



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PROTEOMA DE  
*Mycobacterium microti* Y *Mycobacterium bovis* BCG  
México 1965

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GUSTAVO OLVERA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** Prof. Rodolfo Pastelin Palacios

**Vocal:** Prof. Saturnino De León Chapa

**Secretario:** Profra. Yolanda López Vidal

**1er Suplente:** Prof. Enrique Ortega Soto

**2do Suplente:** Profra. María del Carmen Urzua Hernández

El presente trabajo se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología. 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

---

Dra. Yolanda López Vidal  
**Asesora**

---

cDr. Mauricio Rodríguez Álvarez  
**Supervisor Técnico**

---

Gustavo Olvera García  
**Sustentante**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales y las herramientas para mi superación.

A la Facultad de Química y a su planta docente quienes me ofrecieron el espacio y el tiempo para el desarrollo de mis capacidades académicas.

A la Dra. Yolanda López Vidal por sus asesorías y por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Álvarez por el apoyo y el tiempo dedicado a este proyecto.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por su colaboración para la identificación de proteínas.

A todos los miembros del PIMM por su tiempo, paciencia y apoyo.

A mis sinodales por el tiempo invertido para la revisión de este trabajo.

Un reconocimiento especial para la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo económico otorgado al Macroproyecto “Nuevas Estrategias epidemiológicas, genómicas y proteómicas en Salud Pública” en el área de Tuberculosis (Proyecto No. SDEI.PDiT.05.4), a través del “Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas”, así como al otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto IN225506-2).

## **DEDICATORIAS**

A mis padres y hermana que gracias a su apoyo he logrado alcanzar mis metas a lo largo de mi vida.

A las personas que hicieron muy amena mi paso por la H.H. Facultad de Química, en especial a los “telerines”, quienes facilitaron mi estancia en la facultad y a Rosario que me brindo su apoyo incondicional.

A los miembros del PIMM por hacer más amena mi estancia en el laboratorio y porque de cada uno me llevo algún aprendizaje

## I. ÍNDICE GENERAL

	Páginas
I. Índice general	iv
II. Índice de figuras y tablas	v
III. Abreviaturas y acrónimos	vii
IV. Resumen	viii
1. Introducción	
1.1. Tuberculosis	1
1.2. Epidemiología	
1.2.1. Tuberculosis en el mundo	2
1.2.2. Tuberculosis en México	5
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
1.3.1. Patogénesis y respuesta inmune	8
1.4. Vacunación contra la tuberculosis	10
1.5. Desarrollo de nuevas vacunas	12
2. Antecedentes	
2.1. Generalidades de <i>Mycobacterium microti</i>	14
2.2. Su uso como vacuna contra la tuberculosis	14
2.3. Comparación entre <i>Mycobacterium microti</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> BCG y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	15
3. Justificación	20
4. Objetivo	20
5. Material y Métodos	21
6. Resultados	26
7. Discusión	34
8. Conclusiones	40
9. Bibliografía	41
10. Anexos	45

## II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras	Páginas
<b>Figura 1</b>	
Tasa de Incidencia global de tuberculosis	3
<b>Figura 2</b>	
Prevalencia mundial estimada de VIH en nuevos casos de tuberculosis	4
<b>Figura 3</b>	
Mortalidad por tuberculosis en edad productiva	6
<b>Figura 4</b>	
Microfotografía de <i>M. tuberculosis</i>	7
<b>Figura 5</b>	
Envoltura celular de <i>M. tuberculosis</i>	8
<b>Figura 6</b>	
Transmisión de la tuberculosis	9
<b>Figura 7</b>	
Meta-análisis de la eficacia protectora de la BCG	12
<b>Figura 8</b>	
Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis	13
<b>Figura 9</b>	
Vía de evolución propuesta para los miembros del complejo <i>M. tuberculosis</i>	18
<b>Figura 10</b>	
Imágenes generadas por el programa PD Quest para su análisis	23
<b>Figura 11</b>	
Algoritmo realizado con el PD Quest para el análisis de los proteomas obtenidos	24
<b>Figura 12</b>	
Proteomas de A) <i>M. microti</i> y B) BCG México 1965	28
<b>Figura 13</b>	
Gráfica de distribución por pI y MM de Cada uno de los puntos detectados	29
<b>Figura 14</b>	
Diferencias cuantitativas entre proteínas encontradas en <i>M. microti</i> y en BCG México 1965	30
<b>Figura 15</b>	
Ejemplos de diferencia en intensidad y ausencia de puntos en los proteomas de A) BCG México 1965 y B) <i>M. microti</i>	31
<b>Figura 16</b>	
Patrones comparativos de algunos de los puntos identificados	33

## Tablas

<b>Tabla 1</b>	
Homología genética del complejo <i>M. tuberculosis</i>	17
<b>Tabla 2</b>	
Normalización por número total de píxeles	26
<b>Tabla 3</b>	
Descripción de las proteínas identificadas por espectrometría de masas del proteoma de <i>M. microti</i>	32
<b>Tabla 4</b>	
Comparación de MM y pI experimentales de las proteínas identificadas	32

#### **IV. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

ADC	albúmina-dextrosa-catalasa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Estándar
BCG	Bacilo de Calmette y Guèrin
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultivo de 10 kDa
CHAPS	(3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
DGE	Dirección General de Epidemiología
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ESAT	Antígeno Blanco de Secreción Temprana
IPG	gradiente inmovilizado de pH
ITS	espaciador interno transcrito
Min	minuto
MM	Masa molecular
OADC	ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marcos abiertos de lectura
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonio
RD	región de diferencia
Rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SS	Secretaría de Salud
SUIVE	Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica
TAES	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
Tb	Tuberculosis
UFC	unidad formadora de colonia
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

## V. RESUMEN

La tuberculosis (Tb) es un problema importante de salud en el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es el principal agente causal de la tuberculosis y actualmente la única vacuna aprobada por la OMS para prevenir la Tb es el bacilo atenuado *Mycobacterium bovis* desarrollado por Calmette y Guèrin, comúnmente conocido como BCG; sin embargo en diferentes meta-análisis, esta vacuna ha mostrado tener una eficacia protectora que varía de 0% a 80 %. Derivado a dicha variación en la eficacia protectora, existe una urgente necesidad de desarrollar vacunas y reactivos de diagnóstico más eficientes. Actualmente no se conoce del todo los mecanismos de patogenicidad de las micobacterias, aunque recientes estudios genómicos y del perfil de proteínas han evidenciado parte de estos mecanismos. Una alternativa que se exploró como vacuna contra la tuberculosis a mediados del siglo XX fue el uso de *Mycobacterium microti* (*M. microti*), esta micobacteria es filogenéticamente más cercana a *M. tuberculosis* y no es patógena para el humano, además de que en ensayos clínicos controlados realizados en la época se demostró que *M. microti* protege de forma similar a BCG.

Nuestro objetivo fue definir el patrón de proteínas de *M. microti* y su comparación con BCG. Material y Método. Las proteínas de extracto celular se sometieron a una separación electroforética de dos dimensiones, por punto isoelectrico y masa molecular y posteriormente se tiñeron con plata. Los patrones resultantes se digitalizaron y analizaron. Se logró definir alrededor de 600 puntos, 48.4 % fueron únicos de *M. microti*, 26.7% sólo se encontraron en BCG México 1965 y 24.8% fueron comunes. Se identificaron algunos de los puntos del proteoma de *M. microti* y se encontró: una proteína hipotética de función desconocida, proteínas ribosomales descritas como inductoras de hipersensibilidad retardada, proteínas involucradas en la biosíntesis de leucina, involucradas en almacenamiento de hierro y descritas como antígenos importantes para linfocitos B y T, entre otras. La variación encontrada entre los patrones de electroforesis 2D de las dos especies de micobacterias fue elevada con respecto a estudios similares en los que se compararon micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, en estas diferencias pueden estar interviniendo factores como modificaciones postraduccionales, cambios en la secuencia de amino ácidos o mecanismos de regulación derivados de las diferencias genéticas reportadas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (Tb) es una enfermedad infectocontagiosa crónica, producida por alguna especie del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*): *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*, todas ellas causantes de tuberculosis en humanos y otros mamíferos. La presentación clínica más frecuente es la Tb pulmonar, sin embargo, puede afectar cualquier órgano del cuerpo<sup>1</sup>.

La mayoría de los pacientes con tuberculosis pulmonar experimentan fatiga, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, tos persistente durante varias semanas y pérdida del apetito. En un estado avanzado, las expectoraciones se acompañan de sangre (hemoptisis). El desarrollo de síntomas más específicos depende del órgano afectados y de la extensión de la infección<sup>2</sup>.

La Tb aqueja al hombre desde hace miles de años, existe evidencia paleontopatológica de Tb raquídea en restos humanos neolíticos, pre-colombinos y egipcios tempranos<sup>3</sup>, no obstante, fue hasta que las condiciones de hacinamiento en el estilo de vida urbana adquirido durante la revolución industrial, establecieron las condiciones epidemiológicas que propiciaron la propagación de la enfermedad, de este modo, para los siglos XVII y XVIII un cuarto de la población europea adulta había perecido a causa de la Tb<sup>4</sup>.

Actualmente, y a pesar del progreso logrado con el tratamiento y la vacunación con el bacilo de *Mycobacterium bovis* atenuado por Albert Calmette y Camille Guèrin (BCG), la Tb re-emergió en los países desarrollados y en los países en vías de desarrollo se incrementó. Hoy en día es considerado uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, debido a factores similares a los que se dieron en la Europa del siglo XVII: migraciones, hacinamiento, aumento de la población, pobreza y desnutrición; situación que se agrava por el incremento de la esperanza de vida, la coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)<sup>5,6</sup>, el surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* fármaco y

multifármacoresistentes y el creciente número de personas con algún otro tipo de inmunocompromiso. Por todo esto la Organización Mundial de la Salud declaró en 1993 el estado de emergencia global contra la Tb para desarrollar medidas encaminadas al control de esta enfermedad en el mundo<sup>6,7</sup>.

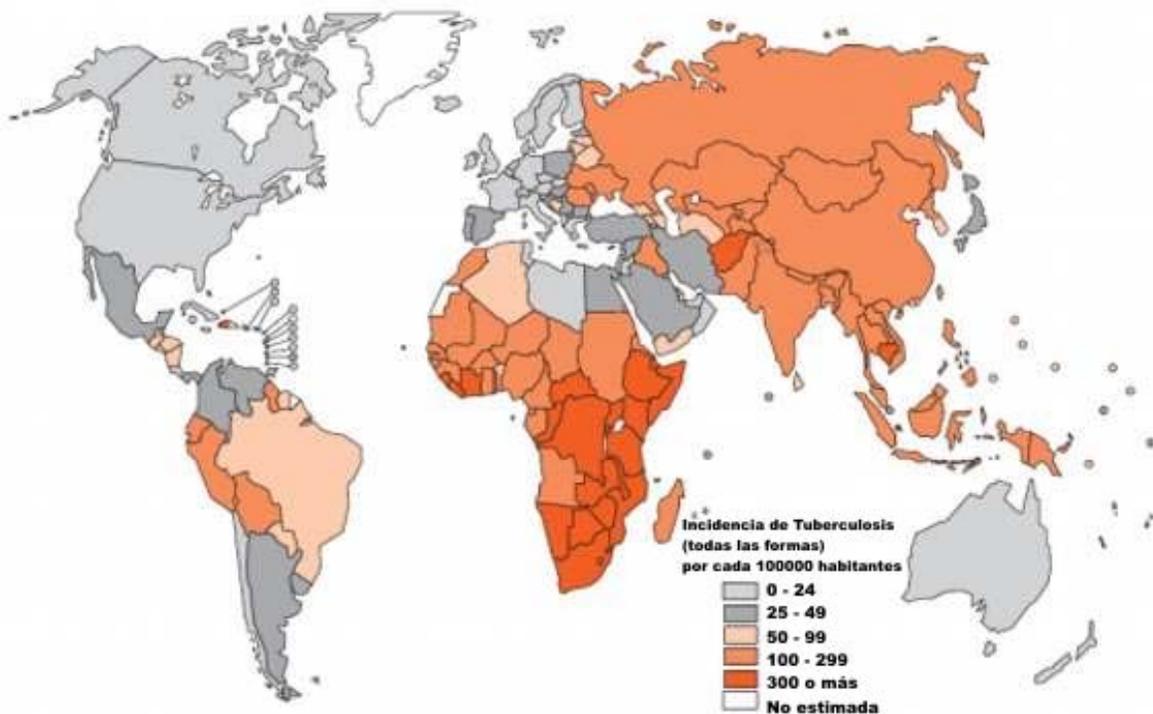
## **1.2. Epidemiología**

### **1.2.1 Tuberculosis en el mundo**

Cada año se presentan en el mundo nueve millones de casos nuevos de tuberculosis y se registran cerca de dos millones de muertes por esta enfermedad, lo que representa un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de los países que más la padecen debido a que en la mayoría de los caso afecta a personas en edad productiva.<sup>6, 8-10</sup>.

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada o ha estado expuesta a *M. tuberculosis* y, a pesar de que la Tb causa la muerte de más personas en el mundo que cualquier otra enfermedad causada por una sola bacteria patógena, sólo el 10% de aquellos que están infectados desarrollan la enfermedad activa (Figura 1)<sup>11, 12</sup>.

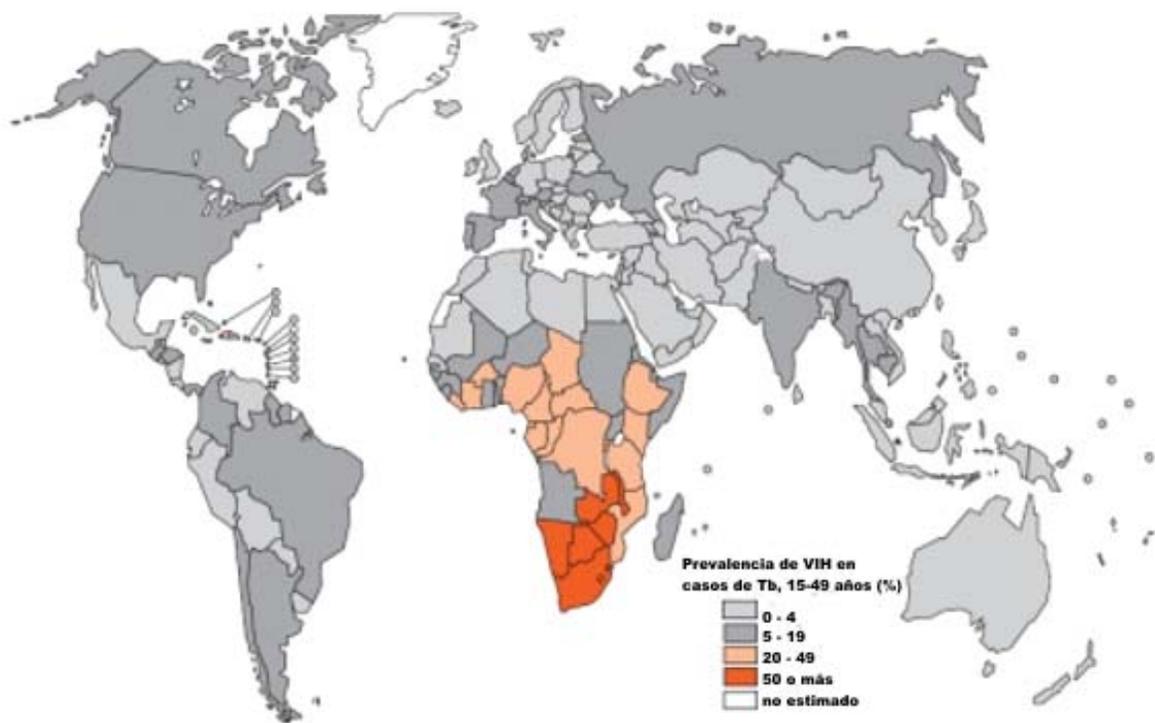
África reporta la incidencia más alta, algunos países de este continente llegan a presentar hasta 356 casos por 100 000 habitantes por año. En 22 de los países más poblados de África y Asia se reportan la mayoría de los casos nuevos de Tb, lo que representa 80% del total a nivel mundial.



**Figura 1.** Tasa de incidencia global de tuberculosis estimada por cada 100 000 habitantes en el 2004. (WHO REPORT 2006. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing)

Desde la década de 1980 se registró un importante incremento en la incidencia mundial de Tb debido a la propagación del VIH en África, donde para el año 2004 el 34% de los enfermos diagnosticados por primera vez con tuberculosis presentaban coinfección con VIH (Figura 2). Se estima que en ese mismo año la tasa de coinfección en Botswana, Sudáfrica, Zambia y Zimbabwe excedió el 50%. A nivel mundial la tasa de coinfección con VIH en el 2004 fue del 8%<sup>6,9</sup>.

Otro de los factores que ha complicado la erradicación de la Tb es la aparición de cepas resistentes a uno o más fármacos que representan el 40% de los casos diagnosticados como positivos en pruebas de esputo alrededor del mundo<sup>9</sup>.



**Figura 2.** Prevalencia mundial estimada de VIH en nuevos casos de Tb en el 2004. (WHO REPORT 2006. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing).

Reportes recientes de la OMS (datos globales del 2004) mostraron que la incidencia de Tb disminuyó o permaneció estable en la mayoría de las regiones, con excepción de África, donde la incidencia continúa en aumento.

Debido a este panorama, desde el año 2000 la OMS implementó el programa “Alto a la Tuberculosis” (STOP TB), cuyo objetivo es eliminar la Tb como problema de salud pública. Dentro de las metas establecidas para el 2005 estaban: la detección de un 70% de los casos (que para el 2006 fue de 60%), 85% de éxito en el tratamiento (para el 2006 fue de 82%) y está previsto que para el 2015 disminuya la incidencia a nivel mundial y que se reduzcan a la mitad las tasas de morbilidad y mortalidad reportadas en 1990 en la mayoría de las regiones, con excepción de África en donde se requieren mayores esfuerzos para lograr estas metas. El objetivo final planteado por la OMS a través de la implementación mundial del programa “Alto a la Tuberculosis” es erradicar la tuberculosis para el año 2050<sup>6, 8-10</sup>.

## **1.2.2 Tuberculosis en México**

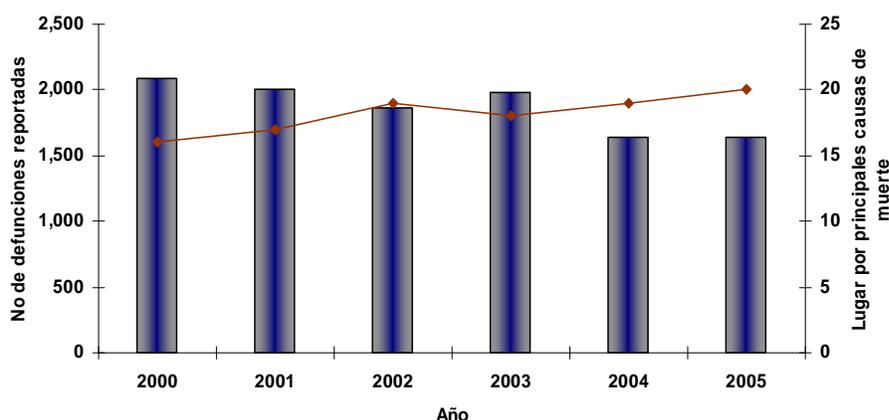
En México, como en el resto del mundo, la población más afectada por la Tb se encuentra en edad productiva (de los 14 a 64 años) de ahí la trascendencia del problema por el impacto económico que genera. Las estrategias de prevención y control de la Tb comenzaron a principios del siglo XX. En 1928 el Dr. Manuel Gea González presentó al Departamento de Salubridad un programa de trabajo para la lucha contra la Tb, el cual consideraba actividades de docencia y asistenciales, además de un proyecto para la aplicación y producción de la vacuna BCG. A partir de ese momento se continuó con los esfuerzos para el control de la Tb: en 1936 se inauguró el sanatorio para enfermos de tuberculosis de Huipulco (actual Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias); en 1939 se estableció el Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis; en 1949 se inauguró el laboratorio productor de la vacuna BCG y en 1966 se inició la campaña masiva de vacunación en población escolar; en los ochenta se adoptó el esquema de tratamiento con fármacos combinados (isoniacida, rifampicina y pirazinamida). Desde 1949 hasta 1970 se produjo en México una vacuna derivada directamente del instituto Pasteur, con esta cepa se vacunó masivamente a la población mexicana hasta 1970 año en el cual la cepa vacunal se cambió por una derivada de Dinamarca hasta que la producción mexicana de la vacuna cesó en 1998.

La información epidemiológica generada en México era diversa ya que la proporcionaban múltiples instrumentos de registro y notificación de casos, unos recomendados por la Dirección General de Medicina Preventiva de la Secretaría de Salud (SS), otros por la Dirección General de Epidemiología (DGE) y otros adoptados por diferentes instituciones o estados, hasta que en 1995 se instauró un sistema único para la notificación y reporte de casos de la tuberculosis<sup>13</sup>.

En el mismo año, en atención al llamado de la OMS para el desarrollo de medidas globales contra la Tb, se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993 para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud,

instrumentando en ese mismo año la estrategia de Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES/DOTS por su siglas en inglés). En su actualización en el año 2005 se replanteó el programa y se integraron las estrategias para atender y prevenir la Tb fármaco y multifármacoresistente (TAES-plus)<sup>14</sup>.

Para el año 2000 la SS a través del Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica (SUIVE) y de la DGE reportó 2,090 defunciones por Tb con lo que esta enfermedad ocupó el lugar 16 dentro de las principales causas de muerte. Sin embargo, desde la instauración del Programa contra la Tb existe una disminución en el número de casos nuevos notificados; para el 2005 se reportaron 1,639 defunciones por Tb lo que la sitúa en el lugar 20 dentro de las principales causas de muerte en México (Figura 3).



**Figura 3.** Mortalidad por Tb en edad productiva (14 a 64 años) en México. En barras se grafica el número de defunciones reportadas por tuberculosis del 2000 al 2005. La línea corresponde al lugar anual que ocupa la tuberculosis dentro de las principales causas de muerte en México en el mismo intervalo de tiempo (elaborado a partir de los documentos electrónicos puestos a disposición por el Sistema Nacional de Información en Salud, SINAI, 2000 – 2005. <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/mortalidad.htm>).

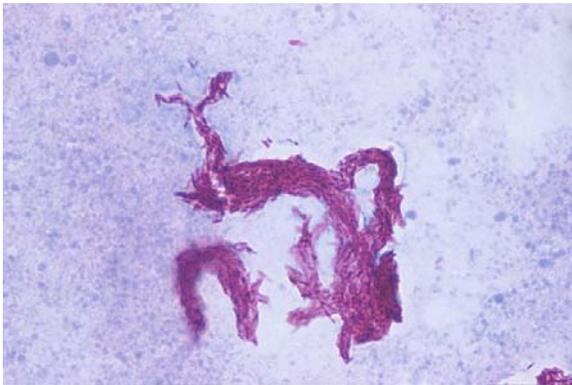
De acuerdo a datos de la OMS, en 2004 la incidencia estimada de Tb en México fue de 33,529<sup>10</sup>, la SS reportó ese mismo año una incidencia de 15,216 (Boletín Epidemiológico. Vigilancia Epidemiológica Semana 1, 2006, SUIVE, DGE), lo que representa tan sólo el 44% de lo estimado por la OMS, por lo que se calcula que existe un sub-registro de aproximadamente el 56% (<http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/mortalidad.htm>).

A pesar de los importantes avances que se han tenido en México en materia de control y prevención de la Tb, prevalece un rezago importante en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, debido a esto se tienen que mantener y fortalecer los programas actuales para

lograr la meta propuesta por la OMS de reducir a la mitad la incidencia con respecto a la de 1990 para el año 2015 y erradicar la Tb para el 2050.

### 1.3 *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* es el principal agente etiológico de la tuberculosis en humanos; fue descubierto por Robert Koch en 1882, se clasifica dentro de la clase *Actinomycetos*, orden de los *Actinomycetales* dentro de la que se encuentra la familia *Mycobacteriaceae*, con un solo género: *Mycobacterium*<sup>15</sup>. *M. tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol resistente (Figura 4), aerobio, ligeramente curvo o recto, de 0.2 a 0.6 µm de ancho por 1.0 a 4 µm de largo, no esporulado y no capsulado; es un patógeno intracelular facultativo, puede sobrevivir y multiplicarse bajo condiciones de estrés oxidativo y microaerofilia dentro de los macrófagos y otras células de mamíferos<sup>2</sup>; su genoma lo conforman 4,411,529 pares de bases, tiene un contenido de G+C de 65.6% mismo que se conserva en el resto de los miembros del complejo *M. tuberculosis*<sup>16</sup> y codifica para 3,995 marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) .



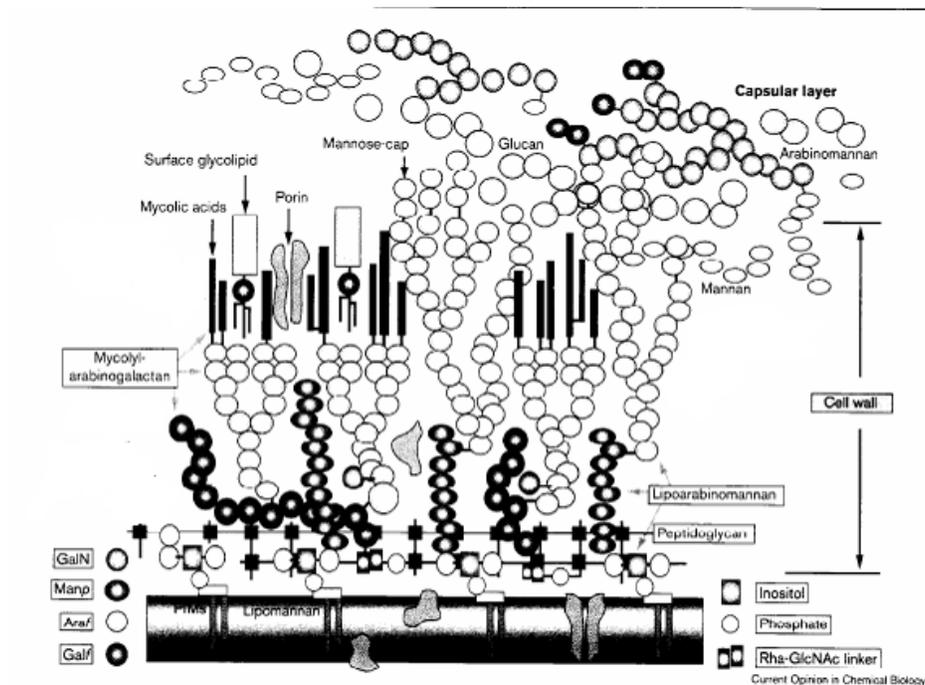
**Figura 4.** Microfotografía de *M. tuberculosis*. Tinción de Ziehl-Neelsen. 100X. Se pueden observar los agregados característicos de las micobacterias.

Como todas las micobacterias, *M. tuberculosis* posee una envoltura celular de estructura compleja constituida por una cápsula, pared celular y membrana plasmática. Entre los principales componentes de la cápsula se encuentran el ácido micólico y glicolípidos; los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos que tienen de 70 a 80 carbonos y se les atribuye el carácter hidrofóbico de la envoltura. La membrana celular tiene las mismas características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las

micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana.

La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confiere un carácter hidrofóbico y resistencia a la hidrólisis enzimática; está constituida por un complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-péptidoglicano (Figura 5), lo que la convierte en una efectiva barrera frente a muchos de los antimicrobianos convencionales.

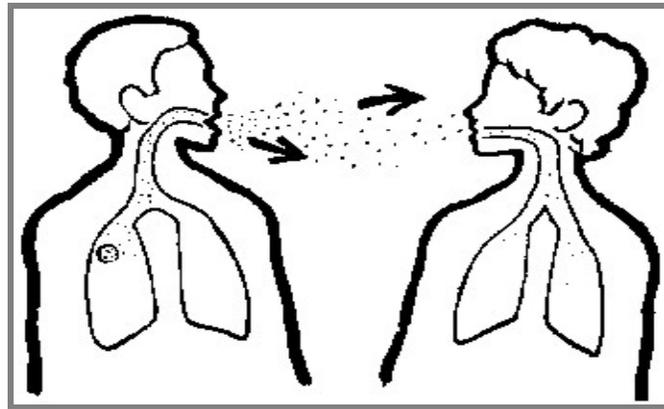
En la superficie del bacilo *M. tuberculosis* existen otras moléculas lipídicas de importancia en la infección, ya que éstas interactúan directamente con los componentes del sistema inmune y promueven la inhibición de sus funciones efectoras. De ellas las más importantes son: el factor cordón (trehalosa 6,6-dimicolato), sulfátidos y micósidos, cada uno con actividad biológica específica<sup>17, 18</sup>.



**Figura 5.** Envoltura celular de *M. tuberculosis*. Modelo de la estructura característica de la pared celular de las micobacterias, caracterizada por la presencia de péptidoglicano, arabinogalactana y ácidos micólicos

### 1.3.1 Patogénesis y respuesta inmune

La principal vía de transmisión de *M. tuberculosis* se produce por una persona infectada y que es capaz de diseminar bacilos viables de *M. tuberculosis* (se le denomina bacilífero). La infección se transmite de persona a persona por vía aérea, al toser o estornudar, por medio de aerosoles con un gran número de bacilos (Figura 6). La tuberculosis también puede transmitirse por fómites, aunque es poco frecuente, o adquirirse por vía oral cuando se ingiere leche no pasteurizada proveniente de vacas infectadas con *M. bovis*<sup>2</sup>.



**Figura 6.** Transmisión de la tuberculosis. Ocurre de persona a persona a través de aerosoles en partículas menores a  $5\mu\text{m}$ , expulsadas al toser por un sujeto bacilífero.

Los eventos en el proceso de infección pueden ser divididos en tempranos y tardíos. Dentro de los tempranos tenemos que una vez que *M. tuberculosis* entra a los espacios alveolares puede ser internalizada por macrófagos alveolares, pneumocitos epiteliales alveolares tipo II y/o células dendríticas; estas células expresan receptores fagocíticos que reconocen patrones moleculares conservados. Los macrófagos residentes en los alveolos representan la primera línea de defensa de la infección por aerosoles, sin embargo, la interacción que se da con las células dendríticas tienen una función preponderante en estadios tempranos de la infección debido a su papel clave en la activación de linfocitos T específicos a antígenos de *M. tuberculosis*<sup>19</sup>.

Una vez en el macrófago del hospedero, *M. tuberculosis* reside inicialmente en una vacuola endocítica llamada fagosoma; si la maduración normal ocurre, es decir se lleva a cabo la fusión fago-lisosoma, la bacteria es eliminada al encontrar un ambiente adverso que incluye pH ácido, intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno, enzimas lisosomales y

péptidos tóxicos. Por otro lado, las micobacterias patógenas que son capaces de inhibir la fusión fago-lisosoma persisten en el interior del macrófago, pero aun no está claro si el bloqueo de la maduración endosomal es esencial para la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis*<sup>20</sup>.

Dentro de los eventos tardíos podemos observar que una vez que los macrófagos fueron infectados atraen, mediante la producción de quimiocinas, a monocitos inactivados, linfocitos y neutrófilos, que conforman posteriormente estructuras focales (granulomas) encargadas de contener la diseminación de la bacteria. Los linfocitos T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y en el subsecuente control del crecimiento micobacteriano mediante una respuesta tipo T<sub>H1</sub> que constituye la respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis*<sup>20</sup>.

Se piensa que *M. tuberculosis* es incapaz de multiplicarse dentro de los granulomas debido al pH ácido, la disponibilidad reducida de oxígeno y a la presencia de ácidos grasos tóxicos, algunos bacilos permanecen en estado latente por décadas<sup>19</sup>.

El estado latente o persistente de la infección puede permanecer por mucho tiempo en una persona de manera asintomática e incapaz de ser transferida. En personas con una eficiente respuesta inmune, la infección es controlada y los granulomas se convierten en pequeñas lesiones fibrosas y calcificadas. Sin embargo, si una persona con infección latente desarrolla alguna alteración fisiológica derivada, por ejemplo, de diabetes, infección por VIH, tratamiento contra cáncer, enfermedad autoinmune o trasplante que debilite su sistema inmunológico, la contención existente en el granuloma se pierde y la bacteria se multiplica diseminándose en el pulmón, este hecho da lugar a la tuberculosis pulmonar activa sintomática y transmisible<sup>19</sup>.

Existe también la posibilidad de presentación extrapulmonar de la tuberculosis como resultado de diseminación hematógena de los bacilos durante la fase inicial de multiplicación y puede no haber evidencia de enfermedad pulmonar en pacientes con tuberculosis diseminada.

#### 1.4. Vacunación contra la Tuberculosis

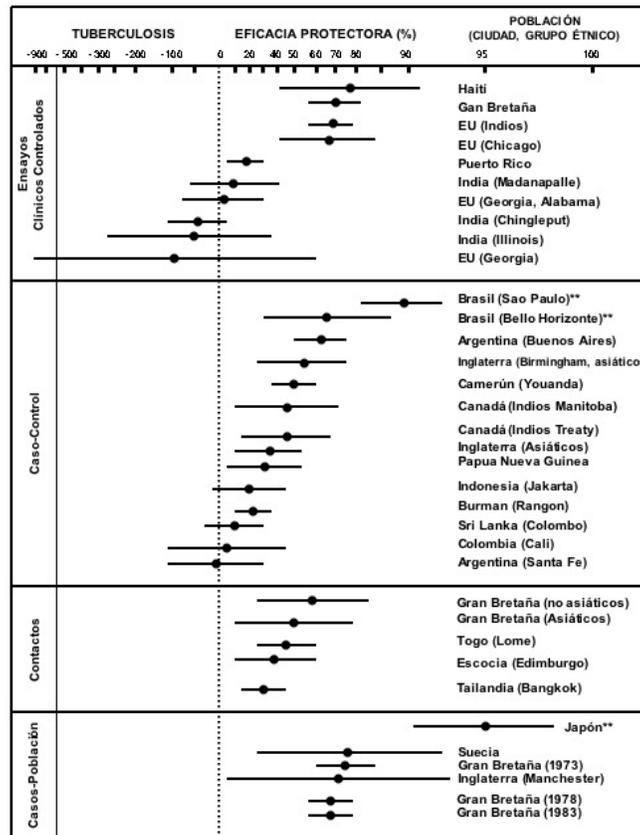
El Bacilo de Calmette y Guèrin (BCG) es una vacuna viva atenuada derivada de *M. bovis* y es la única vacuna existente en el mundo para la prevención de la tuberculosis principalmente en sus formas diseminadas más graves (meníngea y miliar). El crédito por el desarrollo de la vacuna contra la tuberculosis aceptada para su uso en humanos lo tienen Albert Calmette y Camile Guèrin, quienes desde 1906 subcultivaron una cepa de *M. bovis* en un medio de papa glicerinada y bilis de buey a intervalos de 14 días. En 1919 los ensayos de protección y seguridad realizados en varias especies animales demostraron la atenuación del bacilo y que confería protección contra la cepa virulenta de *M. bovis* e incluso contra *M. tuberculosis*. La administración de las primeras dosis de la vacuna BCG en humanos fue en 1921<sup>12</sup>, en ese año se vacunaron a 120 recién nacidos de madres con tuberculosis con tres dosis del bacilo por vía oral y se demostró una disminución en la mortalidad del 25% al 2% en esta población. En Francia en el año 1926 ya habían sido vacunados 5,183 infantes con la BCG<sup>21</sup> y en los años siguientes se implementó el uso de la vacuna BCG en Europa. Actualmente la BCG es la vacuna más utilizada en la historia de la humanidad y a la fecha se han administrado alrededor de  $10^9$  dosis de BCG en todo el mundo<sup>22</sup>, en México se administra una sola dosis al nacimiento por vía intradérmica de forma masiva desde 1966.

En los ensayos de protección iniciales realizados en niños, la BCG demostró conferir una alta protección en contra de la tuberculosis, sin embargo, la mayor carga de tuberculosis está asociada con la enfermedad pulmonar en adultos, contra la cual la vacuna ha demostrado ser menos efectiva. En evaluaciones de meta-análisis se demostró que la protección conferida para la tuberculosis pulmonar varía entre el 0% y 80% (Figura 7)<sup>23</sup>. Para el caso de la vacunación neonatal, la BCG protege eficientemente a los niños en contra de tuberculosis miliar y meníngea<sup>24</sup>, sin embargo, algunos autores sugieren que la inmunidad conferida por la aplicación de la vacuna BCG no es mayor de 8 a 12 años<sup>25</sup>.

Actualmente existen numerosas hipótesis que tratan de explicar la alta variabilidad en la eficacia protectora de la BCG, dentro de las que están: i) la susceptibilidad genética del

hospedero, ii) diferencias en virulencia entre las cepas de *M. tuberculosis*, iii) sobreatenuación de la cepa BCG durante su propagación que derivó en una pérdida sucesiva de su capacidad para inducir una efectiva respuesta inmune protectora, iv) prevalencia de otras infecciones micobacterianas en la población estudiada y v) el nivel de exposición a micobacterias ambientales<sup>26</sup>; sin embargo, ninguna de estas por sí sola tiene evidencias clínicas o experimentales irrefutables que expliquen la variabilidad observada.

Recientemente Castillo *et al* evaluaron la eficacia protectora de 10 subcepas BCG en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva y observaron que la eficacia de las subcepas difiere notablemente. Sus resultados señalan a la BCG Phipps y a la BCG Tice como la más y menos eficaz, respectivamente, en el reto con *M. tuberculosis* H37Rv<sup>27</sup>.

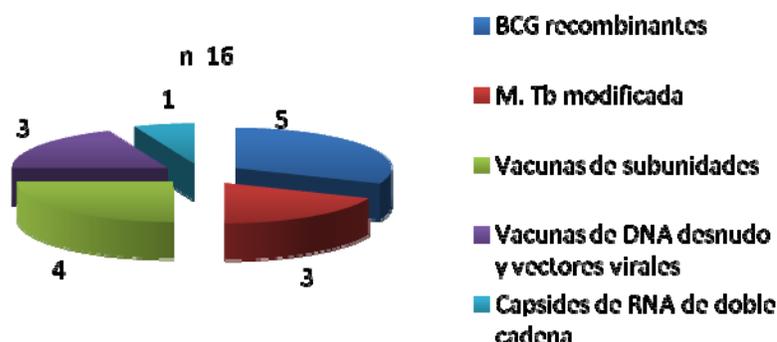


**Figura 7.** Meta-análisis de la eficacia protectora de la BCG. Se observa la variación encontrada en la eficacia protectora de la vacuna BCG en diferentes estudios evaluados, va de un 0% a un 95% en uno de los casos.

## 1.5. Desarrollo de nuevas vacunas

Debido a la gran variabilidad en la eficacia protectora que confiere la vacuna BCG, es prioritario desarrollar una vacuna contra la tuberculosis que sea más eficaz. Durante los últimos años, sobre todo tras la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* en 1998, ha existido un gran impulso en la identificación y caracterización de antígenos expresados durante las diferentes etapas de la infección y la enfermedad<sup>26</sup>. De esta manera, los resultados obtenidos a partir de estas investigaciones han sido un punto clave en la selección de antígenos candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas.

En los últimos 20 años se han evaluado más de 200 candidatos a vacunas que han utilizado diversas estrategias para su desarrollo tales como: recombinación de BCG, atenuación de *M. tuberculosis*, diseño de vacunas de subunidades de proteínas, vacunas de DNA desnudo, vectores virales y cápsides de RNA de doble cadena, entre otras (Figura 8)<sup>28,29</sup>.



**Figura 8.** Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas contra la Tb. El porcentaje se obtiene de un total de 16 vacunas en actual proceso de desarrollo, varias de ellas se encuentran ya en fases clínicas de estudio<sup>28</sup>.

En la gran mayoría de los casos la eficacia conferida por estos candidatos ha sido menor o equivalente a la que proporciona la BCG, sólo las vacunas recombinantes de BCG lograron inducir una respuesta inmune protectora superior a la proporcionada por BCG, reflejada en la reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC) en bazo, hígado y pulmón después del reto con *M. tuberculosis* virulenta en modelos animales<sup>30-33</sup>.

El desarrollo de nuevas vacunas utilizando como vehículo a BCG tiene diversas ventajas tales como que es la vacuna más utilizada en el mundo, no presenta efectos secundarios o son leves, por sí sola funciona como un potente adyuvante, su producción es de bajo costo y

puede aplicarse poco tiempo después del nacimiento<sup>26</sup>. Sin embargo, la vacuna *M. bovis* BCG tiene la misma desventaja que condujo a su atenuación inicial, diversificación y pérdida del nivel de protección que confiere en contra de la Tb: la capacidad de sobreatenuarse irreversiblemente.

Actualmente conocemos más acerca de la filogenia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, entre ellos existen otros microorganismos más cercanos filogenéticamente a *M. tuberculosis* que ofrecen mejores alternativas en eficiencia de la respuesta inmune y que pueden ser muy atractivos para su estudio, como *M. microti*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Generalidades de *Mycobacterium microti***

*Mycobacterium microti* fue descubierto en la frontera británico-escocesa en 1937 por Q. A. Wells, quien lo describió como agente causal de una enfermedad caseosa diseminada del ratón de campo “campañol” (*Microtus agrestis*). El bacilo causante de esta infección tiene características de cultivo *in vitro* que lo diferencian de los bacilos de la tuberculosis humana y bovina, sin embargo, serológicamente no existe ninguna distinción entre los tipos bovino o humano. Lo anterior, aunado al comportamiento en varias especies de animales de laboratorio justificó su clasificación como una nueva especie, el tipo murino del bacilo de la tuberculosis<sup>34</sup>, y su inclusión al complejo *M. tuberculosis*. Actualmente se sabe que *M. microti* es capaz de causar enfermedad en una gran variedad de mamíferos silvestres, incluyendo el ratón de la madera (*Apodemus sylvaticus*), campañoles de banco (*Clethrionomys glareolus*) y musarañas (*Sorex araneus*)<sup>35</sup>.

### **2.2. Uso de *M. microti* como vacuna contra *Mycobacterium tuberculosis***

Debido a que *M. microti* es una especie patógena específica de los ratones de campo (*Microtus agrestis* principalmente), en la segunda mitad del siglo XX se exploró su utilidad como vacuna. En 1952 I. M. Hall y J. A. H. Wylie reportaron un ensayo clínico comparativo de vacunación entre BCG y *M. microti*. El estudio realizado con enfermeras,

estudiantes de medicina y niños de edad escolar demostró la seguridad de *M. microti*, además de que se obtuvo para ambos grupos de vacunación un porcentaje similar de conversión a la prueba de la tuberculina<sup>34</sup>.

El Medical Research Council del Reino Unido realizó otro ensayo clínico en 1950 con 54,239 sujetos de entre 14 y 15 años de edad con un seguimiento de 20 años posterior a la vacunación con BCG o *M. microti*. De forma paralela en Checoslovaquia se utilizó a *M. microti* como vacuna entre 1951 y 1969 en aproximadamente 500,000 personas, en su mayoría recién nacidos. En ambos estudios se demostró una reducción del 75% en la incidencia de tuberculosis con ambas vacunas<sup>36, 37</sup>. Investigaciones más recientes demuestran que *M. microti* confiere protección contra la Tb en animales (conejos<sup>38</sup> y ratones<sup>39</sup>).

En investigaciones recientes con el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva se demostró que la vacunación con *M. microti* incrementa el tiempo de sobrevida de los ratones retados tanto con la cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv como con la cepa hipervirulenta 950 1000 del genotipo Beijing dos meses después de haber sido vacunados y la eficacia resultó similar a la generada por la vacuna BCG<sup>40</sup>.

### **2.3. Comparación entre *Mycobacterium microti*, BCG y *Mycobacterium tuberculosis***

El complejo *M. tuberculosis* está formado por *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*<sup>15</sup> y *M. bovis* BCG. A pesar de su muy cercana relación, se consideran especies diferentes pero que integran un solo complejo. *M. tuberculosis* infecta principalmente a humanos y otros primates; *M. bovis* aún cuando es la principal causa de tuberculosis en ganado bovino, puede también causar enfermedad en una amplia variedad de animales incluyendo al humano; *M. africanum* es un grupo heterogéneo de cepas aisladas de humanos, encontrados principalmente en África ecuatorial y tiene propiedades intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*; *M. microti* es patógeno de ratones de campo y otros pequeños mamíferos; BCG derivó de una cepa de *M. bovis* pero ahora tiene características que la hacen diferir de esta, por lo que se considera

una especie aparte. *M. tuberculosis*, *M. Africanum*, *M. microti* y *M. bovis* fueron aceptadas como especies separadas por la combinación de características fenotípicas y aparente especificidad de hospedero. *M. canetti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* fueron aceptadas en el complejo *M. tuberculosis* como especies separadas en virtud de su preferencia por un hospedero y por la combinación de características genotípicas y fenotípicas particulares<sup>41</sup>.

Los avances en biología molecular han permitido establecer algunas características genotípicas del complejo que permiten cierta diferenciación entre sus miembros, sin embargo, aún no es posible realizar identificaciones rápidas ni relacionar estas diferencias con su nivel de virulencia en diversos hospederos.

Existen métodos basados en el polimorfismo del DNA ribosomal 16S que están ampliamente aceptados para la identificación rápida de algunos microorganismos incluidas algunas especies de micobacterias; sin embargo, para el complejo *M. tuberculosis* la secuencia de este fragmento de DNA resulta idéntica. Para tratar de resolver este problema se han empleado las secuencias del espaciador interno transcrito del DNA ribosomal 16S-23S, usado para diferenciar entre *M. kansasii* y *M. gastri* (micobacterias no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*), sin embargo, estas secuencias también resultaron idénticas entre los miembros del complejo. Otros genes que codifican proteínas se han usado también para tratar de diferenciar las especies micobacterianas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, tal como el gen de la proteína de 32 kDa, *dnaJ*, *hsp65*, *sod*, *recA*, *rpoV*, entre otros (Tabla 1). No obstante, el análisis de la secuencia de estos genes no reveló variabilidad dentro del complejo<sup>42</sup>.

De acuerdo a un estudio realizado por Sreevatsan *et al* en 1997, en el que analizó la secuencia de 26 genes estructurales en 842 cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, existe un 99.9% de similitud en las secuencias, siendo esto un grado mínimo de polimorfismo comparado con lo descrito para otras bacterias patógenas para el humano<sup>43</sup>.

A partir de la secuenciación de los genomas de *M. tuberculosis* H37Rv<sup>16</sup>, *M. bovis* AF2122/97<sup>44</sup> y BCG Pasteur<sup>45</sup>, además de otros estudios de genómica comparativa, se han identificado 14 regiones de diferencia (RD1-14) de 2 a 12 kb ausentes en *M. bovis* y *M. bovis* BCG con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv<sup>46</sup>, de las cuales sólo la RD1 y la RD3 están ausentes exclusivamente en las cepas de *M. bovis* BCG. Además de las RD's, se han identificado en BCG otros marcadores genéticos de diferencia, algunos de estos involucran duplicaciones de genes implicados en el metabolismo de glicerol o reguladores transcripcionales<sup>45</sup>.

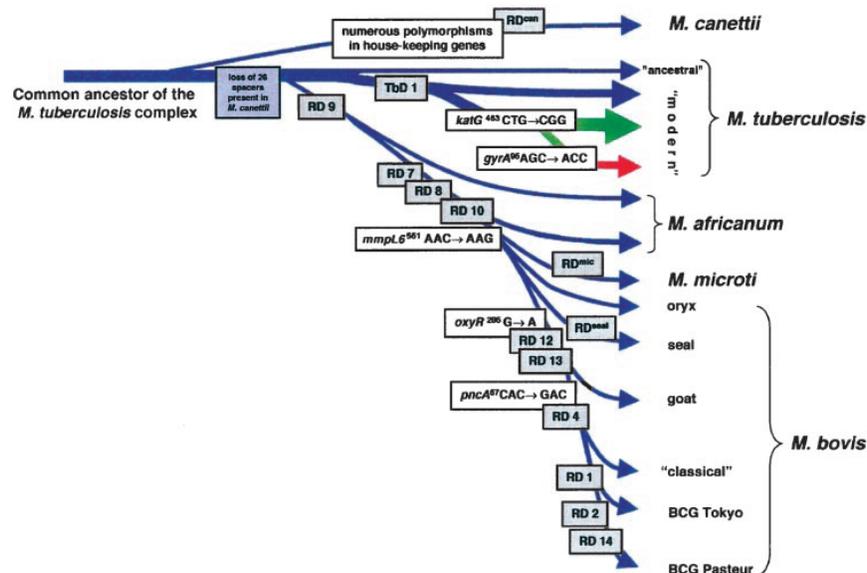
**Tabla 1.** Homología genética del complejo *M. tuberculosis*. Se muestra la homología encontrada para diversos genes en los miembros del complejo.

Gen estudiado	% de homología Complejo <i>M. Tuberculosis</i>	Autor <sup>42</sup>
<i>hsp 65</i>	100	Plicaytis, B. <i>et al.</i> 1992
16S rDNA	100	Talenti, A. <i>et al.</i> 1993
<i>dnaJ</i>	100	Takewaki, S. <i>et al.</i> 1993
Gen de la pt de 32 kDa	100	Soini, H. <i>et al.</i> 1994
<i>sod</i>	100	Shivannavar, C. <i>et al.</i> 1996
<i>recA</i>	100	Van Soolingen, D. <i>et al.</i> 1997
<i>rpoV</i>	100	Comicini, S. <i>et al.</i> 1998
Secuencia ITS 16S-23S	100	Roth, A. <i>et al.</i> 1998
<i>gyrB</i>	99.9	Kasai, H. <i>et al.</i> 1999

En *M. microti* se ha evidenciado la pérdida de las regiones RD7-RD10, al igual que en *M. bovis*, (Figura 9) así como regiones ausentes específicas de la especie: RD1<sup>mic</sup>, RD5<sup>mic</sup>, MiD1, MiD2 y MiD3 relativo a *M. tuberculosis* H37Rv.

La ausencia de la región RD1<sup>mic</sup> es responsable de la pérdida de una gran parte de la región de la familia del antígeno blanco de secreción temprana (ESAT), que incluye a los genes que codifican los antígenos inmunodominantes ESAT-6 y proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP-10); MiD1 y MiD2 codifican proteínas putativas con función aun

desconocida. La región MiD3 contiene 5 genes que codifican una proteína con motivos repetidos de prolina-prolina-glutamato<sup>37, 47</sup>.



**Figura 9.** Vía de evolución propuesta para los miembros del complejo *M. tuberculosis*, basada en la pérdida sucesiva de fragmentos de DNA a partir de un ancestro común.

Hasta el momento las consecuencias biológicas de la pérdida de estos fragmentos de DNA en *M. microti* permanecen desconocidas y es difícil asociar las características de virulencia de *M. microti* a cualquier patrón de pérdida. Debido a esto es necesario aplicar estrategias que nos permitan evaluar las diferencias a otro nivel.

Una de las estrategias post-genómicas que ha contribuido al descubrimiento y descripción de las diferencias entre las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* es la proteómica, que se basa principalmente en el patrón de proteínas resultado de una separación electroforética de dos dimensiones. Esta técnica combina la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) y su masa molecular, a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y tiene el poder de resolver hasta 10,000 especies de proteínas en geles de gran formato (al menos 20cm x 30cm) con suficiente reproducibilidad entre ensayos<sup>48</sup>.

Los análisis proteómicos revelaron numerosas diferencias en la composición de proteínas celulares entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Chicago<sup>48</sup>; *M. tuberculosis* H37Rv y CDC 1551<sup>49</sup>, así como diferencias en proteínas de sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Copenhague<sup>50</sup>. Algunas de las proteínas descritas en estos estudios como el antígeno 85, ESAT-6, CFP-10 y la proteína inmunogénica Mpb64/Mpt64, se han definido como antígenos principales para células T, y muchas otras como proteínas involucradas en el metabolismo celular y proteínas de choque térmico. El objetivo principal de definir la composición diferencial de las proteínas entre las cepas atenuadas y virulentas es facilitar el diseño de nuevas vacunas, quimioterapias y sistemas de diagnóstico para el control de la Tb.

A pesar de que existen diversos estudios de proteómica en miembros del complejo *M. tuberculosis*, ninguno de ellos ha analizado el patrón de proteínas de *M. microti* y siendo este un buen candidato para el desarrollo de nuevas vacunas debido a su atenuación natural para el humano, la propiedad de conferir por sí sola protección en contra de la Tb, su seguridad al ser administrada como vacuna en humanos y sobre todo, la capacidad de recuperar su inmunogenicidad al inocularla en ratones de campo lo que impide la gradual sobreatenuación, nos propusimos evaluar la diferencia entre los proteomas de *M. microti* y BCG para describir el patrón de las proteínas en ambas micobacterias y su grado de semejanza a este nivel lo que permitirá posteriormente identificar proteínas inmunogénicas o que sean efectivas para desarrollar reactivos diagnóstico.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La variación en la eficacia protectora de la única vacuna que existe contra la tuberculosis *M. bovis* BCG, nos impulsa a la búsqueda de una vacuna nueva o antígenos que incrementen la eficacia protectora de la ya existente. El estudio comparativo entre los proteomas de *M. microti* y *M. bovis* BCG nos permitirá evaluar las diferencias y/o semejanzas a nivel de proteínas entre ellas, lo que facilitará la identificación de inmunógenos que estimulen una respuesta protectora y proteínas que sean efectivas como reactivos diagnóstico para la tuberculosis.

### **4. OBJETIVO**

Realizar el análisis comparativo de los proteomas de la fracción celular de *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium bovis* BCG subcepa México 1965.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Cultivos Bacterianos**

La cepa tipo *M. microti* (ATCC 11152) y *M. bovis* BCG subcepa México 1965 (BCG México 1965) se sembraron en medio sólido Middlebrook 7H10 adicionado con 10% de ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa (OADC), se incubaron a 37 °C con 80% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Después de 10 días se transfirió una colonia en 150 mL de medio Middlebrook 7H9 adicionado con 10% de albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) y 0.05% de Tween 80, se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) hasta la fase media logarítmica de crecimiento (8 días)<sup>51</sup>. Transcurrido este tiempo, se cosechó por centrifugación (centrífuga Sorvall® super T21) a 8000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante después de haber sido esterilizado, el botón se resuspendió en 10 mL de agua desionizada estéril y se centrifugó a 8000 rpm por 15 min, este procedimiento se realizó tres veces para eliminar los restos del medio de cultivo del botón de cosecha. Finalmente, el botón se resuspendió en agua desionizada a razón de 0.1 mg de peso húmedo/mL para su posterior lisis. Las bacterias se almacenaron a -70 °C hasta su uso. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado a partir de cultivos independientes.

### **5.2. Obtención de proteínas de extracto celular**

La suspensión de bacterias (0.1 mg de peso húmedo/mL) se descongeló a temperatura ambiente, se transfirieron 3 mL a un tubo estéril, se sonicó con 15 pulsos de 1 min dejando un minuto de reposo entre cada pulso a 20 kHz y 80% de amplitud de salida con la punta de 7 mm de diámetro con el sonicador Ultrasonic Procesor Cp 130 (Cole-Parmer instruments, Illinois, U.S.A.). Se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) como inhibidor de proteasas a una concentración final de 20 mM, la mitad del volumen al finalizar el pulso 7 y el resto al finalizar el pulso 15, se verificó la lisis de los bacilos por microscopía en un frotis teñido con Gram. Los restos celulares se removieron por centrifugación a 14000 rpm x 10 min, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -70 °C hasta su uso. Las

proteínas se cuantificaron por el método de Bradford modificado para microensayo<sup>52, 53</sup>. (Ver anexo A)

De las proteínas obtenidas del sobrenadante (extracto celular) se realizó un SDS-PAGE de una dimensión con el equipo Phast System (Amersham-Bioscience, Uppsala, Sweden) en un gel de poliacrilamida al 12.5%. Las proteínas se visualizaron mediante tinción de plata realizada en la unidad de revelado del mismo equipo, esto para corroborar la integridad de las proteínas.

### **5.3. Electroforesis 2D**

- Isoelectroenfoque

La separación electroforética de primera dimensión se realizó por isoelectroenfoque en tiras de gradiente inmovilizado de pH (IPG) de 11cm de longitud con un gradiente de pH de 4-7 (ReadyStrips™ IPG Strips, Bio-Rad laboratorios Inc., CA, U.S.A.). Las tiras se rehidrataron por 14 h con 80 µg de proteínas en solución de rehidratación (Ver anexo B) CHAPS 2% (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato), Ditiotreititol (DTT) 70 mM, Urea 8 M, anfolinas (pH 4-7) 0.02% y 0.001% de azul de bromofenol]. Posteriormente las tiras fueron colocadas en el sistema de electroforesis horizontal Multiphor II (Amersham- Bioscience, Uppsala, Sweden). El isoelectroenfoque fue corrido a 17 °C 1 mA 5 W con un gradiente de voltaje de 500 V a 2500 V hasta completar 2500 V/h y a 2500 V hasta completar 52000 V/h totales.

Las tiras se trataron con ditiotreititol al 1.5% en solución de equilibrio por 15 min (ver anexo C) y 15 min con iodoacetamida al 3.7% en solución de equilibrio. Ambos tratamientos en agitación.

- Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12.5% (SDS-PAGE)

La separación electroforética de segunda dimensión se realizó en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12.5% de 16 x 16cm en el sistema de electroforesis vertical Hoeffer SE

600 (T30, C3. Ver anexo D). Al final del equilibrio las tiras de IPG se colocaron en los geles y se sellaron con agarosa (ver anexo E). La corrida electroforética se realizó a un voltaje de 50 V, 30 min y 100 V hasta que el frente de corrida alcanzara los 3mm del borde inferior del gel (~9h).

Para visualizar el patrón de proteínas los geles se tiñeron con plata (ver anexo F). Una vez teñidos, las imágenes se capturaron digitalmente con el densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad laboratorios Inc., CA, USA). Para su análisis se utilizó el software de análisis 2-D PDQuest™ Advanced V. 8.0 (Bio-Rad laboratorios Inc., CA, USA).

#### 5.4. Análisis de los geles

El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó con el programa PDQuest™ Advanced V. 8.0, el cual detecta los puntos, filtra la imagen original para clarificar los puntos y crea una imagen tridimensional gaussiana de los puntos. A partir de estos procesos se generan tres imágenes por separado: la imagen cruda original, la imagen filtrada y la imagen gaussiana (Figura 10).

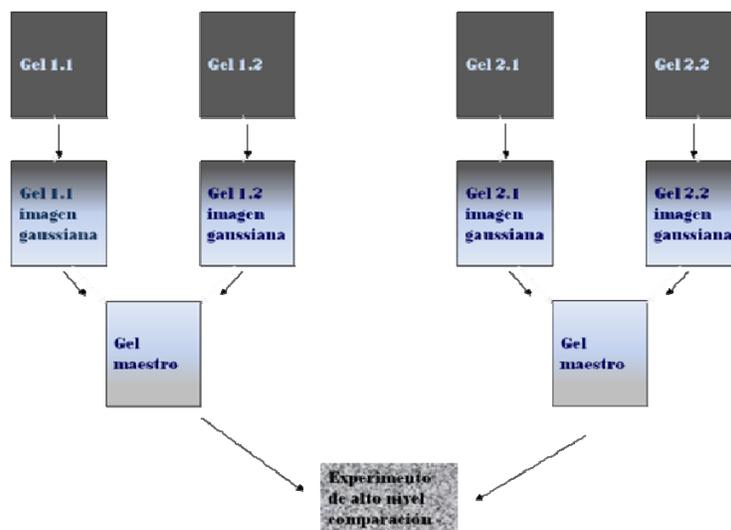


**Figura 10.** Imágenes generadas por el programa PD Quest para su análisis. La imagen gaussiana es una imagen tridimensional sintética sobre la que se realiza el análisis.

Los puntos detectados en cada gel por el programa, se verificaron manualmente, los puntos no detectados fueron añadidos y los puntos equivocadamente asignados se eliminaron. Posterior a esto, las imágenes se combinaron en un gel maestro en el que la imagen de los duplicados se sobreponen para identificar los mismos puntos en cada gel y establecer los marcadores fijos. Después de fijar la mayor cantidad de marcadores el PDQuest automáticamente hace coincidir el resto de los puntos que se encuentren en la misma posición. Se verificaron manualmente los puntos detectados como iguales en todos los geles para eliminar errores de asignación.

Se normalizaron\* los geles maestros, lo que permitió la comparación de valores cuantitativos. Esta normalización se lleva a cabo dividiendo la cantidad de píxeles detectados para cada punto entre el total de los píxeles.

A partir de los geles maestros se realizó un “experimento de alto nivel” que consiste en sobreponer las imágenes de los geles maestros de cada micobacteria, para realizar la comparación entre *M. microti* y BCG México 1965 (Figura 11).



**Figura 11.** Algoritmo realizado en el programa PD Quest para el análisis comparativo de los proteomas obtenidos a partir de dos ensayos de cultivos independientes para cada micobacteria.

## 5.5. Identificación de proteínas

Los puntos seleccionados a partir de un gel 2D teñido con plata, fueron extraídos manualmente y congelados a -70 hasta su uso. Cada punto fue desteñido, reducido, alquilado y digerido con tripsina. Las proteínas digeridas se analizaron por LC-NS-MS/MS (3200 Q TRAP, Applied Biosystems). Los péptidos fueron separadas por cromatografía de

\* Cuando se comparan geles 2D es frecuente que exista cierta variación en el tamaño de los puntos y su intensidad que no se debe a expresión diferencial de proteínas. Esta variación puede ser causada por algunos factores experimentales no fácilmente controlables, incluyendo: i) Diferentes densidades celulares al preparar la muestra, ii) inconsistencias en la eficiencia de la preparación de la muestra debidas a variaciones en reactivos, protocolos, etc., iii) errores de manipulación que resultan en pérdida de muestra durante la preparación, iv) pérdida de muestra al cargar el gel, v) inconsistencias en el tiempo de teñido entre geles, entre otros. Para comparar con más exactitud los puntos entre geles, se deben compensar las variaciones de intensidad no relacionadas con la expresión, a este proceso de compensación se denomina normalización.

líquidos usando un gradiente de elusión de acetonitrilo/0.1% ácido fórmico con un flujo de 0.4  $\mu\text{L}/\text{min}$  por 60 min a través de una columna Zorbax C18 (75  $\mu\text{n}$  x 15 cm, 3.5  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente se sometió a ionización a través de nanoelectrospray y a un sistema de espectrometría de masas en tándem. La identificación de proteínas fue realizada con el algoritmo Mascot en la base de datos MSDB 20050929 y limitada al complejo *M tuberculosis* (<http://www.matrixscience.com>). Se consideraron válidas las identificaciones con un puntaje mayor o igual a 27 y con una MM y pI con una diferencia no mayor al 10% con los valores experimentales.

## 6. RESULTADOS

### Proteínas del extracto celular

Después de 8 días de cultivo en 150 mL de medio Middlebrook 7H9 se obtuvo 8.1  $\mu\text{g}$  de proteínas/mg de células para el cultivo 1 y 7.81  $\mu\text{g}$  de proteínas/mg de células para el cultivo 2 de *M. microti*, del mismo modo para BCG México 1965, cultivos 1 y 2, se obtuvieron 8.0  $\mu\text{g}$  de proteínas/mg de células y 7.5  $\mu\text{g}$  de proteínas/mg de células respectivamente.

### Análisis de los geles 2-DE

Los resultados derivados de la normalización nos permitieron i) demostrar la reproducibilidad inter-ensayo y ii) demostrar la validez de la comparación entre los geles derivados de ambas especies de micobacterias (Tabla 2).

**Tabla 2.** Normalización por número total de píxeles

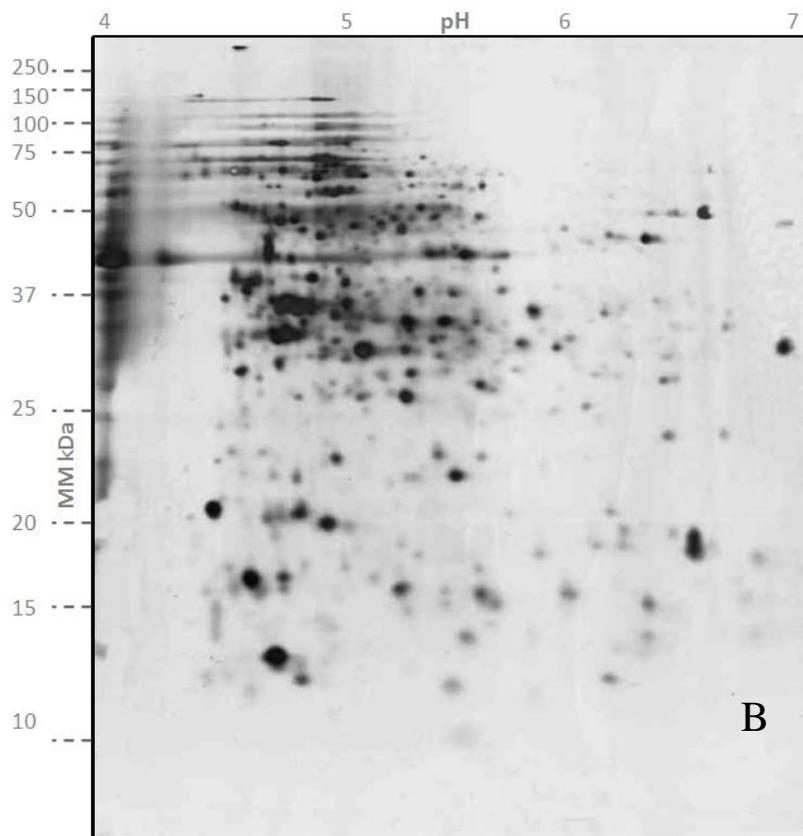
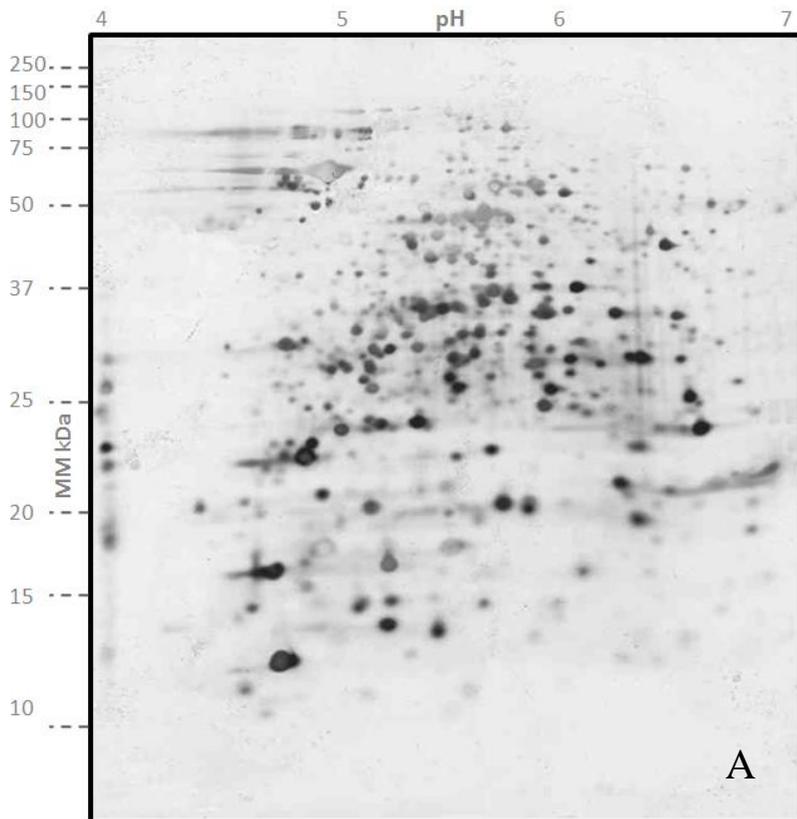
	<i>M. microti</i>	BCG México 1965
Gel 1	4489234	4473159
Gel 2	4485452	4478838
%CV	0.06	0.14
	*%CV	0.23

\*indica el coeficiente de variación obtenido del conteo total de píxeles para los cuatro geles

Los coeficientes de variación obtenidos de los dos ensayos independientes realizados para cada micobacteria fueron 0.06% para *M. microti* y 0.14% para BCG México 1965, mientras que para los 4 geles, el coeficiente de variación fue 0.23%. Diferentes reportes han señalado que el grado de variación técnica del proceso de electroforesis en dos dimensiones con muestras de proteínas bacterianas de cultivos independientes es de ~30% en el coeficiente de variación<sup>54</sup>, por lo que los resultados demuestran la reproducibilidad de los ensayos y la validez de su comparación.

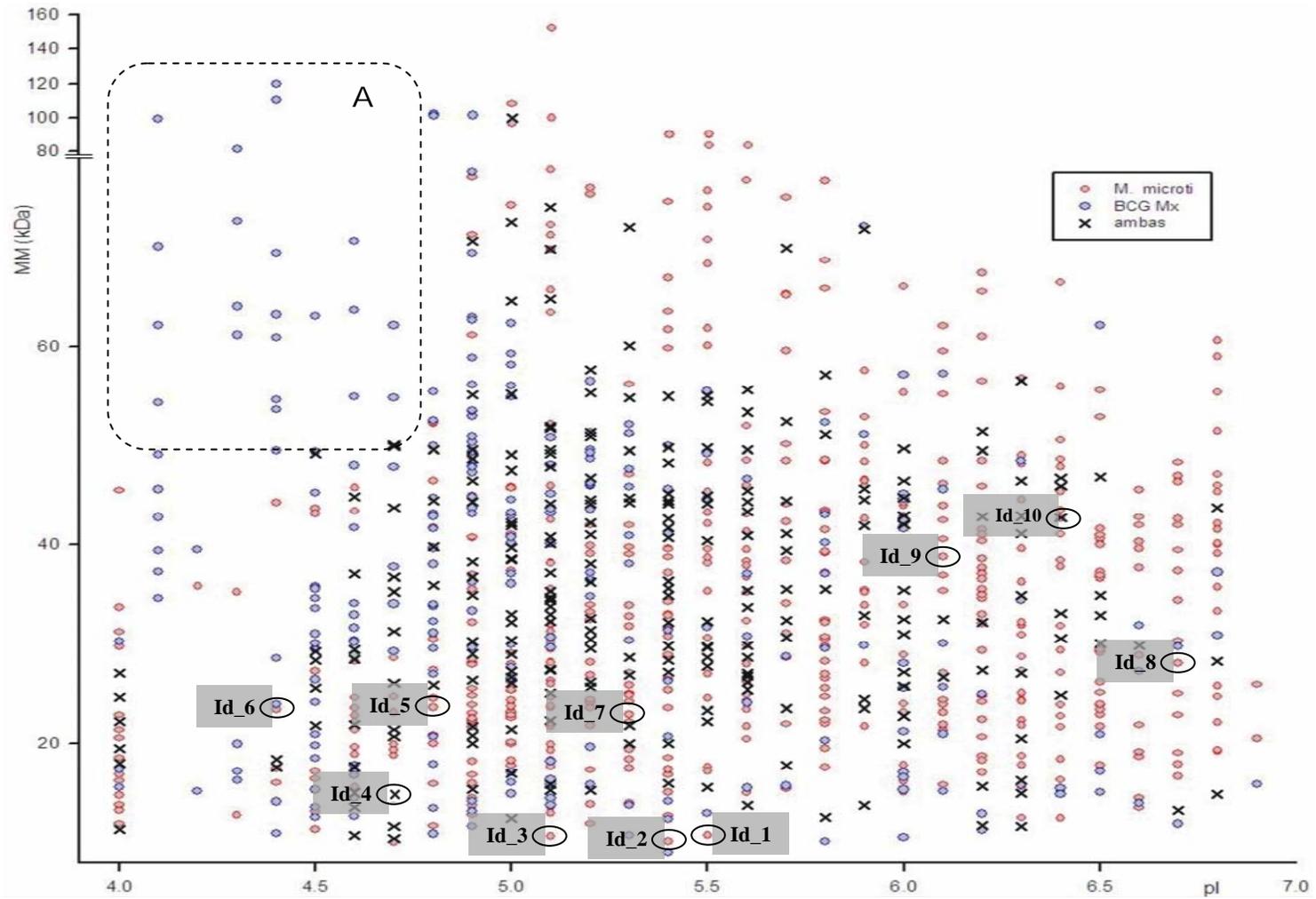
Para el intervalo de pH elegido en las tiras IPG (4-7) se definieron 732 puntos para *M. microti* y 515 puntos para BCG México 1965, todos los puntos detectados en este estudio tienen una masa molecular (MM) experimental en el intervalo de 9 kDa a 152 kDa (Figura 12). En el proteoma de BCG México 1965 se observó un grupo de proteínas entre 4 y 5.5 de pH y entre 25 kDa y 100 kDa, que corresponde al 56% del total de los puntos de esta micobacteria. En este mismo intervalo de pH y MM *M. microti* mostró sólo el 23% de puntos observándose una distribución bien definida de puntos entre 5 y 7 de pH (Figura 12 y 13). Además de esta diferencia se observó en la cepa BCG México proteínas en el intervalo de punto isoeléctrico (pI) de 4.1 a 4.8 y por arriba de 50 kDa mismas que están ausentes en *M. microti* (Figura 13 recuadro A). El 80 % de los puntos resueltos en ambos proteomas tienen entre 4.5 y 6.5 de pI y con una MM menor o igual a 80 kDa.

Los pI y MM obtenidos de cada patrón después de la electroforesis 2D y la tinción de plata están representados en la Figura 13, donde se muestra la distribución de cada uno de los puntos encontrados en cada una de las micobacterias o en ambas. Del total de puntos definidos 484 (48.4%) fueron únicos de *M. microti*, 267 (26.7%) fueron únicos para BCG México 1965 y 248 (24.8%) puntos fueron compartidos por ambas micobacterias estudiadas.



**Figura 12.** Proteomas de A) *M. microti* con un total 732 puntos resueltos y B) BCG México 1965 con un total de 515 puntos resueltos. Electroforesis 2D con un intervalo de pH de 4 - 7 en geles de poliacrilamida al 12.5% de 16 x 16 cm con 80 $\mu$ g de proteínas de extracto celular teñidas con plata.

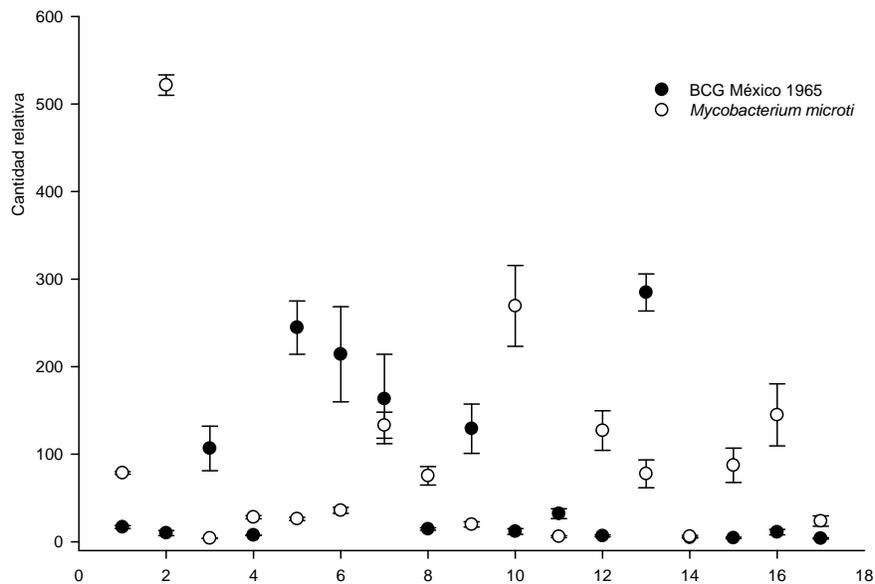




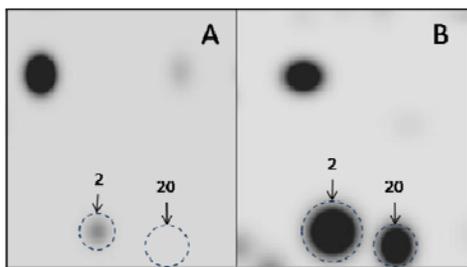
**Figura 13.** Distribución por pI y MM de cada uno de los puntos detectados del extracto celular únicos de *M. microti* (círculos rojos) que corresponden al 48.4% del total de puntos, únicos de BCG México 1965 (círculos azules) 26.8% y puntos presentes en ambos proteomas (x) 24.8%. El 80% de los puntos resueltos para ambas micobacterias se encuentran en el intervalo de 4.5 a 6.5 de pH y por debajo de 80 kDa. El recuadro A señala una zona en la que sólo se detectaron puntos de BCG México 1965, ninguno de los puntos detectados en el proteoma de *M. microti* tiene esas características.

Se realizó un análisis cuantitativo para encontrar posibles diferencias en el nivel de intensidad de las proteínas compartidas. Se seleccionaron los puntos presentes en los 4 geles que presentaran un coeficiente de variación menor o igual a 31.2%<sup>54</sup> entre los duplicados de cada una de las micobacterias estudiadas.

Diecisiete puntos cumplieron con estas características (Figura 14). Las proteínas asignadas como 7 y 14 en la Figura 15 no mostraron diferencia entre las dos micobacterias, algunas proteínas mostraron sobre-expresión que va desde 2.7 veces de sobreexpresión (proteína 4) hasta 50.0 veces (proteína 2, Figura 15) y desde 2.6 veces de subexpresión (proteína 13) hasta 26.0 veces (proteína 3) en *M. microti* con respecto a BCG México 1965.



**Figura 14.** Diferencias cuantitativas entre proteínas encontradas tanto en *M. microti* (círculos blancos) como en BCG México 1965 (círculos negros). Se definieron como diferentes aquellas proteínas en la que no se sobrepone su cantidad relativa considerando su desviación estándar. Las proteínas asignadas como 7 y 14 no muestran diferencias, mientras que en el resto se si existen diferencias en la cantidad relativa observada.



**Figura 15.** Ejemplos de diferencia en intensidad y ausencia de puntos en los proteomas de A) BCG México 1965 y B) *M. microti*. El punto 2 muestra la proteína que se encontró 50.0 veces sobreexpresada en *M. microti* (B) respecto a BCG México 1965(A), el punto 20 ejemplifica una de las proteínas que se encontraron sólo en *M. microti*.

## Identificación de proteínas

Se eligieron 10 puntos del proteoma de *M. microti* para su identificación por LC-NS-MS/MS (Figura 13), los puntos identificados como id\_4 e id\_10 se encontraron en ambos proteomas.

Se lograron identificar ocho proteínas a partir de los puntos id\_3, id\_4, id\_5, id\_7, id\_8, e id\_10; dos proteínas diferentes fueron identificadas en los puntos id\_5 e id\_7 (Tabla 3 y Figura 16). De todas las proteínas identificadas se tienen evidencias en estudios de proteómica en geles de 2D, tanto en proteínas de extracto celular de BCG Tice (Tabla 4) y *M. tuberculosis* H37Rv, como proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, con excepción de la proteína id\_7.1 de la que sólo se contaban con evidencias de su mRNA identificado por microarreglos de DNA<sup>55</sup>. Todas las proteínas identificadas en este estudio y previamente descritas en BCG Tice por el Instituto Max Planck para Biología de la Infección (IMPIB) tienen valores de MM y pI que difieren en no más del 10%, lo que nos habla de la reproducibilidad del método. No se pudo identificar los puntos id\_1, id\_6, id\_9 e id\_2, en el caso de los tres primeros debido a que los puntajes obtenidos no resultaron significativos para asignarles identidad, y para el punto id\_2 mostraba una MM y pI diferentes a los teóricos de la proteína identificada, probablemente se trate de un fragmento de dicha proteína.

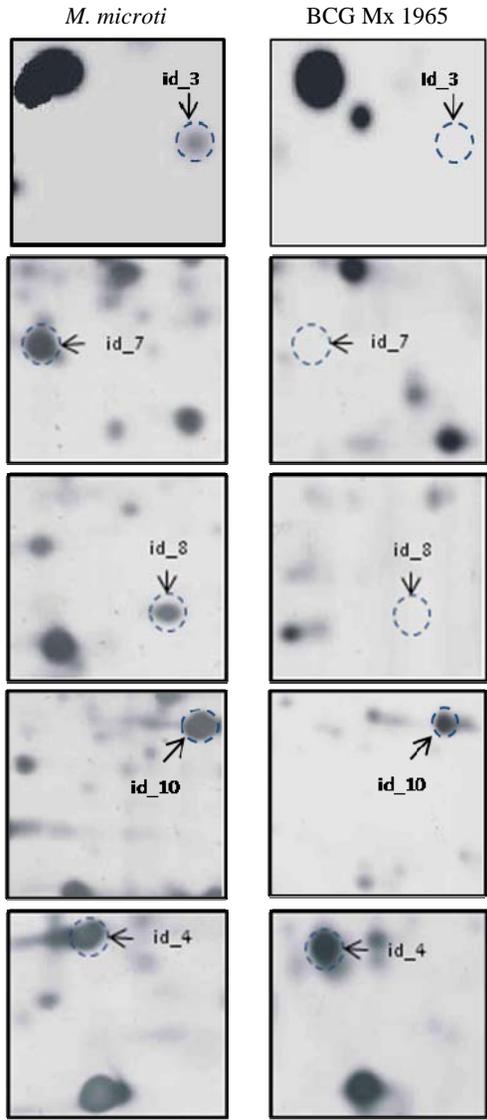
**Tabla 3.** Descripción de las proteínas identificadas por espectrometría de masas (NS LC/MS/MS) del proteoma de *M. microti*. En los puntos Id\_5 e id\_7 se pudieron identificar dos proteínas en la misma localización.

Proteína	Puntaje Global	No de péptidos identificados	% Secuencia	Función	Experimental MM (kDa)	pI	Presente en BCG y/o <i>M. microti</i>
id_3	183	4	40	Proteína hipotética de función desconocida	10.6	5.1	<i>M. microti</i>
id_5.1	124	4	20	Involucrada en la bioenergética celular	19.7	4.9	<i>M. microti</i>
id_5.2	54	1	6	Almacena hierro de forma soluble	19.7	4.9	<i>M. microti</i>
id_7.1	172	3	17	Involucrada en la biosíntesis de leucina	22.5	5.4	<i>M. microti</i>
id_7.2	105	3	17	Involucrada en el metabolismo de nucleótidos	22.5	5.4	<i>M. microti</i>
id_8	71	1	5	Posible oxidación de ácidos grasos	24.8	6.6	<i>M. microti</i>
id_10	77	3	5	Probable proteína de regulación transcripcional	38.7	6.5	<i>M. microti</i> BCG
id_4	318	7	49	Proteína ribosomal involucrada en los mecanismos de traducción	13.7	4.7	<i>M. microti</i> BCG

**Tabla 4.** Comparación de MM y pI experimentales de las proteínas de *M. microti* identificadas en este estudio y las identificadas en BCG Tice por el instituto Max Plank.

Proteína	<i>M. microti</i>		BCG Tice (Max Plank institute)	
	MM (kDa)	pI	MM (kDa)	pI
id_3	10.6	5.1	9.4	4.7
id_5.1	19.7	4.9	21.1	4.8
id_5.2	19.7	4.9	19.1	4.8
id_7.1	22.5	5.4	-----	-----
id_7.2	22.5	5.4	22.8	5.0
id_8	24.8	6.6	23.3	6.0
id_10	38.7	6.5	35.7	6.1

id_4	13.7	4.7	13.4	4.6
------	------	-----	------	-----



**Figura 16.** Patrones comparativos de algunos de los puntos identificados. Las imágenes a la derecha pertenecen al proteoma de *M. microti* y a la izquierda al de BCG México 1965. Sólo los puntos id\_10 e id\_4 se encontraron en ambos proteomas.

## 7. DISCUSIÓN

La mayoría de las proteínas de extracto celular de varias subcepas BCG, así como de *M. tuberculosis* encuentran su punto isoeléctrico en el extremo ácido, pH de 4 a 7, lo cual corresponde con lo predicho en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv por análisis *in silico* en el que se determinó que alrededor de 60% de las proteínas predichas tienen un punto isoeléctrico entre 4 y 7. Dentro de este intervalo de pH el patrón de proteínas de la BCG México 1965 concuerda con los resultados publicados para otras subcepas BCG<sup>48</sup>, en todas ellas una cantidad considerable de proteínas del extracto celular se agrupa hacia la parte ácida, entre el pH 4 y 5.5, y entre 25 y 100 kDa.

Siendo el primer trabajo de este tipo con *M. microti* y con base en los hallazgos de Jungblut *et al*<sup>48</sup> y Mattow *et al*<sup>50, 56</sup>, en los que la máxima diferencia fue de 56 puntos encontrados únicamente en *M. tuberculosis* con respecto a BCG Chicago y Copenhage, se esperaban diferencias menos notables, no obstante, el patrón de proteínas de *M. microti* en el intervalo de pH de 4 a 7 tuvo considerables diferencias con respecto al de BCG México 1965, en el que se encontró una distribución más homogénea de puntos bien definidos entre el intervalo de pH de 5 a 7, estas diferencias se reflejan en que aproximadamente el 25% de los puntos en los proteomas son compartidos entre ambas micobacterias.

Parte fundamental de los estudios proteómicos consiste en determinar la identidad de las proteínas estudiadas para establecer las diferencias que permitan el desarrollo de nuevas vacunas y reactivos diagnósticos contra la Tuberculosis. En este trabajo se seleccionaron 8 proteínas que fueron identificadas, seis de las cuales se encontraron únicamente en el proteoma de *M. microti*. Con excepción de una, todas las proteínas identificadas ya habían sido descritas anteriormente en estudios proteómicos, tanto de cepas virulentas de *M. tuberculosis* como de cepas vacunales BCG. De *M. microti* no existen reportes anteriores en los que se evidencie la presencia de éstas proteínas en específico.

Los valores experimentales de MM y pI de las proteínas identificadas difieren en menos del 10% con lo reportado para las mismas proteínas en BCG Chicago por el Instituto Max

Planck para Biología de la Infección (IMPIB), por lo que, además de comprobar que la reproducibilidad de la técnica es excelente, estos resultados sugieren que la cepa BCG México 1965 no expresa las proteínas identificadas, a diferencia de BCG Chicago, como se ha demostrado en diferentes subcepas de BCG en las que se observaron diferentes patrones de expresión de proteínas (tesis doctoral de Rodríguez A., M.); cabe aclarar que ninguno de los genes que codifican para estas proteínas se encuentran ausentes en BCG o *M. microti*. Es posible también que exista una expresión diferencial tal, que la sensibilidad de la técnica no fuera suficiente para detectar estas proteínas en BCG México 1965; o que se encuentran en una localización diferente dentro del proteoma, para comprobar lo anterior habría que analizar también proteínas del patrón de BCG México 1965.

### **Proteínas identificadas**

Las proteínas de *M. microti* id\_5.2 e id\_8 se definieron en estudios previos como no esenciales mientras que las proteínas id\_7.1, id\_10 e id\_4 están definidas como esenciales, del resto de las proteínas identificadas no se conoce esta propiedad<sup>57</sup>. De acuerdo a la clasificación funcional de los productos génicos de *M. tuberculosis*, las proteínas id\_5.1, id\_5.2, id\_7.1 e id\_7.2 se clasifican como intermediarios del metabolismo y respiración, id\_3 como proteína hipotética, id\_8 como parte del metabolismo de lípidos, id\_10 como proteína reguladora e id\_4 como parte de las vías de información, a continuación se discuten algunas de las características reportadas para las proteínas identificadas:

Id\_3 es una proteína hipotética de función desconocida codificada en un cósmido e identificada originalmente en *M. tuberculosis* H37Rv<sup>58</sup>, interesantemente el marco abierto de lectura (ORF por sus silgas en inglés) de esta proteína no había sido encontrado en el análisis inicial del genoma<sup>16</sup> y su inclusión a la base de datos se debió a su identificación por trabajos de proteómica<sup>58</sup>. La secuencia descrita para esta proteína en *M. tuberculosis* CDC1551 contiene siete aminoácidos más en el extremo amino terminal<sup>58, 59</sup>, el resto es idéntica para todas las especies del complejo *M. tuberculosis* cuyo genoma ha sido secuenciado (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AF2122/97 y BCG Pasteur).

La proteína id\_5.1 está involucrada en la bioenergética celular y fue identificada inicialmente por el IMPIB en 1999 en *M. tuberculosis* H37Rv. Algunos estudios muestran que la expresión de una proteína homóloga en *Legionella pneumophila* es inducida durante la infección intracelular, sin embargo, en una BCG expuesta prolongadamente a macrófagos murinos no se observó un incremento en la síntesis de la proteína<sup>60</sup>, por lo que su inducción no fue considerada como un evento general entre patógenos intracelulares. Por otro lado, la proteína id\_5.2 está involucrada en el almacenaje intracelular de hierro, y se tienen evidencias de que en *M. tuberculosis* H37Rv aumenta su síntesis en condiciones de baja tensión de oxígeno<sup>61</sup>; como ocurre cuando la micobacteria se encuentra dentro del macrófago. Esta proteína ha demostrado también ser un antígeno dominante tanto de linfocitos T como linfocitos B<sup>62</sup>, debido a esto se propone como candidato potencial para el desarrollo de vacunas y herramientas diagnósticas. Posiblemente la presencia de esta proteína en *M. microti* (identificada en este estudio) está involucrada como uno de los factores que intervienen en el nivel de protección que confieren estas micobacterias en contra de la Tuberculosis, sin embargo, se requieren futuros estudios para demostrarlo.

La proteína id\_7.1 está involucrada en la síntesis de leucina y ningún estudio previo ha demostrado su presencia como proteína en miembros del complejo *M. tuberculosis*. Se han creado cepas de BCG y *M. tuberculosis* auxótrofas de leucina mediante el remplazo del gen silvestre que codifica esta proteína por una copia mutante con 359 pares de bases suprimidas, con las que se realizaron estudios de protección en modelos murinos; ninguna de ellas superó la protección conferida por BCG al reto con *M. tuberculosis* H37Rv<sup>63</sup>.

La proteína id\_7.2 está involucrada en el metabolismo de nucleótidos actuando como nucleótido-cinasa, mientras que la proteína id\_8 posiblemente está involucrada en la oxidación de ácidos grasos con componentes específicos, sin embargo, no existe mayor información acerca de las consecuencias biológicas de la presencia o ausencia de estas proteínas.

La proteína id\_10 está involucrada en mecanismos de regulación transcripcional. La comparación entre *M. tuberculosis* Erdman y BCG Chicago reveló que esta proteína

presenta variantes de movilidad, es decir, se encontraba en ambas micobacterias pero en sitios diferentes dentro de sus proteomas<sup>48</sup>. En un estudio similar que comparó a *M. tuberculosis* CDC1551 y *M. tuberculosis* H37Rv, Betts *et al* identificó también variantes de movilidad para esta proteína<sup>49</sup>. Debido a que los genomas de ambas cepas para ese momento (año 2000) estaban disponibles, encontró que existe una transversión en la secuencia del gen, adenina por citosina en *M. tuberculosis* CDC1551 y *M. tuberculosis* H37Rv respectivamente, lo que produce el cambio en un aminoácido y consecuentemente las diferencias en los valores de pI y MM de ambas proteínas.

La proteína id\_4 está involucrada en los mecanismos de traducción, parece ser indispensable para la traducción exacta del mRNA<sup>57</sup>. Esta proteína induce un alto índice de proliferación en linfocitos T después de una exposición a una cepa virulenta y fue identificada también como componente principal del PPD<sup>64</sup>. Se ha demostrado que la acetilación del extremo amino terminal de una de sus isoformas es esencial para generar hipersensibilidad retardada<sup>65</sup>. Es posible que al igual que otras micobacterias que inducen respuesta al PPD, *M. microti* genere este mecanismo de inmunidad celular principalmente por la presencia de esta proteína.

Dentro de las explicaciones a las diferencias en los proteomas y basados en las identificaciones realizadas en este y en estudios anteriores, se puede considerar lo siguiente:

- i) **Ausencia de genes en alguna de las 2 micobacterias estudiadas.** El estudio de la evolución de las diferentes especies del complejo *M. tuberculosis* indica que todas comparten un ancestro común, y la derivación de las especies fue acompañada de la pérdida o ganancia de secuencias de DNA, así por ejemplo la pérdida de la región RD1 separa a las especies virulentas de las que no lo son. De este modo, las regiones RD2, RD4, RD11, RD12 y RD13 están ausentes en BCG México 1965 comparada con *M. microti*, esto deriva en 25 posibles ORF perdidos; de estos, 12 ORF no se incluyen en la zona de resolución de la técnica empleada por nosotros por tener pI menores a 4 o mayores a 7, por lo que sólo serían 13 ORF con posibilidad de ser detectados con nuestro abordaje

experimental, sin embargo, el 50% del total de los puntos resueltos (448 puntos) fueron únicos de *M. microti*. Debemos considerar también la posibilidad de que existan más regiones perdidas no descritas en *M. microti* (ya que su genoma aun no se ha secuenciado totalmente) y que los genes ausentes en ambas micobacterias sean factores que provoquen la total represión de muchos otros genes.

ii) **Modificaciones postraduccionales.** Las diferencias encontradas pueden derivar de modificaciones en las proteínas tales como acilación, fosforilación, glicosilación, metilación y acetilación<sup>66</sup>, en algunos casos la bioinformática aporta fuertes evidencias de potenciales modificaciones al analizar las secuencias de las proteínas, como en el caso de fosforilaciones y acilaciones en las que encontramos secuencias altamente conservadas, por otro lado, otras modificaciones son más difíciles de predecir debido a la ausencia de secuencias consenso definidas. La importancia de estas modificaciones es bien ejemplificada por la proteína id\_4, ya que su acetilación en el extremo amino terminal es determinante para inducir una respuesta de hipersensibilidad retardada. Sin duda, el análisis diferencial de las modificaciones postraduccionales entre cepas proveerá información crucial respecto a la función e importancia biológica de las modificaciones específicas en las proteínas.

iii) **Diferencias en la secuencia de proteínas homólogas en ambas micobacterias.** Las proteínas id\_3 e id\_10 son ejemplos de diferencias entre las secuencias de proteínas homólogas, la secuencia de id\_3 en *M. tuberculosis* CDC1551 contiene siete aminoácidos más en el extremo amino terminal con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv, esta diferencia tuvo correlación con la movilidad electroforética de la proteína en ambas cepas; algo similar ocurrió con la proteína id\_10, cuyo gen difiere en sólo un nucleótido entre dos cepas de *M. tuberculosis*. Junto con estos ejemplos existen múltiples evidencias de proteínas con variantes de movilidad electroforética en diferentes cepas del complejo cuya diferencia no ha sido identificada<sup>48, 49, 58, 59</sup>. Estas modificaciones cobran mayor importancia si consideramos que tales cambios pueden generar, modificar o desaparecer motivos de reconocimiento de linfocitos T o B.

iv) **Limitación de la técnica.** No podemos descartar que algunas diferencias fueran resultado del límite de detección de la tinción con plata, y que algunas de las proteínas no alcanzaron a ser detectadas, sin embargo, esto nos hablaría de expresión diferencial considerablemente mayor en una u otra micobacteria con la misma importancia de análisis que la presencia o ausencia.

La proteómica ha sido fundamental para el entendimiento de la biología e inmunología de la tuberculosis y el resto de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, es un elemento que complementa los estudios genómicos, de transcripción, fisiológicos e inmunológicos con el fin de comprender el origen de las características fenotípicas de *M. microti* y, consecuentemente, en el resto de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, en busca de blancos más efectivos para el desarrollo de vacunas, herramientas de diagnóstico y terapias que ayuden al control de la tuberculosis.

## 8. CONCLUSIONES

- Se logró definir el patrón de proteínas de extracto celular de *Mycobacterium microti* y de *Mycobacterium bovis* BCG México 1965.
- La distribución de las proteínas en *Mycobacterium bovis* México 1965 concuerda con lo reportado previamente para otras subcepas de BCG.
- La comparación de *M. microti* y BCG México 1965 reveló que sus proteomas en el intervalo de pH de 4 a 7 son diferentes.
- El origen de las diferencias proteómicas entre estas dos micobacterias puede estar determinado por múltiples interacciones tales como: ausencia de genes en alguna de las micobacterias estudiadas, modificaciones postraduccionales y/o diferencias en la secuencia de proteínas homólogas en ambas micobacterias.
- Dado que todas las proteínas identificadas están involucradas en procesos metabólicos, se sugiere que bajo las mismas condiciones de cultivo *M. microti* y BCG México 1965 expresan vías metabólicas específicas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pan American Health Organization. ¿Que es la tuberculosis? PAHO publications 2006.
- [2] Wolfgang KJ, Willet HP, Amos DB, Wilfiert AM. Microbiología de Zinsser. 20 ed. Argentina: Editorial Médica-Panamericana 1994.
- [3] Moreno-Altamirano L. Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la tuberculosis. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2004;17(2).
- [4] Gerald L. Mandell JEB, Raphael Dolin. Principles and practice of INFECTIOUS DISEASES. Fourth edition ed. NY: Churchill Livisngstone 1995.
- [5] Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organ. 1994;72(2):213-20.
- [6] World Health Organization. The Global Plan to Stop TB, 2006-2015. actions for life: towards a world free of tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2006 Mar;10(3):240-1.
- [7] Tuberculosis: a global emergency. World Health Forum. 1993;14(4):438.
- [8] Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. Lancet. 2006 Mar 18;367(9514):938-40.
- [9] Aziz MA, Wright A. The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases. Clin Infect Dis. 2005 Aug 15;41 Suppl 4:S258-62.
- [10] World Health Organization. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization. 2006.
- [11] Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. 1991. Bull World Health Organ. 2001;79(1):71-5.
- [12] Kaufmann SH. Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. Nat Rev Immunol. 2006 Sep;6(9):699-704.
- [13] Báez-Saldaña R. Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaria de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre la tuberculosis en México, 1981-1998. revista del instituto nacional de salud pública. 2003.
- [14] Secretaria de Salud. Programa de acción: Tuberculosis. SS. 2001.
- [15] LEAÑO SM, Anandí, et al. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria: European Society of Mycobacteriology 2004.
- [16] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 Jun 11;393(6685):537-44.
- [17] Gorocica P. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2005;18(2):142-53.
- [18] Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2003;83(1-3):91-7.
- [19] Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):463-96.
- [20] García-Sancho MCE. Respuesta Inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 2001;14(2):114-28.

- [21] Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon*. 1999 Sep;37(9):1241-58.
- [22] Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*. 1999 Feb 26;17(7-8):915-22.
- [23] Fine PE, Rodrigues LC. Modern vaccines. *Mycobacterial diseases*. *Lancet*. 1990 Apr 28;335(8696):1016-20.
- [24] Bourdin Trunz PF, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a metaanalysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006.
- [25] Doherty TM. Real world TB vaccines: clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine*. 2005 Mar 18;23(17-18):2109-14.
- [26] Castanon-Arreola M, Lopez-Vidal Y. A second-generation anti TB vaccine is long overdue. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004 Jun 3;3:10.
- [27] Castillo-Rodal AI, Castanon-Arreola M, Hernandez-Pando R, Calva JJ, Sada-Diaz E, Lopez-Vidal Y. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 2006 Mar;74(3):1718-24.
- [28] Skeiky YA, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Jun;4(6):469-76.
- [29] Orme IM. Current progress in tuberculosis vaccine development. *Vaccine*. 2005 Mar 18;23(17-18):2105-8.
- [30] Horwitz MA, Harth G. A new vaccine against tuberculosis affords greater survival after challenge than the current vaccine in the guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1672-9.
- [31] Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. A novel live recombinant mycobacterial vaccine against bovine tuberculosis more potent than BCG. *Vaccine*. 2006 Mar 6;24(10):1593-600.
- [32] Castanon-Arreola M, Lopez-Vidal Y, Espitia-Pinzon C, Hernandez-Pando R. A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005 Jan-Mar;85(1-2):115-26.
- [33] Grode L, Seiler P, Baumann S, Hess J, Brinkmann V, Nasser Eddine A, et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2472-9.
- [34] Wells AQ, Wylie JA. Vaccination against tuberculosis with the vole bacillus. *Br Med Bull*. 1954;10(2):96-100.
- [35] Cavanagh R, Begon M, Bennett M, Ergon T, Graham IM, De Haas PE, et al. *Mycobacterium microti* infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3281-5.
- [36] Hart PD, Sutherland I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J*. 1977 Jul 30;2(6082):293-5.
- [37] Frota CC, Hunt DM, Buxton RS, Rickman L, Hinds J, Kremer K, et al. Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology*. 2004 May;150(Pt 5):1519-27.
- [38] Dannenberg AM, Bishai WR, Parrish N, Ruiz R, Johnson W, Zook BC, et al. Efficacies of BCG and vole bacillus (*Mycobacterium microti*) vaccines in preventing

clinically apparent pulmonary tuberculosis in rabbits: a preliminary report. *Vaccine*. 2000 Nov 22;19(7-8):796-800.

[39] Manabe YC, Scott CP, Bishai WR. Naturally attenuated, orally administered *Mycobacterium microti* as a tuberculosis vaccine is better than subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1566-70.

[40] Larracilla-Camacho J. Evaluación del potencial de *Mycobacterium microti* como vacuna contra la tuberculosis [Experimental]. México: UNAM; 2006.

[41] Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Sep;53(Pt 5):1305-14.

[42] Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):301-8.

[43] Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 2;94(18):9869-74.

[44] Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7877-82.

[45] Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5596-601.

[46] Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3684-9.

[47] Brodin P, Eiglmeier K, Marmiesse M, Billault A, Garnier T, Niemann S, et al. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun*. 2002 Oct;70(10):5568-78.

[48] Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*. 1999 Sep;33(6):1103-17.

[49] Betts JC, Dodson P, Quan S, Lewis AP, Thomas PJ, Duncan K, et al. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology*. 2000 Dec;146 Pt 12:3205-16.

[50] Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, et al. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis*. 2003 Oct;24(19-20):3405-20.

[51] Castañón\_Arreola M. Estudio de la respuesta Th1 inducida por las proteínas ESAT-6 y 38-kDa de *M. tuberculosis* en la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guèrin) [Experimental]. México: UNAM; 2005.

[52] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

- [53] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem.* 1996 May 1;236(2):302-8.
- [54] Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA. Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. *Proteomics.* 2003 Oct;3(10):1912-9.
- [55] Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* 2002 Feb;43(3):717-31.
- [56] Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, Zimny-Arndt U, et al. Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis.* 2001 Aug;22(14):2936-46.
- [57] Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol.* 2003 Apr;48(1):77-84.
- [58] Rosenkrands I, Weldingh K, Jacobsen S, Hansen CV, Florio W, Gianetri I, et al. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis.* 2000 Mar;21(5):935-48.
- [59] Jungblut PR, Muller EC, Mattow J, Kaufmann SH. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5905-7.
- [60] Triccas JA, Gicquel B. Analysis of stress- and host cell-induced expression of the *Mycobacterium tuberculosis* inorganic pyrophosphatase. *BMC Microbiol.* 2001;1:3.
- [61] Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, Aagaard C, Barry CE, 3rd, Andersen P. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol.* 2002 Jul;184(13):3485-91.
- [62] Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, Laal S, Belisle JT. Disease state differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Nov;5(11):2102-13.
- [63] Hondalus MK, Bardarov S, Russell R, Chan J, Jacobs WR, Jr., Bloom BR. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):2888-98.
- [64] Alito A, McNair J, Girvin RM, Zumarraga M, Bigi F, Pollock JM, et al. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovine T-cell responses after infection with a virulent strain. *Braz J Med Biol Res.* 2003 Nov;36(11):1523-31.
- [65] Kitaura H, Kinomoto M, Yamada T. Ribosomal protein L7 included in tuberculin purified protein derivative (PPD) is a major heat-resistant protein inducing strong delayed-type hypersensitivity. *Scand J Immunol.* 1999 Dec;50(6):580-7.
- [66] Cole S, et al. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus.* Washington, D.C.: ASM Press 2005.

## 10. ANEXOS

### A. Método de Bradford (microensayo)

En una microplaca y a partir de un estándar de albúmina sérica bovina 1mg/mL, preparar una curva con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10  $\mu\text{g}$  de proteína. Agregar  $\text{H}_2\text{O}$  cbp 50  $\mu\text{L}$  y añadir 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford. Incubar 5min en oscuridad y leer a  $A_{\lambda 595\text{nm}}$  y  $A_{\lambda 450\text{nm}}$ . El complejo colorante-proteína es estable hasta por 60min. La cantidad de proteína contenida en la muestra por interpolación a partir de una gráfica.

### B. Solución Amortiguadora de Rehidratación

Urea 9M, CHAPS (3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato) 4% w/v, DTT 70mM, azul de bromofenol al 0.001%, anfolinas (Bio-Lyte pH 3-10, Bio-Rad) 0.1%.

Rehidratar el CHAPS, la urea y el azul de bromofenol con la muestra de proteína, agregar el DTT y  $\text{H}_2\text{O}$  cbp el volumen final deseado de la mezcla. Para tiras gradiente inmovilizado de pH (IPG) de 11cm, mezclar 180 $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de rehidratación con las anfolinas. Las tiras IPG se rehidratan de 10 a 16h a temperatura ambiente.

### C. Solución Amortiguadora de Equilibrio

Urea 6M, Glicerol 30% v/v, Tris pH8.8 50mM, SDS 2% w/v, Azul de bromofenol 0.002%. Las tiras IPG se equilibran 15min en solución amortiguadora de equilibrio con DTT (15 mg/mL) y posteriormente con IAA (37.5mg/mL).

### D. Solución de acrilamida/bis-acrilamida (T30% C3%)

Para 100mL disolver 29.1g de acrilamida y 0.9g de bis-acrilamida y llevar a volumen con  $\text{H}_2\text{O}$ . Desgasificar, filtrar con membrana de 0.45 $\mu\text{m}$  y almacenar protegido de la luz a 4°C.

### E. Solución de agarosa para sellar

Agarosa 0.5%w/v, Buffer de corrida 5X 10mL, Azul de bromofenol 0.002%w/v,  $\text{H}_2\text{O}$  40mL. Fundir la agarosa en el  $\text{H}_2\text{O}$  y almacenar en alícuotas de 5mL en tubos de vidrio con tapón de rosca.

## F. Tinción con plata

	Solución	Tiempo
1. Fijación	EtOH 40%, CH <sub>3</sub> COOH 5%	4h o toda la noche
2. Lavado	EtOH 5%	2x20min
3. Pre-tratamiento	H <sub>2</sub> O	3x5min
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.2g/L	2min
4. Lavado	H <sub>2</sub> O	3x20s
5. Impregnación	AgNO <sub>3</sub> 2g/L, formaldehído 37% 0.4 mL/L	25min
6. Lavado	H <sub>2</sub> O	2x20s
7. Revelado	NaCO <sub>3</sub> 30g/L, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O 4mg/L, formaldehído 37% 0.4mL/L	10min o según la aparición de los puntos
8. Lavado	H <sub>2</sub> O	2x2min
9. Paro	CH <sub>3</sub> COOH 10%	10min

Las soluciones de pre-tratamiento, impregnación y revelado deben prepararse al instante. No es recomendable rehusar más de tres veces las soluciones de fijación y paro. 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 10min.