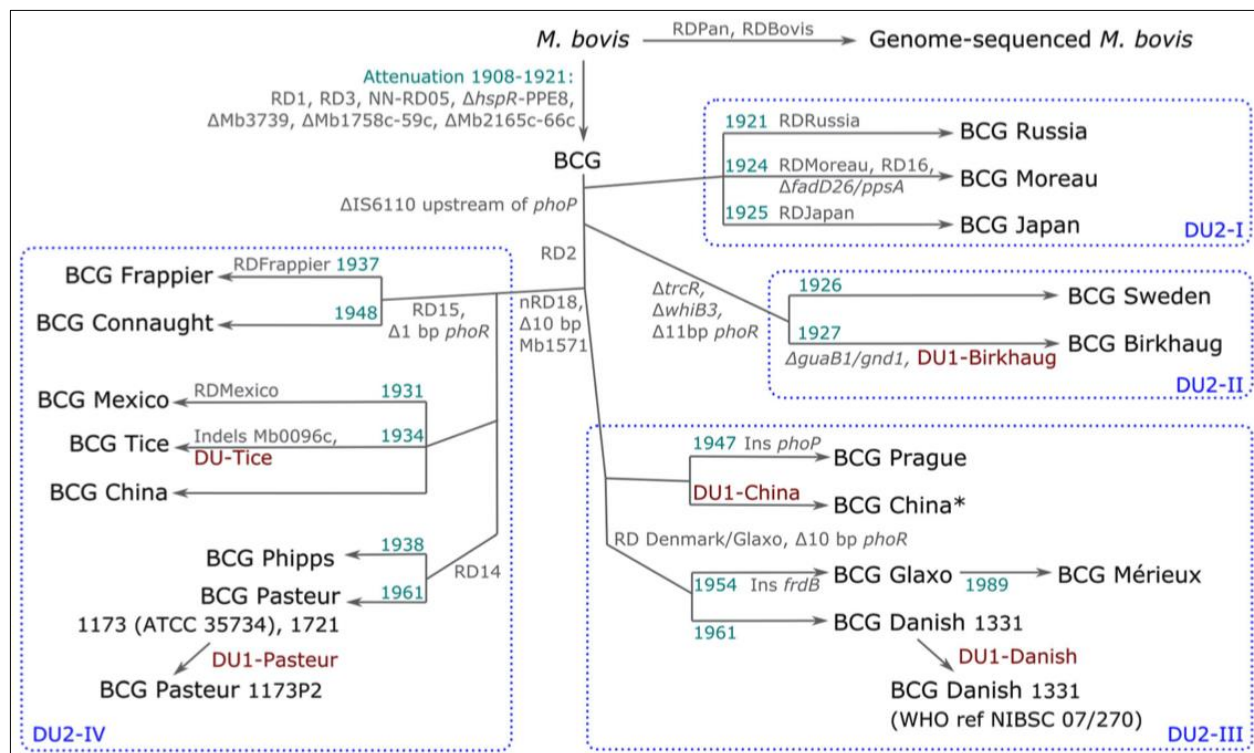
<b>Especie</b>	<b>Número de genomas completos disponibles</b>
<i>M. tuberculosis</i> *	560
<i>M. avium</i> *	76
<i>M. bovis BCG</i>	18
<i>M. intracellulare</i> *	61
<i>M. leprae</i>	6
<i>M. marinum</i>	12
<i>M. bovis</i>	21
<i>M. ulcerans</i>	6
Otras especies	117
<b>TOTAL</b>	<b>877</b>

Tomado de referencia<sup>37</sup>. \*Incluye subespecies.

Uno de los aspectos más relevantes en el análisis de los genomas micobacterianos ha sido la identificación de genes presentes en las cepas virulentas y ausentes en las atenuadas, y su relación con los eventos de patogenia e inmunogenicidad. Una de las principales diferencias entre las micobacterias virulentas y las atenuadas es la delección en estas últimas de la región diferencial 1 (RD1), la cual contiene nueve marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) que codifican proteínas inmunogénicas y participan de los eventos de patogénesis en las primeras fases de la infección.<sup>22, 40</sup> Estas proteínas son la proteína de 6 kDa antigénica de secreción temprana (ESAT-6, por sus siglas en inglés—*Early Secretory Antigen Target 6 kDa*) y la proteína de 10 kDa del filtrado de cultivo (CFP-10, por sus siglas en inglés—*Culture Filtrate Protein 10 kDa*).<sup>41-43</sup> Se ha descrito ampliamente el reconocimiento de estas dos proteínas por el sistema inmune, tanto en respuesta celular como humoral.<sup>44-46</sup>

### **Genómica de *Mycobacterium bovis* BCG**

La distribución de la cepa “original” de BCG Pasteur a diferentes laboratorios alrededor del mundo provocó el surgimiento de diversas subcepas BCG con características propias.<sup>47, 48</sup> El análisis genético comparativo de esas subcepas, tomando como referencia la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv permitió determinar que existen regiones diferenciales (RD), duplicaciones (DU) y secuencias de inserción (IS) diferentes entre las subcepas BCG.<sup>41, 49, 50</sup> Posteriormente, la secuenciación del genoma de la subcepa *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2<sup>21</sup> permitió un análisis más detallado que identificó características específicas en cada cepa (nuevas regiones y diferencias específicas en la DU2). El número de ORFs involucrados en las diferencias es variable, ya que dependiendo de la combinatoria de RD y DU pueden ser desde 101 (BCG Tokyo) hasta 148 (BCG Pasteur).<sup>21</sup> El análisis de los genomas de las subcepas BCG México<sup>51</sup> y Korea 1168P<sup>52</sup> y la subcepa Danesa 1331, que es la de referencia para la producción de vacuna BCG a nivel mundial,<sup>53</sup> ha permitido realizar una genealogía más refinada de las subcepas disponibles. En la Figura 1 se presenta la genealogía refinada de las subcepas BCG, en la cual puede consultarse el año en el que se aisló y tipificó cada subcepa, así como las ausencias o ganancias de material genético.



**Figura 1.** Genealogía refinada de las subcepas BCG.

Tomado de referencia<sup>53</sup>. RD, Regiones diferenciales; Ins, Inserciones; Δ, Deleciones; DU, Duplicaciones en tándem. En azul pálido se muestra el año en que se obtuvo cada subcepa.

Desde hace varios años se ha investigado la relación que existe entre el nivel de protección y las características genéticas de las subcepas BCG, sin embargo no ha sido posible determinar una correlación directa entre los cambios genómicos en las BCG y su eficacia protectora.<sup>54, 55</sup> Por un lado, los estudios realizados en humanos presentan diferencias metodológicas entre ellos, tales como la edad de vacunación, la subcepa BCG empleada, el seguimiento y la endemicidad de la tuberculosis, entre otros, con lo cual la comparación no permite hacer conclusiones definitivas;<sup>56-58</sup> y por el otro, los experimentos en modelos animales han mostrado una marcada heterogeneidad en los resultados, sin importar con que subcepa se hayan vacunados los animales.<sup>59, 60</sup>

Al no poder determinarse el nivel de protección en función de las características del genoma de cada BCG, se sugiere que la regulación de la expresión genética y la síntesis de proteínas

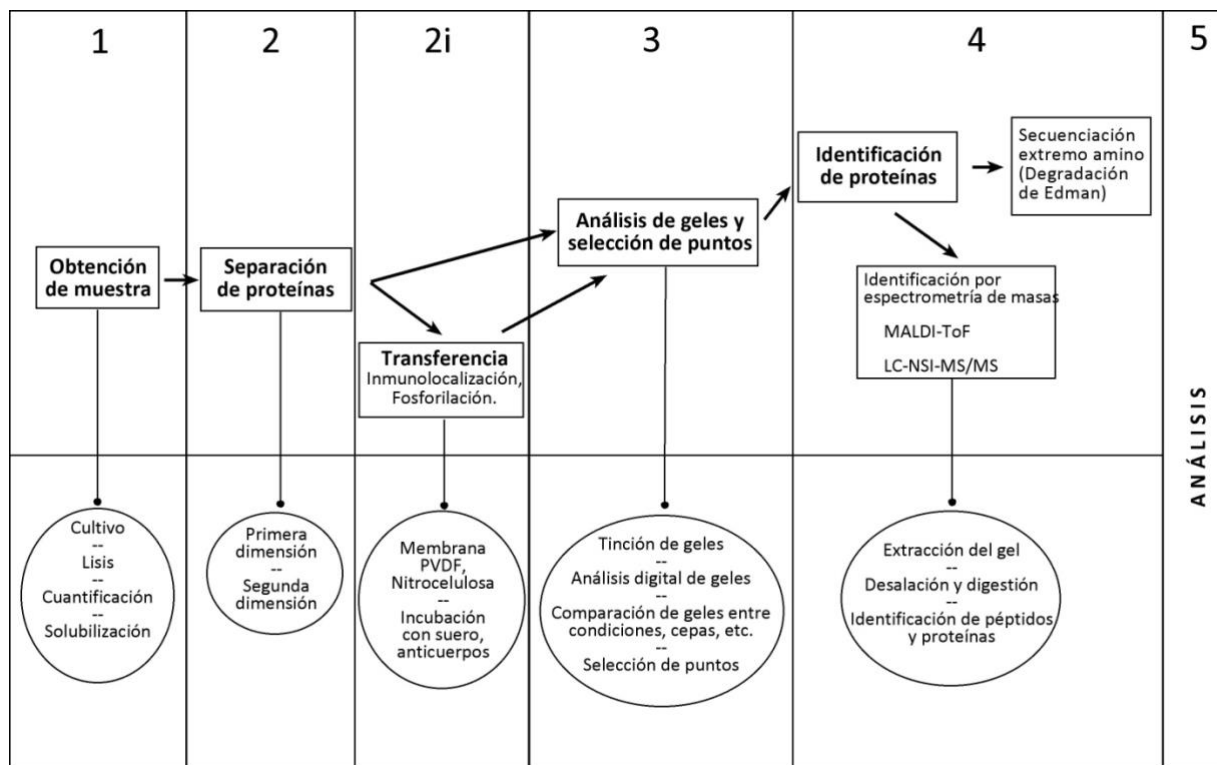


bacterianas durante la infección pueden participar en la inducción de la respuesta inmune protectora de las vacunas BCG, o en el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el estudio de las diferencias a nivel de las proteínas micobacterianas permitirá identificar moléculas relacionadas con la eficacia protectora de las subcepas BCG, o con la patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis.

### **Análisis proteómico**

El componente proteico de una célula en un momento determinado se denomina “proteoma”,<sup>61</sup> y la proteómica es la aplicación de metodologías para el estudio del proteoma de una célula, tejido u organismo.<sup>62</sup> El análisis proteómico puede llevarse a cabo por medio de diversas metodologías: i) Técnicas convencionales como la cromatografía, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el Western blot; ii) Técnicas avanzadas como los microarreglos de proteínas, los estudios basados en geles, la espectrometría de masas y la secuenciación de Edman; iii) Técnicas cuantitativas por medio del marcaje con isótopos radioactivos; iv) Técnicas de alta resolución como la cristalografía de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, y v) Técnicas de análisis bioinformático.<sup>62</sup>

La electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) es una de las metodologías más empleada para la separación de muestras y la visualización de proteínas. Establecida por O’Farrell, en esta metodología las proteínas son separadas de acuerdo con dos características: su punto isoeléctrico (el pH en el cual la carga neta de la proteína es 0 (primera dimensión) y su masa molecular (segunda dimensión).<sup>63</sup> La capacidad de resolución de la 2D-PAGE es variable, y existen reportes en los que se han logrado resolver hasta 10,000 proteínas diferentes en una muestra.<sup>64, 65</sup> En la Figura 2 se presentan los principales pasos que se siguen para llevar a cabo un análisis proteómico basado en 2D-PAGE.



**Figura 2.** Esquema de trabajo para el análisis proteómico basado en geles.

### Proteómica de *Mycobacterium*

El estudio del proteoma micobacteriano inició en la década de 1970, cuando por electroforesis y cromatografía se aislaron y caracterizaron los primeros antígenos de *M. tuberculosis* de naturaleza proteica.<sup>66</sup> La mayoría de los estudios subsecuentes se enfocaron en la búsqueda de proteínas inmunogénicas útiles para el diagnóstico o la vacunación, o de moléculas blanco de nuevos fármacos para combatir no sólo la tuberculosis sino otras enfermedades.<sup>67, 68</sup>

### Proteómica de *Mycobacterium bovis* BCG

El estudio de las proteínas micobacterianas ha sido un componente clave para descifrar los mecanismos de patogenicidad de esa bacteria, así como para determinar el rol que juegan las proteínas en la inducción de respuesta inmune en el hospedero.<sup>66, 69</sup> La primera subdivisión de

las subcepas BCG con base en patrones de secreción de proteínas se hizo con el antígeno MPT64;<sup>70</sup> más adelante, por medio de estudios proteómicos basados en geles de poliacrilamida se caracterizaron de forma más completa las subcepas BCG,<sup>71</sup> y se identificaron proteínas tanto de la fracción celular como del sobrenadante de cultivo (proteínas de secreción) involucradas en los procesos de patogenia y respuesta inmune.<sup>72</sup> Uno de los esfuerzos más relevantes en este respecto ha sido el realizado por el Instituto Max Planck para la Biología de las Infecciones (MPIIB), que ha llevado a cabo la integración de una base de datos abierta con el análisis de los proteomas de varios microorganismos, entre ellos dos cepas virulentas de *M. tuberculosis* (H37Rv y Erdman) y dos subcepas de *M. bovis* BCG (Chicago y Copenhague), que sirve como referencia para la comparación y análisis de trabajos equivalentes.<sup>73</sup> La complementariedad de los estudios proteómicos con la información genómica disponible ha permitido complementar ambas aproximaciones metodológicas para identificar blancos terapéuticos, componentes diagnósticos más específicos y nuevas vacunas contra la tuberculosis.

Por medio del análisis proteómico se han identificado proteínas importantes para la sobrevivencia micobacteriana, algunas de ellas descritas como factores de virulencia (MPT40, Ag85), otras involucradas en respuesta a estrés oxidativo y bajas concentraciones de oxígeno (proteína homóloga a la  $\alpha$ -cristalina, la proteína reguladora Rv3133c, y dos proteínas anotadas como hipotéticas (Rv2623 y Rv2626c),<sup>74</sup> en la sobrevivencia al ambiente intracelular o la falta de nutrientes de *M. tuberculosis*<sup>75</sup> o descritas como inmunógenos (ESAT-6 y CFP-10).<sup>76</sup> El análisis comparativo de los proteomas de varias subcepas BCG ha identificado diferencias y similitudes entre ellas tanto en la fracción celular,<sup>77</sup> como en el filtrado de cultivo<sup>78</sup> y el sub-proteoma de la membrana celular.<sup>79</sup> Hasta ahora la mayoría de los trabajos publicados han sido realizados con cepas estándar de laboratorio, de las cuales no siempre se tiene información sobre su comportamiento en modelos *in vivo*. Los avances en análisis proteómico a través de la secuenciación con el sistema Orbitrap-cuadrupolar y otras metodologías basadas en la

espectrometría de masas han incrementado sensiblemente la detección de muchas proteínas previamente no descritas, y han permitido identificar proteínas micobacterianas que participan en la virulencia y patogénesis.<sup>80-83</sup>

### **La vacuna *Mycobacterium bovis* BCG**

Para la prevención de las formas graves de la tuberculosis en humanos (meníngea y miliar) se realiza la aplicación de la vacuna con el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) en dosis única al nacer; esta vacuna, que fue desarrollada por los investigadores Albert Calmette y Camile Guérin en Francia hace más de cien años, contiene los bacilos vivos atenuados de *Mycobacterium bovis*.<sup>84</sup> Su uso en humanos comenzó en 1921, y durante los años subsiguientes se distribuyeron las cepas semilla de la vacuna a más de 50 laboratorios en diferentes países en todo el mundo para su producción local y aplicación.<sup>47</sup> Hasta que se introdujo la preservación de cepas por liofilización y ultracongelación en 1960, las subcepas BCG eran conservadas con subcultivos, los cuales provocaron cambios a nivel genético que tuvieron impacto en las características microbiológicas de cada una de ellas,<sup>49, 85</sup> lo anterior puede haber sido una de las causas de las variaciones en cuanto a los niveles de protección conferidos por este biológico.<sup>56, 86, 87</sup>

En México, la vacuna BCG se aplica en dosis única a todos los recién nacidos vivos al momento del nacimiento o antes del primer año de vida y pueden utilizarse una de cinco subcepas (Pasteur 1173P2, Danesa 1331, Glaxo 1077, Tokio 172 o Montreal); en caso de que el individuo que se va a vacunar presente enfermedad moderada o grave aguda, bajo peso al nacer (<2 Kg) o desnutrición la vacunación se debe posponer hasta que existan condiciones adecuadas. La principal contraindicación para la vacunación es el inmunocompromiso, sin importar si la inmunosupresión es primaria o secundaria<sup>88, 89</sup>

### Variabilidad de la vacuna BCG

Las primeras diferencias identificadas entre subcepas BCG fueron las diferencias macroscópicas que existían en las colonias de las subcepas BCG al ser cultivadas en condiciones estándares y al ser inoculadas en animales de experimentación,<sup>90</sup> así como por la detección de proteínas antigénicas producidas diferencialmente por las subcepas BCG.<sup>47, 91</sup> Posteriormente, se completaron numerosos ensayos de vacunación en humanos en varios países, cuyo meta-análisis reveló una importante variabilidad en la eficacia protectora de la BCG contra la tuberculosis, al igual que en las metodologías empleadas en los estudios clínicos para su evaluación.<sup>56, 86, 87, 92</sup> Entre los factores que inciden sobre la eficacia de la vacuna BCG se encuentran i) la subcepa con la que se vacuna, ii) la edad de aplicación de la vacuna, iii) la endemidad de la tuberculosis en el país y iv) la presencia de micobacterias no tuberculosas (MNT) en el medio ambiente.<sup>93</sup>

Con la finalidad de evaluar la capacidad protectora de diez subcepas BCG provenientes de colecciones de laboratorios de investigación en condiciones estandarizadas (subcepas Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice, Dinamarca, México, Birkhaug, Suecia y Moreau), en nuestro laboratorio se realizó un estudio en el cual se comparó su eficacia protectora en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.<sup>60</sup> El estudio se basó en la evaluación de la sobrevida, la hipersensibilidad retardada (DTH), las unidades formadoras de colonias (UFC) de *M. tuberculosis* H37Rv en pulmón, el porcentaje de neumonía, las subpoblaciones linfocitarias y los perfiles de citoquinas. Los resultados mostraron que la protección conferida por las subcepas a los animales frente al reto con *M. tuberculosis* H37Rv fue heterogénea, permitiendo tener un grupo de vacunas con los niveles de protección más elevados, otro con niveles intermedios y uno más con las vacunas con los niveles de protección más bajos. La subcepa que mostró la mayor eficacia protectora fue BCG Phipps; entre las subcepas que mostraron una protección intermedia se

encontró BCG Pasteur, y entre las que mostraron los niveles más bajos de protección estuvieron BCG Tice y Danesa.

BCG Phipps es una subcepa derivada directamente de BCG Pasteur en 1938, aproximadamente en el paso 575;<sup>41</sup> junto con Pasteur, ambas subcepas pertenecen al grupo DU2-IV,  $\Delta$ int, y las dos diferencias genéticas entre ellas es que BCG Pasteur presenta la DU1 y la RD14.<sup>53</sup> BCG Tice es una subcepa derivada de BCG Pasteur en 1933-34, la cual fue enviada a Estados Unidos de Norteamérica (EUA) para su preparación; durante los años siguientes la subcepa presentó sobre atenuación, por lo que fue combinada junto con otras tres subcepas y liofilizada en 1952.<sup>47</sup> Esta subcepa pertenece al grupo DU2-IV,  $\Delta$ int, y, al igual que la subcepa Phipps, sus únicas diferencias con BCG Pasteur son la presencia de las regiones DU1 y RD14.<sup>53</sup> Existen dos subcepas BCG México, una derivada directamente de la subcepa Danesa-1331 y denominada BCG México-1997, y otra llamada México-1931, que fue la primera semilla para la producción de esta vacuna que se tuvo en nuestro país. El perfil genético de la BCG México-1931 la sitúa dentro del grupo DU2-IV, en el mismo en el que se encuentran BCG Phipps, Tice y Pasteur 1173, entre otras.<sup>51, 53</sup>

En el presente trabajo se estudió el proteoma de la fracción celular de cinco subcepas BCG (Phipps, Tice, Glaxo-Dinamarca, México-1997 y México-1931) por medio de 2D-PAGE en condiciones estándar de cultivo, identificándose proteínas únicas, comunes y con diferencias en cantidad relativa entre las subcepas por medio de análisis por MS. De igual manera, se estudió el proteoma de la cepa virulenta de referencia *M. tuberculosis* H37Rv en condiciones estándar de cultivo y de cepas de *M. tuberculosis* aisladas de muestras clínicas de tuberculosis pulmonar. Estudios como el presente permiten identificar proteínas relevantes para los procesos biológicos de la bacteria y que pudieran servir como herramientas diagnósticas, blancos terapéuticos o componentes de nuevas vacunas contra esta importante enfermedad.

## JUSTIFICACIÓN

Ante la demostrada variabilidad genética de las subcepas que son empleadas como vacuna única contra la tuberculosis, la vacuna BCG, es conveniente completar la caracterización de estas, particularmente de su perfil de expresión de proteínas. El análisis proteómico de las subcepas BCG permitirá identificar proteínas relevantes para la fisiología bacteriana, la patogénesis de la tuberculosis y la inmunidad contra la BCG. De igual forma, este tipo de análisis en cepas virulentas de *M. tuberculosis* permitirá identificar proteínas que pudieran conducir al diseño de nuevas herramientas para el diagnóstico, tratamiento o prevención de esta importante enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

Si la expresión diferencial del proteoma de las subcepas vacunas BCG y la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv provoca respuesta inmune o procesos patológicos diferentes, entonces el análisis proteómico comparativo permitirá identificar proteínas relevantes para el metabolismo, la patogénesis o la inmunogenicidad de cada cepa.



## OBJETIVOS

### General

1. Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de la fracción celular de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* BCG, relacionadas teórica o experimentalmente con la sobrevivencia o inmunogenicidad micobacterianas, o con la patogénesis de la tuberculosis.

### Específicos

1. Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de cinco subcepas de *M. bovis* BCG *in vitro*.
2. Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*.
3. Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* obtenidas de aislamientos clínicos de tuberculosis pulmonar.

## DISEÑO DEL ESTUDIO

**Objetivo 1: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de cinco subcepas de *M. bovis* BCG *in vitro*.**

1. Estandarización del cultivo y lisis de cinco subcepas de BCG (México-1997, México-1931, Glaxo-Dinamarca, Phipps y Tice), purificación de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D-PAGE) para cada subcepa.
2. Análisis de los proteomas con el programa de cómputo PD-Quest (Bio-Rad).
3. Comparación de la intensidad de expresión de las proteínas en los proteomas de BCG Glaxo-Dinamarca y Phipps.
4. Identificación por medio de técnicas basadas en espectrometría de masas (cromatografía líquida con nano electro spray acoplado a un tándem de espectrometría de masas (LC-NS-MS/MS), o desorción/ionización láser asistida por matriz -tiempo de vuelo- acoplada a espectrometría de masas (MALDI-ToF-MS)) de las proteínas seleccionadas.

**Objetivo 2: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*.**

1. Obtención y análisis de los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 en condiciones estándares de cultivo (con las metodologías estandarizadas en el *Objetivo 1*).
2. Comparación de la intensidad de expresión de proteínas en los proteomas de BCG México-1931 y *M. tuberculosis* H37Rv.
3. Identificación por LC-NS-MS/MS o MALDI-ToF-MS de las proteínas seleccionadas.

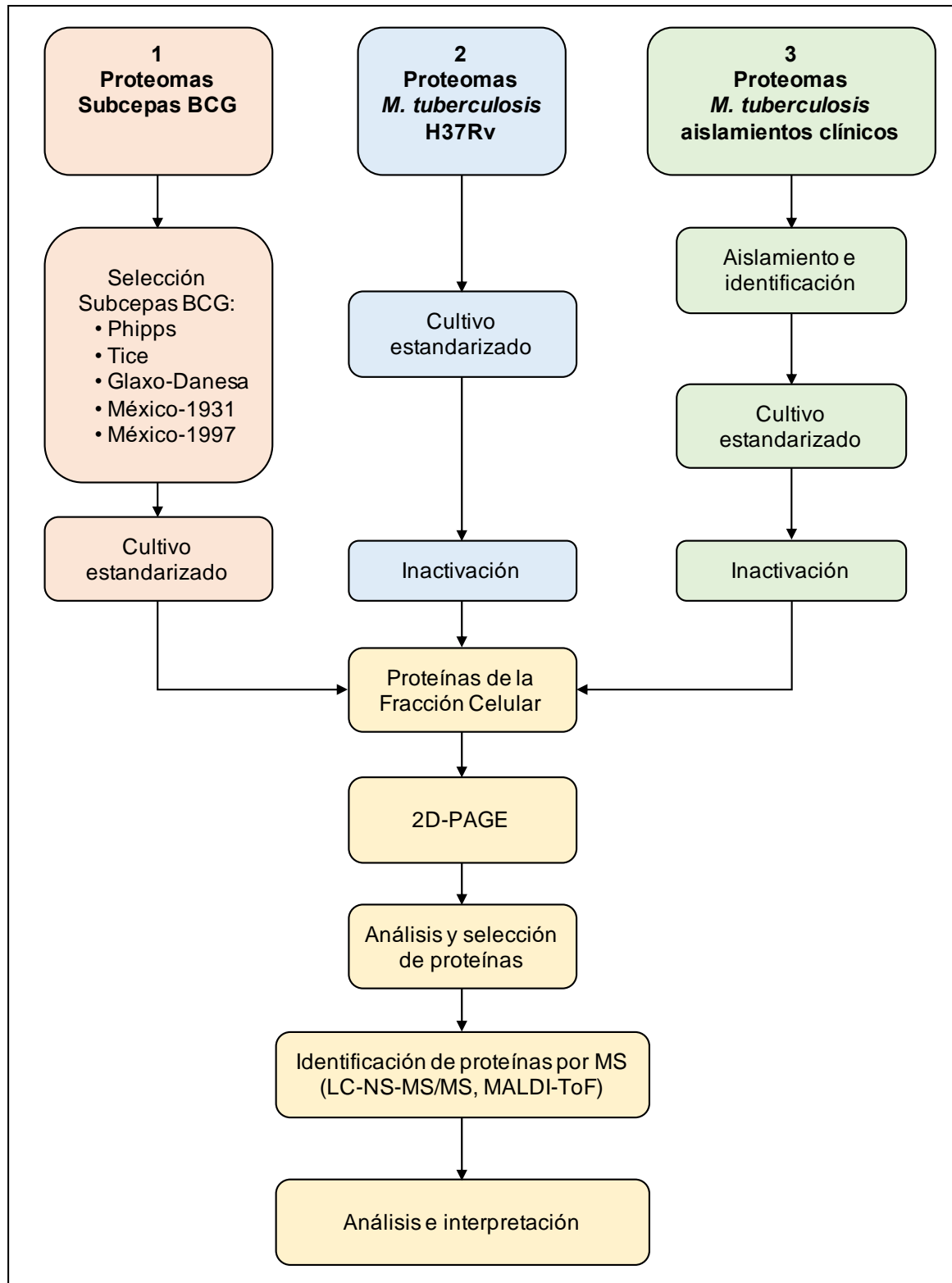
**Objetivo 3: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* obtenidas de aislamientos clínicos de tuberculosis pulmonar.**

Objetivo 3.1: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) y *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, e identificar las proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Objetivo 3.2: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) crecidas *in vivo*, e identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

## **METODOLOGÍAS**

El análisis proteómico de las micobacterias se realizó con proteínas obtenidas de la fracción celular de bacterias obtenidas de cultivos en condiciones estándar, que fueron preparadas para su separación por medio de 2D-PAGE y posterior análisis. Las proteínas de interés en los geles fueron extraídas de los mismos y analizadas con metodologías basadas en espectrometría de masas, lo que permitió la identificación de las proteínas. El diagrama general de la estrategia metodológica se presenta en la Figura 3. En la Figura 4 se presenta el resumen de la metodología empleada para la construcción y análisis de los proteomas. A continuación, se describen los detalles metodológicos para cada uno de los objetivos del estudio.



**Figura 3.** Diagrama general de la estrategia metodológica general de este estudio.

**Objetivo 1: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de cinco subcepas de *M. bovis* BCG *in vitro*.**

1. Se incluyeron en este estudio cinco subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG: Glaxo-Dinamarca (inicialmente Pasteur), Phipps, Tice, México-1997 y México-1931.
2. El cultivo de las subcepas se hizo conforme a las técnicas estandarizadas en trabajos previos en el grupo<sup>94, 95</sup> (ver el *Anexo II. Técnicas de Laboratorio* de esta tesis). A partir de alícuotas congeladas a -70 °C de cada subcepa se hizo la siembra en placas de medio Middlebrook 7H10, enriquecido con ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC), incubado durante 14 días a 37 °C en atmósfera con 3.5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Al término de ese tiempo se tomó una colonia que se resembró en 125 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) y 0.2% de Tween 80, en incubación a 37 °C con agitación orbital (80 rpm) por 8 días.
3. La lisis de las bacterias se llevó a cabo por sonicación en agua desionizada estéril en frío (15 pulsos de 1 min con la máxima potencia de salida seguido de 1 min de reposo) con 10 mM del inhibidor de proteasas Fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) (ver el *Anexo II. Técnicas de Laboratorio* de esta tesis).
4. La cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford<sup>96</sup> (ver el *Anexo II. Técnicas de Laboratorio* de esta tesis).
5. Preparación de las proteínas para la electroforesis de dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2D-PAGE): Solubilización de 100 µg de proteínas en CHAPS 4%, Urea 9M y DTT 70 mM.; rehidratación de tiras de IPG pH 4-7 de 11 cm con la muestra para el isoelectroenfoque (primera dimensión) a 52,000 VH en una cámara Multiphor II (Amersham, USA); equilibrio de las tiras en solución reductora y alquilante; 2ª dimensión en geles al 15% en una cámara Hoeffler S600 (Hoeffler, USA) (50 V por 30 min, seguido de 1 hr a 100 y posteriormente 150 V hasta el final de la corrida). Después de fijar las

proteínas, los geles fueron teñidos con nitrato de plata, y las imágenes fueron captadas en el fotodocumentador GS800 (BioRad) y analizadas con el programa PDQuest (BioRad).

6. Análisis comparativo de los proteomas de las cinco subcepas BCG, y localización de las proteínas propias de cada una de ellas, así como las comunes a todas.
7. La determinación de los perfiles genéticos de las subcepas se realizó por medio de PCR múltiple como parte de los trabajos del grupo con lo cual se corroboró que, excepto la subcepa Pasteur, todas las demás correspondían con el patrón previamente descrito para cada una.<sup>97</sup> El perfil genético de la subcepa Pasteur correspondió al de las subcepas Glaxo-Dinamarca, por lo que se hizo la corrección de la nomenclatura.
8. Análisis comparativo a detalle de los proteomas de las subcepas BCG Phipps y BCG Glaxo-Dinamarca. Se identificaron por espectrometría de masas (MALDI-ToF o LC/NS/MS/MS) 11 proteínas que presentaron diferencias en la intensidad de expresión entre las dos subcepas y se realizó la búsqueda en bases de datos y literatura para determinar su participación en el metabolismo central de las micobacterias, en virulencia, adaptación o inmunogenicidad.

**Objetivo 2: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*.**

Para tener una plantilla de referencia para los análisis de cepas de micobacterias virulentas, se obtuvo el proteoma de la fracción celular de *M. tuberculosis* H37Rv bajo condiciones estándares de cultivo, y se comparó con el proteoma de *M. bovis* BCG México-1931 siguiendo las metodologías estandarizadas en el *Objetivo 1*.

**Objetivo 3: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* obtenidas de aislamientos clínicos de tuberculosis pulmonar.**

Las muestras se obtuvieron en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 'Daniel Cosío Villegas' (INER), donde se llevó a cabo su procesamiento inicial de la siguiente manera: se colectaron tres muestras seriadas de esputo (aproximadamente 30 mL) de cada paciente de días consecutivos, tomadas conforme a la Guía de Práctica Clínica correspondiente.<sup>98</sup> De forma individual, para cada paciente, se mezclaron las muestras para integrar una suspensión final, la cual se descontaminó por medio del protocolo de descontaminación universal (N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sodio).<sup>99</sup> Se concentraron las bacterias por centrifugación, y se observaron al microscopio de fluorescencia con auramina rodamina.

Objetivo 3.1: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) y *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, e identificar las proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Las bacterias provenientes de los aislamientos clínicos fueron sembradas en un frasco del sistema VersaTREK Myco de acuerdo con las especificaciones del fabricante y cultivadas hasta la determinación automática de positividad en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INER. Posteriormente, tanto las bacterias provenientes de las muestras clínicas como las *M. tuberculosis* H37Rv provenientes de la colección del laboratorio se cultivaron conforme a lo estandarizado en un trabajo previo del grupo.<sup>94, 95</sup> Las bacterias fueron transferidas a un cultivo secundario en medio Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC, para ser cultivadas a 37 °C en agitación con 3.5 % de CO<sub>2</sub> por dos semanas, tiempo correspondiente con el final de la fase logarítmica en la curva de crecimiento conforme. Las bacterias fueron retiradas de la incubadora

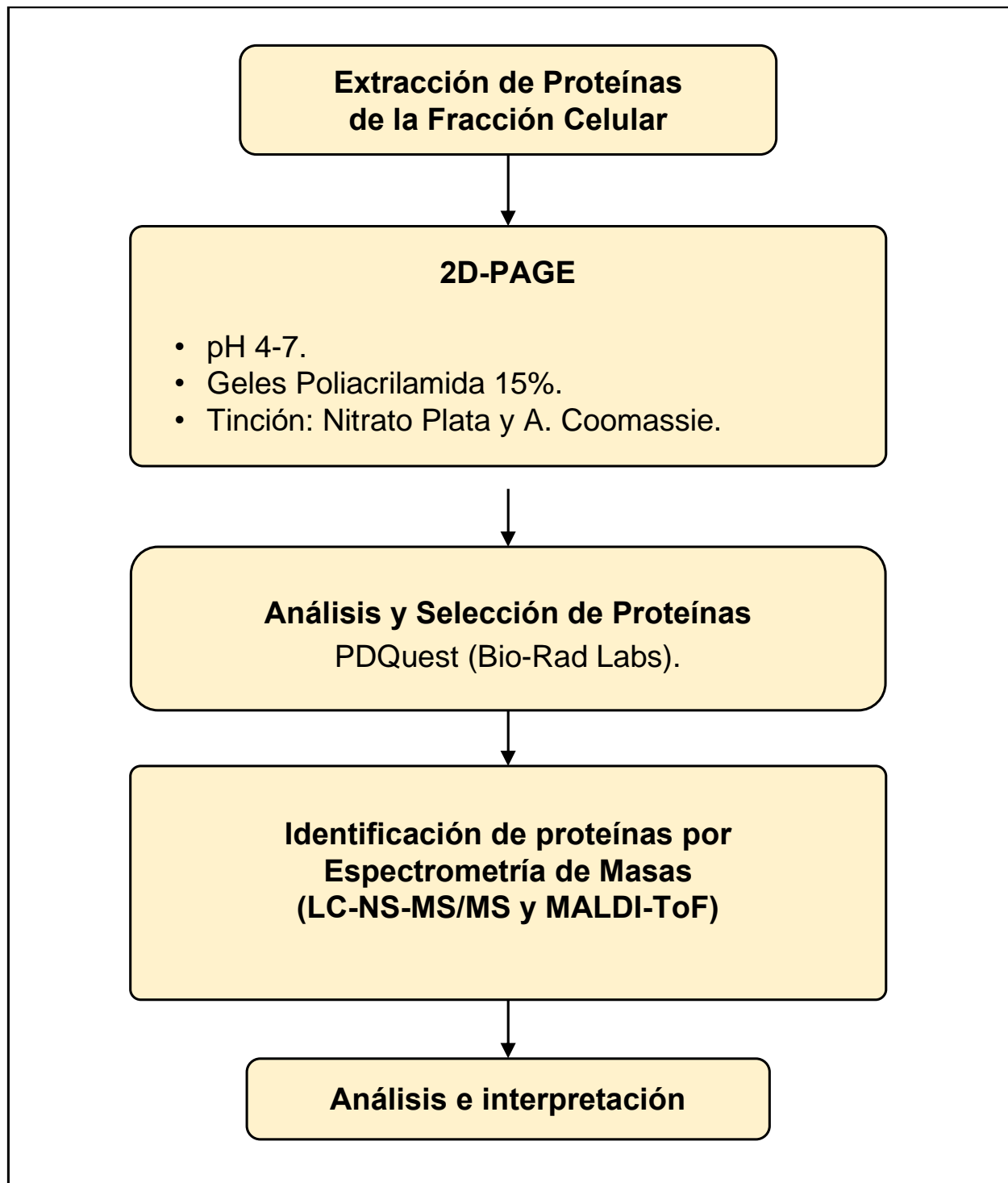


y congeladas a -70 °C hasta su uso. Antes de ser utilizadas, los matraces con el cultivo bacteriano fueron irradiados con rayos gamma a una dosis final de 13 kGy (en el Departamento del Irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares). Una vez inactivadas, se obtuvieron y analizaron los proteomas de las bacterias de acuerdo con los protocolos estandarizados durante el *Objetivo 1*.

Objetivo 3.2: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) crecidas in vivo, e identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Para cumplir con este objetivo, se realizaron diversos ensayos de estandarización para la obtención de las bacterias, entre los que se encuentran:

1. Resuspensión de las bacterias en agua desionizada estéril.
2. Inactivación de las micobacterias por irradiación (rayos gamma).
3. Lisis de las micobacterias en las muestras finales obtenidas por los diversos métodos.
4. Cuantificación de proteínas en las muestras.



**Figura 4.** Diagrama de las metodologías estandarizadas que se utilizaron para el análisis proteómico correspondiente a los tres objetivos descritos.

**RESULTADOS.**

**Objetivo 1: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de cinco subcepas de *M. bovis* BCG *in vitro*.**

Las sub-cepas utilizadas y su procedencia se describen en la Tabla 2.

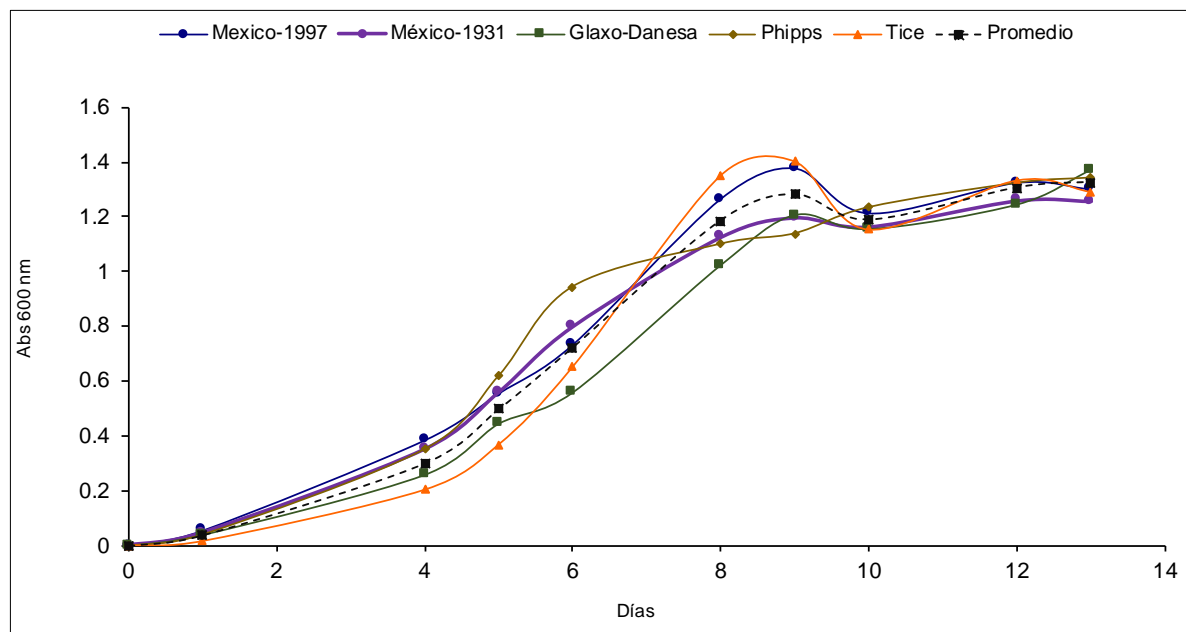
**Tabla 2.** Subcepas incluidas en este estudio.

Subcepa	Procedencia	Clasificación ATCC*
México-1997	Secretaría de Salud (SS), México	35738
Glaxo-Dinamarca	Dr. Mancilla / Instituto Pasteur	35734
Phipps	Dr. M.A. Behr / McGill University	35744
Tice	Dr. M.A. Behr / McGill University	35743
México-1931	Birmex, SS, México	n/a

\*ATCC: American Type Culture Collection; Birmex: Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México, S.A. de C.V.; n/a: no aplica.

**Cultivo, cosecha y lisis de las bacterias**

Las subcepas BCG fueron cultivadas y cosechadas bajo las condiciones estándar descritas en la sección de Metodología. No se encontraron diferencias en las curvas de crecimiento de las subcepas (Figura 5). La cosecha se realizó al día 8 del segundo cultivo (medio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC). La lisis de las bacterias se hizo por sonicación conforme a lo descrito previamente y los viales con las proteínas fueron congeladas a -70 °C hasta su uso.



**Figura 5.** Medición de la absorbancia durante el cultivo en medio líquido de las subcepas BCG en condiciones estándar.

Se realizaron tres geles de cada sub-cepa de BCG provenientes de cultivos independientes. La distribución de las proteínas en los geles presentó un patrón con la mayoría de las proteínas localizadas entre el pH 4.5 y 6, y dos grupos amplios de proteínas entre los 10 y 20 kDa y entre los 25 y 60 kDa, concordante con lo descrito en reportes previos equivalentes.<sup>71, 73</sup> A partir de las imágenes de los geles se integró una imagen única de cada sub-cepa para el análisis, la cual se denominó imagen *patrón*. La conformación de cada imagen patrón se realizó de acuerdo con lo descrito por Urquhart y cols.<sup>100</sup> y se incluyeron las proteínas que se encontraron en dos de los tres geles de cada sub-cepa. Las imágenes patrón de cada sub-cepa se utilizaron para el análisis comparativo entre las sub-cepas. Los detalles de la cuantificación se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Cuantificación de proteínas en los geles de cada subcepa BCG.

Subcepa BCG	Total de proteínas por gel			Promedio	DE	CV (%)	Proteínas incluidas en imagen patrón
	1	2	3				
México-1997	456	640	377	491.0	134.9	27.5	726
Glaxo-Dinamarca	478	608	552	546.0	65.2	11.9	742
Phipps	498	552	406	485.3	73.8	15.2	791
Tice	417	392	346	385.0	36.0	9.4	465
México-1931	448	505	438	463.7	36.1	7.8	488
Promedio	459.4	539.4	423.8	474.2	59.2	12.5	616.3

DE= Desviación estándar. CV= Coeficiente de variación= (DE/promedio) x100.

### **Análisis de las diferencias entre las subcepas BCG Glaxo-Dinamarca y Phipps**

Se decidió profundizar el análisis comparativo entre las subcepas Glaxo-Dinamarca y Phipps debido a que la primera se tenía clasificada como la subcepa de referencia (Pasteur) (lo que se modificó una vez que se realizaron los perfiles genéticos) y estaba en el grupo de subcepas de protección intermedia en el modelo murino de vacunación contra tuberculosis<sup>60</sup>, y la segunda había sido la subcepa que confirió la mayor proyección en el modelo murino. La comparación de los proteomas de las subcepas Glaxo-Dinamarca y Phipps reveló cambios en 544 puntos; se encontraron 168 (30.9%) proteínas únicas en BCG Phipps, y 90 (16.5%) únicas en BCG Glaxo-Dinamarca. De las proteínas con cambios en la intensidad, 51 (9.4%) y 86 (15.8%) mostraron aumento en intensidad entre 1.51 a 140.3 veces en la subcepa Glaxo-Dinamarca y Phipps, respectivamente). Setenta y dos (13.2%) proteínas no mostraron cambios de intensidad entre las subcepas. En la Tabla 4 se presentan los detalles del análisis.

**Tabla 4.** Descripción del análisis de los proteomas de las subcepas BCG Glaxo-Dinamarca y Phipps de acuerdo con los cambios en la intensidad de las proteínas en los 2D-PAGE.

Intensidad de los pixeles <sup>a</sup>		Número de puntos (n = 544) <sup>b</sup>	
		BCG Phipps % <sup>c</sup> (n)	BCG Glaxo- Dinamarca % <sup>c</sup> (n)
Únicas (incremento >140.4 veces)		30.9 (168)	16.5 (90)
Incremento de la intensidad (veces)	1 a 1.5	5.5 (30)	9.6 (52)
	1.51 a 2	4 (22)	6.4 (35)
	2.1 a 5	2.4 (13)	6.6 (36)
	5.1 a 10	1.5 (13)	2.2 (12)
	10.1 a 140.3	0.6 (3)	0.6 (3)
	Total	14 (81)	25.4 (138)
Sin cambio		13.2 (72)	13.2 (72)

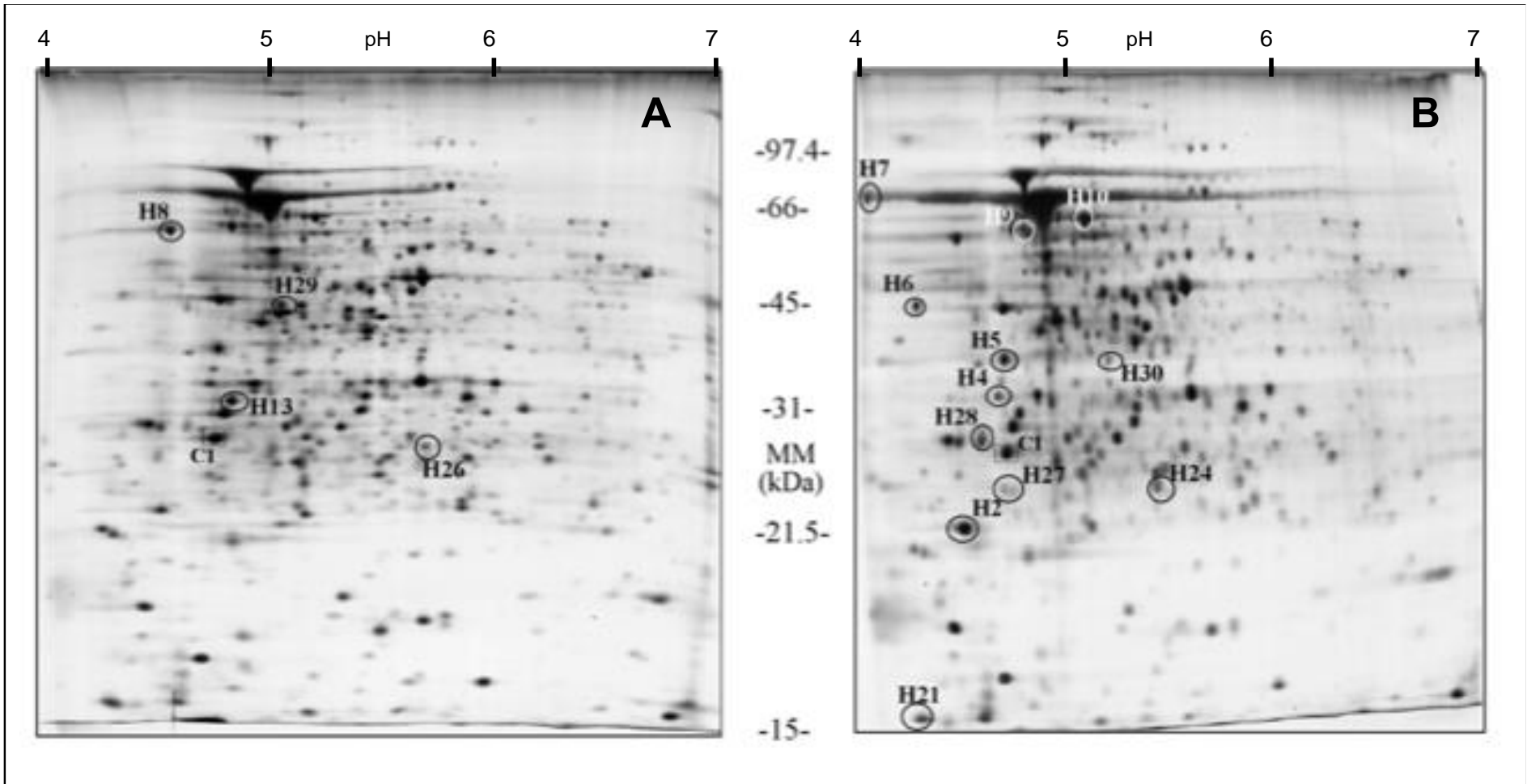
<sup>a</sup>Normalización de cada punto de acuerdo con la Densidad Total de la imagen del gel al cual pertenece; <sup>b</sup>Se incluyeron 544 puntos de la comparación de BCG Phipps vs. BCG Glaxo-Dinamarca en el análisis; <sup>c</sup>Se tomaron los 544 puntos como 100%.

Se seleccionaron 20 proteínas cuya intensidad en los geles fue diferente entre las subcepas y que fue posible su identificación por LC-NS-MS/MS. El análisis de los proteomas se realizó a partir de geles analíticos, mientras que, para la identificación, las proteínas se obtuvieron de geles preparativos. En la Figura 6 se muestran los proteomas de la fracción celular de BCG Phipps y Glaxo-Dinamarca; se señalan las proteínas que fueron seleccionadas para la identificación. La información sobre las características de los puntos analizados se presenta en la Tabla 5; a distribución de las proteínas identificadas de acuerdo con su función agrupada se presenta en la Tabla 6 y en la Tabla 7 y la Tabla 8 se presenta la información sobre la identificación de las proteínas analizadas.

**Tabla 5.** Características electroforéticas y cambios en la intensidad de los puntos seleccionados de los geles (marcados en la Figura 6).

Punto	Valores teóricos <sup>a</sup>		Valores experimentales <sup>b</sup>		Incremento en intensidad (veces)
	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI	
<i>Puntos con intensidad aumentada en BCG Phipps<sup>c</sup></i>					
H2	21.56	4.3	21.7	4.5	1.3
H4	34.9	4.9	33.1	4.34	1
H5	32.4	4.64	36.1	4.74	>140.4*
H6	32.7	4.7	44.1	4.18	>140.4
H7	56.72	4.56	68.1	4.0	2.8*
H9	42.98	4.73	51.2	4.72	2.8
H10	55.87	4.74	61.3	4.9	3.7
H21	17.25	4.1	16.89	4.34	5.1*
H24	24.4	5.6	24.4	5.5	2
H25	28.2	5.7	28.3	5.6	1.7
H27	25.4	4.4	25.4	4.7	1.5
H28	32.2	4.4	32.2	4.6	1.8
H30	36.0	5.1	36.1	5.2	1.3
<i>Puntos con intensidad aumentada en BCG Glaxo-Dinamarca<sup>d</sup></i>					
H8	56.72	4.56	62.4	4.55	4.2
H13	56.1	4.73	31.6	4.77	1.2
H26	29.3	5.8	29.2	5.7	1.8*
H29	37.1	4.9	37.5	5.1	1.1

<sup>a</sup>Masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI) teóricos (calculados *in silico* a partir de la secuencia genética que codifica la proteína) obtenidos de GenoList<sup>101</sup>; <sup>b</sup>Valores experimentales de los puntos en los geles de acuerdo con el análisis con el programa PDQuest Advanced 2-D Analysis V8.0; <sup>c</sup>Valor medio de la intensidad de los píxeles en la subcepa Phipps sobre la subcepa Glaxo-Dinamarca. \*Valor de p a una cola <0.05, prueba U-Mann-Whitney. <sup>d</sup>Valor medio de la intensidad de los píxeles en la subcepa Glaxo-Dinamarca sobre la subcepa Phipps.



**Figura 6.** 2D-PAGE representativos de las proteínas (80 µg) del extracto celular de *M. bovis* BCG Glaxo-Dinamarca (A) y Phipps (B).

Tiras IPG de 11 cm, con intervalo de pH 4-7; geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata. Se destacan algunas de las proteínas seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. MM= Masa molecular en Kilodaltones (kDa).



**Tabla 6.** Resumen de la distribución de las proteínas identificadas en BCG Phipps y Glaxo-Dinamarca, de acuerdo con su función agrupada.

Incremento en	Función de la proteína, n (%)			Total
	Respuesta Estrés <sup>a</sup>	Antígeno (inmunogenicidad) <sup>b</sup>	Funciones generales <sup>c</sup>	
BCG Phipps	4 (23.5)	5 (29.4)	8 (47.1)	17
BCG Glaxo-Dinamarca	1 (25.0)	0 (0)	3 (75.0)	4
Total	5 (23.8)	5 (23.8)	11 (52.4)	21

<sup>a</sup>Agrupación de acuerdo con la Categoría Funcional (CF) del gen o la proteína en GenoList<sup>101</sup>; respuesta a estrés incluye CF0: Virulencia, detoxificación y adaptación. <sup>b</sup>Antígeno (inmunogenicidad) de acuerdo a publicaciones previas, presentadas en la Tabla 10 y en la sección de Discusión de esta tesis; <sup>c</sup>Argupación de CF1: Metabolismo de lípidos, CF3: Procesos celulares y de pared celular y CF7: Metabolismo intermediario y respiración.

**Tabla 7.** Proteínas con incremento en la expresión en *M. bovis* BCG Phipps, con respecto a *M. bovis* BCG Glaxo-Dinamarca, identificadas por espectrometría de masas.

Clave	Datos de masas			Datos de la proteína		Datos del gen <sup>d</sup>			
	Péptidos alineados [#]	Cobertura (%) <sup>a</sup>	Puntaje global <sup>b</sup>	Nombre	Función (CF <sup>c</sup> )	Nombre (sinónimo)	Rv	MB	BCG
<i>Proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS</i>									
H5	[8]	29	129	Rv1794	Participa en el transporte de proteínas PE/PPE (4)	<i>Rv1794</i>	1794	1822	1826
H7	[13]	27	168	Chaperonina 2 60 kDa GroEL2. CPN60-2. Ag-65 kDa. Proteína de choque término 65. Proteína A de pared celular. Antígeno A	Previene el mal plegamiento y promueve el re-plegamiento y correcto ensamblaje de polipéptidos no plegados generados bajo condiciones de estrés (0)	<i>groL2</i> ( <i>groEL-2</i> , <i>hsp65</i> , <i>hsp60</i> , <i>Rv0440</i> )	0440	0448	0479
H9 (1)	[10]	25	101	MetK (posible S-adenosilmetionin-sintasa)	Cataliza la formación de S-adenosilmetionina de metionina y ATP (7)	<i>Rv1392</i>	1392	1427	1453
H9 (2)	[7]	35	52	GatA (posible glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferasa [sub-unidad A])	Componente del aparato traduccional (2)	<i>Rv3011c</i>	3011c	3036c	3033c
H10	[7]	23	163	GroEL1	Previene el mal plegamiento y promueve el re-plegamiento y correcto ensamblaje de polipéptidos no plegados generados bajo condiciones de estrés (0)	<i>groEL1</i> ( <i>cpn60_1</i> )	3417c	3451c	3487c
<i>Proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS</i>									
H2	[12]	55	442	AhpC (alkil hidroperoxi reductasa C)	Involucrada en respuesta a estrés oxidativo (0)	<i>ahpC</i> ( <i>Rv2428</i> )	2428	2454	2447
H4	[3]	17	52	Serin-proteínasa 2 del requerimiento A de alta temperatura (HtrA) (HtrA2, PepA, Mtb32A)	Posiblemente hidroliza péptidos y/o proteínas (7)	<i>htrA2</i> ( <i>pepA</i> , <i>mtb32a</i> , <i>Rv0125</i> )	0125	0130	0159
H6	[2]	17	52	Antígeno Mpt32 (glicoproteína 45 kDa)	Podría mediar la unión de la bacteria a la célula hospedera (3)	<i>apa</i> ( <i>mpt32</i> , <i>modD</i> , <i>Rv1860</i> )	1860	1891	1896

Clave	Datos de masas			Datos de la proteína		Datos del gen <sup>d</sup>			
	Péptidos alineados [#]	Cobertura (%) <sup>a</sup>	Puntaje global <sup>b</sup>	Nombre	Función (CF <sup>c</sup> )	Nombre (sinónimo)	Rv	MB	BCG
H21	[3]	22	198	CFP17	Secretada durante la infección / Inmunogénica (3)	<i>cfp17</i>	1827	1858	1862
H22	[4]	22	227	CFP17	Secretada durante la infección / Inmunogénica (3)	<i>cfp17</i>	1827	1858	1862
H23	[13]	55	442	Alkilhidroperoxi-reductasa	Involucrada en respuesta a estrés oxidativo (1)	<i>ahpC</i>	2428	2454	2447
H24	[8]	26	242	Enoil-CoA-hidratasa	Oxidación de ácidos grasos (1)	<i>echA3</i>	0632c	0649c	0679c
H25	[7]	23	245	Posible Hidrolasa	Participa en metabolismo celular (7)	<i>BCG3470</i>	3400	3433	3470
H26	[6]	24	161	Proteína de 35 kDa rica en alanina	Regulación de la homeostasis de lípidos de la pared / Inmunogénica (2)	<i>35kd_ag</i>	2744c	2765c	2760c
H27	[14]	26	227	Proteína de transcripción antiterminación	Participa en la terminación de la transcripción/ interactúa con fact. RHO y RNA Pol. (2)	<i>nusG</i>	0639	0658	0688
H28	[7]	25	318	Posible tioredoxina	Participa en reacciones redox (7)	<i>BCG1368</i>	1324	1359	1386
H30	[9]	31	575	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Participa en la segunda fase la glucólisis (7)	<i>gap</i>	1436	1471	1497

<sup>a</sup>Porcentaje de la secuencia que representan los péptidos secuenciados. <sup>b</sup>Para la identificación de proteínas por MALDI-TOF-MS (Desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo- acoplada a espectrometría de masas), se consideraron  $\geq 5$  péptidos coincidentes, y  $\geq 10\%$  cobertura de la secuencia; la puntuación  $>25$  indica identidad o alta homología ( $p < 0.05$ ); para LC/NSI-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a ionización por nano electrospray- tándem de espectrometría de masas) se consideraron  $\geq 2$  péptidos coincidentes, un puntaje individual de los péptidos  $\geq 25$ ,  $\geq 10\%$  de cobertura de la secuencia, y  $\geq 3$  coincidencias consecutivas en las series de los iones *y* y *b*; la puntuación  $>22$  indica identidad o alta homología ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup>CF = Categorías funcionales, de acuerdo con GenoList:<sup>101</sup> 0) Virulencia, detoxificación y adaptación, 1) Metabolismo de lípidos, 2) Vías de información, 3) Procesos celulares y de pared celular, 4) RNA estables, 5) secuencias de inserción y fagos, 6) PE/PPE, 7) Metabolismo intermediario y respiración, 8) Desconocida, 9) Proteínas reguladoras, 10) Conservadas hipotéticas. <sup>d</sup>Rv= Número del gen en *M. tuberculosis* H37Rv; MB= Número del gen en *M. bovis* AF2122/97; BCG= Número del gen en *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2.

**Tabla 8.** Proteínas con incremento en la expresión en *M. bovis* BCG Glaxo-Dinamarca con respecto a *M. bovis* BCG Phipps.

Clave	Datos de masas			Datos de la proteína		Datos del gen <sup>d</sup>			
	# péptidos alineados	Cobertura (%) <sup>a</sup>	Puntaje global <sup>b</sup>	Nombre	Función (CF <sup>c</sup> )	Nombre (sinónimo)	Rv	MB	BCG
<i>Proteínas identificadas por MALDI-TOF-MS*</i>									
H8	5	12	77	GroEL2	Previene el mal plegamiento y promueve el re-plegamiento y correcto ensamblaje de polipéptidos no plegados generados bajo condiciones de estrés (0)	<i>groL2 (groEL-2, hsp65, hsp60, Rv0440)</i>	0440	0448	0479
H13	5	10	53	FhaA (TB39.8)	Involucrada en la transducción de señales (9)	<i>Rv0020c</i>	0020c	0020c	0050c
<i>Proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS**</i>									
H26	6	24	161	Proteína de 35 kDa rica en alanina	Regulación de la homeostasis de lípidos de la pared / Inmunogénica (2)	<i>35kd_ag (Rv2744c)</i>	2744c	2765c	2760c
H29	8	19	358	Posible alcohol deshidrogenasa NADP-dependiente	Genera aldehído o cetona de alcohol (7)	<i>adhC (Rv3045)</i>	3045	3071	3069

<sup>a</sup>%Sec= Porcentaje de la secuencia que representan los péptidos secuenciados. <sup>b</sup>Para la identificación de proteínas por MALDI-TOF-MS (Desorción/ionización láser asistida por matriz- tiempo de vuelo- acoplada a espectrometría de masas), se consideraron  $\geq 5$  péptidos coincidentes, y  $\geq 10\%$  cobertura de la secuencia; la puntuación  $>25$  indica identidad o alta homología ( $p < 0.05$ ); para LC/ESI-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a ionización por nano electrospray- tandem de espectrometría de masas) se consideraron  $\geq 2$  péptidos coincidentes, un puntaje individual de los péptidos  $\geq 25$ ,  $\geq 10\%$  de cobertura de la secuencia, y  $\geq 3$  coincidencias consecutivas en las series de los iones *y* y *b*; la puntuación  $>22$  indica identidad o alta homología ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup>CF = Categorías funcionales, de acuerdo con GenoList<sup>101</sup>: 1) Virulencia, detoxificación y adaptación, 2) Metabolismo de lípidos, 3) Vías de información, 4) Procesos celulares y de pared celular, 5) secuencias de inserción y fagos, 6) PE/PPE, 7) Metabolismo intermediario y respiración, 8) Desconocida, 9) Proteínas reguladoras, 10) Conservadas hipotéticas. <sup>d</sup>Rv= Número del gen en *M. tuberculosis* H37Rv; MB= Número del gen en *M. bovis* AF2122/97; BCG= Número del gen en *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2.

De acuerdo con estudios genómicos, todos los genes que codifican las proteínas identificadas en este trabajo se encuentran presentes en el genoma de las subcepas Glaxo-Dinamarca y Phipps;<sup>21,41</sup> de igual forma, excepto una (H22), las 10 proteínas identificadas han sido descritas en trabajos proteómicos previos en las mismas ubicaciones en los geles (pI y MM), principalmente en los realizados por el MPIIB.<sup>73</sup> En la Tabla 9, se muestran las intensidades (en píxeles) de cada uno de los puntos descritos por el MPIIB.

**Tabla 9.** Intensidad en la base de datos del MPIIB<sup>73</sup> de los puntos correspondientes a las proteínas analizadas en este estudio.

Clave	Descrito por MPIIB en (intensidad en píxeles)	
	FC BCG Ch / Cop <sup>a</sup>	FC H37Rv <sup>b</sup>
H21	- / -	183 (en Snd <sup>c</sup> )
H22	- / -	-
H23	774 / 354	111.7
H24	251.9 / 320.7	219.1
H25	197.3 / 145.7	158.4
H26	446.5 / 346.7	391.2
H27	238 / 279	270.6
H28	32.2 / 120	128.9
H29 <sup>d</sup>	331.7, 330.9 / 187.2, 262.4	137.2, 229.9
H30	162 / 48	113.6

<sup>a</sup>FC = Fracción Celular de BCG Ch = Chicago y Cop = Copenhague.

<sup>b</sup>FC = Fracción Celular de *M. tuberculosis* H37Rv. <sup>c</sup>Snd = Sobrenadante. <sup>d</sup>Se ha identificado en dos puntos diferentes en los geles.

De las proteínas identificadas, se encontró que algunas participan en procesos relevantes para la inmunogenicidad de la vacuna BCG. Por ejemplo, la proteína CFP (puntos H21 y H22) ha sido descrita como un componente inmunogénico muy importante de *M. tuberculosis*,<sup>102</sup> presente tanto en la fracción celular como en el filtrado de cultivo <sup>103</sup>. En la Tabla 10, se muestra un resumen de los estudios previos que se han realizado en varias de las proteínas que también fueron identificadas en el presente trabajo.

**Tabla 10.** Proteínas identificadas en el presente trabajo, involucradas en diversos procesos biológicos relevantes para la infección por micobacterias.

Clave	Nombre Proteína	Ref.	Hallazgo
H21 y H22	CFP10 (Proteína del Filtrado de Cultivo 10)	104	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GarA, implicada en la regulación del almacenaje de glucógeno.</li> <li>• Tiene dominios “forkhead-associated” (FHA), que une péptidos con fosfotreonina.</li> </ul>
		105	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una proteína que contiene dominios FHA.</li> <li>• Sustrato fisiológico putativo de PknB, proteína cinasas Ser/Thr esencial en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.</li> <li>• Fue el mejor sustrato detectable del dominio catalítico de PknB en los extractos celulares no-desnaturalizados.</li> <li>• Es fosforilada por PknB.</li> <li>• Tiene un sitio de fosforilación en la región N-terminal, rica en Ser o Thr fuera del FHA.</li> </ul>
		103	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ha sido identificada como proteína inmunodominante, presente en la fracción celular y en filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.</li> </ul>
		102	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconocida en C57BL/10.</li> <li>• Asociada a CFP21, las más potentes inductoras de IFN-<math>\gamma</math> (40-60% del total de respuesta a CF-ST).</li> </ul>
	CFP17 (Proteína del Filtrado de Cultivo 17)	106	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Presente en filtrado de cultivo, pared celular, citoplasma y fracción celular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.</li> </ul>
		107	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CFP17 recombinante induce altos niveles de IFN-<math>\gamma</math> en ratón y en pacientes con TB.</li> </ul>
H24	EchA3 (Enoil-coA hidratasa 3)	108	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otra Enoil-coA hidratasa, EchA8, es 2.5 veces sobre-regulada a 96 hrs. de privación de nutrientes en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.</li> </ul>
		22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hay 21 enzimas homólogas pertenecientes a la superfamilia de las enoil-coA hidratasas/isomerasas.</li> </ul>
H25	Posible hidrolasa, Posible B- fosfoglucomutasa.	109	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rv3400 más expresado en BCG Tokyo y Pasteur que <i>M. bovis</i> virulentas.</li> </ul>
		22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posible B-fosfoglucomutasa.</li> </ul>
H27	NusG	110	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descrita con el mismo patrón electroforético que la proteína Hipotética Rv3705c.</li> </ul>
		78	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Al estudiar sobrenadante, se encuentra sólo en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y no en BCG.</li> </ul>

**Objetivo 2: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*.**

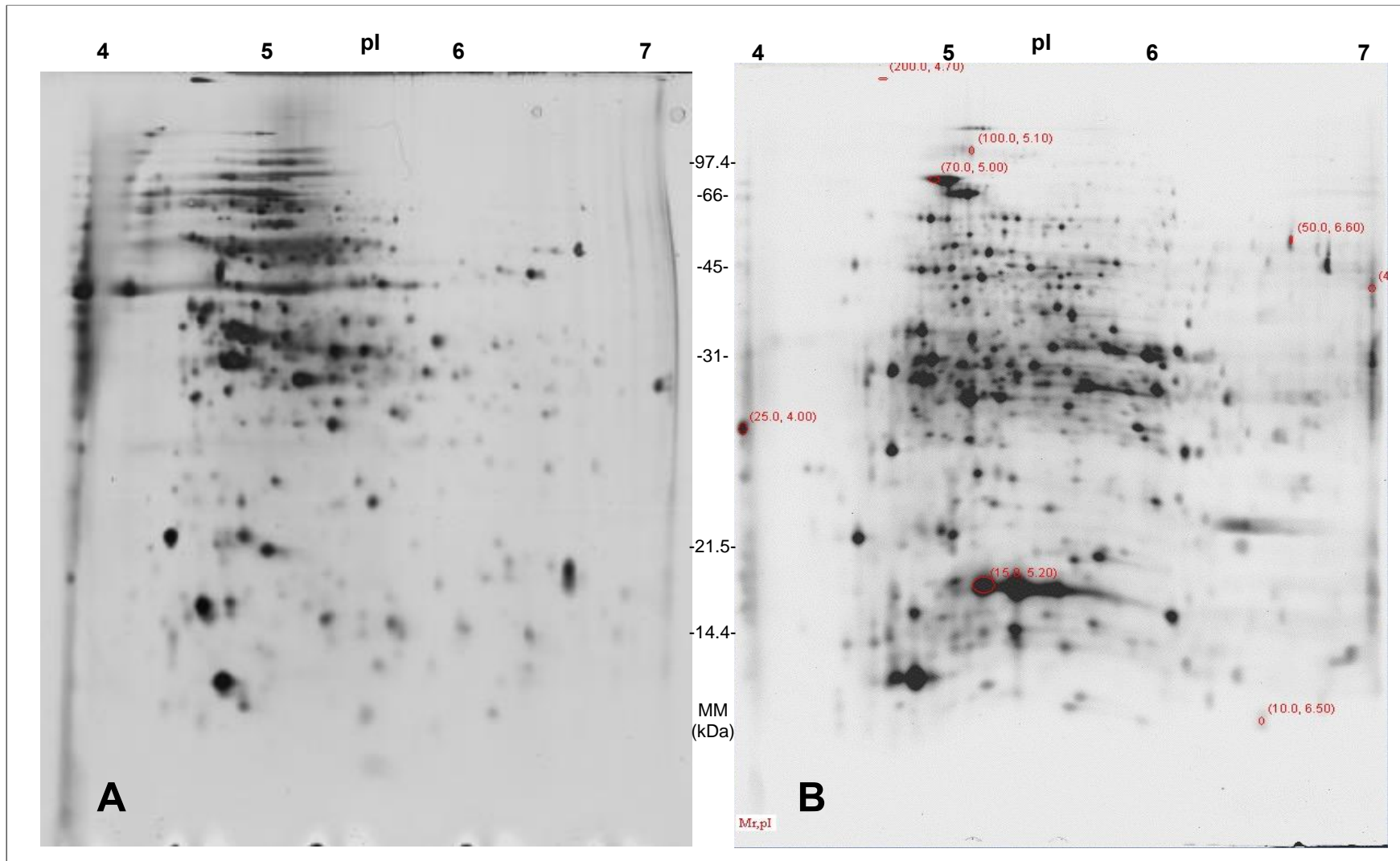
Objetivo 2.1: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*, e identificar las proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Se realizaron triplicados de los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv en condiciones estándares de cultivo a fin de contar con una plantilla de referencia para los análisis de cepas virulentas. Se construyó una imagen patrón, la cual fue comparada contra la imagen patrón de los geles de BCG México-1931. Todos los experimentos se realizaron con bacterias provenientes de cultivos independientes, y los geles fueron elaborados de acuerdo con la metodología previamente descrita (80 µg de proteínas, tiras IPG de 11 cm, pH 4-7, geles de poliacrilamida al 12% en 2 dimensiones (2D-PAGE) que se tiñeron con nitrato de plata. En la Tabla 11 se presentan los resultados de la cuantificación de las proteínas en los geles. La Figura 7 muestra una imagen representativa de los proteomas de BCG México-1931 (A) (488 puntos) y *M. tuberculosis* H37Rv (B) (546 puntos).

**Tabla 11.** Conteo de puntos en proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931.

Subcepa BCG	Total proteínas por gel			Prom.	DE	CV (%)	Proteínas incluidas en imagen patrón
	1	2	3				
BCG México-1931	448	505	438	463.7	36.1	7.8	488
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	311	546	612	489.7	158.2	32.3	546

DE= Desviación estándar. CV= Coeficiente de variación= (DE/promedio) x100.

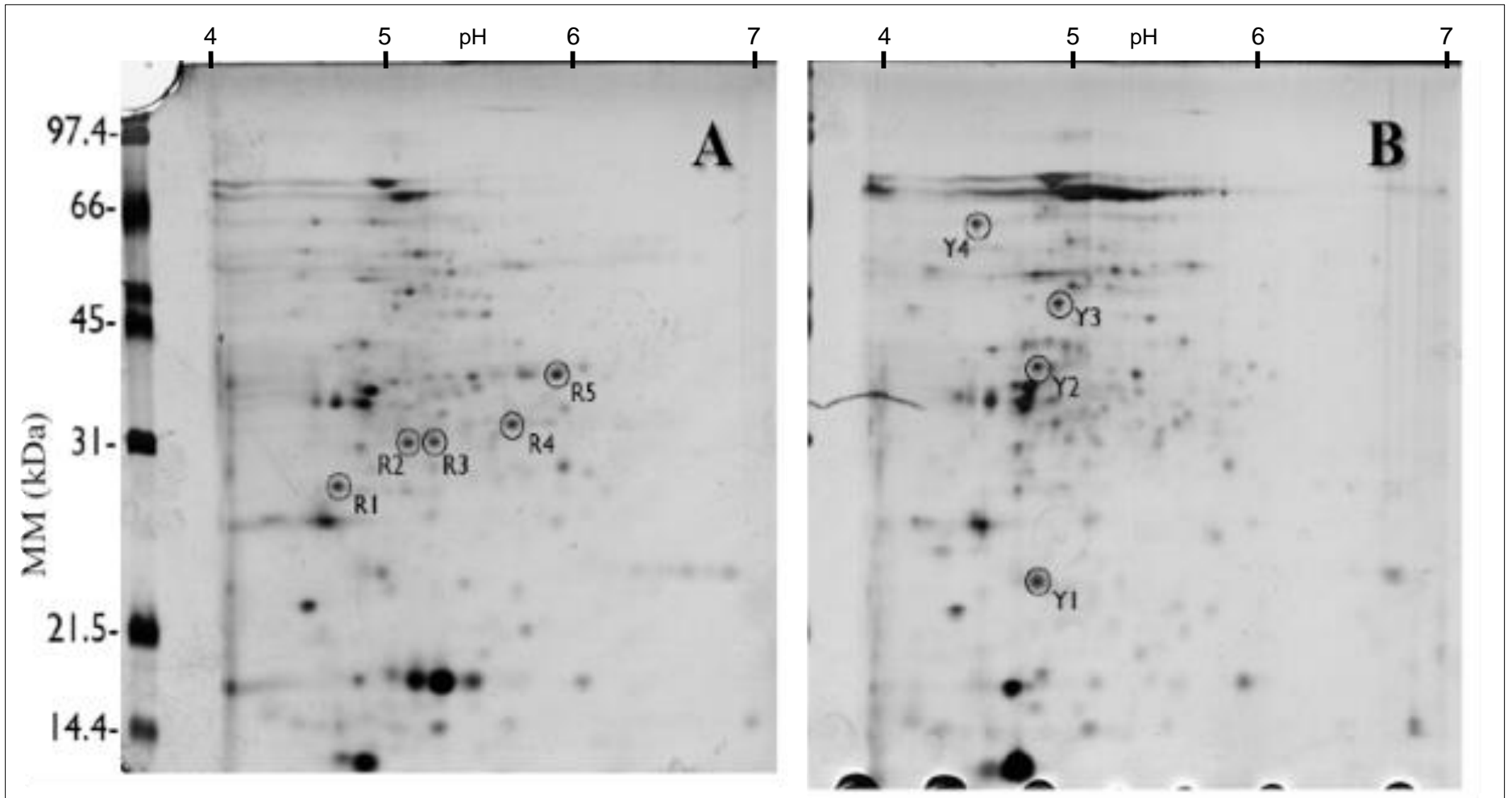


**Figura 7.** 2D-PAGE representativos de las proteínas (80  $\mu$ g) del extracto celular de BCG México-1931 (A) y *M. tuberculosis* H37Rv (B) (en rojo se muestran las proteínas empleadas para la calibración del análisis con el programa PDQuest). Tiras IPG de 11 cm, con intervalo de pH 4-7; geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata.



*Identificación de proteínas de M. tuberculosis H37Rv y BCG México-1931 in vitro*

El análisis comparativo de los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 permitió la localización de proteínas con variaciones en la intensidad de su expresión en una cepa con respecto a la otra. Se seleccionaron 9 proteínas para ser identificadas por cromatografía líquida/nano electro espray acoplado a espectrometría de masas (LC/NS/MS/MS, por sus siglas en inglés). En la Figura 8 se muestran las proteínas seleccionadas de los geles de *M. tuberculosis* H37Rv (A) y *M. bovis* BCG-México-1931 (B). En la Tabla 12 se describen las proteínas identificadas. En la Tabla 13 se presenta un resumen de la función de las proteínas identificadas.



**Figura 8.** 2D-PAGE representativos de las proteínas (80  $\mu$ g) del extracto celular de *M. tuberculosis* H37Rv (A) y *M. bovis* BCG México-1931 (B) (se señalan las proteínas seleccionadas para ser identificadas por LC/NS/MS/MS). Tiras IPG de 11 cm, con intervalo de pH 4-7; geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata. MM= Masa molecular en Kilodaltones (kDa).

**Tabla 12.** Proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv (A) y BCG México-1931 (B) identificadas por LC/NSI-MS/MS.

Clave	Datos de masas			Teórico		Experimental		Datos de la proteína		Datos del gen <sup>d</sup>			
	Péptidos alineados [#]	Cobertura (%) <sup>a</sup>	Puntaje global <sup>b</sup>	pl	MM (kDa)	pl	MM (kDa)	Nombre	Función (CF <sup>c</sup> )	Nombre (sinónimos)	Rv	MB	BCG
A) Proteínas con incremento en la expresión en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv con respecto a BCG México-1931													
R1	[1]	8	42	4.4	25.1	4.6	24.8	Mpt64	Secretada durante la infección / Inmunogénica (3)	<i>mpt64</i> ( <i>mpb64</i> )	1980c	2002c	Ausente
R2	[2]	8	60	4.9	30.8	5.7	34.6	Ag 85-B	Micolil Transferasa / Une fibronectina (1)	<i>fbpB</i> ( <i>mpt59</i> , <i>85B</i> )	1886c	1918c	1923c
R3	[2]	59	10	4.9	30.8	5.7	34.5	Ag 85-B	Micolil Transferasa / Une fibronectina (1)	<i>fbpB</i> ( <i>mpt59</i> , <i>85B</i> )	1886c	1918c	1923c
R4	[2]	61	2	6.1	35.8	6.5	35.6	Ag 85-A	Micolil Transferasa / Une fibronectina (1)	<i>fbpA</i> ( <i>mpt44</i> , <i>85A</i> )	3804c	3834c	3866c
R5	[5]	22	218	5.5	31.7	5.6	31.6	TB31.7	Proteína de estrés universal (10)	<i>tb31.7</i>	2623	2656	2650
B) Proteínas con incremento en la expresión en <i>M. bovis</i> BCG México-1931 con respecto a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv													
Y1	[1]	5	59	4.7	18.3	4.5	18.3	Pirofosfatasa inorgánica	Cat: pirofosfato + H <sub>2</sub> O = 2 ortofosfato (7)	<i>ppa</i>	3628	3652	3686
Y2	[1]	2	65	4.7	30.5	4.5	30.3	Oxidoreductasa	Involucrada en met. celular (7)	<i>Rv2971</i>	2971	2996	2993
Y3	[3]	8	122	4.9	37.8	4.6	37.7	Posible NAD(P) transhidrogenasa- $\alpha$ -subunid. alfa	Cat: NADPH + NAD <sup>+</sup> = NADP + DADH (7)	<i>pntAA</i>	0155	0160	0191

LC/NSI-MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a ionización por nano electrospray- tándem de espectrometría de masas). <sup>a</sup>Porcentaje de la secuencia que representan los péptidos secuenciados. <sup>b</sup>Se consideraron  $\geq 2$  péptidos coincidentes, un puntaje individual de los péptidos  $\geq 25$ ,  $\geq 10\%$  de cobertura de la secuencia, y  $\geq 3$  coincidencias consecutivas en las series de los iones y y b; la puntuación  $>22$  indica identidad o alta homología ( $p < 0.05$ ). <sup>c</sup>CF = Categorías funcionales, de acuerdo con GenoList:<sup>101</sup> 1) Virulencia, detoxificación y adaptación, 2) Metabolismo de lípidos, 3) Vías de información, 4) Procesos celulares y de pared celular, 5) secuencias de inserción y fagos, 6) PE/PPE, 7) Metabolismo intermediario y respiración, 8) Desconocida, 9) Proteínas reguladoras, 10) Conservadas hipotéticas. <sup>d</sup>Rv= Número del gen en *M. tuberculosis* H37Rv; MB= Número del gen en *M. bovis* AF2122/97; BCG= Número del gen en *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2. pl= Punto isoeléctrico; MM= Masa molecular.

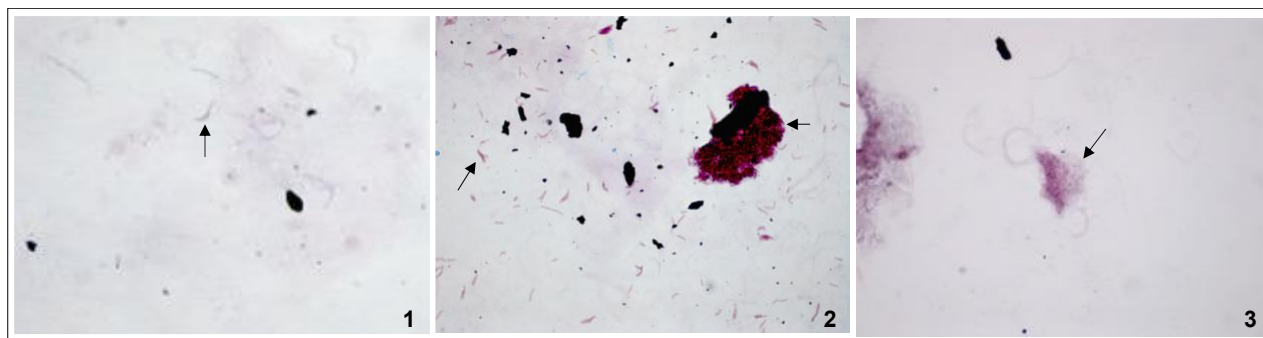
**Tabla 13.** Resumen de la distribución de las proteínas identificadas en *M. tuberculosis* H37Rv y en BCG México-1931, de acuerdo con su función agrupada.

Incremento en	Función de la proteína*, n (%)			Total
	Respuesta Estrés <sup>a</sup>	Antígeno (inmunogenicidad) <sup>b</sup>	Funciones generales <sup>c</sup>	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1 (20.0)	4 (80.0)	0 (0)	5
BCG México-1931	0 (0)	0 (0)	3 (100.0)	3
Total	1 (12.5)	4 (50.0)	3 (37.5)	8

<sup>a</sup>Agrupación de acuerdo con la Categoría Funcional (CF) del gen o la proteína en GenoList<sup>101</sup>; respuesta a estrés incluye CF0: Virulencia, detoxificación y adaptación. <sup>b</sup>Antígeno (inmunogenicidad) de acuerdo a publicaciones previas, presentadas en la Tabla 10 y en la sección de Discusión de esta tesis; <sup>c</sup>Agrupación de CF1: Metabolismo de lípidos, CF3: Procesos celulares y de pared celular y CF7: Metabolismo intermediario y respiración.

Adicionalmente, se hicieron ensayos para analizar los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv obtenida de un modelo murino de tuberculosis pulmonar experimental vacunado con diferentes subcepas de BCG y *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*.

Para estos ensayos se utilizaron los pulmones de los ratones infectados en el estudio previo realizado en nuestro laboratorio.<sup>60</sup> Las bacterias se obtuvieron por medio de homogenización del tejido, tamizado, sonicación, centrifugación y lisis. En ninguno de los experimentos se obtuvieron cantidades suficientes para realizar el análisis proteómico como había sido estandarizado previamente (80 µg), por lo cual no fue posible realizar el análisis proteómico como estaba previsto. En la Figura 9 se muestran las imágenes de microscopía de las micobacterias obtenidas en tres experimentos independientes. En la Tabla 14 se muestran los rendimientos de proteínas en los experimentos.



**Figura 9.** Imágenes representativas de las muestras con bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) obtenidos de los pulmones de ratones infectados.

Se observaron 10 mL de suspensión; tinción de Ziehl-Neelsen (x100). Las flechas señalan los BAAR.

**Tabla 14.** Rendimiento de proteínas de los experimentos de extracción de micobacterias de los pulmones de ratones infectados.

# Experimento	Concentración de proteínas (mg/mL)
1	0.066
2	0.125
3	0.032

Alternativamente, se realizaron ensayos para la inmunoseparación magnética de las micobacterias de los pulmones infectados. Se estandarizó la separación de las micobacterias por medio de un anticuerpo primario contra *M. bovis* BCG en cabra, seguido de la unión de un anticuerpo secundario anti-FC de cabra acoplado a una perla magnética.

El número de bacterias obtenidas en los ensayos con varias especies de micobacterias (virulentas y atenuadas) fue muy reducido). La cantidad de proteínas finales en el experimento mejor estandarizado fue de 10 mg/mL. Se realizó una 2D-PAGE con la totalidad de la muestra, sin embargo, no se observó ninguna proteína en el gel.



**Figura 10.** Microfotografía de la suspensión final de *M. tuberculosis* H37Rv obtenidas de pulmones de ratones, posterior a la inmunoseparación magnética. Tinción con yoduro de propidio e iluminación con lámpara de fluorescencia (x100). Se destacan en círculos blancos los bacilos.

**Objetivo 3: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* obtenidas de aislamientos clínicos de tuberculosis pulmonar.**

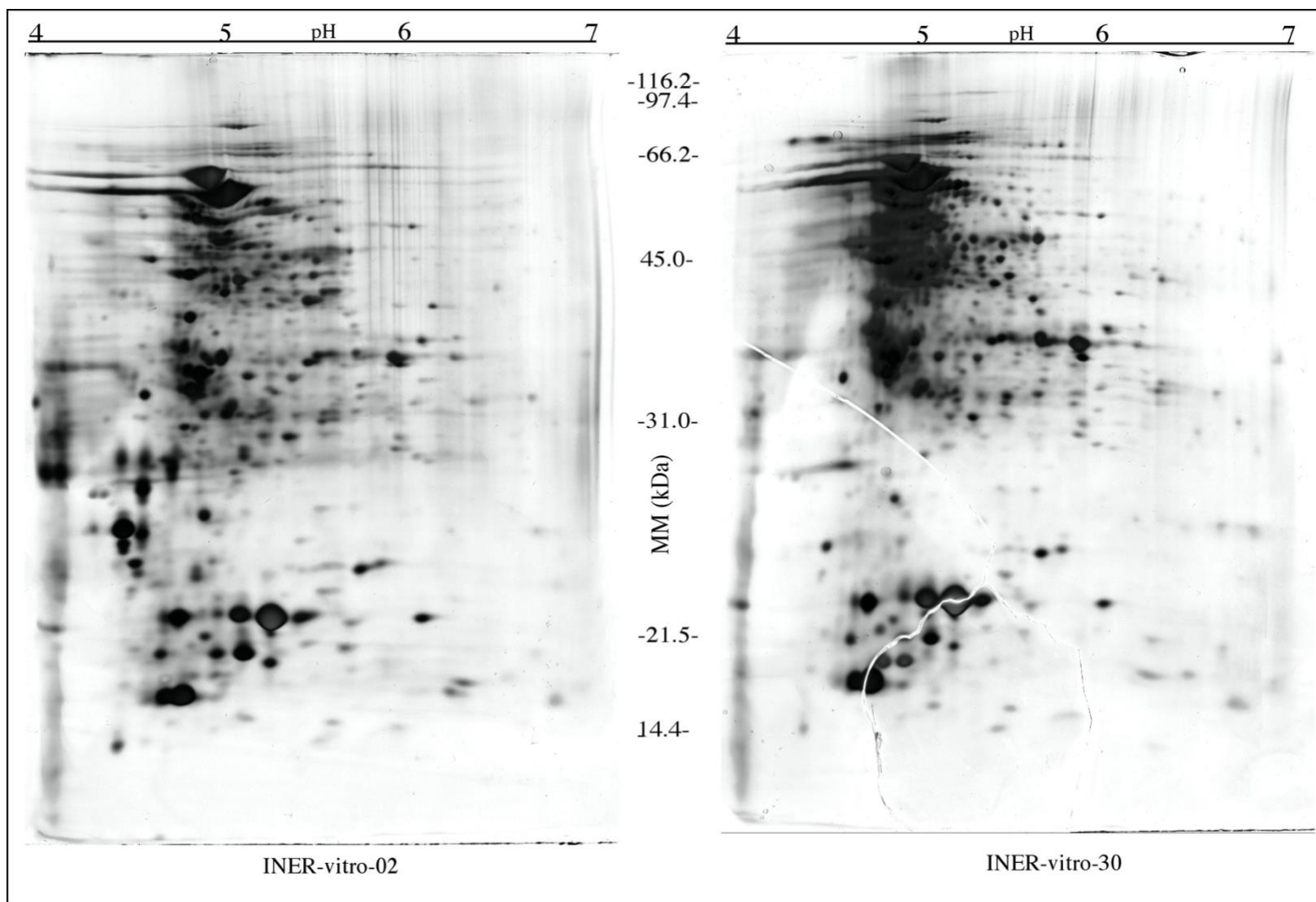
Objetivo 3.1: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) in vivo e in vitro, e identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Con las metodologías estandarizadas, se realizó la construcción y análisis de los proteomas de las fracciones celulares de dos cepas de *M. tuberculosis* provenientes de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar (codificadas como INER-vitro-02 e INER-vitro-30). En la Tabla 15 se muestran los resultados de la cuantificación de los puntos en cada uno de los proteomas. En la Figura 11 se muestran las imágenes de los geles.

**Tabla 15.** Descripción numérica de los proteomas de *M. tuberculosis* de muestras clínicas *in vitro*.

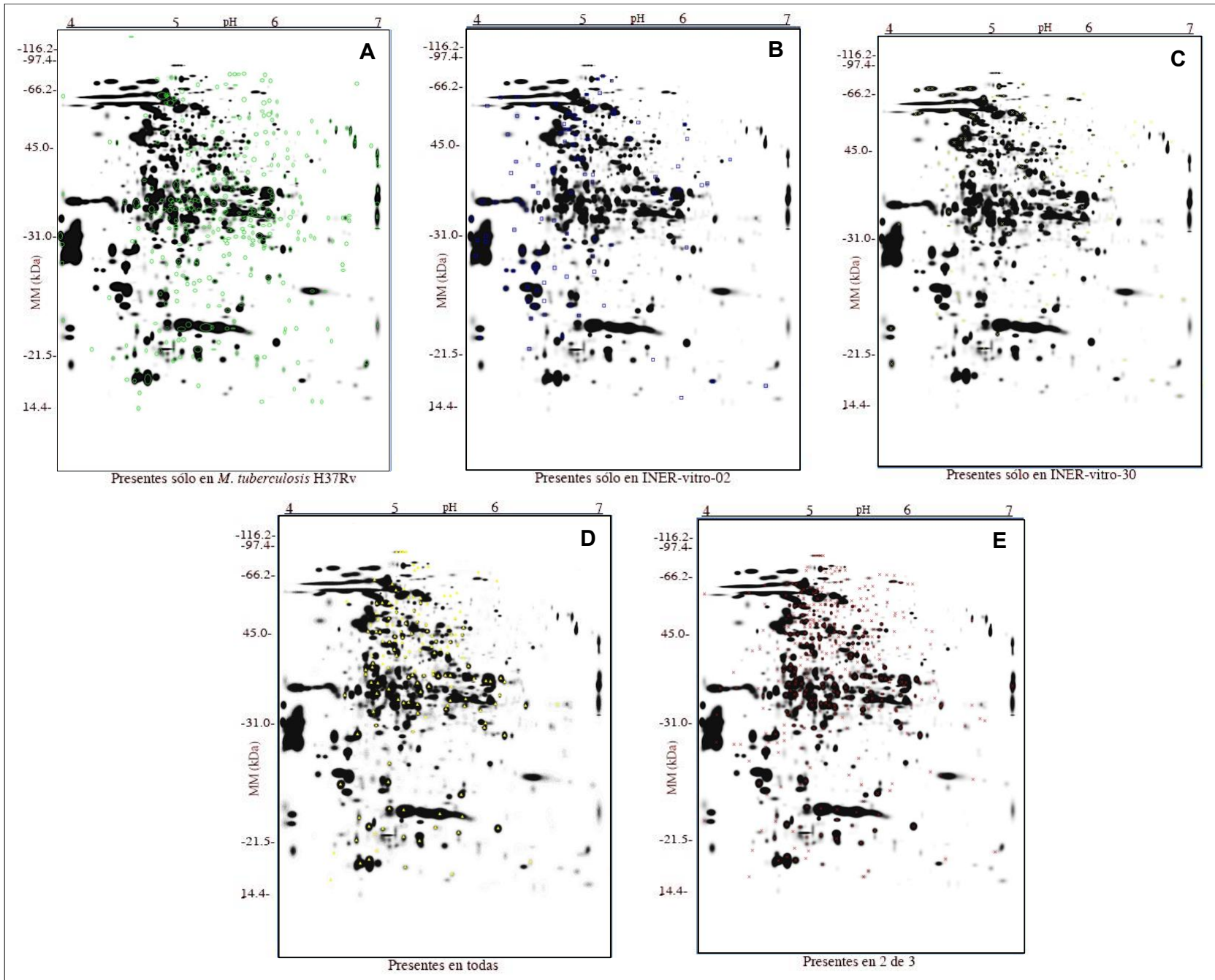
Muestra	# Puntos
INER-vitro-02	404
INER-vitro-30	402

La comparación de los proteomas de la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv se realizó con los dos proteomas obtenidos de las dos cepas de *M. tuberculosis* de muestras clínicas *in vitro*. En la se muestra la imagen patrón de los geles y su comparación; se señalan los puntos comunes a las 3 cepas (Panel A; 158 puntos, marcas amarillas), los presentes sólo en *M. tuberculosis* H37Rv (Panel B; 102 puntos, marcas verdes), los presentes sólo en INER-vitro-02 (Panel C; 102 puntos, marcas azules), los presentes sólo en INER-vitro-30 (Panel D; 102 puntos, marcas amarillas) y los presentes en dos de 3 cepas (Panel E, 395 puntos, marcas rojas).



**Figura 11.** 2D-PAGE de las proteínas (80  $\mu$ g) del extracto celular de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* cultivados *in vitro*. Tiras IPG de 11 cm, con intervalo de pH 4-7; geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata. MM= Masa molecular en Kilodaltones (kDa).

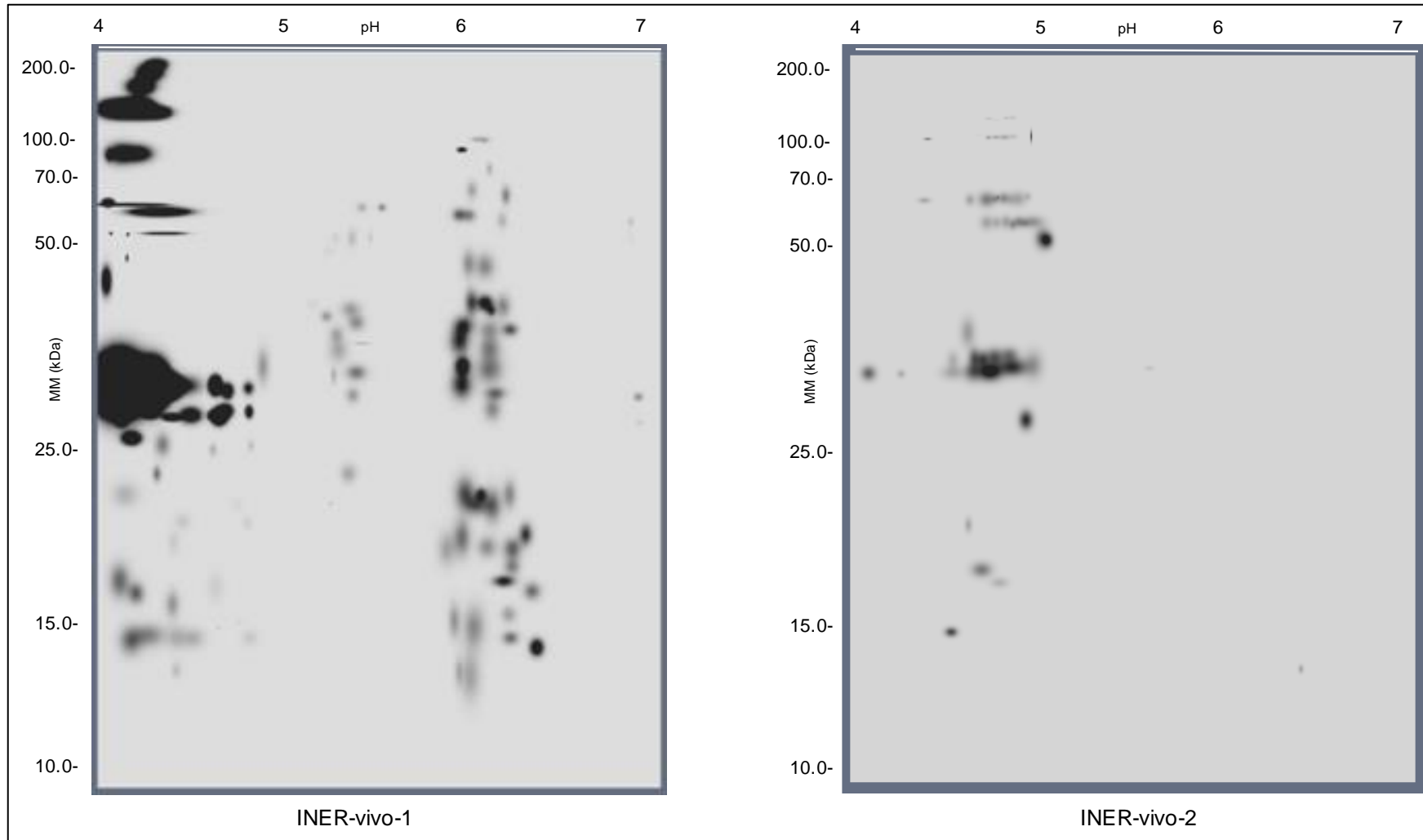




**Figura 12.** Comparación de los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv, y de dos muestras clínicas de *M. tuberculosis in vitro*. MM= Masa molecular en Kilodaltones (kDa).

Objetivo 3.2: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) crecidas *in vivo*, e identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

Con las metodologías estandarizadas, se realizó la construcción y análisis de los proteomas de las fracciones celulares de dos cepas diferentes de *M. tuberculosis in vivo*, provenientes de pacientes con tuberculosis pulmonar (codificadas como INER-vivo-1 e INER-vivo-2). La cantidad de proteínas obtenida para los geles fue muy baja (40 µg). En el análisis se pudieron cuantificar 123 y 49 puntos en los geles de la muestra INER-vivo-1 e INER-vivo-2, respectivamente. En la se muestran los geles analizados.



**Figura 13.** 2D-PAGE de las proteínas (40  $\mu$ g) del extracto celular de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis in vivo*.

Tiras IPG de 11 cm, con intervalo de pH 4-7; geles de poliacrilamida al 12% teñidos con nitrato de plata. MM= Masa molecular en Kilodaltones (kDa).

## METAS ALCANZADAS

**Objetivo 1: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de cinco subcepas de *M. bovis* BCG in vitro.**

1. Se estandarizaron las metodologías para la obtención y análisis de los proteomas, lo que permitió realizar el análisis comparativo entre las subcepas BCG.
2. El análisis detallado de los proteomas de las subcepas BCG Glaxo-Danesa (antes Pasteur) y Phipps permitió identificar proteínas que han sido descritas como antígenos micobacterianos, así como proteínas involucradas en procesos generales (metabolismo, síntesis de lípidos o síntesis de proteínas) o en la respuesta bacteriana al estrés.
3. Parte de los resultados de este trabajo se publicaron en el artículo: Phenotypic differences between BCG vaccines at proteome level. Rodríguez-Álvarez Mauricio, Mendoza Hernández Guillermo, Encarnación Sergio, Calva Juan José, López-Vidal Yolanda. *Tuberculosis* 2009; 89: 126.
4. Con las metodologías estandarizadas en el trabajo de esta tesis se realizó el análisis proteómico de varias micobacterias con las que se trabajaba en el grupo, lo cual contribuyó a las siguientes publicaciones:
  - Artículo científico: The secretome of a recombinant BCG substrain reveals differences in hypothetical proteins. Rodríguez-Alvarez Mauricio, Palomec-Nava Iliana D., Mendoza-Hernández Guillermo, López-Vidal Yolanda. *Vaccine* 2010; 28: 3997-4001. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.01.064.
  - Artículo científico: Genomic and proteomic analyses of Mycobacterium bovis BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. Patricia Orduña, Miguel A. Cevallos, Samuel Ponce de León, Adriana Arvizu, Ismael

L. Hernández-González, Guillermo Mendoza-Hernández, and Yolanda López-Vidal. *BMC Genomics* 2011; 12: 493. DOI: 10.1186/1471-2164-12-493.

- Tesis de licenciatura: Iliana Donají Palomec Nava. Analisis del secretoma de *Mycobacterium bovis* BCG subcepa Tice y su recombinante rBCGPstS-1. 2007 Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. DOI: [https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000625227](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000625227).
- Tesis de maestría: Jaqueline Larracilla Camacho. Identificación y análisis comparativo de proteínas de micobacterias no tuberculosas de aislamientos clínicos. 2009 Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. DOI: [https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000642997](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000642997).

**Objetivo 2: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*.**

Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* H37Rv y BCG México-1931 *in vitro*, e identificar las proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

1. Los proteomas de la fracción celular de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG México-1931 se elaboraron; su análisis permitió la identificación de proteínas expresadas diferencialmente.
2. Las siguientes técnicas se estandarizaron:
  - 2.1. Inactivación de micobacterias con rayos gama.
  - 2.2. Homogenización, tamizado y centrifugación en gradiente de sacarosa.
  - 2.3. Separación inmunomagnética.
  - 2.4. Inmunofluorescencia.
  - 2.5. Citometría de flujo.
3. El rendimiento de las muestras no permitió contar con la cantidad suficiente de bacterias para realizar los proteomas.

**Objetivo 3: Identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución) en los proteomas de *M. tuberculosis* obtenidas de aislamientos clínicos de tuberculosis pulmonar.**

Objetivo 3.1: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) y *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, e identificar las proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

1. Las proteínas de dos muestras clínicas de *M. tuberculosis* cultivadas *in vitro* se obtuvieron, y se realizó el análisis comparativo entre éstas y la cepa tipo de *M. tuberculosis* H37Rv.
2. Proteínas previamente identificadas se localizaron, y su abundancia relativa en los proteomas se determinó.

Objetivo 3.2: Comparar los proteomas de *M. tuberculosis* (aislamientos clínicos) crecidas *in vivo*, e identificar proteínas únicas (presencia/ausencia) o con cambios en su nivel de expresión (aumento/disminución).

1. Las proteínas de dos muestras clínicas de *M. tuberculosis in vivo* se obtuvieron.
2. No fue posible llevar a cabo un análisis detallado de los geles debido a la baja cantidad de proteínas que se obtuvieron de las muestras.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La cantidad y distribución de las proteínas de la fracción celular de las micobacterias en los 2D-PAGE analizados en este trabajo correlaciona con lo publicado en estudios previos de otros autores<sup>100</sup> y con lo que está predicho para *M. tuberculosis* H37Rv a partir de su genoma.<sup>111</sup> Varias de las proteínas aquí identificadas ya habían sido descritas en estudios genómicos y proteómicos, sin embargo, este fue el primer trabajo en el que las subcepas BCG estudiadas cuentan con información directa de su inmunogenicidad en un modelo experimental, y uno de los primeros esfuerzos por estudiar el proteoma de la fracción celular micobacteriana *in vivo*.

Estudios proteómicos previos de diferentes especies de micobacterias han incluido la fracción celular, el filtrado de cultivo y las proteínas de membrana,<sup>71, 77, 78, 106</sup> todos con condiciones bien determinadas, y las proteínas identificadas integran bases de datos robustas. Sin embargo, los criterios de selección de los puntos en las 2D-PAGE no siempre han estado completamente claros y el criterio más empleado ha sido el de ausencia-presencia. El análisis estadístico representa una aproximación efectiva para la comparación de proteomas. En nuestro análisis encontramos que BCG Glaxo-Dinamarca tiene más puntos con cambios en la intensidad, mientras que BCG Phipps tiene más puntos únicos. El análisis estadístico como el realizado en este estudio puede servir de guía para establecer los criterios de selección de las proteínas en las 2D-PAGE para identificación.

La subcepa BCG Pasteur 1173P2 es considerada la subcepa de referencia para estudios de BCG; su genoma fue secuenciado en 2007.<sup>21</sup> BCG Phipps derivó de BCG Pasteur en 1938 y fue utilizada en dos estudios clínicos en Estados Unidos (EU), en los que mostró niveles de protección de entre 40 y 83%,<sup>47</sup> sin embargo, esta subcepa no se volvió a utilizar para vacunación y sólo ha sido conservada en colecciones de cultivos para investigación básica.<sup>55</sup>



Respecto a las diferencias entre genes y proteínas, un estudio de microarreglos identificó diferencias genéticas entre las subcepas BCG, principalmente deleciones;<sup>55</sup> posteriormente, otro reportó DU y RD específicas en varias subcepas.<sup>21</sup> El análisis del genoma de la subcepa BCG México-1931 reveló dos mutaciones específicas dentro de las cuales se encuentran genes que podrían tener participación en proceso regulatorios.<sup>51</sup>

De acuerdo con el análisis publicado por Brosch y cols.,<sup>21</sup> los genomas de BCG Glaxo-Dinamarca y Phipps comparten tres condiciones: i) las regiones diferenciales 1 y 2 (RD1 y RD2); ii) la pérdida de una secuencia de inserción (IS, por sus siglas en inglés) 6110 en la región adyacente a *phoP*; y iii) mutaciones puntuales en *sigK* y *crp*; en conjunto, esos cambios involucran 22 ORF. Las dos diferencias mejor conocidas entre estas subcepas son las regiones diferenciales nRD18 y RD-Glaxo-Dinamarca (RDgd), las cuales involucran a 35 ORF. Sin embargo, estas diferencias, mínimas en comparación con el tamaño del genoma, no explican por sí solas las diferencias en la eficacia protectora que se ha visto entre estas subcepas en modelos clínicos y en los experimentos en el modelo murino de tuberculosis pulmonar.<sup>60</sup> Ninguna de las proteínas identificadas en el presente estudio se encuentran codificadas por genes localizados en nRD18 ni en RDgd.

Cuatro de las proteínas aquí identificadas han sido descritas previamente con participación en procesos de virulencia, detoxificación o adaptación (categoría funcional (CF) 0).<sup>22</sup> Tres de ellas (H10, H7, y H2: GroEL1; GroEL2, y AhpC, respectivamente) se encontraron con mayor intensidad en BCG Phipps, y una (H8: GroEL2) en BCG Glaxo-Dinamarca, lo que se corresponde con un reporte previo.<sup>112</sup> GroEL1 (BCG3487c, Rv3417c) es una chaperona involucrada en el plegamiento de proteínas y en la respuesta a choque térmico; es un potente inductor de síntesis de citocinas, incluidas las interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, e IL-12, así como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de donadores sanos.<sup>83, 112, 113</sup>

GroEL2 (BCG0479, Rv0440), también denominada antígeno de 65 kDa, es una proteína de choque térmico que participa en el plegamiento de proteínas sintetizadas *de novo*, importadas, desplegadas o mal plegadas; representa un elemento clave para la sobrevivencia micobacteriana dentro del macrófago y es reconocida por el sistema inmune, tanto *in vivo* como *in vitro*.<sup>112, 114</sup> Sólo hay una copia de *BCG0479* en el genoma de las subcepas BCG y, probablemente, las diferencias en la movilidad electroforética observadas en los puntos H7 y H8 de los proteomas puedan atribuirse a modificaciones post-traduccionales, o a asociaciones a otros elementos proteicos y no a isoformas de la proteína.<sup>71</sup> Se ha descrito que GroEL2 de *M. tuberculosis* estimula la respuesta proinflamatoria de las células dendríticas.<sup>115</sup> En un estudio donde ratones BALB/c vacunados con el DNA codificante de GroEL2 fueron retados con *M. tuberculosis* H37Rv se encontró que había estimulación de la producción de IgG2a e interferón gama (IFN- $\gamma$ , por sus siglas en inglés); más aún, una respuesta inmune específica a la administración de GroEL2 de *M. tuberculosis* H37Rv recombinante indujo producción de TNF- $\alpha$  e IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de sujetos vacunados con BCG y en sujetos sanos negativos a la prueba con el purificado derivado de proteínas (PPD, por sus siglas en inglés) de *M. tuberculosis*.<sup>51, 116</sup>

La proteína AhpC está involucrada en respuesta a estrés oxidativo, principalmente a intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI, por sus siglas en inglés) y resistencia a isoniazida.<sup>117</sup> El gen *ahpC* está presente en varias micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*, y *M. bovis* BCG (revisado en Ref.<sup>118</sup>). Bajo condiciones estándares de cultivo, AhpC se encontró sobre expresada en BCG Chicago en comparación con *M. tuberculosis* H37Rv;<sup>110</sup> cuando se compararon los proteomas de dos cepas virulentas de *M. tuberculosis* (H37Rv y CDC1551), se encontró que esta proteína disminuyó en CDC1551 a los 5, 8, y 12 días de cultivo.<sup>119</sup> En cabras infectadas con *M. avium* sub. *Pseudotuberculosis*, AhpC indujo una fuerte expresión de IFN- $\gamma$  y ha sido descrito como factor de virulencia en cobayos.<sup>118</sup> AhpC de la subcepa BCG México-1931

fue reconocida por suero de pacientes con tuberculosis activa o prueba de tuberculina (PPD) positiva.<sup>51</sup>

Un estudio previo de nuestro grupo reportó que BCG Phipps confirió mejores niveles de protección en un modelo murino de tuberculosis pulmonar.<sup>60</sup> Es posible que el incremento de AhpC y GroELs en esta subcepa (Phipps) participe en su sobrevivencia intramacrofágica facilitando un procesamiento y presentación antigénicos más eficientes, con el concomitante aumento de la protección como resultado de la activación prolongada del sistema inmune.

H13, la proteína A asociada a un domino con cabeza de horquilla (Forkhead associated, FhaA) (TB39.9, BCG0050c, Rv0020c) se encontró incrementada en BCG Glaxo-Dinamarca en este estudio; en *M. tuberculosis* H37Rv, está codificada por el gen *Rv0020c*, localizado dentro del conjunto genético *pknA/pknB/ppp*, el cual incluye a la proteína esencial PknB.<sup>105</sup> FhaA es uno de los sustratos más abundantes de la cinasa de proteínas en serina o treonina PknB.<sup>120-122</sup> La eliminación del gen *fhaA* (homólogo de *Rv0020c* de *M. tuberculosis* H37Rv) en *M. smegmatis* altera la sobrevivencia de esta bacteria *in vitro*, ya que afecta la síntesis e integridad de la pared celular e interactúa con proteínas de unión a penicilina.<sup>123</sup>

También más intenso en BCG Glaxo-Dinamarca, el punto H26 (mostrado en la Figura 6) fue identificado como la proteína conservada de 35 kDa rica en alanina (antígeno 35 kDa, BCG2760c, Rv2744c); en *M. tuberculosis* H37Rv está codificada por *Rv2744c*, un gen que funciona como operón junto con *Rv2745c*, un posible regulador transcripcional;<sup>124</sup> el antígeno 35 kDa participa en la respuesta de fago (*phage response*).<sup>117</sup> *Rv2744c* participa en la regulación de la homeostasis de los lípidos de la pared micobacteriana y la persistencia noreplicativa de *M. tuberculosis*.<sup>125</sup>

H5, identificada como la proteína BCG1826 (Rv1794), se encontró únicamente en BCG Phipps. Ha sido descrita en la fracción celular tanto de micobacterias virulentas de *M. tuberculosis* (H37Rv y Erdman), como de dos subcepas de micobacterias atenuadas (BCG Chicago y Copenhagen);<sup>73</sup> sin embargo, hasta la fecha, no se han reportado diferencias en cuanto a nivel de

expresión. El gen *Rv1794* tiene una regulación positiva en condiciones de infección natural en modelo animal.<sup>126</sup> Se han encontrado niveles de transcritos de *BCG1826* en BCG Glaxo-Dinamarca en cantidad equivalente a los encontrados en dos cepas virulentas de *M. bovis* y al doble de lo encontrado en BCG Japón, una de las subcepas de BCG más recientes.<sup>21</sup> La proteína *Rv1794* forma parte de un sistema de secreción tipo VII (ESX-5); la disrupción del gen *Rv1794* en *M. tuberculosis* provoca alteraciones en la secreción de proteínas ricas en prolina-ácido glutámico (PE) o prolina-prolina-ácido glutámico (PPE), lo que resulta en una atenuación de la virulencia tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>127</sup>

H21, más intensa en BCG Phipps (Figura 1), fue identificada como la proteína CFP17 (BCG1862, *Rv1827*). Esta proteína tiene dominios FHA de unión a fosfotreonina, participa en el metabolismo del glucógeno, y es el sustrato fisiológico de PknB.<sup>105</sup> Está presente en el filtrado de cultivo, la fracción celular y la pared celular de *M. tuberculosis* H37Rv.<sup>106</sup> Es reconocida, junto con CFP21, como un importante inductor de IFN- $\gamma$  en ratones C57BL/10; cuando se administra de forma recombinante en PBMC de ratones y pacientes con tuberculosis, CFP17 induce elevados niveles de IFN- $\gamma$ .<sup>107</sup> Se ha evaluado el potencial de la proteína *Rv1827* recombinante para el diagnóstico de tuberculosis, y ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad para ser reconocida tanto por suero de pacientes con tuberculosis pulmonar, como con tuberculosis extrapulmonar y tuberculosis multi-drogo-resistente.<sup>128</sup>

Setecientas cuarenta y dos proteínas de BCG participan en procesos celulares o de pared celular (categoría funcional micobacteriana 3; aproximadamente 19% de lo codificado por el genoma).<sup>101</sup> Aquí, sólo fue identificada una proteína de esta categoría: H6, única en BCG Phipps, denominada Antígeno Mpt32 (glicoproteína 45 kDa; BCG1896, *Rv1860*). Aún cuando su función no está completamente descrita, probablemente está implicada en la persistencia micobacteriana y antigenicidad; en cobayos, Mpt32 fue reconocida por anticuerpos que interactúan con receptores para linfocitos T; cuando se administró como vacuna recombinante en modelo animal, indujo protección mediada por IFN- $\gamma$  e IL-2.<sup>129</sup> Se ha descrito que la administración de esta

proteína a pacientes con tuberculosis induce una respuesta mediada por TNF- $\alpha$  e IL-10, y que un péptido de esta proteína en particular (de los aminoácidos 21 a 39) puede ayudar a distinguir entre tuberculosis activa y latente, por lo que tiene potencial como vacuna para prevenir la progresión de la enfermedad latente a activa.<sup>130</sup>

Noviecintas proteínas (aproximadamente 23% de lo codificado en el genoma) están involucradas en metabolismo intermediario y respiración (FC 7). Nosotros encontramos seis de ellas con intensidad diferente entre las subcepas BCG aquí estudiadas: 5 en Phipps (H4, H9, H25, H30, y H28), y una en Glaxo-Dinamarca (H29). H4 (HtrA2, BCG0159, Rv0125) es una proteína que puede funcionar como proteasa y como chaperona, tiene un procesamiento autolítico, y forma parte de un sistema de dos componentes requerido por *M. tuberculosis* para el crecimiento en infección persistente. Esta proteína (Rv015c) forma parte de una proteína inmunogénica de fusión que incluye a la proteína MTB39A (Rv1196) y está siendo evaluada como vacuna contra la tuberculosis (M72/AS01E).<sup>117, 131, 132</sup>

H9, una posible S-adenosil-metionina sintasa (MetK, BCG1453, Rv1392), participa en la síntesis de aminoácidos. H25 es una posible hidrolasa (BCG3470, Rv3400), que pudiera estar involucrada en metabolismo celular. H30, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (BCG1497, Rv1436), participa en la glucólisis; un estudio donde se comparó al proteoma de BCG Pasteur en cultivo estático contra el cultivo en agitación reveló la presencia de esta proteína únicamente en la condición de cultivo estático, sugiriendo su regulación positiva durante tensión de oxígeno baja.<sup>133</sup> El análisis proteómico de aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* ha descrito un incremento en la intensidad de esta proteína (Rv1436) en cepas resistentes a ofloxacina.<sup>134</sup> La sobreexpresión de esta proteína en *M. tuberculosis* provoca un incremento en la unión de esta bacteria a la transferrina y un aumento en el consumo de hierro, lo que podría representar una ventaja para la supervivencia de esta bacteria dentro de los macrófagos.<sup>135</sup>

La proteína NusG (H27) (BCG0688, Rv0639), con una mayor intensidad en BCG Phipps, es una proteína que participa en la síntesis de otras proteínas al interactuar con la RNA polimerasa y el factor Rho, una proteína esencial para el crecimiento micobacteriano;<sup>136-138</sup> la proteína homóloga de esta proteína, BCG0688, fue reconocida por el suero de individuos sanos PPD positivos en proteomas de BCG México-1931.<sup>51</sup>

H28, una posible tioredoxina (BCG1386, Rv1324), participa en varias reacciones de oxidoreducción. Esta proteína fue previamente descrita en *M. tuberculosis* H37Rv,<sup>106</sup> y un análisis de transcritos (mRNA) encontró que *Rv1324* se regula negativamente después de 4, 24 y 96 hrs de privación de nutrientes.<sup>108</sup> El análisis *in silico* reveló que esta proteína contiene un epítipo que tiene una alta afinidad para unir alelos del MHC I y II, por lo que podría ser considerada como un buen componente de una vacuna de subunidades contra la tuberculosis.<sup>139</sup>

La posible alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (BCG3069, Rv3045) (H29) ha sido descrita presente únicamente en los proteomas de BCG en cultivos estáticos.<sup>133</sup> Aún cuando en nuestros experimentos las micobacterias fueron cultivadas en condiciones estándares de cultivo enriquecido, BCG Phipps presentó una mayor expresión de proteínas relacionadas a la sobrevivencia en condiciones de estrés oxidativo, así como algunas proteínas metabólicas relevantes, en comparación con BCG Glaxo-Dinamarca. Esto podría representar una ventaja de la subcepa Phipps para la adaptación a condiciones medioambientales adversas o a cambios de sustratos metabólicos, sin embargo, son necesarios estudios complementarios para explicarlo.

Una contribución importante del presente estudio es que se documentaron las diferencias en el número de proteínas únicas, así como con cambios en la intensidad entre BCG Phipps y Glaxo-Dinamarca. La respuesta inmune no puede relacionarse directamente a un mayor o menor contenido genético en las subcepas BCG, sino a la interacción del hospedero con las mismas, incluida la regulación de la expresión de proteínas. No es correcto asumir que subcepas BCG con similar contenido genético tendrán el mismo grado de regulación en la expresión proteica.<sup>140</sup> Los datos aquí presentados relacionados con las diferencias fenotípicas en proteínas de pared

celular, hipotéticas, metabólicas y de virulencia en condiciones estandarizadas de cultivo entre BCG Phipps y Glaxo-Dinamarca, junto con nuestros resultados previos de eficacia protectora de esas subcepas, aportan nuevos elementos para la comprensión de las diferencias entre las subcepas BCG. La relevancia biológica de la expresión proteica entre las distintas BCG, hace de las proteínas moléculas clave, particularmente en el contexto de patogenicidad y respuesta inmune.

Como ha sido documentado en otros estudios, la cantidad y distribución de las proteínas de la fracción celular de *M. tuberculosis* H37Rv bajo condiciones estándares de cultivo es muy similar a la de las subcepas BCG,<sup>73</sup> lo cual en parte también se puede explicar dada la alta homología de sus genomas.<sup>21</sup> En el presente estudio encontramos proteínas con una mayor expresión en *M. tuberculosis* H37Rv en comparación con una subcepa BCG; varias de esas proteínas han sido descritas como inmunogénicas o factores de virulencia, mientras que las proteínas con incremento en la expresión en BCG que se identificaron, todas pertenecen a la categoría funcional de metabolismo y adaptación.

Identificamos la proteína Rv1886 (también conocida como antígeno 85B (Ag85B)) (R2 y R3) con mayor intensidad en el proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv con respecto al de BCG México-1931. Estudios previos han descrito esta proteína como un importante antígeno de *M. tuberculosis* que estimula principalmente de linfocitos T<sup>141</sup> y ha sido evaluado exitosamente como candidato vacunal en modelo murino.<sup>142</sup> Al ser considerado como un potente inmunógeno, la proteína Rv1886 forma parte de dos candidatos vacunales contra la tuberculosis en humanos que se encuentran en evaluación clínica actualmente: la vacuna H4:IC31, que contiene una proteína de fusión RV1886 + TB10.4 (Rv0288), y la vacuna H56:IC31, que contiene una proteína de fusión con Rv1886 + ESAT6 (Rv3875) + Rv2660.<sup>132</sup>

La proteína Rv3804c (también denominada MPT44, antígeno 85A y FBPA) fue encontrada con incremento en *M. tuberculosis* H37Rv respecto a BCG-1931 (R4). Se ha descrito previamente

que la proteína homóloga BCG3866 de esta proteína es reconocida por suero de sujetos PPD negativos en proteomas de BCG-1931.<sup>51</sup>

La proteína TB31.7 (Rv2623) (R5) es una proteína universal de respuesta a estrés en *M. tuberculosis*; está involucrada en la regulación de la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de la pared micobacteriana y, por lo tanto, en su crecimiento.<sup>143</sup> En este trabajo encontramos esta proteína con un incremento en la intensidad en la cepa virulenta (*M. tuberculosis* H37Rv) respecto a la cepa atenuada (BCG México-1931); el homólogo de esta proteína, BCG2650, fue reconocido por el suero de pacientes con tuberculosis pulmonar activa en proteomas de BCG México-1931.<sup>51</sup>

Encontramos la pirofosfatasa inorgánica Ppa (Rv3628) (Y1) con la intensidad aumentada en BCG México-1931 respecto a *M. tuberculosis* H37Rv. Esta proteína se expresa de forma constitutiva en *M. tuberculosis* y no se sobreexpresa en el ambiente intramacrofágico ni por condiciones de estrés *in vitro*.<sup>144</sup> Ha sido descrito que esta proteína interactúa con células dendríticas y estimula una respuesta celular tipo Th1, protectora incluso frente a la cepa hipervirulenta Beijing, por lo que ha sido evaluada como un potencial candidato para una nueva vacuna de subunidades.<sup>145</sup>

También, con un incremento en intensidad en BCG México-1931, la oxidoreductasa Rv2971 (Y2); su gen es esencial para el crecimiento y la sobrevivencia de *M. tuberculosis*, se ha descrito que tiene participación en el proceso de resistencia al antibiótico isoniazida<sup>146</sup> y es reconocida por suero de sujetos PPD negativos en proteomas de BCG México-1931.<sup>51</sup>

Un estudio proteómico previo de la proteína PntAA (Rv0155) (Y3), una NAD(P) transhidrogenasa, la encontró con un incremento en intensidad en aislamientos clínicos resistentes a los aminoglucósidos kanamicina y amikacina.<sup>147</sup> En el presente trabajo, la encontramos con una intensidad mayor en BCG México-1931 respecto a *M. tuberculosis*.



La distribución de los proteomas de *M. tuberculosis* provenientes de aislamientos clínicos siguió el mismo patrón de distribución que el resto de las micobacterias estudiadas. El análisis de los geles permitió localizar proteínas comunes y únicas de dos muestras clínicas con respecto a la cepa virulenta de referencia (*M. tuberculosis* H37Rv). Este fue el primer estudio que en el que se abordó el análisis del perfil proteico de micobacterias directamente obtenidas de muestras clínicas, con lo cual se pudieron identificar algunas de las limitantes técnicas que presenta este abordaje, a partir de lo cual se pueden modificar las estrategias.

## CONCLUSIONES

### **Objetivo 1:**

1. Los proteomas de las subcepas BCG son diferentes entre sí en cuanto a la cantidad de proteínas de la fracción celular en condiciones estándar de cultivo, aún cuando tienen una alta similitud a nivel genómico y en sus patrones de crecimiento no mostraron diferencias importantes.
2. La mayoría de las proteínas identificadas con mayor intensidad en BCG Phipps están relacionadas con virulencia o sobrevivencia micobacteriana, lo que podría explicar la mayor protección conferida por esa subcepa en el modelo murino de protección con BCG contra tuberculosis pulmonar.
3. Las proteínas identificadas con mayor intensidad en BCG Glaxo-Dinamarca se han descrito previamente con participación en procesos del metabolismo general de las micobacterias, lo cual tal vez modifica la síntesis de proteínas antigénicas, de respuesta a estrés o inmunogénicas y haga que esta sea una de las subcepas que confirió un nivel de protección intermedio en el modelo murino.
4. Las proteínas de la fracción celular de las subcepas BCG estudiadas conservaron una distribución en los geles concordante con lo descrito con otras micobacterias virulentas y atenuadas; tener un patrón electroforético de las micobacterias es de utilidad para facilitar el estudio de estas bacterias e identificar elementos únicos o cambios en los niveles de expresión de proteínas a nivel individual en alguna especie.

**Objetivo 2:**

1. *Mycobacterium* H37Rv y BCG México-1931 mostraron diferencias entre sí en cuanto a la cantidad de proteínas de la fracción celular en condiciones estándar de cultivo; las principales diferencias genéticas entre ambas cepas son las que provocan que la primera sea virulenta y la segunda esté atenuada y pueda usarse como vacuna.
2. Las proteínas identificadas con mayor intensidad en *M. tuberculosis* H37Rv con respecto a BCG México-1931 están relacionadas con procesos de virulencia e inmunogenicidad, lo cual sugiere que son proteínas generales de las bacterias virulentas ya que están presentes solo en ellas aún en condiciones estándar de cultivo.
3. Las proteínas identificadas con mayor intensidad en BCG México-1931 con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv están relacionadas con procesos celulares generales; la menor expresión de proteínas relacionadas con sobrevivencia o virulencia en condiciones estándar de cultivo en la subcepa BCG puede ser uno de los elementos que determinan su atenuación, y permite identificar proteínas relevantes para los procesos generales de las micobacterias.

**Objetivo 3:**

1. Los proteomas de los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis in vivo* presentan una distribución y cantidad de proteínas diferentes de las de otras micobacterias *in vitro*, lo cual no permite una comparación directa de los proteomas.
2. Los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis in vivo* tienen proteínas únicas en comparación con la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro*, las cuales podrían ser parte de los elementos de adaptación y respuesta de la micobacteria a las condiciones presentes en el tejido pulmonar de los pacientes.

## PERSPECTIVAS

Las proteínas identificadas en este trabajo podrían ser evaluadas como:

- Vacunas recombinantes o vacunas de sub-unidades para la inmunización primaria o como dosis de refuerzo para prevenir la tuberculosis (BCG1862, BCG1826 o BCG0688).
- Reactivos diagnósticos que ayuden a diferenciar la respuesta dirigida contra la infección por *M. tuberculosis* de la estimulada por la vacunación con BCG (Rv1980c).
- Blancos terapéuticos de fármacos antimicrobianos o inmunoterapias contra la tuberculosis (Rv0632c).

## REFERENCIAS

1. Fitzgerald DW, Sterling TR, Haas DW. *Mycobacterium tuberculosis*. Capítulo: 250. En: GL Mandell, JE Bennett and R Dolin, editores. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7 ed. Churchill Livingstone. 2007. New York, USA. pp. 3129-3164.
2. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2020. Geneva, Switzerland. En: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1312164/retrieve>. Fecha de consulta: 1-Dic-20.
3. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med* 2006; 100(11): 1862-70.
4. Vynnycky E, Fine PME. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect* 1997; 119: 183-201.
5. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* 1994; 72(2): 213-20.
6. FA D. Multiple-drug-resistant tuberculosis. *Lancet* 2000; 356(s1): 62.
7. Dheda K, Gumbo T, Maartens G, Dooley KE, McNerney R, Murray M, Furin J, Nardell EA, London L, Lessem E, Theron G, Helden PI, Niemann S, Merker M, Dowdy D, Van Rie A, Siu GKH, Pasipanodya JG, Rodrigues C, Clark TG, Sirgel FA, Esmail A, Lin H-H, Atre SR, Schaaf HS, Chang KC, Lange C, Nahid P, Udwadia ZF, Horsburgh Jr R, Churchyard GJ, Menzies D, Hesselning AC, Nuermberger E, McIlleron H, Fennelly KP, Goemaere E, Jaramillo E, Low M, Morán Jara C, Padayatchi N, Warren RM. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis. *Lancet Respir Med* 2017; 5(4): 291-360.
8. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, Van Soolingen D. Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. *Emerg Inf Dis* 2002; 8(8): 843-849.
9. Merker M, Blin C, Mona S, Duforet-Frebourg N, Lecher S, Willery E, Blum MG, Rusch-Gerdes

- S, Mokrousov I, Aleksic E, Allix-Beguec C, Antierens A, Augustynowicz-Kopec E, Ballif M, Barletta F, Beck HP, Barry CE, 3rd, Bonnet M, Borroni E, Campos-Herrero I, Cirillo D, Cox H, Crowe S, Crudu V, Diel R, Drobniowski F, Fauville-Dufaux M, Gagneux S, Ghebremichael S, Hanekom M, Hoffner S, Jiao WW, Kalon S, Kohl TA, Kontsevaya I, Lillebaek T, Maeda S, Nikolayevskyy V, Rasmussen M, Rastogi N, Samper S, Sanchez-Padilla E, Savic B, Shamputa IC, Shen A, Sng LH, Stakenas P, Toit K, Varaine F, Vukovic D, Wahl C, Warren R, Supply P, Niemann S, Wirth T. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage. *Nat Genet* 2015; 47(3): 242-9.
10. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The Growing Burden of Tuberculosis. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1009-1021.
11. Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka PT, Jha P. Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43 000 adult male deaths and 35 000 controls. *Lancet* 2003; 362: 507-515.
12. Pizzol D, Di Gennaro F, Chhaganlal KD, Fabrizio C, Monno L, Putoto G, Saracino A. Tuberculosis and diabetes: current state and future perspectives. *Trop Med Int Health* 2016; 21(6): 694-702.
13. Romanowski K, Clark EG, Levin A, Cook VJ, Johnston JV. Tuberculosis and chronic kidney disease: an emerging global syndemic. *Kidney International* 2016; 90(1): 34-40.
14. World Health Organization (WHO). WHO Global Tuberculosis Programme. (1994). TB : a global emergency, WHO report on the TB epidemic. Geneva: Switzerland. En: <http://www.who.int/iris/handle/10665/58749>. Fecha de consulta: 1-Dic-19.
15. WHO Report 2007. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376). Geneva.
16. Dirección General de Epidemiología (DGE), Secretaría de Salud (SS). Histórico Boletín epidemiológico 1981-2020. 2019. En: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico>. Fecha de consulta: 15-Ene-21.

17. Dirección General de Epidemiología (DGE), Secretaría de Salud (México). Anuarios de morbilidad 1984-2019. En: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Fecha de consulta: 15-Abr-21.
18. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace Jr RJ. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. Capítulo: 36. En: PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller and RH Tenover, editores. Manual of clinical microbiology. 8th ed. ASM Press. 2003. Washington DC. pp. 532-559.
19. Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. Bacteriol Rev 1977; 41(1): 217-372.
20. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. Frontiers in Microbiology 2018; 9: 67.
21. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, García-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, García JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(13): 5596-601.
22. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, Tekaiya F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby J, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail M, Rajandream M, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares S, Sulston J, Taylor K, Whitehead S, Barrell B. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393: 537-544.
23. Brosch R, Gordon SV, Pym AS, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. Int J Med Microbiol 2000; 290: 143-152.
24. Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. Biochemistry and

- molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 1997; 24(2): 263-70.
25. Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(8): a021113.
  26. Shang S, Kats D, Cao L, Morgun E, Velluto D, He Y, Xu Q, Wang CR, Scott EA. Induction of *Mycobacterium Tuberculosis* Lipid-Specific T Cell Responses by Pulmonary Delivery of Mycolic Acid-Loaded Polymeric Micellar Nanocarriers. *Front Immunol* 2018; 9: 2709.
  27. Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *J Res Med Sci* 2018; 23: 63.
  28. Abrahams KA, Besra GS. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology* 2018; 145(2): 116-133.
  29. Chapin KC, Lauderdale T-L. Reagents, stains, and media: Bacteriology. Capítulo: 27. En: PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller and RH Tenover, editores. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ASM Pres. 2003. Washington DC. pp. 354-383.
  30. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of Long-Lived Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Mice. *J Immunol* 1995; 154: 3359-3372.
  31. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 475-527.
  32. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Mycobacterium* y bacterias ácido-alcohol resistentes relacionadas. Capítulo: 22. *Microbiología Médica*. 8va ed. Elsevier. 2017. Barcelona, España. pp. 218-233.
  33. Kunst H. Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. *Respir Med* 2006; 100(12): 2098-106.
  34. Cox HS, Morrow M, Deutschmann PW. Long term efficacy of DOTS regimens for tuberculosis: systematic review. *BMJ* 2008; 336(7642): 484-7.
  35. World Health Organization (WHO). Guidelines for surveillance of drug resistance in



- tuberculosis. 5th Edition. 2015. En: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/174897/9789241549134\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/174897/9789241549134_eng.pdf). Fecha de consulta: 15-Abr-21.
36. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet* 2019; 393(10181): 1642-1656.
37. National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Library of Medicine. Genome information by organism. *Mycobacterium*. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=1763>. Fecha de consulta: 22-Sep-21.
38. Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A, Convit J, Young S, Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. *Science* 2005; 308(5724): 1040-2.
39. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 409(6823): 1007-11.
40. Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, Buddle BM, Hewinson RG, Vordermeier HM. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6996-7003.
41. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284(5419): 1520-3.
42. Berchet F-X, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium*

- tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998; 144: 3195-3203.
43. Behr MA. BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 86-92.
  44. Mustafa AS, Oftung F, Amoudy HA, Madi NM, Abal AT, Shaban F, Rosenkrands I, Andersen P. Multiple Epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 Antigens Are Recognized by Antigen-Specific Human T Cell Lines. *Clin Inf Dis* 2000; 30(Suppl 3): S201-S205.
  45. Ulrichs T, Munk M, Mollenkopf H-J, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro M, Kaufmann S. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3949-3958.
  46. Kanaujia GV, Motzel S, Garcia MA, Andersen P, Gennaro ML. Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates. *Clin Diag Lab Immun* 2004; 11(1): 222-226.
  47. Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuberc Lung Dis* 1999; 79(4): 243-250.
  48. Abdallah AM, Behr MA. Evolution and Strain Variation in BCG. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1019: 155-169.
  49. Behr M, Small P. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999; 17: 915-922.
  50. Brosch R, Gordon SV, Buchrieser C, Pym A, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast* 2000; 17: 111-123.
  51. Orduña P, Cevallos MA, Ponce de Leon Rosales S, Arvizu A, Hernandez-González IL, Mendoza-Hernández G, López-Vidal Y. Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. *BMC Genomics* 2011; 12: 493.

52. Joung SM, Jeon SJ, Lim YJ, Lim JS, Choi BS, Choi IY, Yu JH, Na KI, Cho EH, Shin SS, Park YK, Kim CK, Kim HJ, Ryoo SW. Complete Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Korea, the Korean Vaccine Strain for Substantial Production. *Genome Announc* 2013; 1(2): e0006913.
53. Borgers K, Ou JY, Zheng PX, Tiels P, Van Hecke A, Plets E, Michielsens G, Festjens N, Callewaert N, Lin YC. Reference genome and comparative genome analysis for the WHO reference strain for *Mycobacterium bovis* BCG Danish, the present tuberculosis vaccine. *BMC Genomics* 2019; 20(1): 561.
54. Behr MA, Small P. Has BCG attenuated to impotence? *Nature* 1997; 389: 133-134.
55. Behr MA. Correlation between BCG genomics and protective efficacy. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 249-252.
56. Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* 1993; 22(6): 1154-8.
57. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 2006; 367(9517): 1173-80.
58. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, Snell L, Mangtani P, Adetifa I, Lalvani A, Abubakar I. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2014; 349: g4643.
59. Lagranderie MMR, Balazuc A-M, Deriaud E, Leclerc CD, Gheorghiu M. Comparison of Immune Responses of Mice Immunized with Five Different *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strains. *Inf Immun* 1996; 64(1): 1-9.
60. Castillo-Rodal AI, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, López-Vidal Y. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary

- tuberculosis. *Infect Immun* 2006; 74(3): 1718-24.
61. Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 783-812.
  62. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* 2017; 55(2): 182-196.
  63. O'Farrell PH. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biochem Chem* 1975; 250(10): 4007-4021.
  64. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4(12): 3665-85.
  65. Adams LD, Gallagher SR. Two-dimensional gel electrophoresis. *Current Protocols in Immunology* 2005; Supp 69: 8.5.1-8.5.24.
  66. Daniel TM, Janicki BW. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* 1978; 42(1): 84-113.
  67. Cash P. Investigating pathogen biology at the level of the proteome. *Proteomics* 2011; 11(15): 3190-202.
  68. Schmidt F, Volker U. Proteome analysis of host-pathogen interactions: Investigation of pathogen responses to the host cell environment. *Proteomics* 2011; 11(15): 3203-11.
  69. Howard FD, Pretty HR, McConnell HM. Identification of phagocytosis-associated surface proteins of macrophages by two-dimensional gel electrophoresis. *J Cell Biol* 1982; 92(Feb): 283-288.
  70. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. Evidence for absence of the MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993; 61(5): 1730-4.
  71. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SH. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 1999; 33(6): 1103-17.

72. Naito M, Izumi S, Yamada T. Two-dimensional electrophoretic analysis of humoral responses to culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG in patients with leprosy and tuberculosis. *Int J Leprosy and Other Mycob Dis* 1998; 66(2): 208.
73. Max Planck Institute for Infection Biology. Proteome 2D-PAGE Database. En: [https://protein.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/menu\\_frame.cgi](https://protein.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/menu_frame.cgi). Fecha de consulta: 15-Abr-21.
74. Boon C, Li R, Qi R, Dick T. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J Bacteriol* 2001; 183(8): 2672-6.
75. Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, Haeselbarth G, Muller EC, Jungblut PR, Kaufmann SH. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* 2003; 24(19-20): 3405-20.
76. Okkels LM, Andersen P. Protein-protein interactions of proteins from the ESAT-6 family of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2004; 186(8): 2487-2491.
77. Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, Zimny-Arndt U, Hagens K, Muller EC, Kaufmann SH. Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis* 2001; 22(14): 2936-46.
78. Mattow J, Schiabile UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, Haeselbarth G, Müller E-C, Jungblut PR, Kaufmann SHE. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* 2003; 24: 3405-3420.
79. Zheng J, Wei C, Leng W, Dong J, Li R, Li W, Wang J, Zhang Z, Jin Q. Membrane subproteomic analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Proteomics* 2007; 7(21): 3919-31.
80. Bourmaud A, Gallien S, Domon B. Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications. *Proteomics* 2016; 16(15-16): 2146-59.

81. Verma R, Pinto SM, Patil AH, Advani J, Subba P, Kumar M, Sharma J, Dey G, Ravikumar R, Buggi S, Satishchandra P, Sharma K, Suar M, Tripathy SP, Chauhan DS, Gowda H, Pandey A, Gandotra S, Prasad TS. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Analysis of H37Ra and H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res* 2017; 16(4): 1632-1645.
82. Pinto SM, Verma R, Advani J, Chatterjee O, Patil AH, Kapoor S, Subbannayya Y, Raja R, Gandotra S, Prasad TSK. Integrated Multi-Omic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra Redefines Virulence Attributes. *Front Microbiol* 2018; 9: 1314.
83. Yu Y, Jin D, Hu S, Zhang Y, Zheng X, Zheng J, Liao M, Chen X, Graner M, Liu H, Jin Q. A novel tuberculosis antigen identified from human tuberculosis granulomas. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14(4): 1093-103.
84. Calmette H, Guèrin C. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux cultivé sur la bile. *Académie des Sciences* 1908: 1456-1459.
85. Fine PME. The BCG Story: Lessons from the Past and Implications for the Future. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Supp 2. March-April): S353-S359.
86. Rodrigues LC, Smith PG. Tuberculosis in developing countries and methods for its controls. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 739-744.
87. Brewer TF. Preventing tuberculosis with *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* 2000; 31(Suppl 3): S64-S67.
88. Secretaría de Salud México. Norma Oficial Mexicana NOM-036-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, sueros, antitoxinas e inmunoglobulinas en el humano. *Diario Oficial de la Federación* 2003; Tomo DXCVIII(13): 51-77.
89. Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), Secretaría de Salud. Manual de vacunación, edición 2017. Ciudad de México. En: <https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/documentos/manual-de-vacunacion-edicion-2017>.

Fecha de consulta: 1-Dic-19.

90. Dubos RJ, Pierce CH. Differential characteristics in vitro and in vivo of several substrains of BCG. *Am Rev Tuberc Pulmon Dis* 1956; 74(5): 655-714.
91. Abou-Zeid C, Smith I, Grange J, Steele J, Rook G. Subdivision of daughter strains of bacille Calmette-Guerin (BCG) according to secreted protein patterns. *J Gen Microbiol* 1986; 132(11): 3047-53.
92. Clemens JD, Chuong JJ, Feinstein AR. The BCG controversy. A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* 1983; 249(17): 2362-9.
93. Brandt L, Cunha JF, Weinreich OA, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P. 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* 2002; 70(2): 672-678.
94. Castillo Rodal A. Comparación de la capacidad protectora de seis subcepas de *M. bovis* BCG en el modelo murino de tuberculosis pulmonar. Tesis de Maestría. 2003. En.
95. Castañón Arreola M. Estudio de la respuesta Th1 inducida por las proteínas ESAT-6 y 38-kDa de *M. tuberculosis* en la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guèrin). Tesis de Doctorado. 2005. En.
96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
97. Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA. Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001; 19(15-16): 2146-51.
98. Consejo de Salubridad General de México. Guía de Práctica Clínica (GPC). Atención, diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar en pacientes mayores de 18 años en el primer nivel de atención. En: <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/SS-107-08/RR.pdf>.
99. Win Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Mycobacteria*. Capítulo: 19. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Sixth ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2006. Philadelphia, PA, USA. pp. 1064-1124.

100. Urquhart BL, Atsalos TE, Roach D, Basseal DJ, Bjellqvist B, Britton WL, Humphery-Smith I. 'Proteomic contigs' of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* (BCG) using novel immobilised pH gradients. *Electrophoresis* 1997; 18(8): 1384-92.
101. Institut Pasteur. GenoList. An integrated environment for the analysis of microbial genomes. Customized for *Mycobacterium* preselection. En: <http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/3/wa/goToTaxoRank?level=Mycobacterium>. Fecha de consulta: 1-Dic-19.
102. Malen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 2007; 7(10): 1702-18.
103. Covert BA, Spencer JS, Orme IM, Belisle JT. The application of proteomics in defining the T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 2001; 1(4): 574-86.
104. Pallen M, Chaudhuri R, Khan A. Bacterial FHA domains: neglected players in the phosphothreonine signalling game? *Trends Microbiol* 2002; 10(12): 556-63.
105. Villarino A, Duran R, Wehenkel A, Fernández P, England P, Brodin P, Cole ST, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Cervenansky C, Alzari PM. Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* 2005; 350(5): 953-63.
106. Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* 2000; 21: 3740-3756.
107. Weldingh K, Andersen P. Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23(2): 159-164.
108. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microb* 2002; 43(3): 717-731.
109. Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation



- of cell shape. *Genes Dev* 2005; 19(14): 1692-704.
110. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf H-J, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SHE. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microb* 1999; 33(6): 1103-1117.
111. Urquhart BL, Cordwell SJ, Humphery-Smith I. Comparison of predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(1): 70-9.
112. Abdallah AM, Hill-Cawthorne GA, Otto TD, Coll F, Guerra-Assuncao JA, Gao G, Naeem R, Ansari H, Malas TB, Adroub SA, Verboom T, Ummels R, Zhang H, Panigrahi AK, McNerney R, Brosch R, Clark TG, Behr MA, Bitter W, Pain A. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. *Sci Rep* 2015; 5: 15443.
113. Lewthwaite JC, Coates AR, Tormay P, Singh M, Mascagni P, Poole S, Roberts M, Sharp L, Henderson B. *Mycobacterium tuberculosis* chaperonin 60.1 is a more potent cytokine stimulator than chaperonin 60.2 (Hsp 65) and contains a CD14-binding domain. *Infect Immun* 2001; 69(12): 7349-55.
114. Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva CL. Identification and characterization of protective T cells in *hsp65* DNA-vaccinated and *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 1998; 66(1): 169-75.
115. Georgieva M, Sia JK, Bizzell E, Madan-Lala R, Rengarajan J. *Mycobacterium tuberculosis* GroEL2 Modulates Dendritic Cell Responses. *Infect Immun* 2018; 86(2).
116. Al-Attiyah R, Madi N, El-Shamy AS, Wiker H, Andersen P, Mustafa A. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47(2): 254-61.
117. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, Sabio y Garcia J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo

- M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 2013; 4(1): 3-66.
118. Master S, Zahrt TC, Song J, Deretic V. Mapping of *Mycobacterium tuberculosis katG* promoters and their differential expression in infected macrophages. *J Bacteriol* 2001; 183(13): 4033-9.
119. Betts J, Dodson P, Quan S, Lewis AP, Thomas PJ, Duncan K, McAdam RA. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolates CDC 1551. *Microbiology* 2000; 146: 3205-3216.
120. Roumestand C, Leiba J, Galophe N, Margeat E, Padilla A, Bessin Y, Barthe P, Molle V, Cohen-Gonsaud M. Structural insight into the *Mycobacterium tuberculosis* Rv0020c protein and its interaction with the PknB kinase. *Structure* 2011; 19(10): 1525-34.
121. Pennell S, Westcott S, Ortiz-Lombardia M, Patel D, Li J, Nott TJ, Mohammed D, Buxton RS, Yaffe MB, Verma C, Smerdon SJ. Structural and functional analysis of phosphothreonine-dependent FHA domain interactions. *Structure* 2010; 18(12): 1587-95.
122. Grundner C, Gay LM, Alber T. *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains. *Protein Sci* 2005; 14(7): 1918-21.
123. Viswanathan G, Yadav S, Joshi SV, Raghunand TR, Jass J. Insights into the function of FhaA, a cell division-associated protein in mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2017; 364: fnw294.
124. Roback P, Beard J, Baumann D, Gille C, Henry K, Krohn S, Wiste H, Voskuil MI, Rainville C, Rutherford R. A predicted operon map for *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(15): 5085-95.
125. Armstrong RM, Adams KL, Zilisch JE, Bretl DJ, Sato H, Anderson DM, Zahrt TC. Rv2744c Is a PspA Ortholog That Regulates Lipid Droplet Homeostasis and Nonreplicating Persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 2016; 198(11): 1645-1661.

126. Karakousis PC, Yoshimatsu T, Lamichhane G, Woolwine SC, Nuernberger EL, Grosset J, Bishai WR. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J Exp Med* 2004; 200(5): 647-57.
127. Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, Sayes F, Bitter W, Brennan MJ, Leclerc C, Batoni G, Campa M, Brosch R, Esin S. Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol* 2012; 83(6): 1195-209.
128. Singh A, Kumar Gupta A, Gopinath K, Sharma P, Singh S. Evaluation of 5 Novel protein biomarkers for the rapid diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: preliminary results. *Sci Rep* 2017; 7: 44121.
129. Ferraz JC, Stavropoulos E, Yang M, Coade S, Espitia C, Lowrie DB, Colston MJ, Tascon RE. A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. *Infect Immun* 2004; 72(12): 6945-50.
130. Satchidanandam V, Kumar N, Biswas S, Jumani RS, Jain C, Rani R, Aggarwal B, Singh J, Kotnur MR, Sridharan A. The secreted protein Rv1860 of *Mycobacterium tuberculosis* stimulates human polyfunctional CD8+ T cells. *Clin Vaccine Immunol* 2016; 23(4): 282-93.
131. Mohamedmohaideen NN, Palaninathan SK, Morin PM, Williams BJ, Braunstein M, Tichy SE, Locker J, Russell DH, Jacobs WR, Jr., Sacchettini JC. Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement A of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 2008; 47(23): 6092-102.
132. AERAS. Vaccine Candidates. En: <http://www.aeras.org/candidates>. Fecha de consulta: 1-Dic-19.
133. Floczyk MA, McCue LA, Stack RF, Hauer CR, McDonough KA. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding

- proteins. *Infect Immun* 2001; 69(9): 5777-5785.
134. Lata M, Sharma D, Deo N, Tiwari PK, Bisht D, Venkatesan K. Proteomic analysis of ofloxacin-mono resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Proteomics* 2015; 127(Pt A): 114-21.
  135. Boradia VM, Malhotra H, Thakkar JS, Tillu VA, Vuppala B, Patil P, Sheokand N, Sharma P, Chauhan AS, Raje M, Raje CI. *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin. *Nat Commun* 2014; 5: 4730.
  136. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 2003; 48(1): 77-84.
  137. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sassetti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog* 2011; 7(9): e1002251.
  138. Botella L, Vaubourgeix J, Livny J, Schnappinger D. Depleting *Mycobacterium tuberculosis* of the transcription termination factor Rho causes pervasive transcription and rapid death. *Nat Commun* 2017; 8: 14731.
  139. Devasundaram S, Deenadayalan A, Raja A. *In silico* analysis of potential human T Cell antigens from *Mycobacterium tuberculosis* for the development of subunit vaccines against tuberculosis. *Immunol Invest* 2014; 43(2): 137-59.
  140. Irwin SM, Goodyear A, Keyser A, Christensen R, Troudt JM, Taylor JL, Bohsali A, Briken V, Izzo AA. Immune response induced by three *Mycobacterium bovis* BCG substrains with diverse regions of deletion in a C57BL/6 mouse model. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(5): 750-6.
  141. Bertholet S, Ireton GC, Kahn M, Guderian J, Mohamath R, Stride N, Laughlin EM, Baldwin SL, Vedvick TS, Coler RN, Reed SG. Identification of human T cell antigens for the development of vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2008; 181(11): 7948-57.

142. Windish HP, Duthie MS, Misquith A, Ireton G, Lucas E, Laurance JD, Bailor RH, Coler RN, Reed SG. Protection of mice from *Mycobacterium tuberculosis* by ID87/GLA-SE, a novel tuberculosis subunit vaccine candidate. *Vaccine* 2011; 29(44): 7842-8.
143. Glass LN, Swapna G, Chavadi SS, Tufariello JM, Mi K, Drumm JE, Lam TT, Zhu G, Zhan C, Vilcheze C, Arcos J, Chen Y, Bi L, Mehta S, Porcelli SA, Almo SC, Yeh SR, Jacobs WR, Jr., Torrelles JB, Chan J. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 interacts with the putative ATP binding cassette (ABC) transporter Rv1747 to regulate mycobacterial growth. *PLoS Pathog* 2017; 13(7): e1006515.
144. Benini S, Wilson K. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* soluble inorganic pyrophosphatase Rv3628 at pH 7.0. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 2011; 67(Pt 8): 866-70.
145. Kim WS, Kim JS, Cha SB, Kim H, Kwon KW, Kim SJ, Han SJ, Choi SY, Cho SN, Park JH, Shin SJ. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3628 drives Th1-type T cell immunity via TLR2-mediated activation of dendritic cells and displays vaccine potential against the hyper-virulent Beijing K strain. *Oncotarget* 2016; 7(18): 24962-82.
146. Shahine A, Prasetyoputri A, Rossjohn J, Beddoe T. A structural characterization of the isoniazid *Mycobacterium tuberculosis* drug target, Rv2971, in its unliganded form. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2014; 70(Pt 5): 572-7.
147. Kumar B, Sharma D, Sharma P, Katoch VM, Venkatesan K, Bisht D. Proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin and amikacin. *J Proteomics* 2013; 94: 68-77.

## ANEXOS

### ANEXO I. MEDIOS Y SOLUCIONES

Soluciones Stock para geles de SDS-PAGE.

A. *Solución de Acrilamida 30% / Bis-acrilamida (3%).*

29.1 g de acrilamida + 0.9 g de Bis-acrilamida, con 100 mL con dH<sub>2</sub>O.

Desgasificar.

Filtrar con membrana de 0.45 mm. Almacenar a 4° C en frasco ámbar.

B. Tris-HCl, pH 8.8 (1.5 M).

27.23 g Tris base (18.15 g/100 mL)

≈ 80 mL dH<sub>2</sub>O.

Ajustar a pH 8.8 con 1N HCl.

Llevar a 150 mL con dH<sub>2</sub>O y almacenar a 4° C.

C. Tris-HCl, pH 8.8 (0.5 M).

6 g Tris base.

≈ 60 mL dH<sub>2</sub>O

Ajustar a pH 6.8 con 1N HCl. Llevar a 100 mL con dH<sub>2</sub>O y almacenar a 4° C.

D. SDS al 10%.

Disolver 10 g SDS en agua con agitación generosa y llevar a 100 mL con dH<sub>2</sub>O.

E. Solución amortiguadora de muestra (reductora con SDS).

dH<sub>2</sub>O 4.0 mL

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.0 mL

Glicerol 0.8 mL

10 % (w/v) SDS 1.6 mL

2-b-mercaptoetanol 0.4 mL

0.05 % (w/v) azul bromofenol 0.2 mL

TOTAL 8.0 mL

Diluir la muestra mínimo 1:4 con el buffer de muestra, a 95° C por 4 min.

Guardar a temperatura ambiente protegida de la luz (frasco ámbar).

F. Solución de corrida electroforética 5x (o de Corrida), pH 8.3 -suficiente para 10 corridas en la cámara Hoeffer SE-600-.

Tris base 9 g (15 g/L)

Glicina 43.1 g (72 g/L)

SDS 3 g (5 g/L)

Llevar a 600 mL con dH<sub>2</sub>O. En caso de precipitación, calentar a 37° C.

Diluir 60 mL de solución 5x con 240 mL de dH<sub>2</sub>O para una corrida.

G. Soluciones para la Tinción de Geles con Nitrato de Plata

1. *Fijación*: 40% Etanol (Grado reactivo [Sigma]) + 5% Ác. acético (p/electroforesis [Sigma]) + 50% dH<sub>2</sub>O.
2. *Lavado*: 50% Etanol + 50% dH<sub>2</sub>O.
3. *Pre-tratamiento*: Tiosulfato de sodio pentahidratado (0.2 g/L) (para electroforesis [Merk]).
4. *Impregnación*: Nitrato de plata (2 g/L) (Sigma) + 0.75 mL Formaldehído 37% / L (para electroforesis [Sigma]).
5. *Revelado*: Carbonato de sodio (60 g/L) (para electroforesis [Sigma]) + 0.5 mL Formaldehído 37% / L + Tiosulfato de sodio pentahidratado (4 mg/L –concentración final-).
6. *Paro*: 1% Ácido acético + 99% dH<sub>2</sub>O.

## ANEXO II. TÉCNICAS DE LABORATORIO

### 1. CULTIVO, COSECHA Y LISIS DE *M. BOVIS* BCG

#### Cultivo de *M. bovis* BCG

El cultivo de las subcepas se hizo conforme a las técnicas estandarizadas en trabajos previos en el grupo.<sup>94, 95</sup> Se tomaron alícuotas congeladas a -70 °C de cada subcepa, se descongelaron y 100 µL del homogenizado se sembraron en placas de medio Middlebrook 7H10 (Difco, USA) enriquecido con OADC (BBL, USA), las cuales fueron incubadas por 14 días a 37 °C, con 3.5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad. Al término de ese tiempo, se tomó una colonia que fue resuspendida en solución salina isotónica (SSI) estéril. Se ajustó en 0.6 la densidad óptica a 600 nm de todas las subcepas. De esa suspensión se tomó 1 mL para inocular 125 mL de medio Middlebrook 7H9 (Difco, USA) enriquecido con ADC (BBL, USA), el cual fue cultivado de manera continua por 20 días a 37 °C con 80 rpm de agitación orbital. Cada 24 hrs se determinó la densidad óptica a 600 nm, con los datos se construyó una curva de crecimiento.

Se determinó el día 8 como el final de la fase logarítmica de crecimiento. Se realizó nuevamente un cultivo de las micobacterias como se describió previamente. Al día 8 fueron cosechadas por centrifugación a 10,000 rpm x 10 min, lavadas 3 veces en agua desionizada estéril y resuspendidas en agua desionizada estéril, a razón de 1 mL por cada 100 mg de bacterias (peso húmedo).

#### Lisis de *M. bovis* BCG

Para lisar a las bacterias por sonicación se utilizó un aparato Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, USA). Una vez cosechado y lavado, el paquete bacteriano se colocó en un frasco de vidrio sumergido en hielo, dentro de una campana de bioseguridad clase II-A. Se aplicó ultrasonido con una punta de 2 mm de diámetro, en 15 pulsos al 100% de salida, de 1 min encendido / 1 min apagado cada uno. Para estandarizar la lisis de las bacterias se tomaron muestras representativas cada 3 pulsos, para ser vistas al microscopio con la tinción de Ziehl-Neelsen. Se determinó que a los 15 pulsos se obtenía una lisis prácticamente total de las bacterias. Para evitar la degradación de la muestra por proteasas, se agregó 10 mM de inhibidor de proteasas (Fluoruro de fenilmetilsulfonil [PMSF], Sigma, USA), dividido en dos administraciones, la primera al término del quinto pulso y la segunda al término del último pulso.

Una vez concluida la lisis, la muestra fue separada por centrifugación a 10,000 rpm x 5 min. Una fracción del sobrenadante se empleó para la cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford. Al resto de la suspensión se le agregó CHAPS 4% (3-[(3-cloramidopropil)dimetilamonio]-1-propanesulfonato), Ditioteitol (DTT) 70 mM y Urea 9M y fue ultracentrifugada a 100,000 X g por 30 min y fue utilizado para el análisis proteómico.

### 2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

#### a. Reactivo de Bradford:

Preparar a temperatura ambiente.

0.1 g de Coomassie G250.

50 mL etanol

agitar



100 mL de ácido fosfórico.  
Aforar a 1 litro con agua desionizada.

Filtrar con papel filtro (Wattman #1).  
Guardar en frasco ámbar a 4 °C.  
Cada vez que vaya a utilizarse deberá ser filtrado nuevamente.

**b. Curva de Estándares:**

- Hacer un estándar de Albúmina: 1 mg / mL.
- El coeficiente de absortividad debe ser 0.6 al medir a 280 nm.

Estándares:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
Albúmina (µL)	0	10	20	40	60	80	100
dH <sub>2</sub> O (µL)	100	90	80	60	40	20	0
Bradford (mL)	1	1	1	1	1	1	1
[Proteínas] µg	0	10	20	40	60	80	100

Medir absorbancia a 595 nm.

Construir la curva colocando los valores de absorbancia en el eje Y, y la concentración de proteínas en el eje X.

**c. Medición de la muestra:**

- Tomar 10 µL de la muestra, agregar 90 µL de dH<sub>2</sub>O y 1 mL de Bradford y medir a 595 nm. Determinar la concentración de proteínas en función de la fórmula de la curva estándar.
- En caso de que la concentración de la muestra sea mayor al valor máximo de la curva hay que hacer diluciones 1:2, 1:5 o 1:10.
- Medir dos o tres diluciones de la muestra, por duplicado. Promediar para un valor final.
- Sustituir los valores en la fórmula de la curva para determinar la concentración de proteínas en la muestra.

**2. Equilibrio de las tiras IPG, una vez terminado el isoelectroenfoque:**

- 1) Sacar la tira de la cámara de isoelectroenfoque.
- 2) Retirar el exceso de aceite con dH<sub>2</sub>O; colocar sobre papel filtro para eliminar excesos.
- 3) Colocar la tira en un tubo de ensaye, siempre con el lado plástico hacia abajo.
- 4) Preparar Solución A:
  - 7 mL de la solución de equilibrio.
  - + 500 µL de DTT 1 M.
  - + 1.4 mL de SDS 10%.
- 5) Colocar la tira en la Solución A y dejar en agitación leve durante 15 minutos.

- 6) Preparar Solución B:            7 mL de la solución de equilibrio.  
  + 250 mg de iodoacetamida.  
  + 1.4 mL SDS 10%.
- 7) Al término del Paso 5. Cambiar la tira IPG al tubo con la Solución B y dejar en agitación leve por 15 min.
- 8) Al término del Paso 7, se puede colocar la tira sobre un papel filtro ligeramente mojado con dH<sub>2</sub>O (con la cara con el gel hacia arriba), de preferencia apoyando sobre uno de los bordes de la tira. Puede permanecer en esa posición hasta por 10 min. Se puede retirar el exceso de solución de equilibrio absorbiendo las gotas con papel filtro húmedo, sin lastimar el gel de la tira.

### 3. Fijación y Revelado de Geles de Poliacrilamida con Proteínas

A continuación se describen los pasos a seguir para la tinción de geles de poliacrilamida que contengan proteínas. Se recomienda utilizar esta tinción para aquellos geles que no contengan más de cien microgramos de proteínas, debido a la alta sensibilidad del nitrato de plata para detectar as proteínas. La tinción aquí descrita no es un método cuantitativo que permita inferir la abundancia de cada proteína revelada.

Todas las soluciones deben prepararse el mismo día en que serán utilizadas. Todos los procedimientos se realizan a temperatura ambiente.

1. Al finalizar la corrida electroforética, colocar el gel en un recipiente en el cual quede completamente plano, sin dobleces del gel. Agregar solución de fijación suficiente para que lo cubra por completo y dejar en agitación leve (50 rpm) durante 1 h.
2. Colectar los desechos de la solución de fijación y realizar 3 lavados de 20 seg cada uno en la solución de lavado.
3. Colectar los desechos de la solución de lavado e incubar en solución de pre-tratamiento exactamente durante 1 min.
4. Desechar los restos de la solución de pre-tratamiento y realizar 3 lavados de 20 seg cada uno en H<sub>2</sub>O.
5. Agregar la solución de impregnación y dejar en agitación leve (50 rpm) durante 20 min.
6. Colectar los desechos de la solución de impregnación y realizar 2 lavados de 20 seg cada uno en H<sub>2</sub>O.
7. Agregar 10 mL de la solución de revelado y enjuagar el gel y el recipiente. Desechar esa solución y agregar el resto de la solución de revelado. Mantener en agitación hasta que se logre la imagen deseada.
8. Desechar la solución de revelado y lavar 2 veces 20 seg con H<sub>2</sub>O.
9. Agregar la solución de paro. Capturar la imagen del gel dentro de la siguiente media hora de que se haya detenido el revelado. En esa solución se puede quedar el gel por tiempo indefinido, en refrigeración y bien tapado.

### ANEXO III. PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS Y DISTINCIONES

Durante el desarrollo del presente trabajo, parte de los avances fueron presentados en los siguientes foros:

Título	Co-autores	Lugar de presentación
<i>Posters en reuniones científicas</i>		
<b>ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PROTEOMAS DE LAS VACUNAS DE MYCOBACTERIUM BOVIS BCG CONTRA LA TUBERCULOSIS POR ELECTROFORESIS DE DOS DIMENSIONES.</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ; MAURICIO CASTAÑÓN-ARREOLA; SERGIO ENCARNACIÓN; ANGEL GABRIEL MARTÍNEZ BATALLAR; YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	XXVIII Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Pue. 2004
<b>COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO MYCOBACTERIUM BOVIS BCG VACCINES' PROTEOMES</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; GUILLERMO MENDOZA-HERNÁNDEZ MAURICIO CASTAÑÓN-ARREOLA SERGIO ENCARNACIÓN ANGEL; GABRIEL MARTÍNEZ BATALLAR YOLANDA LOPEZ-VIDAL	6 <sup>th</sup> International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections. Estocolmo, Suecia. 2005
<b>COMPARACIÓN DE LOS PROTEOMAS DE DOS SUBCEPAS DE M. BOVIS BCG</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	Seminario del Departamento de Microbiología y Parasitología. Fac.Med.-UNAM. México, D.F. 2005
<b>ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO ENTRE DOS SUBCEPAS DE LA VACUNA CONTRA TUBERCULOSIS, MYCOBACTERIUM BOVIS BCG</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ SERGIO ENCARNACIÓN; GUILLERMO MENDOZA-HERNÁNDEZ MAURICIO CASTAÑÓN-ARREOLA YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	2 <sup>do</sup> Congreso Académico "Dr. Roberto Kretschmer Schmid". Fac. Medicina-UNAM. México, D.F. 2006
<b>PROTEÓMICA COMPARATIVA DE MYCOBACTERIUM MICROTI Y MYCOBACTERIUM BOVIS BCG MEXICO 1965</b>	GUSTAVO OLVERA GARCIA MAURICIO RODRIGUEZ-ALVAREZ GUILLERMO MENDOZA HERNANDEZ; YOLANDA LOPEZ VIDAL	II Simposio Mexicano de Espectrometría de Masas, Proteómica Celular y Molecular. Guanajuato, Gto. 2007
<b>PROTEÓMICA COMPARATIVA DE DOS SUBCEPAS DE LA VACUNA MYCOBACTERIUM BOVIS BCG CONTRA LA TUBERCULOSIS</b>	MAURICIO RODRIGUEZ-ALVAREZ SERGIO ENCARNACION GUILLERMO MENDOZA; HERNÁNDEZ JUAN JOSE CALVA MERCADO YOLANDA LOPEZ VIDAL	II Simposio Mexicano de Espectrometría de Masas, Proteómica Celular y Molecular. Guanajuato, Gto. 2007
<b>COMPARACION DE LOS PROTEOMAS DE DOS VACUNAS DE MYCOBACTERIUM BOVIS BCG CONTRA LA TUBERCULOSIS</b>	MAURICIO RODRIGUEZ-ALVAREZ GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ YOLANDA LOPEZ VIDAL	Primer Encuentro de Carteles Sobre Investigación Realizada por Estudiantes. Fac. Medicina-UNAM. México, D.F. 2007

Título	Co-autores	Lugar de presentación
<b>DIFERENCIAS FENOTÍPICAS ENTRE DOS VACUNAS BCG A NIVEL PROTEÓMICO.</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; SERGIO ENCARNACIÓN; GUILLERMO MENDOZA-HERNÁNDEZ; JUAN JOSÉ CALVA; YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	XXXIV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 2009
<i>Presentación oral</i>		
<b>ACTUALIZACIÓN EN TUBERCULOSIS</b>	MAURICIO RODRIGUEZ-ALVAREZ	Diplomado de Actualización en Microbiología Clínica y de Laboratorio. Benemérita Universidad de Puebla. Puebla, Pue. 2007
<b>2D-GE (PROTEÓMICA)</b>	MAURICIO RODRIGUEZ-ALVAREZ	Tópico Selecto Teórico-Práctico de Proteómica. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. México, DF. 2008
<b>ANÁLISIS PROTEÓMICO DE DOS VACUNAS BCG</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; YOLANDA LÓPEZ VIDAL	Primer Simposio de Tuberculosis, Paratuberculosis y Otras Micobacteriosis de Importancia en Salud Animal. Fac. Veterinaria-UNAM. México, D.F. 2008
<b>ANÁLISIS IN SÍLICO (PROTEÓMICA)</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	Tópico Selecto Teórico-Práctico de Proteómica. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 2008
<b>PROTEOMAS COMPARATIVOS ENTRE DOS SUBCEPAS M. BOVIS BCG Y M. TUBERCULOSIS</b>	MAURICIO RODRÍGUEZ-ALVAREZ; YOLANDA LÓPEZ-VIDAL	5º Simposio Fronteras del Conocimiento en Tuberculosis y Otras Micobacteriosis "Dr. Joseph Colston". México, D.F. 2009

## ANEXO IV. DISTINCIONES

Distinción	Título	Presentado En
Primer Lugar	<b>DIFERENCIAS FENOTÍPICAS ENTRE DOS VACUNAS BCG A NIVEL PROTEÓMICO.</b>	XXXIV Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. 2009
Primer Lugar	<b>COMPARACION DE LOS PROTEOMAS DE DOS VACUNAS DE MYCOBACTERIUM BOVIS BCG CONTRA LA TUBERCULOSIS</b>	Primer Encuentro de Carteles Sobre Investigación Realizada por Estudiantes. Fac. Medicina-UNAM. México, D.F. 2007

## **ANEXO V. ARTÍCULOS PUBLICADOS**

1. Rodríguez-Alvarez M, Mendoza-Hernández G, Encarnación S, Calva JJ, López-Vidal Y. Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. *Tuberculosis* 2009; 89: 126-35. doi: 10.1016/j.tube.2008.12.001
2. Rodríguez-Alvarez M1, Palomec-Nava ID, Mendoza-Hernández G, López-Vidal Y. The secretome of a recombinant BCG substrain reveals differences in hypothetical proteins. *Vaccine* 2010; 28(23): 3997-4001. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.064

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

Tuberculosis 89 (2009) 126–135



Contents lists available at ScienceDirect

## Tuberculosis

journal homepage: <http://intl.elsevierhealth.com/journals/tube>

## GENERAL

## Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level

Mauricio Rodríguez-Alvarez<sup>a</sup>, Guillermo Mendoza-Hernández<sup>b</sup>, Sergio Encarnación<sup>c</sup>, Juan José Calva<sup>d</sup>, Yolanda López-Vidal<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio de Investigación, 4° piso, Av. Universidad #3000, Coyoacán, 04510 México, D.F., Mexico<sup>b</sup> Laboratorio de Péptidos y Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio de Investigación, 2° piso, Av. Universidad #3000, Coyoacán, 04510, México D.F., Mexico<sup>c</sup> Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 565-A, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico<sup>d</sup> Unidad de Epidemiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMSZ), Vasco de Quiroga #15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, 14000 México, D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 June 2008

Received in revised form

28 October 2008

Accepted 14 December 2008

## Keywords:

Proteomics

BCG

2D-PAGE

Tuberculosis

Protein identification

## SUMMARY

To contribute to *Mycobacterium bovis* BCG characterization, two substrains were analyzed using two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and mass spectrometry (MS), based on their protective efficacy in a pulmonary-tuberculosis mouse model. Cell-fraction proteins of BCG Denmark and Phipps substrains were separated into ~500 spots in 2D-PAGE. The proteomes were similar in protein number, and isoelectric point (pI) and molecular mass (MM) distribution. Statistical analysis, resulted in 72 spots with no change, and 168 and 90 unique for BCG Phipps or Denmark, respectively. Two hundred and fourteen spots showed changes in intensity of >1-fold, 138 of Denmark, and 76 of Phipps. Seventeen spots were selected for MS-based identification (13 from Phipps and 4 from Denmark), including unique, as well as proteins with changes in intensity. The proteins identified participate in virulence, detoxification, adaptation, lipid metabolism, information pathways, cell wall and cell processes, intermediary metabolism and respiration, or still hypotheticals. Our findings contribute to phenotype characterization of BCG substrains and provide new elements to consider for the design of diagnostic tools, drug targets and a new vaccine against tuberculosis based upon protein expression through quantitative statistical analysis.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guèrin (BCG) remains the only vaccine to protect against miliary and meningeal tuberculosis (TB) in humans.<sup>1</sup> Since its development in the 1920s, many substrains were derived from the original BCG due to worldwide distribution and different local conditions for vaccine production and preservation.<sup>2</sup> Not all BCG substrains remain available, and many studies have described differences among original BCG vaccine-derived substrains at several levels, including protective efficacy,<sup>1</sup> culture filtrate analysis,<sup>3,4</sup> genetic coding,<sup>5</sup> or protein comparison.<sup>6–8</sup>

According to the World Health Organization (WHO), it is mandatory to complete characterization of the BCG substrains to reduce TB threat.<sup>9</sup> High throughput gene sequencing has generated increased databases useful for predicting coding genes and protein

function. By these means, the BCG Pasteur 1173P2 genome was sequenced in its 4,374,522-bp (3954 protein-coding genes).<sup>10</sup> Proteomic approaches (mainly two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis [2D-PAGE] and mass spectrometry [MS]-based analysis) have identified proteins involved in stress response, low-oxygen tension,<sup>11</sup> intracellular response, or nutrient starvation in *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>4</sup> BCG substrains, including Chicago, Copenhagen, and Pasteur, have also been studied using proteomic approaches,<sup>6</sup> and several similarities and differences under standard culture conditions in the cell-fraction,<sup>7</sup> culture filtrate,<sup>4</sup> and more recently the membrane subproteome<sup>12</sup> have been described.

Recently we reported the protection level of 10 different BCG substrains in a pulmonary-tuberculosis mouse model.<sup>13</sup> On evaluating colony forming units (CFU), Delayed Type Hypersensitivity (DTH) response, and serological cytokine profile, we showed that BCG Phipps and Denmark induced similar protection against the challenge with *M. tuberculosis* H37Rv, nevertheless, animals vaccinated with BCG Denmark showed the highest pneumonic area in lungs – one of the most important components of the disease. Studying differences between BCG substrains at proteome level and

\* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56 16 08 44.  
E-mail address: lvidal@servidor.unam.mx (Y. López-Vidal).



## The secretome of a recombinant BCG substrain reveals differences in hypothetical proteins

Mauricio Rodríguez-Alvarez<sup>a</sup>, Iliana D. Palomec-Nava<sup>a</sup>, Guillermo Mendoza-Hernández<sup>b</sup>, Yolanda López-Vidal<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio de Investigación, 4<sup>o</sup> piso, Av. Universidad #3000, Coyoacán, 04510 México, D.F., México

<sup>b</sup> Laboratorio de Péptidos y Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio de Investigación, 2<sup>o</sup> piso, Av. Universidad #3000, Coyoacán, 04510 México, D.F., México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 August 2009

Received in revised form 21 January 2010

Accepted 28 January 2010

Available online 12 February 2010

#### Keywords:

BCG

Tuberculosis

Recombinant vaccines

### ABSTRACT

Tuberculosis remains a major human health problem worldwide, and strategies for its prevention include the generation and characterization of new recombinant vaccines containing immunodominant antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. By comparing the secretomes of wild-type *Mycobacterium bovis* and a PstS1-recombinant *M. bovis* BCG vaccine substrain (rBCG38), we identified six conserved hypothetical proteins (BCG2696, BCG1674, BCG0372, BCG0427, BCG2436c, and BCG3053) that are differentially expressed. Our findings will aid in the identification of highly immunogenic proteins present in rBCG.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Since the declaration of a global tuberculosis (TB) emergency by the World Health Organization in 1993, one goal has been the generation of a new vaccine that is better than the currently used *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette–Guèrin (BCG) vaccine and does not interfere with diagnostic tests [1,2]. BCG was generated by the attenuation of a virulent *M. bovis* strain through sub-culturing and has been used as a human vaccine since 1934. Since that time, many substrains derived from the original Pasteur substrain have arisen due to distribution for local production in many countries [3]. Recently, the variability among BCG substrains has been demonstrated using proteomic [4,5], genomic [6,7], epidemiological [8–10], and animal-based [11,12] approaches.

One of the most widely used strategies for generation of a new vaccine is to recombine immunodominant antigens from *Mycobacterium tuberculosis* into BCG to improve its efficacy [2,13,14]. In our laboratory, we constructed a recombinant BCG substrain (rBCG38) expressing the *M. tuberculosis* 38 kDa antigen (also denominated PstS1, PhoS, or PhoS1) that induced better protection than its wild-type parental strain, BCG Tice [15]. Encoded by *Rv0934*, PstS1 is present in many mycobacteria, including BCG and *M. tuberculo-*

*sis*. PstS1 participates in phosphate transport at the cell membrane and has been reported to be secreted [16]. Furthermore, numerous reports indicate that PstS1 is a target of both cellular and humoral immune responses [17,18].

We previously described the immune response to both virulent and hypervirulent mycobacterial challenge (*M. tuberculosis* H37Rv and *M. tuberculosis* Beijing) in mice vaccinated with either BCG Tice or the recombinant rBCG38. In all parameters evaluated (survival rate, colony-forming units in lungs, percentage of pneumonia, T cell subsets, and monocyte-derived cytokine profiles), rBCG38 provided better protection than BCG Tice [15]. Furthermore, we analyzed the cell-fraction proteome of two BCG substrains and found differences in hypothetical proteins [19]. In order to characterize the secretome of both vaccines, they were grown in Sauton media, and the culture supernatants were filtered and separated using two-dimensional denaturing gradient gel electrophoresis (2D-DGGE) within the pH range of 4–7. Based on the gel analysis, three spots were selected for protein identification by mass spectrometry. Of these, we identified hypothetical proteins; proteins involved in virulence, detoxification, or adaptation; and proteins involved in intermediary metabolism and respiration (mycobacterial functional categories 16, 0, and 7, respectively, according to <http://genolist.pasteur.fr/BCGList>). To our knowledge, this is the first report regarding the hypothetical proteins BCG0372 and BCG2436c (encoded by genes *Rv0333* and *Rv2420c*, respectively) in mycobacterial secretomes.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 23 21 47; fax: +52 55 56 16 08 44.  
E-mail address: [lvidal@servidor.unam.mx](mailto:lvidal@servidor.unam.mx) (Y. López-Vidal).