



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DEL SECRETOMA DE *Mycobacterium bovis* BCG SUBCEPA Tice Y SU RECOMBINANTE rBCGPstS-1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ILIANA DONAJÍ PALOMEC NAVA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

| | |
|---------------|---|
| Presidente | Dr. Rodolfo Castellón Calacios |
| Local | Dr. Benjamín Ónica Berenice Casas Navarrete |
| Secretario | Dra. Yolanda López Hidalgo |
| 1er. suplente | Dr. Juan Antonio Ovila Flores |
| 2do. suplente | Dr. Benjamín Adriana Peña Belmont |

El presente trabajo fue realizado en el Programa de Ingeniería Molecular y Biotecnología del Departamento de Microbiología y Parasitología del primer piso del edificio de Investigación Científica de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Yolanda López Hidalgo
asesor

Dr. Juan Antonio Ovila Flores
supervisor técnico

Liliana González Alarcón
representante

AGRADECIMIENTOS

□ la □niversidad □acional □tóno□a de □éxico por dar□e la oport□nidad de pertenecer a s□co□nidad□

□ la □ac□ltad de □□□□ica □a cada □no de □is profesores□por s□s ense□an□as acad□micas □conse□os en pro de la □e□ora de □i for□ación profesional□

□ la □ra□□olanda □ópe□□idal por la asesor□a brindada d□rante el desarrollo del presente traba□o□

□l □r□□□iller□o □endo□a □ern□nde□por s□colaboración para la identificación de prote□nas□

□l □r□□a□ricio □asta□ón □rreola por el tie□po dedicado a este pro□ecto□

□ cada □no de los □ie□bros del □□□ □ por apo□ar□e en la reali□ación de este est□dio□por s□paciencia □a□□da□

□ □is sinodales por asistir□e en la □e□ora del presente traba□o□

□n reconoci□iento especial para la □niversidad □acional □tóno□a de □éxico□por el apo□o económico otor□ado al Macroproyecto “□éneas □strate□ias epide□iológicas□enológicas □proteómicas en Salud Pública” en el área de Tuberculosis (Proyecto No. SDEI.PDi□□□□□□□□a través del “Programa Transdisciplinario en Investi□ación □esarrollo para □ac□ltades □Escuelas”; así como al otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico □□ro□ecto □□□□□□□□□□□□

DEDICATORIAS

A mis padres por sacrificio y apoyo por dar me la oportunidad de llegar hasta a donde alentarme a seguir adelante

A mi abuelo por ser una parte importante en mi vida

A mi familia y amigos por su apoyo y amistad de tantos años por creer en mí y apoyarme y escudarme

A mis compañeros de los "telerines" por ofrecerme su amistad por los momentos compartidos durante la carrera sin los cuales hubiera sido más difícil cumplir con esta etapa

A Gustavo, Mauricio, Hugo y todas las "niñas" del PIMM por su compañerismo y hacer más agradable mi estancia en el laboratorio

ÍNDICE

CONTENIDO DE LOS VOLUMENES

CONTENIDO DE LOS VOLUMENES

CONTENIDO DE LOS VOLUMENES

CONTENIDO DE LOS VOLUMENES

| | |
|--|--|
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| Aspectos generales de la tuberculosis | |
| Generalidades de la infección patológica | |
| Epidemiología | |
| Tuberculosis en México | |
| Control y prevención | |
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| Vacuna <i>M. bovis</i> bacilo Calmette-Guérin | |
| Desarrollo de nuevas vacunas contra la TB | |
| Proteínas de filtrado de cultivo | |
| Función e importancia | |
| Antígeno estérico de la vacuna recombinante rBCGst | |
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| CONTENIDO DE LOS VOLUMENES | |
| Cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> | |
| Cultivo bacteriano | |
| Obtención de proteínas de filtrado de cultivo | |
| Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante | |
| Electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones | |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1. Vacuna contra la tuberculosis
- Figura 1.2. *Mycobacterium tuberculosis*
- Figura 1.3. Representación esquemática de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*
- Figura 1.4. Ruta principal de transmisión de la tuberculosis
- Figura 1.5. Prevalencia mundial de tuberculosis pulmonar
- Figura 1.6. Prevalencia global de tuberculosis en México
- Figura 1.7. Factores que influyen en el resurgimiento epidémico de la TB en México
- Figura 1.8. Mecanismo de la vacuna BCG
- Figura 1.9. Meta-análisis de la eficacia protectora de la vacuna BCG
- Figura 1.10. Estrategias para desarrollo de nuevas vacunas contra la TB
- Figura 1.11. Secreciones de *Mycobacterium tuberculosis*
- Figura 1.12. Distribución total de los puntos detectados para *Mycobacterium tuberculosis*
- Figura 1.13. Historia clínica de un caso
- Figura 1.14. Detalle del análisis
- Figura 1.15. Análisis cuantitativo de puntos de las secreciones de *Mycobacterium tuberculosis*

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1. Características fenotípicas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. goodii*
- Tabla 1.2. Métodos para la normalización con base en el número total de píxeles
- Tabla 1.3. Número de puntos detectados
- Tabla 1.4. Estrategias identificadas

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

□ □ por ciento

□ □ □ rados □elsi□

□ □ □ □ □ □ electroforesis en □el de poliacrila□ida de dos di□ensiones □ □ □ pol□acrila□ide
□el electrop□oresis□en in□l□s□

a□ □ □ antes de □risto

□ □ □ □ □cido desoxirribon□cleico

□ □ □ □ □ nitrato de plata

□λ_m□ valor de absorbancia a □na lon□it□d de onda de □nanó□etros

□ □ □ □ □ bacilo □cido□alco□ol□resistente

□ □ □ □ bacilo de □al□ette□ □ □rin

□ □ □ □ alb□ □ina s□rica bovina □bovine ser□ □ alb□ □in□en in□l□s□

□ □ □ □ □ □ □ □ □ cola□idopropil□di □etila □onio □ □ □propanos□fonato

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □cido ac□tico

c□ □ cent□ □etros

□ □ □ □ □ dióxido de carbono

□ □ □ □ □irección □eneral de □pide□iolo□a

□ □ □ □ □ □ipersensibilidad retardada □delafed□f□pe □ □ipersensitivit□ □en in□l□s□

□ □ □ □ □ ditiotreitól

□t□ □ □ □ etanol

□ □ □ □ □ ramos

□ □ □ □ □ oras

□ □ □ □ □ d□ □a□ □a destilada

□ □ □ □ □ □cido clor□drico

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □edad relativa

□ □ □ □ □ iodoaceta□ida

□ □ □ □ □ □interferón □a□ □ □a

□ □ □ □ □ in□ □no□lob□lina □

□ □ □ □ □ interle□cina

□ □ □ □ □ □radiante in□obili□ado de p□ □ □ □ □obili□ed p□ □radiant□en in□l□s□

secuencia de inserción insertion sequence in

bilobases

amilodaltones

litro

croato rafia de lidos acoplada a espectro etra de asas en tandem con ionización por nanoelectrospray liid croato rap nanoelectrospray tandem aspectro et en in

olaridad o concentración olar

M. bovis = *Mycobacterium bovis*

multifracorresistente multiresistant tuberculosis en in

microrrao

iliraao

ininto

micróetro

ilolar

microlitro

ililitro

s icobacterias no tuberculosis

M. tuberculosis = *Mycobacterium tuberculosis*

concentración oral

carbonato de sodio

hidróxido de sodio

pentosulfato de sodio penta hidratado

ácido olíco albina dextrosa catalasa oleic acid alb in dextrose catalase en in

oraniación ndial de la ald

pb pares de bases

proteínas de filtrado de cultivo

potencial de hidróeno

derivado proteínico purificado protein purified derivative en in

persulfato de amonio

receptor de antígeno vacuolar que reconoce sobreexpresa el antígeno est

reacciones de diferencia reion of difference en in

revoluciones por in

se

dodecil sulfato de sodio sodio dodecil sulfato en in

secretaría de salud otrora secretaria de salud asistencia

instituto único de información para la vigilancia epidemiológica

síndrome de inmunodeficiencia adquirida

instituto nacional de información en salud

ratamiento cortado estrictamente supervisado

tuberculosis

TDM= trehalosa 6, 6' diacolato

virus de la inmunodeficiencia humana

instituto de epidemiología y control de enfermedades

subpoblación de linfocitos cooperadores tipo 4 helper 1 proctes en in

α = factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha en in)

unidades formadoras de colonia

olt ora

vol en vol en

tuberculosis con fracorresistencia extendida extensivel dr resistant

tuberculosis en in

vol peso vol en eivt vole en in

RESUMEN

Alonso-Camacho Diana et al. Análisis del secretoA de *Mycobacterium bovis* subcepa Bice
s recombinante r – tesis de licenciatura – Facultad de
Ciencias Exactas

La tuberculosis es un problema global de salud pública y los países pobres son los más afectados. La única vacuna aprobada por la Organización Mundial de la Salud para prevenir la TB es la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* la cual varía en su eficacia protectora contra la TB. Una alternativa para mejorar la eficacia protectora de la TB son las vacunas recombinantes que sobreexpresan antígenos inductoras de *M. tuberculosis* o *M. bovis* tales como las proteínas de filtrado de cultivo. La principal de las proteínas estudiadas es la lipoproteína de Bice la cual es reconocida por células en diferentes etapas de la infección tanto en modelos animales como en células de pacientes con TB. Este tipo de respuesta sí tiene las células participan en la modulación posterior desarrollo de inmunidad protectora tipo del hospedero hacia la infección de *M. tuberculosis*. La cepa recombinante de la vacuna Bice que sobreexpresa el antígeno r – induce mayor eficacia protectora contra *M. tuberculosis* en modelo murino de TB. En el presente trabajo se compararon los perfiles proteicos de las secreciones de la Bice recombinantes. Se analizó per se detectó expresión diferencial relativa para algunos puntos. Lo cual permitió identificar algunas proteínas involucradas en la modulación de la respuesta inducida por células del hospedero relacionadas al incremento en la protección conferida por r –

1. INTRODUCCIÓN

Desde épocas prehistóricas la tuberculosis causó daños a la humanidad y se han registrado hallazgos de ella en sitios de Italia, Egipto y Grecia. En países del Medio Oriente poblados durante la era neolítica se hallaron en esta enfermedad la era padecida por el hombre desde hace más de 4000 años. También se han encontrado indicios de ella en diversas regiones de Europa y África, como en lugares que correspondieron a los antiguos imperios griego y romano. En la era clásica, Hipócrates describió la enfermedad posteriormente Aristóteles la proponía como una enfermedad contagiosa. En el siglo XIX Europa se había convertido en el foco de infección de muchas epidemias de tuberculosis. A fines del siglo XIX comenzaron a establecerse las bases clínicas y patológicas de la enfermedad. No obstante se calcula que la tuberculosis acabó con la vida de una cuarta parte de la población europea durante la primera mitad del siglo XX debido a la mejora de las condiciones de vida y la vacunación masiva contra la tuberculosis. Al descubrimiento de los antibióticos en el siglo XX hacia los años 40 la enfermedad prácticamente había desaparecido en los países industrializados.

Mediados de la década de los 80's, el número de casos de tuberculosis comenzó a incrementarse debido principalmente a dos factores: el incremento de casos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y la situación de pobreza y malnutrición en países no desarrollados. Ante tal panorama la OMS fue declarada en 1986 como situación de emergencia mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con el propósito de impulsar la práctica de medidas para su control y eliminación. Hoy en día se estima que aproximadamente el 25% de la población mundial y mil millones están infectados con el bacilo de la tuberculosis. Cerca de 8 millones de individuos enferman de tuberculosis activa cada año de los cuales 3 millones son bacilíferos. Los bacilíferos tienen una alta probabilidad de propagar el agente infeccioso a otros. Hasta fines del siglo XX se había logrado controlar los esfuerzos por combatir la tuberculosis y la lucha contra la tuberculosis continúa vigente.

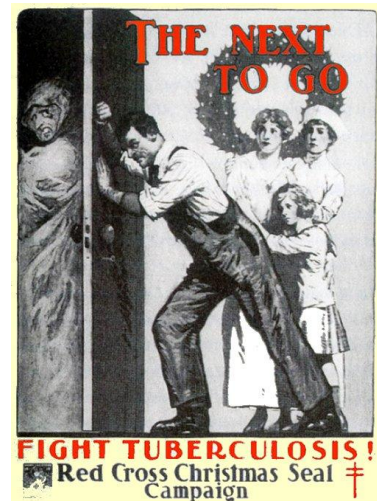


Figura 1 Cartel de propaganda emitido por la Cruz Roja en apoyo a una campaña lanzada en 1917 para recaudar fondos para combatir y prevenir la tuberculosis.

lipoproteínas El TDM se ha denominado como “factor cordón”, el cual es esencial para que el bacilo crezca formando “cordones serpentina”

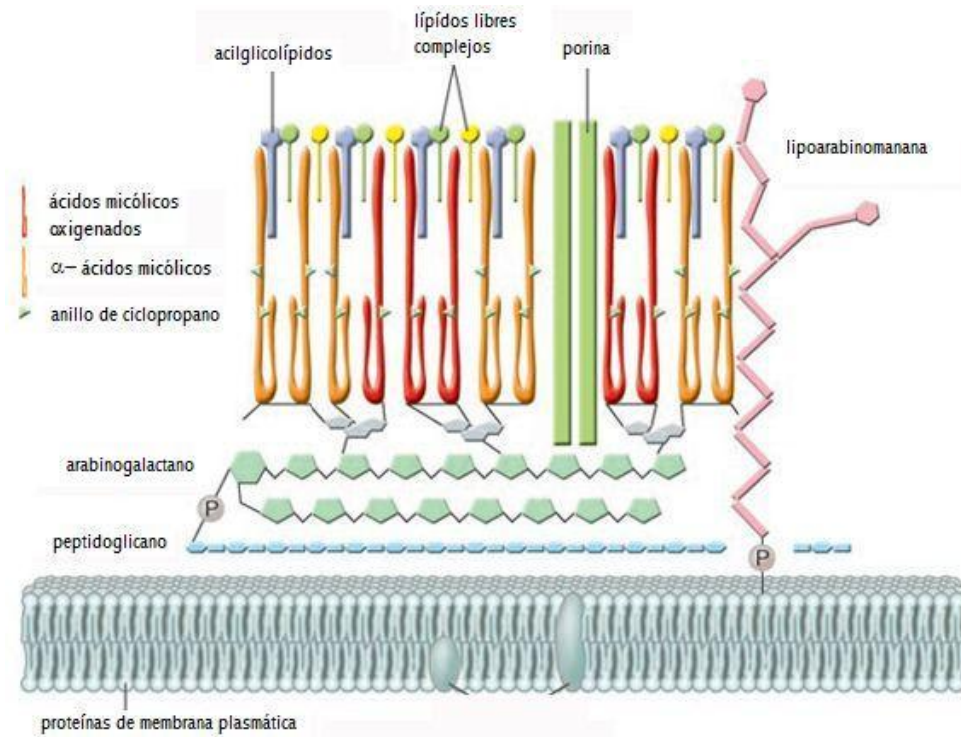


Figura 3. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis* En el dibujo se muestran los α -micolatos que son la forma más abundante. Los ceto- α -etoximicolatos oxigenados. Estos se encuentran unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano la cual está unida a la capa de peptidoglicano. Otros complejos lipídicos de la pared celular incluyen a los acilglicolípidos (incluyendo a los α -micolatos) y otros lípidos complejos libres. La lipoarabinomana se encuentra unida a la membrana plasmática a través de un enlace fosfodiéster.

La composición química tan peculiar de su pared celular le proporciona características especiales a las micobacterias: resistencia a la desecación, a la destrucción por calor, crecimiento lento, a sequías, requerimientos nutricionales especiales para su cultivo, alta hidrofobicidad, resistencia a agentes bactericidas, bacteriostáticos, frías, no se tiñen fácilmente por métodos convencionales, resisten a la decoloración por alcohol ácido, característica empleada por la tinción de Ziehl-Neelsen para identificar al grupo de microorganismos denominados bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) al cual pertenecen las micobacterias.

Los métodos utilizados para la diferenciación y caracterización genética de las especies micobacterianas se basan frecuentemente en la identificación de regiones de polimorfismo genético como las secuencias de inserción que se replican y transponen variando su ubicación dentro del genoma. Este elemento está presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*. Otra estrategia utilizada para la genotipificación es el análisis basado en la ausencia o presencia de regiones de diferencia en el polimorfismo generado por estas secuencias cortas de DNA. Ha sido una herramienta útil en la investigación de la evolución global y filogenia del complejo *M. tuberculosis*. A pesar de que los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* poseen más del 90% de homología genética, ambas presentan notables diferencias fenotípicas y patológicas.

| | cepa | | |
|---------|------------------------------|--------------------|-----------------------------|
| | <i>M. tuberculosis</i> H37Rv | <i>M. bovis</i> B6 | <i>M. bovis</i> BCG Pasteur |
| taaaopb | TTTTTT | TTTTTT | TTTTTT |
| TTTTTT | TTTTTT | TTTTTT | TTTTTT |
| TTT | TTT | TTT | TTT |

Tabla 1. Características genómicas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis*. En esta tabla ilustra la comparación de los genomas de cepas de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* en cuanto a taaaopb en pares de bases. El contenido de aminoácidos codificados por codones ricos en adenina y citosina (TTT) en el genoma de *M. tuberculosis* se codifican para una proteína (TTT).

La investigación proteómica de las especies micobacterianas ha cobrado en años recientes un lugar importante durante las últimas décadas. La utilización de diferentes técnicas como la electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones, espectrometría de masas, etc., ha proporcionado información relevante acerca de la localización de proteínas y su participación en el reconocimiento antígeno-crutas metabólicas y procesos de regulación celular. Algunas aplicaciones de las técnicas proteómicas son la comparación fenotípica entre cepas para la identificación de antígenos específicos de células o la caracterización de factores de virulencia o marcadores moleculares asociados a la patología o presentación de la enfermedad.

1.2. Generalidades de la infección y patogénesis

La transmisión de la TB primaria es por vía respiratoria. *M. tuberculosis* se diseña de persona a persona por medio de pequeñas gotas de saliva en aerosoles menores a 5 µm inhaladas al estornudar, expectorar, toser o hablar por individuos comúnmente llamados bacilíferos. Si bien la transmisión por objetos contaminados (fómites) es poco frecuente, otra forma de infección también se da por vía oral al ingerir leche o productos lácteos sin pasteurizar provenientes de animales infectados con *M. bovis* o por vía cutánea (oftalmica) al tener contacto con micobacterias no tuberculosas. Estas TB provocan en el humano afecciones clínicamente indistinguibles de la TB causada por *M. tuberculosis*.

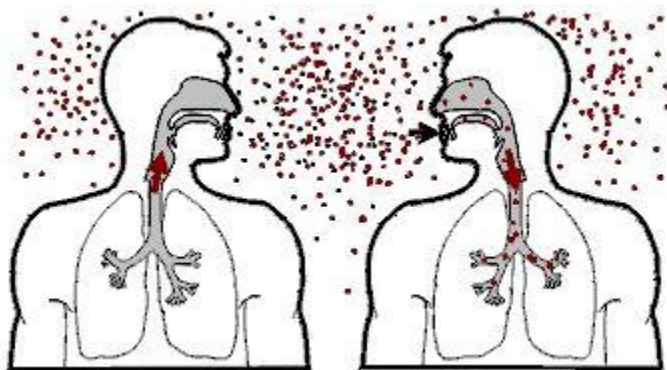


Figura 4. La principal de transmisión de la tuberculosis a enfermedad se diseña a través de aerosoles de saliva expuestas al toser, hablar o estornudar por personas infectadas (tomado de <http://textbookofbacteriology.net/tbspreadanimation/>)

De esta serie del 5 al 10% de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollan la enfermedad en alguna etapa de su vida. La mayoría de las variedades de la infección en humanos implican problemas casi exclusivamente en pulmones, si se diseña afecta prácticamente cualquier órgano (eso, piel, meninges, riñones, etc.).

M. tuberculosis es un microorganismo intracelular que se establece en pulmones, sobrevive a la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos alveolares, foco de infección al evadir los mecanismos microbicidas al multiplicarse dentro de las células peritone la diseminación de la infección a otros espacios. Una vez que los bacilos o moléculas secretadas por los

Los procesos producen inflamación en nodulos linfaticos locales se inicia una respuesta celular especifica mediada por linfocitos T la cual activa a macrófagos provoca la formación de una lesión conocida como granuloma caseo. Una zona interna contiene una mancha de tejido necrosado restos celulares bacterianos que en conjunto dan una apariencia de queso necrosis caseosa. Las micobacterias sobrevivientes en el granuloma se mantienen en estado latente al presentarse una alteración inmunológica del hospedero se reactiva el foco de infección los bacilos de nuevo proliferan la enfermedad se desarrolla con la producción de neofonía el mismo proceso de formación de granulomas pero con áreas extensas de necrosis caseosa estas lesiones se expanden hasta que su contenido caseoso se libera hacia la luz del árbol bronquial formando cavidades aireadas que resultan ideales para el desarrollo de los bacilos los cuales se liberan a través de las expectoraciones o pueden alcanzar el torrente sanguíneo y diseminarse hacia otros órganos.

La respuesta inmune protectora contra la TB es el resultado del balance entre la inmunidad especifica e inespecifica del hospedero. Los sintomas más frecuentes suelen ser fiebre, astenia, hemoptisis, pérdida de peso y disnea. El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad es por cultivo bacteriológico a partir de muestras sometidas previamente a la observación directa de Ziehl-Neelsen. La presencia de lesiones cavitarias se detecta mediante una prueba de radiografía. El tratamiento terapéutico para casos nuevos dura de 6 a 9 meses y comprende la administración de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, estreptomycin y etambutol.

1.3. Epidemiología

Alrededor del 25% de los pacientes con TB activa vive en países en vías de desarrollo. En donde se producen el 80% de las muertes por esta enfermedad. La TB acaba con la vida de aproximadamente 3 millones de personas al año. Las muertes al día. La tendencia epidemiológica de la incidencia de TB sigue aumentando en el mundo. La población adulta joven es la más afectada principalmente en países de África y Asia.

Existe un alto factor de riesgo para desarrollar la TB en los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) quienes padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) siendo la situación cada vez más alarmante a medida que se estima que un 10% de los casos de TB presentan coinfección con el VIH. Esta asociación tiene efectos graves ya que se ha convertido en la principal causa de defunción entre los pacientes infectados por el VIH. Mientras que los individuos VIH positivos infectados con *M. tuberculosis* tienen un 10% de probabilidad de desarrollar una reactivación de TB postinfección primaria en algún momento de su vida, los pacientes inmunosuprimidos pueden infectarse nuevamente con el bacilo en pocos casos mostrar una progresión rápida a enfermedad activa.

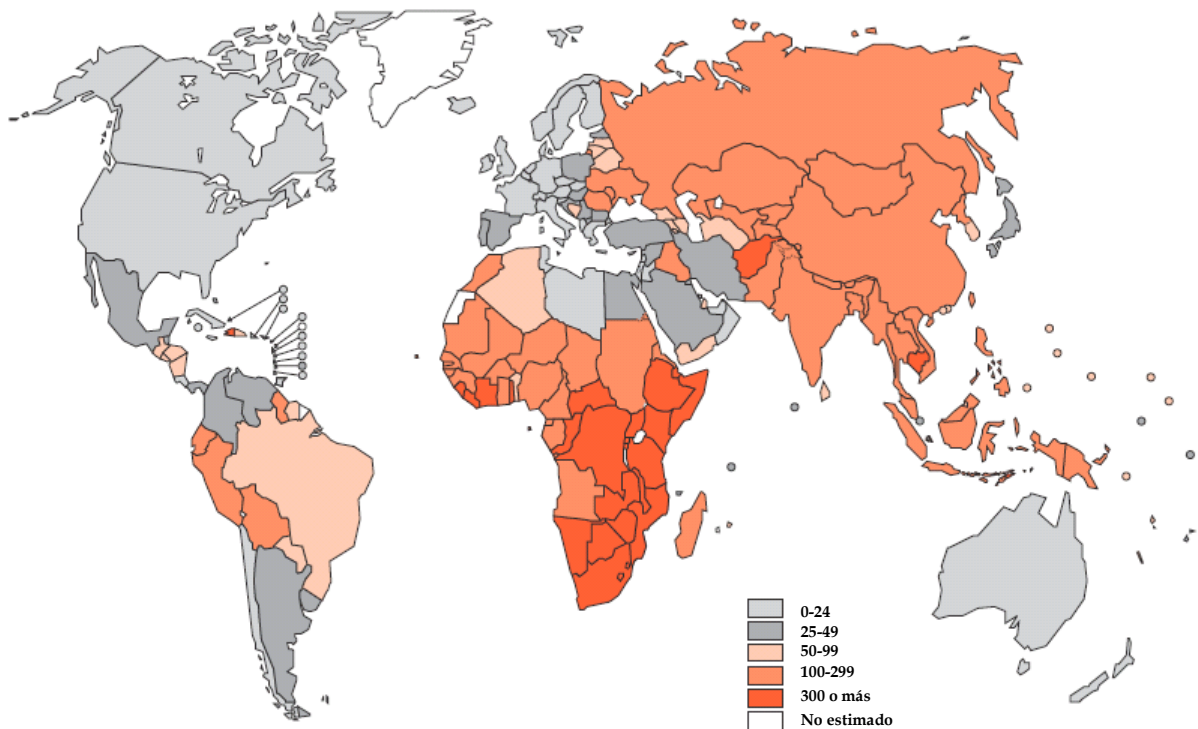


Figura 5. Incidencia mundial de tuberculosis. La incidencia de TB postinfección primaria por cada 100,000 habitantes por país reportada para el año 2000 por la OMS. Publicado en el informe de la OMS sobre el número de nuevos casos se registró en la región de Asia meridional. De la incidencia mundial sin embargo la incidencia estimada por habitante en el África subsahariana es casi el doble (casi 300 casos por cada 100,000 habitantes).

Por otro lado, un porcentaje considerable está relacionado al fenómeno de multirresistencia como consecuencia del tratamiento ineficiente de la enfermedad. Existen casos de TB multirresistente en los que por sí mismas en casi todos

los países del mundo en algunas regiones se han dado brotes de cepas de *M. tuberculosis* con fr^oacorresistencia extendida por s^os si^olas en in^os durante los ^oltimos años

De acuerdo a las estadísticas de la ^ose ha estimado que de no e^oprenderse medidas preventivas de control s^os efectivas contra la enfermedad entre los años ^o se infectar^on aproximada^omente ^o millones de personas ^o millones desarrollar^on la enfermedad activa ^o millones morir^on a causa de la ^o

1.4. Tuberculosis en México

En México el cuadro epidemiológico es también preocupante de acuerdo a la lista de indicadores de salud emitida por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud la es la causa de muerte ocasionada por un agente infeccioso único la población en edad productiva a años es la s^os afectada

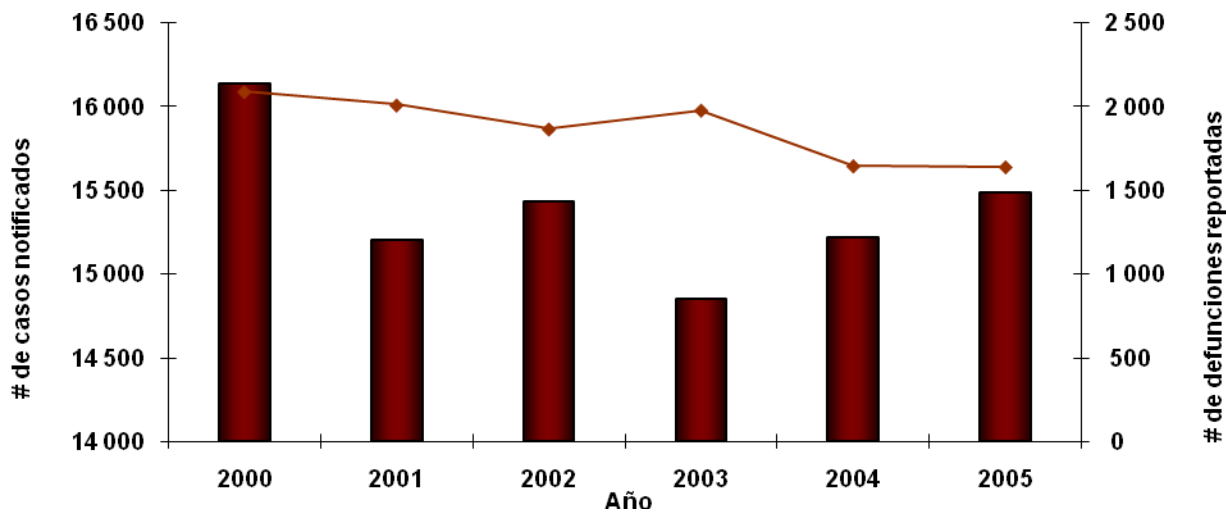


Figura 6. Incidencia y mortalidad de tuberculosis en México. Se grafica el número de casos (barras) de defunciones (línea) por año en población de 15 a 64 años reportados en el periodo comprendido de 2000 a 2005 elaborado a partir de las listas de indicadores de salud publicados vía electrónica por la ^o

A pesar de que ha habido un ligero decrecimiento en el número de casos y de defunciones reportadas por año a nivel nacional ^o esta enfermedad se ha situado desde el año

dentro de los primeros meses de las principales causas de mortalidad en población en edad productiva datos proporcionados por la OMS en el 2000 revelan que la cuarta parte de los casos de TB están asociados con otras enfermedades como son diabetes, desnutrición, alcoholismo o VIH/SIDA.

Existen datos epidemiológicos de la TB en México que muestran algunas discrepancias entre los casos notificados de ceguera y mortalidad por la OMS y los reportes de la OMS específicamente para el 2000 la OMS notificó una incidencia de 10 de 100 000 casos de ceguera por TB en México mientras que para ese mismo año la OMS en el boletín epidemiológico de la semana 4 de febrero reportó una incidencia nacional de 10 de 100 000 casos de ceguera de manera que en ese año existió un subregistro calculado alrededor de 10% en la ceguera y 10% en la mortalidad nacional.

Actualmente se estima que hay aproximadamente 10 000 casos de TB en nuestro país el cierre de 2000 en base a los casos publicados en el boletín de epidemiología de los estados con la mayor incidencia son Veracruz y California y Chiapas con 10 000 y 10 000 casos acumulados respectivamente.

La TB representa un problema de salud pública a nivel nacional y la actual situación social influye en su resurgimiento epidémico. Para ello por lo que la participación conjunta de todos los sectores involucrados con el desarrollo social del país facilitaría la eficiente aplicación de medidas que permitan lograr un mejor control y prevención de la enfermedad.

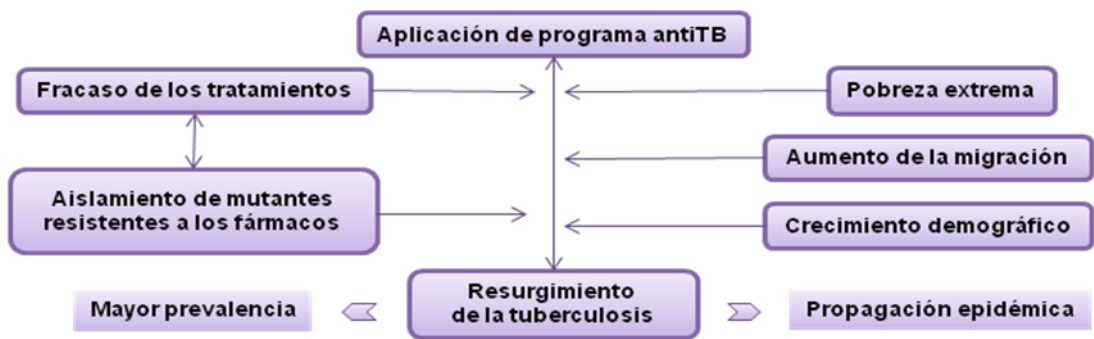


Figura 7. Factores que influyen en el resurgimiento epidémico de la TB en México: aplicación deficiente de un programa anti-tuberculosis, condición de pobreza y crecimiento poblacional.

2. ANTECEDENTES

Así una década después del descubrimiento de *M. tuberculosis* como agente causal de la tuberculosis Robert Koch desarrolló un extracto de cultivo puro de *M. tuberculosis* al que actualmente se le conoce como tuberculina Koch propiamente a la tuberculina como un agente terapéutico tras observar que cobayos animales altamente susceptibles a la tuberculosis infectados con *M. tuberculosis* podían recuperarse de la enfermedad al ser tratados con este extracto. Más tarde admitió el fracaso de la tuberculina como tratamiento tras obtener resultados desalentadores en muchos pacientes tuberculosos durante varios años Koch había estado en contacto con *M. tuberculosis* por lo que probablemente para muchos ya había desarrollado una respuesta inmune contra el microorganismo fue entonces que demostró que la tuberculina inducía una fuerte reacción en sí mismo finalmente planteó un uso como reactivo de diagnóstico para la tuberculosis al que la tuberculina se denomina derivado proteico purificado que es utilizada como método para detectar infección con *M. tuberculosis* [1]

2.1. Vacuna *M. bovis* Bacilo Calmette- Guèrin (BCG)

La investigación y desarrollo de vacunas específicas contra la tuberculosis impulsada en parte por el médico francés Louis Pasteur en el instituto que actualmente lleva su nombre de manera que antes de muchos comenzaron a probarse alternativas de vacuna a partir de bacilos muertos vivos atenuados o micobacterias no tuberculosas [2] [3]

Al principio del siglo XX Rodolfo Guérin aisló una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) a partir de leche proveniente de una vaca tuberculosa en 1908 esta cepa fue enviada al instituto Pasteur donde Albert Calmette y Camille Guérin se dedicaban al cultivo de cepas virulentas de *M. tuberculosis* en estos dos investigadores comenzaron una serie de cultivos de la cepa de *M. bovis* aislada por Guérin en medio de papa blanda de leche y glicerol en el que previamente habían observado que los bacilos se volvían menos virulentos después de unos meses realizados durante unos años [4] [5] a [6] obtuvieron la vacuna *M.*

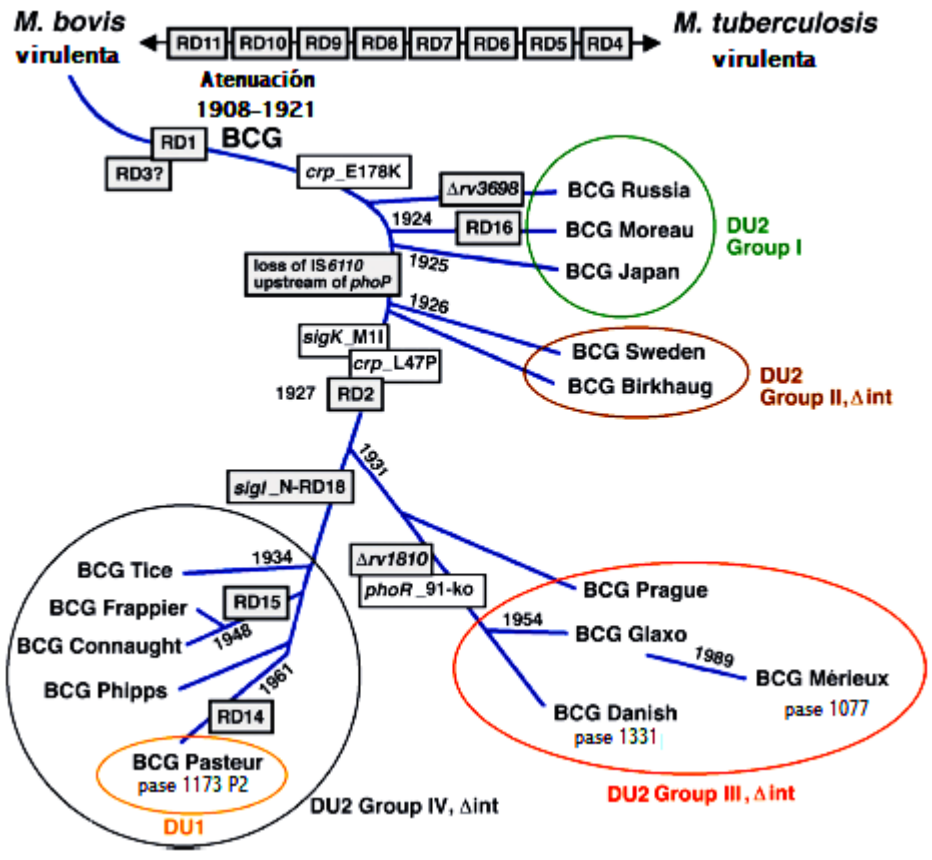


Figura 8 Diagrama de la vacuna BCG que muestra la obtención de la cepa original a partir de *M. bovis* y la posterior diversificación en las diferentes subcepas derivadas de la cepa Pasteur. Los recuadros blancos corresponden a la posición de marcadores genéticos identificados recientemente por Rose *et al.* En recuadros azules se indican los marcadores genéticos ausentes para diferentes subcepas con respecto a un aislamiento contemporáneo de *M. bovis*. Todas las subcepas carecen de la región IS6110. Los círculos se refieren a la distribución de las vacunas en tipos basados en la identificación de duplicaciones en tándem independientes. Δint se refiere al elemento de inserción IS6110.

La *M. bovis* protege eficazmente contra la tuberculosis miliar y en consecuencia son las formas graves de la enfermedad en la niñez. Ha sido aplicada a más de 100 millones de personas. Lo que hace la vacuna más utilizada en el mundo. En 1961 se inició en México la vacunación con la vacuna BCG. La Organización Panamericana establece que su aplicación es obligatoria en los recién nacidos. Todo niño no vacunado al nacimiento deberá recibirla antes de cumplir un año de edad. La vacuna se administra en la región deltoidea derecha por vía intradérmica sola o simultáneamente con otras vacunas a dosis única de 0.1 ml (10⁶ - 10⁷ unidades).

En diferentes ensayos clínicos realizados en distintas poblaciones se ha demostrado que la vacuna presenta gran variabilidad en su eficacia protectora contra la tuberculosis en población adulta. Si bien existen también discrepancias con respecto a la duración de la inmunidad que confiere la vacuna, varios autores sostienen que su eficacia protectora no dura más de unos años, sin embargo existen datos que indican que esta eficacia persiste hasta por años.

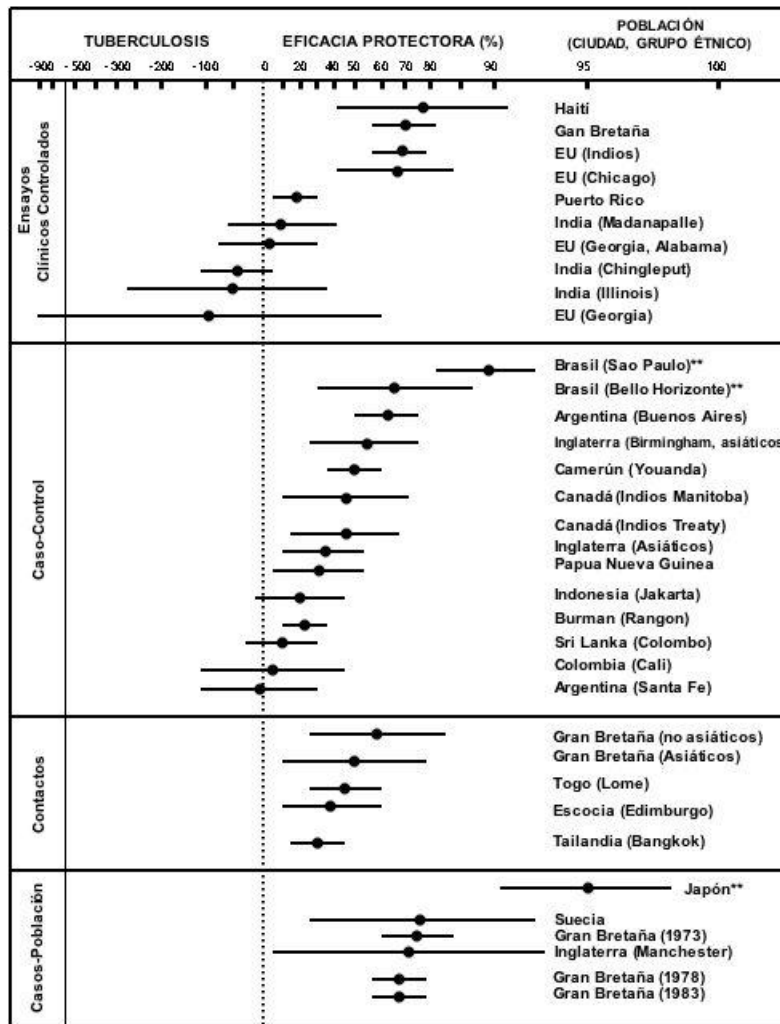


Figura 9 Meta-análisis de la eficacia protectora de la vacuna BCG. Se muestra el análisis de diferentes ensayos clínicos en los que se evaluó la eficacia protectora expresada en escala logarítmica de la vacuna contra la tuberculosis en distintas poblaciones. La variabilidad promedio es del 20% que va de 0 a 40%. Las barras indican intervalos de confianza del 95%.

Se han planteado varias hipótesis para tratar de explicar la variación en la protección conferida por la vacuna entre las vacunas. Se destacan las diferencias entre las subcepas de pérdida progresiva de su capacidad para generar una respuesta inmune de memoria protectora más durable. Atención de subcepas bloqueado o enmascaramiento por previa exposición a vacunas en áreas endémicas, susceptibilidad genética del hospedero [11].

No obstante hasta hace poco no se contaba con evidencia experimental que demostrara diferencias estadísticamente significativas en la eficacia protectora entre las diferentes BCG's. En el 2008 se evaluó la eficacia protectora de diez subcepas de BCG en un modelo murino de pérdida progresiva de memoria con base en los parámetros detectados: curva de supervivencia, carga bacilar en pulmón, hipersensibilidad retardada, respuesta de pulmón afectado con neofonación perfil de citocinas. Los resultados mostraron que la vacuna de Jipps confirió mayor protección a los animales ante el reto con la cepa tipo *M. tuberculosis*. Incluso en otro tipo de vacunas que confirieron menor nivel de protección se incluyó a la vacuna Jipps que continúa siendo una de las vacunas utilizadas para inmunizar niños [12].

Ante la variabilidad de la eficacia protectora de la vacuna es necesario desarrollar una nueva vacuna contra la tuberculosis que contribuya a un mejor control y prevención de la infección [13].

2.2. Desarrollo de nuevas vacunas contra la TB

Partir de la comparación de los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y *M. bovis* [14]. Tabla 1. Se evidenció que no existen grandes diferencias genéticas entre estos microorganismos por lo que para evaluar las diferencias en la eficacia protectora de la vacuna son necesarias otras herramientas. El análisis proteómico aporta información relevante acerca de la localización de proteínas y su participación en el reconocimiento antígeno, rutas metabólicas y procesos de regulación celular durante los últimos años sobre todo tras la secuenciación completa de los genomas de *M. tuberculosis* en 2000 y de *M. bovis* en el 2004. Cabe mencionar que en gran medida se ha avanzado en la identificación y caracterización de proteínas expresadas durante las diferentes etapas de la infección y la enfermedad [15]. Entre las diferencias que

presentan las subcepas [10] destaca el perfil de proteínas secretadas al medio de cultivo [11] y algunas de ellas han sido identificadas como inmunógenos [12] por tanto han sido un punto clave en la selección de antígenos candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas [13]

M. tuberculosis posee múltiples antígenos de naturaleza [14] reactividad inmunológica diversas [15] [16] polisacáridos [17] proteínas [18] sin embargo hasta la fecha no han sido definidas claramente cuáles [19] cuántas proteínas están involucradas en la inducción de una respuesta inmune protectora [20] mediada por células del hospedero infectado [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [124] [125] [126] [127] [128] [129] [130] [131] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145] [146] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154] [155] [156] [157] [158] [159] [160] [161] [162] [163] [164] [165] [166] [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173] [174] [175] [176] [177] [178] [179] [180] [181] [182] [183] [184] [185] [186] [187] [188] [189] [190] [191] [192] [193] [194] [195] [196] [197] [198] [199] [200] [201] [202] [203] [204] [205] [206] [207] [208] [209] [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216] [217] [218] [219] [220] [221] [222] [223] [224] [225] [226] [227] [228] [229] [230] [231] [232] [233] [234] [235] [236] [237] [238] [239] [240] [241] [242] [243] [244] [245] [246] [247] [248] [249] [250] [251] [252] [253] [254] [255] [256] [257] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264] [265] [266] [267] [268] [269] [270] [271] [272] [273] [274] [275] [276] [277] [278] [279] [280] [281] [282] [283] [284] [285] [286] [287] [288] [289] [290] [291] [292] [293] [294] [295] [296] [297] [298] [299] [300] [301] [302] [303] [304] [305] [306] [307] [308] [309] [310] [311] [312] [313] [314] [315] [316] [317] [318] [319] [320] [321] [322] [323] [324] [325] [326] [327] [328] [329] [330] [331] [332] [333] [334] [335] [336] [337] [338] [339] [340] [341] [342] [343] [344] [345] [346] [347] [348] [349] [350] [351] [352] [353] [354] [355] [356] [357] [358] [359] [360] [361] [362] [363] [364] [365] [366] [367] [368] [369] [370] [371] [372] [373] [374] [375] [376] [377] [378] [379] [380] [381] [382] [383] [384] [385] [386] [387] [388] [389] [390] [391] [392] [393] [394] [395] [396] [397] [398] [399] [400] [401] [402] [403] [404] [405] [406] [407] [408] [409] [410] [411] [412] [413] [414] [415] [416] [417] [418] [419] [420] [421] [422] [423] [424] [425] [426] [427] [428] [429] [430] [431] [432] [433] [434] [435] [436] [437] [438] [439] [440] [441] [442] [443] [444] [445] [446] [447] [448] [449] [450] [451] [452] [453] [454] [455] [456] [457] [458] [459] [460] [461] [462] [463] [464] [465] [466] [467] [468] [469] [470] [471] [472] [473] [474] [475] [476] [477] [478] [479] [480] [481] [482] [483] [484] [485] [486] [487] [488] [489] [490] [491] [492] [493] [494] [495] [496] [497] [498] [499] [500] [501] [502] [503] [504] [505] [506] [507] [508] [509] [510] [511] [512] [513] [514] [515] [516] [517] [518] [519] [520] [521] [522] [523] [524] [525] [526] [527] [528] [529] [530] [531] [532] [533] [534] [535] [536] [537] [538] [539] [540] [541] [542] [543] [544] [545] [546] [547] [548] [549] [550] [551] [552] [553] [554] [555] [556] [557] [558] [559] [560] [561] [562] [563] [564] [565] [566] [567] [568] [569] [570] [571] [572] [573] [574] [575] [576] [577] [578] [579] [580] [581] [582] [583] [584] [585] [586] [587] [588] [589] [590] [591] [592] [593] [594] [595] [596] [597] [598] [599] [600] [601] [602] [603] [604] [605] [606] [607] [608] [609] [610] [611] [612] [613] [614] [615] [616] [617] [618] [619] [620] [621] [622] [623] [624] [625] [626] [627] [628] [629] [630] [631] [632] [633] [634] [635] [636] [637] [638] [639] [640] [641] [642] [643] [644] [645] [646] [647] [648] [649] [650] [651] [652] [653] [654] [655] [656] [657] [658] [659] [660] [661] [662] [663] [664] [665] [666] [667] [668] [669] [670] [671] [672] [673] [674] [675] [676] [677] [678] [679] [680] [681] [682] [683] [684] [685] [686] [687] [688] [689] [690] [691] [692] [693] [694] [695] [696] [697] [698] [699] [700] [701] [702] [703] [704] [705] [706] [707] [708] [709] [710] [711] [712] [713] [714] [715] [716] [717] [718] [719] [720] [721] [722] [723] [724] [725] [726] [727] [728] [729] [730] [731] [732] [733] [734] [735] [736] [737] [738] [739] [740] [741] [742] [743] [744] [745] [746] [747] [748] [749] [750] [751] [752] [753] [754] [755] [756] [757] [758] [759] [760] [761] [762] [763] [764] [765] [766] [767] [768] [769] [770] [771] [772] [773] [774] [775] [776] [777] [778] [779] [780] [781] [782] [783] [784] [785] [786] [787] [788] [789] [790] [791] [792] [793] [794] [795] [796] [797] [798] [799] [800] [801] [802] [803] [804] [805] [806] [807] [808] [809] [810] [811] [812] [813] [814] [815] [816] [817] [818] [819] [820] [821] [822] [823] [824] [825] [826] [827] [828] [829] [830] [831] [832] [833] [834] [835] [836] [837] [838] [839] [840] [841] [842] [843] [844] [845] [846] [847] [848] [849] [850] [851] [852] [853] [854] [855] [856] [857] [858] [859] [860] [861] [862] [863] [864] [865] [866] [867] [868] [869] [870] [871] [872] [873] [874] [875] [876] [877] [878] [879] [880] [881] [882] [883] [884] [885] [886] [887] [888] [889] [890] [891] [892] [893] [894] [895] [896] [897] [898] [899] [900] [901] [902] [903] [904] [905] [906] [907] [908] [909] [910] [911] [912] [913] [914] [915] [916] [917] [918] [919] [920] [921] [922] [923] [924] [925] [926] [927] [928] [929] [930] [931] [932] [933] [934] [935] [936] [937] [938] [939] [940] [941] [942] [943] [944] [945] [946] [947] [948] [949] [950] [951] [952] [953] [954] [955] [956] [957] [958] [959] [960] [961] [962] [963] [964] [965] [966] [967] [968] [969] [970] [971] [972] [973] [974] [975] [976] [977] [978] [979] [980] [981] [982] [983] [984] [985] [986] [987] [988] [989] [990] [991] [992] [993] [994] [995] [996] [997] [998] [999] [1000]

durante la última década se han evaluado más de 1000 candidatos a vacuna en modelo animal [1] resultado de diferentes estrategias para su desarrollo [2] como son vacunas de subunidades proteicas [3] vacunas de ADN [4] vacunas atenuadas de otras cepas de micobacterias filogenéticamente [5] cercanas a [6] de *M. tuberculosis* [7] vacunas auxótrofas [8] vacunas recombinantes basadas en [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [124] [125] [126] [127] [128] [129] [130] [131] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145] [146] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154] [155] [156] [157] [158] [159] [160] [161] [162] [163] [164] [165] [166] [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173] [174] [175] [176] [177] [178] [179] [180] [181] [182] [183] [184] [185] [186] [187] [188] [189] [190] [191] [192] [193] [194] [195] [196] [197] [198] [199] [200] [201] [202] [203] [204] [205] [206] [207] [208] [209] [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216] [217] [218] [219] [220] [221] [222] [223] [224] [225] [226] [227] [228] [229] [230] [231] [232] [233] [234] [235] [236] [237] [238] [239] [240] [241] [242] [243] [244] [245] [246] [247] [248] [249] [250] [251] [252] [253] [254] [255] [256] [257] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264] [265] [266] [267] [268] [269] [270] [271] [272] [273] [274] [275] [276] [277] [278] [279] [280] [281] [282] [283] [284] [285] [286] [287] [288] [289] [290] [291] [292] [293] [294] [295] [296] [297] [298] [299] [300] [301] [302] [303] [304] [305] [306] [307] [308] [309] [310] [311] [312] [313] [314] [315] [316] [317] [318] [319] [320] [321] [322] [323] [324] [325] [326] [327] [328] [329] [330] [331] [332] [333] [334] [335] [336] [337] [338] [339] [340] [341] [342] [343] [344] [345] [346] [347] [348] [349] [350] [351] [352] [353] [354] [355] [356] [357] [358] [359] [360] [361] [362] [363] [364] [365] [366] [367] [368] [369] [370] [371] [372] [373] [374] [375] [376] [377] [378] [379] [380] [381] [382] [383] [384] [385] [386] [387] [388] [389] [390] [391] [392] [393] [394] [395] [396] [397] [398] [399] [400] [401] [402] [403] [404] [405] [406] [407] [408] [409] [410] [411] [412] [413] [414] [415] [416] [417] [418] [419] [420] [421] [422] [423] [424] [425] [426] [427] [428] [429] [430] [431] [432] [433] [434] [435] [436] [437] [438] [439] [440] [441] [442] [443] [444] [445] [446] [447] [448] [449] [450] [451] [452] [453] [454] [455] [456] [457] [458] [459] [460] [461] [462] [463] [464] [465] [466] [467] [468] [469] [470] [471] [472] [473] [474] [475] [476] [477] [478] [479] [480] [481] [482] [483] [484] [485] [486] [487] [488] [489] [490] [491] [492] [493] [494] [495] [496] [497] [498] [499] [500] [501] [502] [503] [504] [505] [506] [507] [508] [509] [510] [511] [512] [513] [514] [515] [516] [517] [518] [519] [520] [521] [522] [523] [524] [525] [526] [527] [528] [529] [530] [531] [532] [533] [534] [535] [536] [537] [538] [539] [540] [541] [542] [543] [544] [545] [546] [547] [548] [549] [550] [551] [552] [553] [554] [555] [556] [557] [558] [559] [560] [561] [562] [563] [564] [565] [566] [567] [568] [569] [570] [571] [572] [573] [574] [575] [576] [577] [578] [579] [580] [581] [582] [583] [584] [585] [586] [587] [588] [589] [590] [591] [592] [593] [594] [595] [596] [597] [598] [599] [600] [601] [602] [603] [604] [605] [606] [607] [608] [609] [610] [611] [612] [613] [614] [615] [616] [617] [618] [619] [620] [621] [622] [623] [624] [625] [626] [627] [628] [629] [630] [631] [632] [633] [634] [635] [636] [637] [638] [639] [640] [641] [642] [643] [644] [645] [646] [647] [648] [649] [650] [651] [652] [653] [654] [655] [656] [657] [658] [659] [660] [661] [662] [663] [664] [665] [666] [667] [668] [669] [670] [671] [672] [673] [674] [675] [676] [677] [678] [679] [680] [681] [682] [683] [684] [685] [686] [687] [688] [689] [690] [691] [692] [693] [694] [695] [696] [697] [698] [699] [700] [701] [702] [703] [704] [705] [706] [707] [708] [709] [710] [711] [712] [713] [714] [715] [716] [717] [718] [719] [720] [721] [722] [723] [724] [725] [726] [727] [728] [729] [730] [731] [732] [733] [734] [735] [736] [737] [738] [739] [740] [741] [742] [743] [744] [745] [746] [747] [748] [749] [750] [751] [752] [753] [754] [755] [756] [757] [758] [759] [760] [761] [762] [763] [764] [765] [766] [767] [768] [769] [770] [771] [772] [773] [774] [775] [776] [777] [778] [779] [780] [781] [782] [783] [784] [785] [786] [787] [788] [789] [790] [791] [792] [793] [794] [795] [796] [797] [798] [799] [800] [801] [802] [803] [804] [805] [806] [807] [808] [809] [810] [811] [812] [813] [814] [815] [816] [817] [818] [819] [820] [821] [822] [823] [824] [825] [826] [827] [828] [829] [830] [831] [832] [833] [834] [835] [836] [837] [838] [839] [840] [841] [842] [843] [844] [845] [846] [847] [848] [849] [850] [851] [852] [853] [854] [855] [856] [857] [858] [859] [860] [861] [862] [863] [864] [865] [866] [867] [868] [869] [870] [871] [872] [873] [874] [875] [876] [877] [878] [879] [880] [881] [882] [883] [884] [885] [886] [887] [888] [889] [890] [891] [892] [893] [894] [895] [896] [897] [898] [899] [900] [901] [902] [903] [904] [905] [906] [907] [908] [909] [910] [911] [912] [913] [914] [915] [916] [917] [918] [919] [920] [921] [922] [923] [924] [925] [926] [927] [928] [929] [930] [931] [932] [933] [934] [935] [936] [937] [938] [939] [940] [941] [942] [943] [944] [945] [946] [947] [948] [949] [950] [951] [952] [953] [954] [955] [956] [957] [958] [959] [960] [961] [962] [963] [964] [965] [966] [967] [968] [969] [970] [971] [972] [973] [974] [975] [976] [977] [978] [979] [980] [981] [982] [983] [984] [985] [986] [987] [988] [989] [990] [991] [992] [993] [994] [995] [996] [997] [998] [999] [1000]

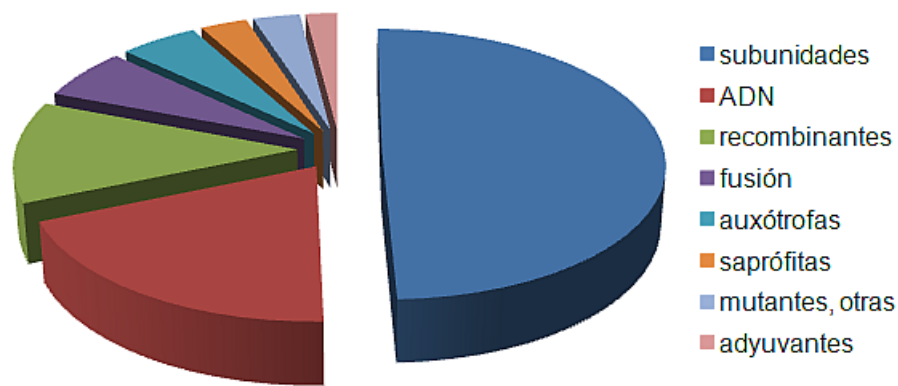


Figura 10 Estrategias para desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis. Se muestra la distribución de las vacunas evaluadas en modelo animal por institutos nacionales de salud: National Institutes of Health o CDC en los Estados Unidos [1]

La mayoría de las vacunas de subunidades proteicas de BCG se basan en proteínas presentes en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* que al administrarse con adyuvantes inducen inmunidad protectora específica mediada por células T en ratón/coba o primates [10].

Desafortunadamente la gran mayoría de las vacunas evaluadas hasta el momento no confieren una protección que se limite sólo a las vacunas de fisión o basadas en BCG de múltiples vectores que expresan genes de un antígeno. Han demostrado ser capaces de inducir mejores niveles de protección en comparación con aquellas que expresan una sola proteína [11].

Por otro lado algunas vacunas recombinantes basadas en BCG que expresan o sobreexpresan proteínas contenidas en el filtrado de cultivo (incluyendo proteínas de secreción) de *M. tuberculosis* también han demostrado inducir una eficacia superior a la inducida por la BCG reflejada en la reducción de la carga bacilar en bafo [12]. En ratón coba o ante el reto con cepas virulentas de *M. tuberculosis* como H37Rv o la cepa hipervirulenta H37Fno tipo H37Fv [13].

El uso de la BCG como vehículo de expresión de antígenos inmunomodulantes ofrece varias ventajas: tiene una seguridad demostrada que ha sido aplicada a más de 3 millones de personas con pocos efectos secundarios o ocasionales; se aplica poco tiempo después del nacimiento por su sola función como potente adyuvante en modelos animales; en humanos su producción no es cara lo que la hace económicamente conveniente para países en vías de desarrollo como México [14]. Algunos candidatos para vacunas contra la TB que pertenecen a esta categoría se encuentran actualmente en fase de ensayos clínicos [15].

2.3. Proteínas de filtrado de cultivo

Desde los años 70 se comenzó el interés por estudiar a las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo (también denominadas proteínas de filtrado de cultivo) debido a que los concentrados de estas tanto de *M. tuberculosis* como de *M. bovis* se

utilizaban para la producción de la tuberculina el diseño de reactivos más específicos para detectar la infección por *M. tuberculosis* [10]

Al final de la década de 1940 se evaluó diferentes extractos micobacterianos de acuerdo con su capacidad para generar inmunidad celular en ratones proporcionó la primera evidencia de que sólo las micobacterias viables estimulaban a células capaces de inducir una respuesta protectora contra cepas virulentas de *M. tuberculosis* [11]

McCoy y Collins plantearon que solamente las micobacterias en fase de multiplicación metabólicamente activas eran capaces de liberar un número de proteínas las cuales eran los antígenos responsables de la resistencia específica mediada por células a la infección por *M. tuberculosis* de los modelos antígenos eran menos eficaces en presencia de un gran número de micobacterias inertes debido a que estas inducen predominantemente una respuesta humoral por la excesiva liberación de polisacárido de la pared celular a medida que son digeridas por los macrófagos [12]

En ensayos de actividad inmunológica tanto *in vivo* como *in vitro* Collins y colaboradores demostraron que las células son reconocidas por células responsables de la sensibilidad a la tuberculina pero no por anticuerpos monoclonales dirigidos en contra del lisado completo de *M. tuberculosis* no viable [13] la parte de esta investigación fue dirigida por Collins y colaboradores confirmaron que los antígenos “protectores” eran secretados o liberados por las micobacterias al cultivarse en medios sintéticos [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100] [101] [102] [103] [104] [105] [106] [107] [108] [109] [110] [111] [112] [113] [114] [115] [116] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [124] [125] [126] [127] [128] [129] [130] [131] [132] [133] [134] [135] [136] [137] [138] [139] [140] [141] [142] [143] [144] [145] [146] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154] [155] [156] [157] [158] [159] [160] [161] [162] [163] [164] [165] [166] [167] [168] [169] [170] [171] [172] [173] [174] [175] [176] [177] [178] [179] [180] [181] [182] [183] [184] [185] [186] [187] [188] [189] [190] [191] [192] [193] [194] [195] [196] [197] [198] [199] [200] [201] [202] [203] [204] [205] [206] [207] [208] [209] [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216] [217] [218] [219] [220] [221] [222] [223] [224] [225] [226] [227] [228] [229] [230] [231] [232] [233] [234] [235] [236] [237] [238] [239] [240] [241] [242] [243] [244] [245] [246] [247] [248] [249] [250] [251] [252] [253] [254] [255] [256] [257] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264] [265] [266] [267] [268] [269] [270] [271] [272] [273] [274] [275] [276] [277] [278] [279] [280] [281] [282] [283] [284] [285] [286] [287] [288] [289] [290] [291] [292] [293] [294] [295] [296] [297] [298] [299] [300] [301] [302] [303] [304] [305] [306] [307] [308] [309] [310] [311] [312] [313] [314] [315] [316] [317] [318] [319] [320] [321] [322] [323] [324] [325] [326] [327] [328] [329] [330] [331] [332] [333] [334] [335] [336] [337] [338] [339] [340] [341] [342] [343] [344] [345] [346] [347] [348] [349] [350] [351] [352] [353] [354] [355] [356] [357] [358] [359] [360] [361] [362] [363] [364] [365] [366] [367] [368] [369] [370] [371] [372] [373] [374] [375] [376] [377] [378] [379] [380] [381] [382] [383] [384] [385] [386] [387] [388] [389] [390] [391] [392] [393] [394] [395] [396] [397] [398] [399] [400] [401] [402] [403] [404] [405] [406] [407] [408] [409] [410] [411] [412] [413] [414] [415] [416] [417] [418] [419] [420] [421] [422] [423] [424] [425] [426] [427] [428] [429] [430] [431] [432] [433] [434] [435] [436] [437] [438] [439] [440] [441] [442] [443] [444] [445] [446] [447] [448] [449] [450] [451] [452] [453] [454] [455] [456] [457] [458] [459] [460] [461] [462] [463] [464] [465] [466] [467] [468] [469] [470] [471] [472] [473] [474] [475] [476] [477] [478] [479] [480] [481] [482] [483] [484] [485] [486] [487] [488] [489] [490] [491] [492] [493] [494] [495] [496] [497] [498] [499] [500] [501] [502] [503] [504] [505] [506] [507] [508] [509] [510] [511] [512] [513] [514] [515] [516] [517] [518] [519] [520] [521] [522] [523] [524] [525] [526] [527] [528] [529] [530] [531] [532] [533] [534] [535] [536] [537] [538] [539] [540] [541] [542] [543] [544] [545] [546] [547] [548] [549] [550] [551] [552] [553] [554] [555] [556] [557] [558] [559] [560] [561] [562] [563] [564] [565] [566] [567] [568] [569] [570] [571] [572] [573] [574] [575] [576] [577] [578] [579] [580] [581] [582] [583] [584] [585] [586] [587] [588] [589] [590] [591] [592] [593] [594] [595] [596] [597] [598] [599] [600] [601] [602] [603] [604] [605] [606] [607] [608] [609] [610] [611] [612] [613] [614] [615] [616] [617] [618] [619] [620] [621] [622] [623] [624] [625] [626] [627] [628] [629] [630] [631] [632] [633] [634] [635] [636] [637] [638] [639] [640] [641] [642] [643] [644] [645] [646] [647] [648] [649] [650] [651] [652] [653] [654] [655] [656] [657] [658] [659] [660] [661] [662] [663] [664] [665] [666] [667] [668] [669] [670] [671] [672] [673] [674] [675] [676] [677] [678] [679] [680] [681] [682] [683] [684] [685] [686] [687] [688] [689] [690] [691] [692] [693] [694] [695] [696] [697] [698] [699] [700] [701] [702] [703] [704] [705] [706] [707] [708] [709] [710] [711] [712] [713] [714] [715] [716] [717] [718] [719] [720] [721] [722] [723] [724] [725] [726] [727] [728] [729] [730] [731] [732] [733] [734] [735] [736] [737] [738] [739] [740] [741] [742] [743] [744] [745] [746] [747] [748] [749] [750] [751] [752] [753] [754] [755] [756] [757] [758] [759] [760] [761] [762] [763] [764] [765] [766] [767] [768] [769] [770] [771] [772] [773] [774] [775] [776] [777] [778] [779] [780] [781] [782] [783] [784] [785] [786] [787] [788] [789] [790] [791] [792] [793] [794] [795] [796] [797] [798] [799] [800] [801] [802] [803] [804] [805] [806] [807] [808] [809] [810] [811] [812] [813] [814] [815] [816] [817] [818] [819] [820] [821] [822] [823] [824] [825] [826] [827] [828] [829] [830] [831] [832] [833] [834] [835] [836] [837] [838] [839] [840] [841] [842] [843] [844] [845] [846] [847] [848] [849] [850] [851] [852] [853] [854] [855] [856] [857] [858] [859] [860] [861] [862] [863] [864] [865] [866] [867] [868] [869] [870] [871] [872] [873] [874] [875] [876] [877] [878] [879] [880] [881] [882] [883] [884] [885] [886] [887] [888] [889] [890] [891] [892] [893] [894] [895] [896] [897] [898] [899] [900] [901] [902] [903] [904] [905] [906] [907] [908] [909] [910] [911] [912] [913] [914] [915] [916] [917] [918] [919] [920] [921] [922] [923] [924] [925] [926] [927] [928] [929] [930] [931] [932] [933] [934] [935] [936] [937] [938] [939] [940] [941] [942] [943] [944] [945] [946] [947] [948] [949] [950] [951] [952] [953] [954] [955] [956] [957] [958] [959] [960] [961] [962] [963] [964] [965] [966] [967] [968] [969] [970] [971] [972] [973] [974] [975] [976] [977] [978] [979] [980] [981] [982] [983] [984] [985] [986] [987] [988] [989] [990] [991] [992] [993] [994] [995] [996] [997] [998] [999] [1000]

2.3.1. Función e Importancia

El genoma de *M. tuberculosis* posee genes que codifican para preproteínas con péptido señal tipo [1] las cuales son secretadas vía [2] dependiente del sistema de secreción [3] es

En el mecanismo de transporte de moléculas en el cual las proteínas poseen una secuencia señal en el extremo amino terminal una secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* permitió identificar que el locus de inserción presente en *M. bovis* que codifica proteínas que se secretan activamente al medio de cultivo via independiente con el genoma se demostró que la inserción de la vacuna cepas de BCG sólo revierte parcialmente su virulencia. Otros genomas de *M. bovis* y de *M. bovis* también presentan diferencias en la expresión de genes que codifican proteínas de secreción. Debido a varios análisis a nivel de proteínas han identificado marcadores abiertos de lectura no detectados previamente por análisis genómicos. Así como los genes carecen de péptido señal es claro que el abordaje proteómico fortalece el estudio de este tipo de proteínas y complementa el estudio genómico al revelar el perfil proteómico producto de los genes expresados.

Las células participan en la modulación y posterior desarrollo de inmunidad protectora del hospedero hacia la infección por *M. tuberculosis* mediante la activación de macrófagos, células dendríticas y células cebadas para la secreción de mediadores proinflamatorios y citoquinas que inducen la diferenciación y maduración de células presentadoras de antígeno que conlleven a la proliferación de células específicas para células secretoras de IFN- γ . Este tipo de respuesta añadido a la naturaleza inmunomodulante de epítopos anti-*M. tuberculosis* presentes en las vacunas recombinantes involucrado en el incremento de la protección observada con vacunas recombinantes basadas en genes que expresan antígenos procedentes de filtrado de cultivo.

La estimulación de células y de células específicas para *M. tuberculosis* es clave para adquirir inmunidad protectora mediante vacunación mientras que la detección de células que reconocen específicamente antígenos de *M. tuberculosis* es fundamental para el éxito de una prueba de diagnóstico. Varios estudios han demostrado que la mayoría de los epítopos inmunomodulantes reconocidos por células T en la vacuna son de proteínas secretadas. Existe también presencia de anticuerpos contra genes en sueros de pacientes con células específicas para el mismo tipo de proteínas en individuos infectados con *M. tuberculosis*. Por tanto, las células son consideradas como potentes candidatos para el diseño de nuevas vacunas y pruebas para diagnóstico específico de *M. tuberculosis*.

Las proteínas de secreción se han relacionado con la virulencia del bacilo ya que al ser liberadas activamente es posible que participen en la evasión micobacteriana de la respuesta inmune en los mecanismos empleados por el bacilo de la TB en la infección latente o el desarrollo de la enfermedad en individuos infectados [10]. Esta función inmunomoduladora de las proteínas probablemente contribuya a la supervivencia del bacilo en hospederos susceptibles tal como ha sido descrito por algunos autores [11].

Las proteínas secretadas de forma abundante conforman al complejo antigénico que son secretadas en grandes cantidades y son importantes para la adhesión y posterior infección a células eucariotes debido a que son capaces de unirse a la fibronectina el cual es un componente de la matriz extracelular en animales. Participan en la interacción del bacilo con la superficie de los epitelios y la invasión intracelular a través de receptores de fibronectina presentes en los macrófagos. La enzima superóxido dismutasa que se encuentra presente en la membrana externa es secretada en grandes cantidades por *M. tuberculosis* durante su crecimiento es responsable de la eliminación de radicales reactivos del oxígeno y de las toxinas abundantes en el ambiente bactericida de los fagolisosomas [12].

2.4. Antígeno PstS-1 y la vacuna recombinante rBCGPstS-1

En el genoma de *M. tuberculosis* se han identificado genes que codifican para lipoproteínas las cuales al ser exportadas o liberadas al medio extracelular pueden estar involucradas en sistemas de transporte de nutrientes. Un ejemplo es el antígeno PstS [13].

El antígeno PstS es una lipoproteína glicosilada localizada en la superficie micobacteriana que se libera gradualmente a través de la fisión que es una de las proteínas de filtrado de cultivo que está estudiadas en *M. bovis* que se encuentra presente en menor cantidad con respecto a su homólogo en *M. tuberculosis*. El antígeno PstS es un aminoácido es el receptor primario de un sistema de transporte de fosfatos tipo ABC que posee una masa molecular punto isoeléctrico teóricos de 100 kDa respectivamente está codificada en el gen *pstS1* de *M. bovis* con tamaño de 100 pb y posición en el genoma [14]. La evidencia

experimental de que el gen *pstSI* junto con otros genes *pst* de *M. tuberculosis* están organizados en un operón regulado por fosfato. Se existe un incremento en la expresión de la proteína *Stt1* cuando las bacterias se cultivan en condiciones de alta concentración de fosfato.

Esta lipoproteína es reconocida en las etapas tempranas de la infección en varios modelos animales así como por células de sangre periférica de pacientes con sus contactos sanos. Induce proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y altos niveles de γ e IL-2. Se ha demostrado también que existe una elevada producción de α 1-acríficos debido a su naturaleza inmodulante. El antígeno *Stt1* se considera como una molécula con potencial para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis.

En el 2005 se desarrolló la recombinante vacuna basada en la subcepa *H37Rv* que sobreexpresa al antígeno *Stt1* en la recombinante inducida por protección en el modelo murino de *M. tuberculosis* progresiva en comparación con su vacuna homóloga sin recombinar al reto con *M. tuberculosis*. La vacuna recombinante redujo significativamente el número de bacterias en pulmón de los ratones infectados con dicha vacuna y fue capaz de prolongar la supervivencia del 50% de los ratones retados con la cepa hipervirulenta *M. tuberculosis* H37Rv. En esta vacuna también indujo el desarrollo de una respuesta inmune celular tipo Th1 reflejada por un incremento en la producción de γ e IL-2. Es importante realizar el estudio comparativo de los secretos de ambas de estas vacunas ya que se podrán observar diferencias en el patrón de expresión proteico. Es posible que pudieran ser atribuibles al evento de la recombinación. La identificación de proteínas expresadas diferencialmente entre estas dos vacunas aportará información relevante para la futura identificación de antígenos involucrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero relacionados con el incremento en la mejor protección conferida por recombinante.

3. JUSTIFICACIÓN

La vacuna recombinante rBCG₁₉ protege eficazmente contra *M. tuberculosis* en un modelo murino de tuberculosis primaria. En este estudio comparativo de los secretomas de rBCG₁₉ y BCG se pretende identificar diferencias proteicas entre ambas vacunas. La identificación de dichas diferencias aportará información acerca de posibles antígenos involucrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero relacionados con el incremento en la protección conferida por rBCG₁₉.

4. HIPÓTESIS

Los secretomas de las vacunas rBCG₁₉ y BCG no son iguales.

5. OBJETIVO

Analizar y comparar los secretomas de *Mycobacterium bovis* BCG y la vacuna recombinante rBCG₁₉.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG

Se cultivaron las subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG en medio de crecimiento recombinante sobre la expresión del antígeno *IS6110* de la colección de cepas del Centro de Referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

6.2. Cultivo bacteriano

Las vacuolas se cultivaron en placas de medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.5% de glicerol, ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa durante 7 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Posteriormente se tomó una colonia y se resembró en caldo de cultivo *in vitro* anexo. Los cultivos se incubaron a 37°C en condiciones estáticas durante 7 días. Al alcanzar la fase de crecimiento exponencial, los cultivos fueron cosechados por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se les adicionó inhibidor de proteasas *in vitro* de etilfenil sulfonio y fueron congelados a -80°C hasta su uso.

6.3. Obtención de proteínas de filtrado de cultivo (PFC)

El sobrenadante de cultivo se descongeló radicalmente a temperatura ambiente y se le añadió inhibidor de proteasas *in vitro* conservador *in vitro* de sodio -*in vitro* al 0.5% y se actuó como bacteriostático. Se esterilizó por filtración a través de membranas de 0.45 µm y 0.2 µm. Posteriormente, en la continuación se concentró *in vitro* por ultrafiltración utilizando celdas con agitación constante *in vitro* de membranas de filtración por centrifugación *in vitro* para la concentración de las proteínas se utilizaron membranas de celulosa regenerada *in vitro* de punto de corte de 10 kDa. La cuantificación de las proteínas se realizó por la técnica de Bradford *in vitro* una vez concentradas las proteínas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

A partir de los concentrados obtenidos de *in vitro* se realizó *in vitro* para confirmar la integridad de las proteínas antes de realizar la electroforesis en dos dimensiones y se preparó

Una muestra de las células con solución amortiguadora de carga en anexo se realizó una electroforesis en gels de poliacrilamida reducida en 4-20% en Tris/Glycine/SDS en buffers de running de BioRad en una cámara de electroforesis de BioRad hasta completar 4000 voltaje en Tris/Glycine/SDS en buffers de running de BioRad. Las proteínas se visualizaron por tinción con Coomassie utilizando la unidad de revelado del mismo equipo.

6.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE)

Para la obtención de secretos proteicos de células se utilizaron 100 µg de proteína en solución amortiguadora de rehidratación en anexo. Las proteínas se separaron por isoelectroenfoque en tiras de gradiente de pH inóvil de 4-7 de BioRad de longitud 10 cm de BioRad. Los strips fueron adquiridos hasta completar 1000 voltaje en isoelectroenfoque se realizó en la cámara de running de BioRad en tres etapas: a 1000 voltaje hasta completar 1000 voltaje se incrementó el voltaje a 2000 voltaje hasta completar 1000 voltaje y a 3000 voltaje hasta completar 1000 voltaje. Al término del isoelectroenfoque las tiras fueron equilibradas en solución amortiguadora de equilibrio en anexo en dos pasos: el primero con 100 mM Tris-HCl posteriormente con iodoacetamida. Para la electroforesis de la segunda dimensión las tiras equilibradas se colocaron sobre gels de poliacrilamida en gradiente de pH de 4-7 de BioRad en anexo se selló con solución de arososa en anexo y se corrieron a 100 V durante 10 h en una cámara de BioRad. Las proteínas fueron visualizadas por tinción de plata en anexo.

6.6. Análisis de geles 2D

La imagen de los secretos fue capturada en formato digital en un escáner de BioRad calibrado en densitometría (ver Anexo) – posteriormente se realizó el análisis comparativo de los gels utilizando el software 2D PDQuest™ Advanced V. 8.0 (BioRad laboratories). Para el análisis de las imágenes digitales se realizaron los ajustes correspondientes de manera que todos los puntos visibles fueran detectados por el programa. Una vez cargadas las imágenes de cada gel se crearon los gels maestros virtuales de cada muestra a partir de la combinación de dos secretos se coordinaron las posiciones de los puntos anclando al menos 10% del total de puntos presentes. Cabe en

Modelo de distorsión que considera posibles variaciones de la técnica de la imagen de cada célula fue normalizada de acuerdo al total de píxeles presentes en los canales para el análisis de expresión diferencial relativa. Los puntos se eligieron en base a dos criterios: si se estuviesen presentes en los secretomas de las dos vacunas detectados en todos los canales y si los valores de cantidad de cada punto estuviesen en un rango menor o igual a ± 2 los puntos seleccionados se compararon conforme al valor calculado de los estimadores promedio y la desviación estándar. Solo aquellos de estos puntos fueron seleccionados para su identificación.

Para la conversión de la señal detectada por el densitómetro a unidades de densidad óptica se realizó al calibrar con el filtro correspondiente para la tinción de plata. Durante el proceso de detección de puntos se utilizó la fórmula $Y = \pi \sigma_x^2 \sigma_y^2$ para calcular la cantidad de cada punto. σ_x y σ_y corresponden a la desviación estándar en x y y de la distribución Gaussiana de un punto en dirección al eje de las “x” y al eje de las “y”, respectivamente.

6.7. Identificación de proteínas

Los puntos seleccionados se escindieron manualmente a partir de un gel preparativo de proteína teñido con plata. Se congelaron a -80°C hasta ser soportados. Estas se prepararon para el análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por nanoelectrospray con el equipo Applied Biosystems. Cada punto fue destendido, reducido al vacío y digerido con tripsina. Las mezclas de péptidos fueron separadas por cromatografía de líquidos con un gradiente de elución de acetonitrilo y ácido fórmico con un flujo de $1000 \mu\text{l/min}$ durante 120 min a través de una columna Orbax $150 \mu\text{m} \times 150 \text{cm} \times 5 \mu\text{m}$. Los péptidos se ionizaron por nanoelectrospray, se separaron, detectaron y sometieron a espectrometría de masas en tándem. Los patrones de espectrometría de masas se compararon con los existentes en la base de datos para la identificación de proteínas se realizó por métodos probabilísticos con el algoritmo Mascot dentro de la base de datos. Se limitó al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (<http://www.atrxscience.com>). Se consideraron válidas las identificaciones con un puntaje de péptidos mayor o igual a 10 valores de $p < 0.05$ con una diferencia no mayor al 10% con respecto a los valores experimentales.

7. RESULTADOS

Las proteínas de filtrado de cultivo se obtuvieron a partir de la concentración de los sobrenadantes de cultivo de *M. bovis* Tice y rBCGPstS-1 la cantidad de proteína obtenida fue respectivamente

Los secretos se obtuvieron al separar las mediante visuales con tinción de plata en la se estran imágenes representativas de los secretos obtenidos de las vacunas análisis comparativo se realizó a partir de los de proteínas provenientes de dos cultivos independientes utilizando el programa est

Con el fin de disminuir la variabilidad atribuible a la técnica como la separación electroforética de las proteínas o la tinción de plata se utilizaron los datos de normalización con base en el número total de píxeles tabla

| Vacuna BCG | | |
|-------------------|-------------|-------------|
| | BCG Tice | rBCGPstS-1 |
| Número de píxeles | | |
| el | | |
| el | | |
| \bar{X} | | |
| s | | |
| %CV* | 0.14 | 0.39 |

Tabla 2. Datos para la normalización con base en el número total de píxeles \bar{X} media aritmética s desviación estándar σ coeficiente de variación porcentual σ/\bar{X}

La separación electroforética en dos dimensiones permitió resolver alrededor de puntos de *M. bovis* Tice y rBCGPstS-1 respectivamente tabla

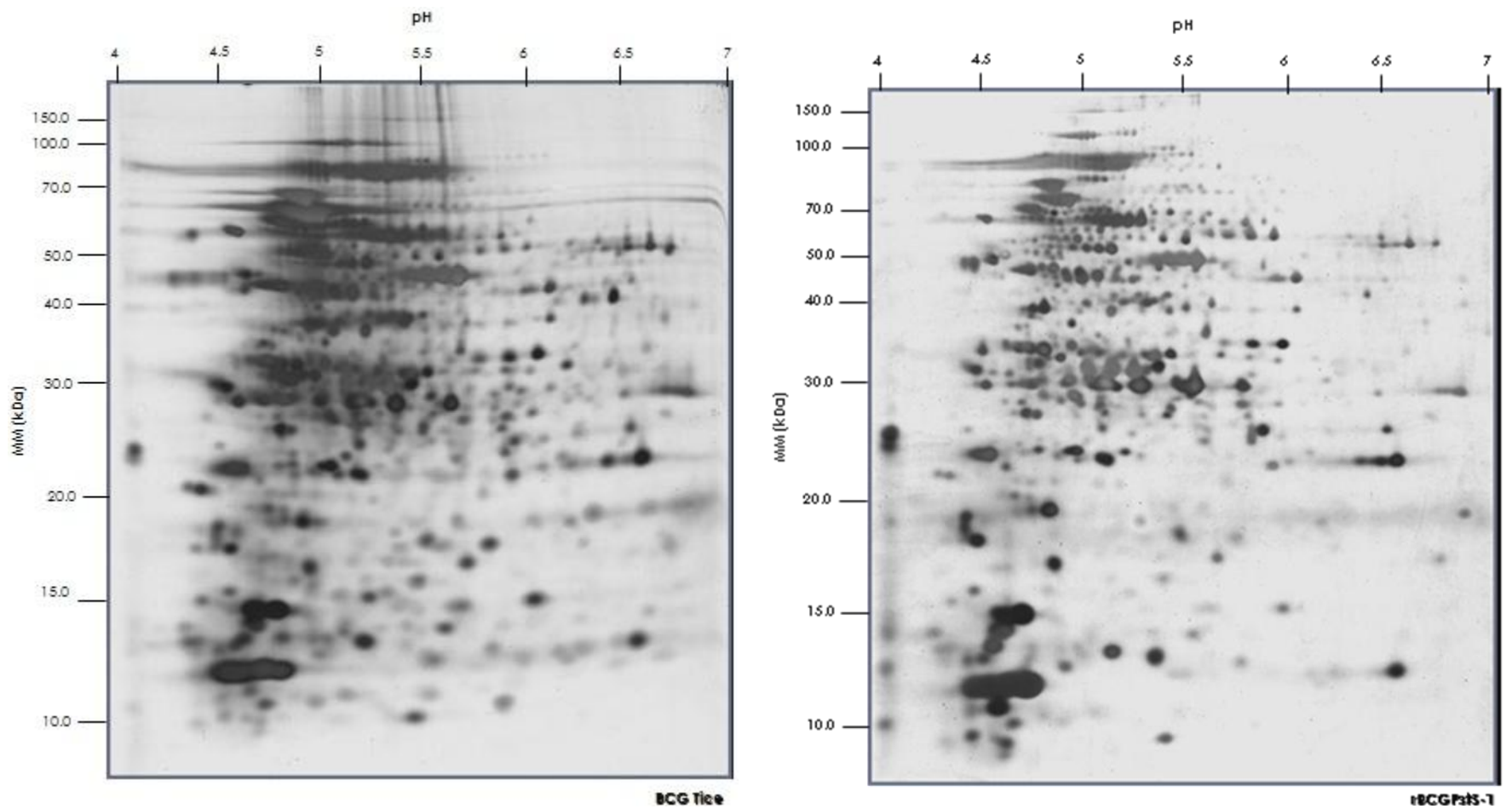


Figura 11. Secretomas de BCG Tice y rBCG PstS-1. Se muestran imágenes representativas de los gels obtenidos por electroforesis de las vacunas BCG Tice y rBCG PstS-1. Se visualizaron por tinción de plata los spots de proteínas en tiras de 20 cm por 15 cm de 10 x 15 cm.

| Vacuna BCG | Ensayo | | El maestro |
|--------------|--------|------|------------|
| | 1 | 2 | |
| 1000 1ice | 1000 | 1000 | 1000 |
| r10000st1000 | 1000 | 1000 | 1000 |

Tabla 3. Número de puntos detectados. Se muestra el número de puntos detectados en los diferentes ensayos. La columna de la derecha corresponde al total de puntos incluidos en el el maestro del secreto de cada subcepa. Sobre el cual se basa el análisis de los maestros virtuales de cada subcepa se conformaron a partir de la combinación de las imágenes de dos secretos.

La comparación de los maestros de 1000 1ice r10000st1000 reveló que las vacunas poseen patrones de proteínas similares lo cual se confirmó al construir la gráfica de distribución de los valores experimentales de masa molecular en función de su punto isoeléctrico. Véase figura 13.

1000 1ice r10000st1000 comparten aproximadamente el 50% de su perfil de proteínas. No obstante, los puntos del secreto de r10000st1000 no se detectaron en el secreto de la vacuna bómbola sin recombinar. Véase figura 13.

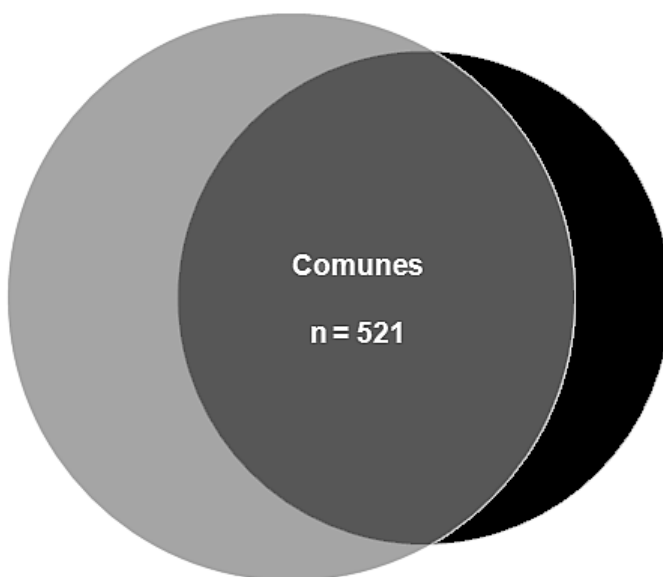


Figura 13. Gráfica de densidad que representa la comparación de puntos de los maestros de los secretos de 1000 1ice (n=1000) y r10000st1000 (n=1000). Los puntos que son presentes en los secretos de 1000 1ice (ris claro) r10000st1000 (negro) respectivamente. La intersección de los círculos corresponde a los puntos comunes a las dos vacunas (n=521) cuyo promedio de masa molecular es de 10000 Da con respecto a 1000 1ice r10000st1000.

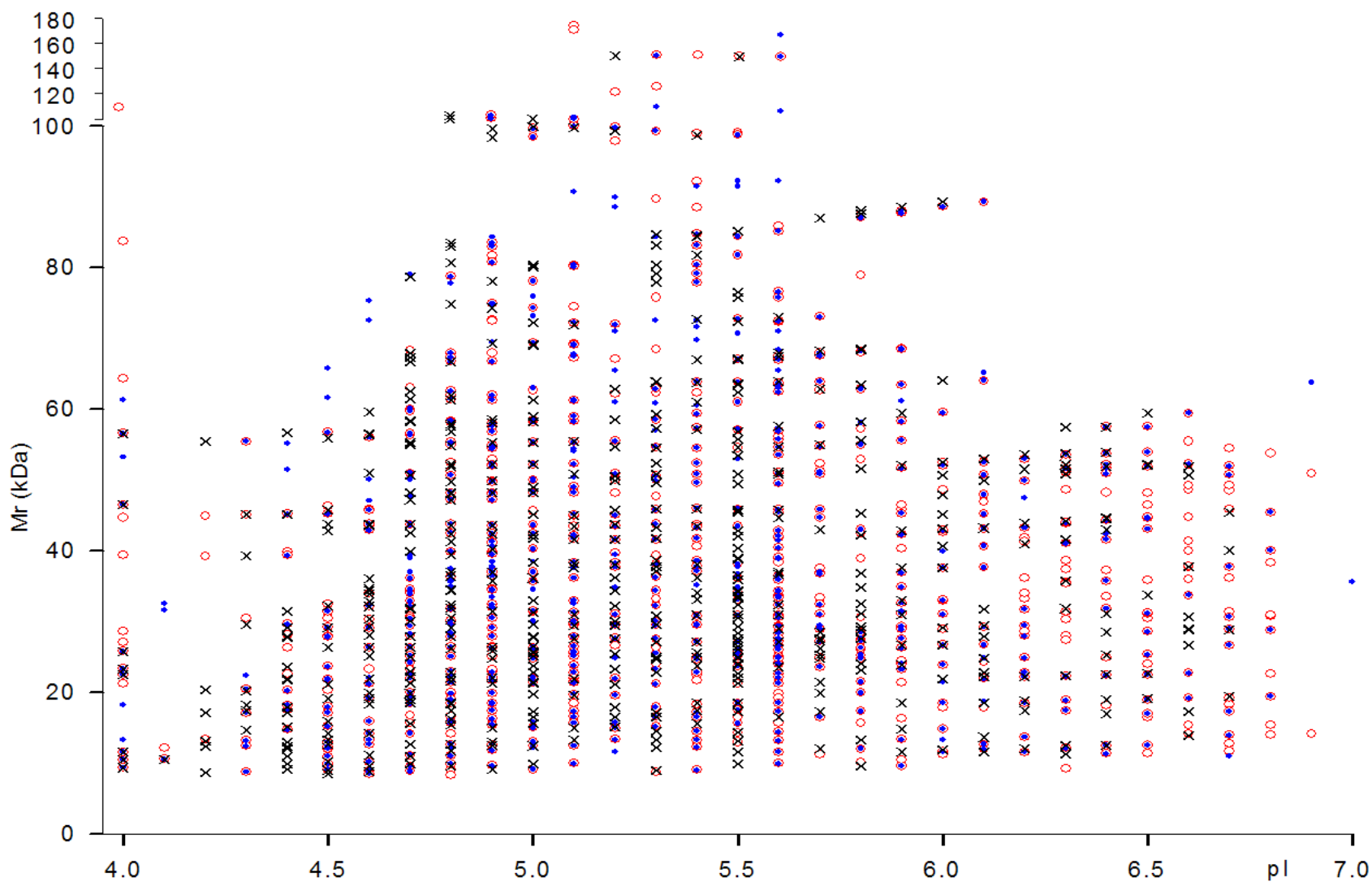


Figura 12. Distribución total de los puntos detectados en el 2D. El gráfico muestra la posición de los puntos detectados en el espacio de Mr (eje vertical) y pI (eje horizontal). Los círculos abiertos y cerrados, las cruces y las asteriscas representan los puntos correspondientes a las vacías de las ordenadas que corresponden a la masa molecular relativa. El eje horizontal (pI) representa el punto isoeléctrico.

En la figura 14 se ilustran ejemplos de puntos para los que se detectaron diferencias tanto cualitativa (a ausencia/presencia) como cuantitativa (expresión diferencial relativa).

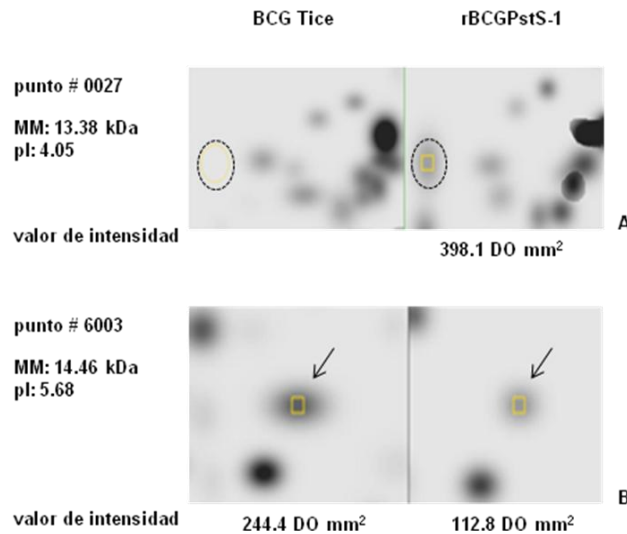


Figura 14. Detalle del análisis que se muestran ejemplos de patrones de expresión diferencial entre puntos presentes en rBCGPstS-1 no detectados en BCG Tice (a) así como entre puntos con distintos valores de intensidad (b).

Partir del análisis de los puntos seleccionados con base en los criterios establecidos se determinó si existía expresión diferencial relativa para uno de ellos. Al menos de los cuales presentaron un incremento en sus valores de intensidad (desviación estándar) a la vez en digital de los puntos se comparó visualmente con los geles físicos y se eligieron algunos para su identificación por espectrometría de masas. En la tabla 14

uno de los puntos extraídos del gel no se identificó debido a que por espectrometría de masas solamente se detectó un fragmento de la proteína (en la experiencia) o teórica (en el cual probablemente presenta un punto isoeléctrico más básico que experimental) que la proteína completa. De las proteínas identificadas presentaron una distribución variada en cuanto a sus valores de pI. En la tabla 15 se observó que existió incremento de 2 veces en la expresión de una proteína de rBCGPstS-1 con respecto a BCG Tice.

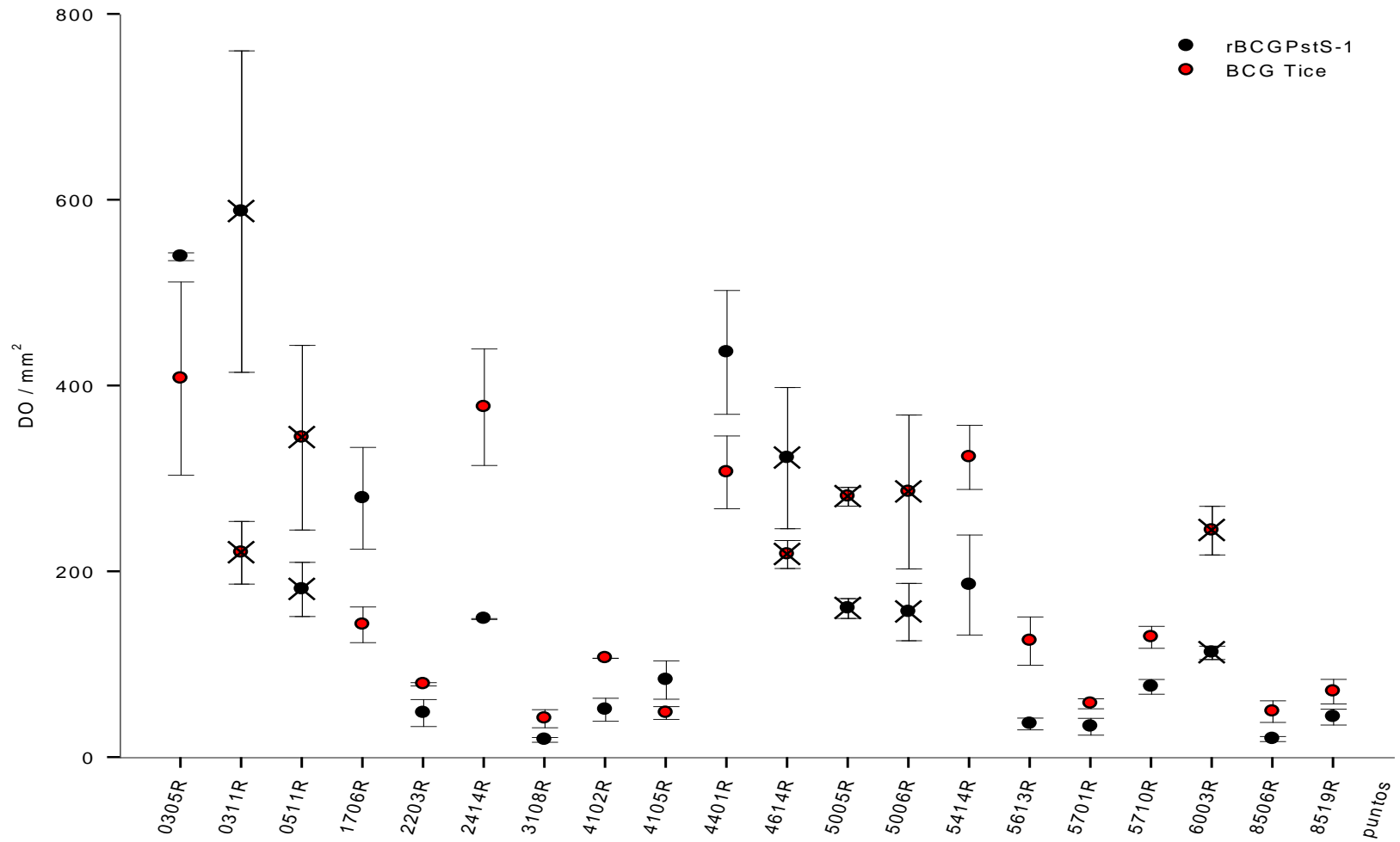


Figura 15. Análisis cuantitativo de puntos de los secretos de BCG Tice y rBCGPstS-1 a través del valor promedio de intensidad de cada punto y su desviación estándar de las ordenadas para cada uno de los puntos que mostraron expresión diferencial relativa de las abscisas. Los círculos rojos corresponden a los puntos de BCG Tice y los círculos negros a los de rBCGPstS-1. X representa puntos que mostraron un incremento de 10% en la intensidad.

8. DISCUSIÓN

Se han identificado proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo de diferentes especies micobacterianas que se conoce que desempeñan diversas funciones esenciales para el crecimiento y sobrevivencia y factores de virulencia. Las proteínas de filtrado de cultivo al ser liberadas al medio extracelular pueden representar el contacto inicial con el sistema inmune del hospedero como moléculas inmunomodulantes. En el presente estudio se analizaron los secretomas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* con el fin de identificar diferencias en el patrón de expresión proteica.

Considerando que diversos análisis a nivel de proteínas han identificado marcadores de lectura en *M. tuberculosis* y no se habían detectado por análisis genómicos como la ausencia de péptido señal en el estudio proteómico de vacunas que complementa el abordaje genómico al revelar el perfil proteómico producido de los genes expresados.

La mayoría de los estudios proteómicos que han descrito corresponden a cultivos de *M. tuberculosis*. En este trabajo se analizó el perfil de secreción de *M. bovis* cultivada *in vitro* e inicialmente las proteínas de extracto celular. La mayoría de las proteínas de *M. tuberculosis* se encuentran en la región de secreción de *M. bovis* de manera que los resultados del presente estudio evidencian que los secretomas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* poseen una distribución de proteínas que corresponde a lo reportado previamente referente a la región de secreción de los puntos detectados se encuentran en el intervalo de secreción.

Las proteínas de las vacunas *M. bovis* y *M. tuberculosis* se distribuyen de manera similar se han observado por primera vez. El antígeno *Stx* está presente en la superficie micobacteriana por lo que es posible que en *M. tuberculosis* existan depósitos de esta lipoproteína a nivel de la pared celular como consecuencia de su sobreexpresión esto a su vez puede haber provocado la diseminación en la secreción o liberación de *M. bovis* al medio de cultivo de *M. tuberculosis* con respecto a *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

En cuanto a las diferencias en la intensidad de los puntos, varios factores se alían a la visualización de las proteínas por tinción con plata no es posible realizar un análisis cuantitativo para detectar diferencias de expresión sin embargo otros factores han reportado expresión diferencial a partir de la comparación de intensidades de puntos teñidos con plata. Ante esta controversia al utilizar la tinción con plata, dado que los valores de densidad permitieron demostrar la reproducibilidad de la técnica experimental, en el presente estudio se determinó realizar un análisis de “expresión diferencial relativa” con base en los valores de intensidad detectados para algunos puntos comunes a los dos experimentos.

Los principales valores de intensidad de píxeles correspondieron a proteínas de 100 kDa. Cabe mencionar que esto podría indicar que en la proteína recolectada con *pstSI* existe un impedimento para la secreción adecuada o liberación de proteínas. Algunos puntos que mostraron cambios de aproximadamente 2 veces en su valor de intensidad fueron identificados en la tabla 1.

De acuerdo a los grupos funcionales a los que pertenecen las proteínas identificadas, la mayoría de estas proteínas se relacionan con procesos metabólicos. Además, algunas de estas proteínas poseen actividad inmunorreguladora y se han relacionado con la virulencia del bacilo, como se describe a continuación.

La única proteína para la cual se determinó un mayor incremento de expresión, casi el doble de intensidad de píxeles en el experimento con respecto a la proteína fue identificada como el receptor específico para varias deshidrogenasas que transfiere a la cadena respiratoria. Se ha propuesto que esta proteína participa en la beta oxidación de ácidos grasos, los cuales son componentes esenciales de la compleja pared de las micobacterias. Ha sido detectada previamente en sobrenadantes de cultivo, extracto celular y fracción de la pared celular de *M. tuberculosis* y ha sido identificada como antígeno inmunodominante de células T.

Por otro lado, las proteínas que mostraron un mayor incremento en sus valores de intensidad en el experimento fueron identificadas como proteínas hipotéticas de estructura y función

desconocida este es el caso de las proteínas id¹ e id² esta última relacionada ne¹amente en *M. tuberculosis* cuando se cultiva en altas concentraciones de hierro ¹ la id¹ no ha sido reportada en estudios previos de proteómica el gen de la codificación ha sido descrito como no esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* al menos a factores superiores este tipo de genes podrían ser esenciales para la supervivencia micobacteriana en el ambiente del hospedero ¹

La proteína id¹ es una enzima citosólica secretada tanto por *M. tuberculosis* como por *M. bovis* ¹ participa en la síntesis de nucleósidos trifosfato se adenosiniltransferasa posee amplia especificidad de sustrato interviniendo en el control del crecimiento y diferenciación celular ¹ la id¹ secretada por *M. tuberculosis* al medio extracelular actúa como factor citotóxico para macrófagos al secretar el ¹ e inhibir la activación de los receptores ¹ la consecuente fagocitosis por lo que se ha relacionado con la supervivencia del bacilo y evasión del sistema inmune ¹

En un estudio comparativo de los proteomas de la fracción celular de alveolas vacuolas de *M. tuberculosis* ¹ realizado en el laboratorio de inmunología molecular microbiología y comunicación personal se detectó que los puntos correspondientes a id¹ e id² se encontraban presentes únicamente en las ¹ en el presente trabajo también se detectó la presencia de estos puntos en el sobrenadante de cultivo tanto de ¹ dice como de ¹ por lo que fueron seleccionados para su identificación por espectrometría de masas los puntos id¹ e id² fueron identificados como la misma proteína la cual es una proteína ribosomal formada por dos dominios diferentes ambos dominios están codificados por el mismo gen se diferencian por una acetilación en el extremo amino terminal de uno de ellos ¹ se ha reportado a este dígito como uno de los componentes termostables del derivado proteínico purificado ¹ capaz de inducir una fuerte respuesta de hipersensibilidad retardada ¹ esta proteína ribosomal se relaciona con mecanismos tradicionales que actúa como receptor de diferentes factores involucrados en la síntesis de proteínas desempeña una función esencial para el correcto proceso tradicional también se ha identificado a esta proteína como antígeno inóculo inante de células ¹

La identificación de las proteínas de respuesta con expresión diferencial relativa con relación a las células que en condiciones *in vitro* la vacuna recombinante refleja la liberación de proteínas involucradas en procesos metabólicos e inmunológicas por otro lado dado que la vacuna recombinante posee gran cantidad de la proteína idéntica es posible que la sobreexpresión de la lipoproteína está formada por una parte de un sistema de transporte de fosfatos tipo *phosphatase* involucrada de manera importante en procesos dependientes de vías de señalización reguladas por fosfato.

Existen evidencias de presencia de anticuerpos contra proteínas en suero de pacientes con células específicas para el mismo tipo de proteínas en individuos infectados con *M. tuberculosis* por lo que ensayos de proliferación celular bajo el estímulo de las proteínas de respuesta expresadas diferencialmente con respecto a células permitieron identificar antígenos candidatos para vacunas o pruebas de diagnóstico más sensibles y específicas.

Es posible que los perfiles de proteínas liberadas *in vitro* reflejen la expresión de proteínas que tienen acceso al medio extracelular cuando la micobacteria se encuentra en el interior del fagoso para la identificación y caracterización de las proteínas liberadas por respuesta al entrar en contacto con el ambiente intracelular de macrófagos aportar información relevante sobre los antígenos involucrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero y su relación con el incremento en la mejor protección conferida por la vacuna recombinante.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionan una descripción de los cambios globales en el perfil de expresión de proteínas de filtrado de cultivo de la vacuna recombinante de respuesta con respecto a células de otros estudios de células estimuladas con proteínas expresadas diferencialmente entre estas dos vacunas contribuirán a un mejor entendimiento de los mecanismos empleados por la respuesta para inducir una respuesta inmune de mejor eficacia protectora.

9. CONCLUSIONES

- El ratón *rice* y el ratón *st* poseen una distribución similar de proteínas de filtrado de cultivo.
- El ratón *st* libera un menor número de proteínas al medio de cultivo.
- Las proteínas con expresión diferencial relativa en el ratón *st* con respecto al ratón *rice* identificadas como antígenos inmunológicos podrán participar en la eficaz respuesta inmune inducida por la vacuna recombinante.

- 10000 [Boletín de epidemiología y salud pública](#)
- 10000 [Core health indicators take latest data from multiple sources](#)
[http://www.cdc.gov/core/core/select_process.cfm](#)
- 10000 [Guilabala celebración del día mundial contra la tuberculosis de marzo del](#)
[www.evinst.alnf.espx](#)
- 10000 [http://www.cenave.org.mx/tuberculosis/default.asp?id_red=es](#)
- 10000 [Guilabala es el día mundial en tuberculosis: detección de casos, tratamiento y vigilancia](#)
[www.rentas.respuestas.a.gov.pp](#)
- 10000 [http://www.cdc.gov/od/odiacentre/factsheets/fs0001es/index.html](#)
- 10000 [Ópera anual de procedimientos clínicos de vacunación en México](#)
[www.gov.pp](#)
- 10000 [http://www.cdc.gov/institutes/exe](#)
- 10000 Kaufmann, S. H. E. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it [www.tuberculosis.org](#)
- 10000 Bradann Robert Koch and the pressures of scientific research: tuberculosis and the Berlin Institute
- 10000 Pettinorensen, M., Adofed, J., et al. Development of the *Mycobacterium bovis* vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree [www.berlin.org](#)
- 10000 Preer, M. Relationships between bacille Calmette-Guérin strains and the efficacy of the vaccine in the prevention of tuberculosis [www.linfectdis.org](#)
- 10000 Brispen, M. History of BCG and its substrains [www.roliniol.es](#)
- 10000 Sborn, M. Changes in BCG strains [www.bercle.org](#)
- 10000 Eir, M. and Hall, M. Historical and molecular phylogenetics of BCG strains [www.vaccine.org](#)
- 10000 Sborn, M. BCG vaccine: an investigation of colonies from four different strains after their introduction as seed for vaccine preparation in four production laboratories [www.rolstand.org](#)
- 10000 Mastón, M. Estudio de la respuesta inmune inducida por las proteínas de la *M. tuberculosis* en la vacuna bacilo Calmette-Guérin [www.doctorado.org](#)
- 10000 Codificación a la Norma Oficial Mexicana para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud [www.salud.gob.mx/ss/sa/ta.html](#)
- 10000 Preer, M. Reventin tuberculosis: it's bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature [www.linfectdis.org](#)
- 10000 Fine, M. and Godri, S. Modern vaccines for bacterial diseases [www.ancet.org](#)
- 10000 Covert, M. Real world vaccines: clinical trials in endemic regions [www.vaccine.org](#)
- 10000 Ronson, M., Santos, A., M. Ostoc, J., et al. Conformer efficacy of BCG vaccine in American Indians and Alaska natives [www.hearfollopp.std.org](#)

- 10111 Florio-Ruane, M. A., et al. Influence of culture media on the resistance and response of *Mycobacterium bovis* to reactive nitrogen intermediates. *Microbes Infect.*
- 10112 Flopoel, M., et al. Global analysis of proteins synthesized by *Mycobacterium smegmatis* provides direct evidence for physiological heterogeneity in stationary phase cultures. *Microbiol. J.*
- 10113 Schenbrenner, D., et al. Comparative proteomic analysis of laboratory grown *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium delticensis*. *Proteome Res.*
- 10114 Attom, S. E., et al. Proteins unique to intramacrophage *Mycobacterium tuberculosis* proteomics. *Microbiol. J.*
- 10115 Etschberger, M., et al. Validation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.*
- 10116 Eickbush, P. G., et al. Comparative proteomic analysis of culture supernatant proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra. *Microbes Infect.*
- 10117 Inblat, M., et al. Comparative proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.*
- 10118 Rosenkrands, M., et al. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis.*
- 10119 Condit, R., et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect. Immun.*
- 10120 Copra, R., et al. Pototoxic activity of nucleoside diphosphate kinase secreted from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*
- 10121 Laborina, M., et al. Secretion of phosphatidylinositol nucleoside diphosphate kinase and phosphatase by *Mycobacterium bovis*. *Secretion of phosphatidylinositol receptors.* *Mol. Microbiol.*
- 10122 Gara, M., et al. Ada and aAda lonin and secretion of the gene encoding the ribosomal protein of *Mycobacterium bovis*. *Microbes Infect.*
- 10123 Iturza, M., et al. AAda ribosomal protein included in *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative is a major heat-resistant protein in strain strongly dependent on persensitivity. *Microbes Infect.*
- 10124 Corbelli and Belinzer. Inactivation of the Bradford protein assay increases its sensitivity. *Theoretical and Experimental Studies.*

ANEXOS

MEDIOS

A. Medio Sauton

Para preparar 100 mL de medio Sauton se disolvió en agua destilada 10 g de ácido cítrico, 10 g de fosfato de potasio, 10 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 10 g de citrato férrico de amonio, 10 g de glicerol y 10 g de piruvato de sodio en 80 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a volumen en un frasco estéril por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

Para el cultivo de la subcepa r00001 se adicionó sulfato de canamicina (100 µg/mL) cada tercer día.

SOLUCIONES

B. Amortiguadora de carga 2X

Se preparó 100 mL de solución de glicerol (100%) y 100 µL de β-mercaptoetanol (100%) en 10 mL de agua destilada. Se agregó 100 µL de bromofenol azul (100%) a la solución de glicerol.

Se disolvió en agua destilada 10 g de acetato de sodio para preparar la solución de 0.5 M. Se calentó en baño María por 10 min.

C. Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)

Para preparar 100 mL de solución de Tris base en agua destilada se pesó 15 g de Tris base y se llevó a volumen en un frasco estéril con agua destilada.

D. Amortiguadora de Rehidratación

Se preparó 100 mL de solución de glicerol (100%) y 100 µL de β-mercaptoetanol (100%) en 10 mL de agua destilada. Se agregó 100 µL de bromofenol azul (100%) a la solución de glicerol.

Se rehidrató el medio de cultivo con la solución de glicerol y bromofenol azul. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a volumen en un frasco estéril con agua destilada.

K. DGGE 10 - 17 %

Se clarificarán dos soluciones de poliacrilamida utilizando un sistema forador de radiación. Las soluciones se preparan de la siguiente manera:

| Reactivo | Colocación al 10% de acrilamida | Colocación al 17% de acrilamida |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Agua | — | 1000 µL |
| Agua d | 10000 µL | 10000 µL |
| Crisp 1000 µL | 10000 µL | 10000 µL |
| Colocación de acrilamida bis acrilamida 1000 µL | 10000 µL | 10000 µL |
| Agua 100 µL | 1000 µL | 1000 µL |
| Agua 100 µL | 1000 µL | 1000 µL |
| Colocación final | 1000 µL | 1000 µL |

10000 µL etilendiamina

Una vez inyectado el volumen total de la muestra se coloca una capa de isopropanol sobre los gels para que la superficie de los platos quede plana. Los gels se dejan polimerizar al menos durante 24 h.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

L. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (microensayo)

En una microplaca a partir de un estándar de proteína se preparará una curva con 100 µL de proteína. Se añadirá 10 µL de proteína y 10 µL de reactivo de Bradford. Se leerá en oscilometría a 595 nm. El complejo colorante proteína es estable hasta por 24 h. La cantidad de proteína contenida en la muestra se interpolará a partir de la gráfica.

M. Tinción con plata

Todas las soluciones deben prepararse el día anterior en frío. Las soluciones de pretratamiento, fijación y revelado deben prepararse al instante.

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| Fijación | 100 ml de solución de fijación |
| Lavado | 100 ml de agua |
| Pretratamiento | 100 ml de solución de pretratamiento |
| Fijación | 100 ml de solución de fijación |
| Revelado | 100 ml de solución de revelado |
| Paro | 100 ml de solución de paro |

Todo el procedimiento se realiza a temperatura ambiente tal como se describe a continuación.

1. Al finalizar la corrida electroforética, colocar el gel en un recipiente en el cual quede completamente plano, sin dobleces. Preparar solución de fijación suficiente para cubrirlo por completo, dejar en fijación leve durante 1 hora.

2. Colectar los desechos de la solución de fijación, realizar lavados de 10 minutos en la solución de lavado.

3. Desechar los restos de la solución de lavado, realizar lavados de 10 minutos en agua.

4. Incubar en solución de pretratamiento exactamente durante 1 hora.

5. Desechar los restos de la solución de pretratamiento, realizar lavados de 10 minutos en agua.

6. Preparar la solución de fijación, dejar en fijación leve durante 1 hora.

7. Colectar los desechos de la solución de fijación, realizar lavados de 10 minutos en agua.

8. Preparar 100 ml de la solución de revelado, enmarcar el gel en el recipiente, desechar esa solución, preparar el resto de la solución de revelado, mantener en fijación durante 1 hora o hasta que se logre la intensidad deseada según la aparición de los puntos.

9. Desechar la solución de revelado, lavar 3 veces 10 minutos con agua.

10. Preparar la solución de paro, aptar la cámara digital del gel dentro de la siguiente media hora de que se haya detenido el revelado. Los geles pueden almacenarse en la solución de paro a 4°C hasta por una semana antes de secar los geles entre dos hojas de papel celofán, se recomienda hacer un lavado con solución de glicerol al 10% durante 1 hora.