



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO
DE PROTEÍNAS DE MICOBACTERIAS NO
TUBERCULOSAS DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:
JACQUELINE LARRACILLA CAMACHO

TUTORA: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL



MÉXICO, D. F.

2009



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDADES ACADÉMICAS FACULTAD DE QUÍMICA
E INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

Of. No. PMDCB/130/2009

QFB. JACQUELINE LARRACILLA CAMACHO
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 19 de enero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Identificación y análisis comparativo de proteínas de Micobacterias no tuberculosas de aislamientos clínicos", dirigida por la Dra. Yolanda López Vidal.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

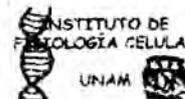
PRESIDENTE	Dra. Estela Sánchez Quintanar
VOCAL	Dr. Guillermo Mendoza Hernández
SECRETARIO	Dr. Enrique Ortega Soto
SUPLENTE	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
SUPLENTE	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de enero de 2009.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yolanda López Vidal, por esta gran oportunidad que me brindó para crecer académica y personalmente.

Al cDr. Mauricio Rodríguez Álvarez, por la asesoría en la técnica de 2D-PAGE y su orientación en el análisis *in silico*; por su paciencia, su tiempo y sus consejos.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, por su valiosísima colaboración con la identificación de proteínas por espectrometría de masas.

Al Dr. Francisco Quiñones Falconi, por proporcionar los aislamientos clínicos de MNT.

A los miembros del jurado: Dra. Estela Sánchez Quintanar; Dr. Guillermo Mendoza Hernández; Dr. Enrique Ortega Soto; Dra. Clara Inés Espitia Pinzón y Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por todos sus comentarios y sugerencias que fueron de vital importancia para enriquecer y mejorar este trabajo.

A la Sra. Leticia García Gutiérrez, quien siempre me apoyó en la realización de todos los trámites necesarios al principio, durante y al final de esta etapa académica, con mucha eficiencia y cordialidad.

La realización de los estudios de posgrado fue financiada por la beca escolar con número de registro 204896, concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. La conclusión de la tesis fue financiada por la Secretaría de Desarrollo Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el programa “Fomento a la Graduación de los Alumnos de Posgrado de la UNAM”.

El estudio fue parcialmente financiado por los proyectos: DGAPA-PAPIIT IN225506 y IN209708, y por el Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” dentro de la línea de investigación Tuberculosis (SDEI.PTID.05.4)

Lo que más se necesita para aprender es un espíritu humilde.

Sabiduría china

El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer hacer siempre lo que se hace.

L. Tolstoi

Aquel que luche con monstruos deberá cuidarse de no convertirse en uno durante el proceso.

F. Nietzsche

DEDICATORIAS

Para la Universidad Nacional Autónoma de México: ¡gracias por todo lo que he recibido, pero estoy más agradecida por permitirme servir a los demás!

Con mucho cariño para: papá, papá Alfonso, mamá Carmen, Charo, tío Martín.

Para mi mamá y mi hermana Claudia Irene: por compartir la vida conmigo, creer en mi capacidad, motivarme, quererme, aguantarme. Por mostrarme que una de las grandes cosas por hacer en esta vida es luchar incansablemente por lo que más se desea.

Para mis tíos Jesús, Paz, Concepción, Manuel, Agustín, Alfonso, Guadalupe y Jorge: por formar una parte esencial de mi superación personal y por contribuir con este logro tan importante.

Para mis amig@s de la Facultad, por supuesto Lupita, Gaby, Citlalli, Angie, Katy, Andy, Alex y Martín: por escucharme cada vez que necesité un poco de desahogo y por hacerme pasar excelentes momentos con ustedes. Por dejar ser su amiga también.

Para Ely y Xóchitl, Xóchitl y Ely: quienes me ayudaron a no rendirme nunca ante la zozobra y quienes siempre me acompañaron incondicionalmente durante esta difícil travesía. No tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

Para todos mis alumnos del curso de Proteómica: porque haber estado con ustedes fue todo un reto que pude superar.

Para todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana: Adriana, Carol, Iliana, Ivonne, Gustavo, Juan, MauRo, Neli, Paty, Tere, por darme todo lo mejor de ustedes; a Karina, Martha, Roxana y Hugo, por todo lo que me han dejado. A todos gracias por soportarme y formar parte del principio de esta etapa. Alex, Alicia, Erick, Gaby, Irma, Karen, Lulú, Lupita, Meli, Naty, Paco, Pili, Rodolfo, Sebastian, Xavier, por hacer ameno el final.

Maritoña, Mari y Gonza: por ofrecerme su amistad y estar al pendiente de mí. Por compartir conmigo tantas experiencias agradables y no abandonarme en las adversidades. Gracias también por sus enseñanzas.

Para el Sr. Ricardo: por escucharme y ayudarme en muchas ocasiones... ¡y por ser tan servicial en el laboratorio!

Para la Dra. Yolanda: ¡Mil gracias!

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
RESUMEN	viii
ABREVIATURAS	ix
ANTECEDENTES	1
El género <i>Mycobacterium</i>	2
Clasificación de las micobacterias	4
Micobacterias no tuberculosas	5
Hábitats	7
Importancia de las MNT	8
Importancia clínica	8
MNT y tuberculosis	11
Análisis proteómico para el estudio de <i>Mycobacterium</i>	16
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	23
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
METODOLOGÍA	25
Cepas de estudio	26
Aislamientos clínicos de MNT	26
Identificación de los aislamientos de MNT	26
Cultivo de las cepas de estudio	26
Cultivo primario	26
Cultivo secundario y cosecha	27
Cinéticas de crecimiento	27
Cultivos de trabajo	27
Cuantificación de las micobacterias	28
Obtención de proteínas	28
	vi

	Página
Proteínas de filtrado de cultivo	28
Proteínas de extracto celular	28
Cuantificación de proteínas	29
Electroforesis de doble dimensión (2-DE)	29
Primera dimensión: isoelectroenfoque	29
Segunda dimensión: SDS-PAGE	29
Revelado de los geles y obtención de la imagen en formato digital	30
Análisis de los geles bidimensionales	30
Identificación de proteínas	31
RESULTADOS	34
Cinéticas de crecimiento	35
Electroforesis de doble dimensión	38
Identificación de proteínas	41
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	61
REFERENCIAS	63
ANEXOS	73
Anexo I. Cinética de crecimiento	74
Anexo II. Distribución de los puntos resueltos por 2-D PAGE	78
Anexo III. Datos de los genomas de las especies utilizadas en el presente trabajo	80

RESUMEN

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son aquellas especies que no pertenecen al complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que son distintas a *Mycobacterium leprae*. Tienen la capacidad de causar patologías a nivel pulmonar, cuyos síntomas y signos son indistinguibles de la tuberculosis. La prueba cutánea al derivado proteico purificado (que se basa en una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado) es de poco valor en el diagnóstico en virtud de que un resultado positivo a esta prueba podría deberse a una respuesta inmune inducida ya sea por MNT o por *M. tuberculosis*. Se han estudiado proteínas de *M. tuberculosis* para resolver las desventajas asociadas al uso de este reactivo. Sin embargo, se sabe poco sobre las proteínas de las MNT. El objetivo del presente trabajo fue identificar proteínas únicas de dos de las cepas de MNT aisladas con mayor frecuencia de enfermedad pulmonar, así como las comunes con *M. tuberculosis* H37Rv mediante la comparación de sus proteomas, de modo que fuera posible seleccionar proteínas con el potencial de ser utilizadas como biomarcadores de infección.

Las cepas de micobacterias de aislados clínicos de enfermedad pulmonar, *M. avium* y *M. abscessus*, se cultivaron hasta la fase logarítmica. El sobrenadante del cultivo y el paquete celular se procesaron para extraer las proteínas correspondientes. Éstas se separaron por electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y los perfiles resultantes se analizaron *in silico* para localizar proteínas únicas y comunes con *M. tuberculosis* H37Rv. Algunas se seleccionaron para su posterior identificación por espectrometría de masas.

M. avium, *M. abscessus* y *M. tuberculosis* H37Rv compartieron un 4.0% de proteínas de filtrado de cultivo y un 9.0% en el extracto celular. Se obtuvo un mayor número de ellas en los filtrados de cultivo que en los extractos celulares. Las proteínas que fueron identificadas correspondieron a las categorías funcionales de virulencia, desintoxicación y adaptación; metabolismo de lípidos; vías de señalización; procesos celulares y pared celular; metabolismo intermediario y respiración. Asimismo, se hallaron proteínas hipotéticas y de función desconocida. Estos resultados dan a conocer algunas proteínas que podrán ser consideradas a futuro en el diseño de biomarcadores de infección ya sea por MNT o por *M. tuberculosis*.

ABREVIATURAS, UNIDADES Y FÓRMULAS QUÍMICAS

ADC	Albúmina-dextrosa-catalasa
Ag85	Complejo antigénico 85
AraLAM	Lipoarabinomana con una molécula de fosfoinositol y arabinosa
BCG	Bacilo de Calmette y Guèrin
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Citosina
CFP-10	Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfato
DAP	Ácido L-alanil-D-isoglutaminil-meso-diaminopimélico-D-alanina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
ESAT-6	Antígeno blanco de secreción temprana de 6 kDa
G	Guanina
<i>hsp65</i>	Proteína de choque térmico de 65 kDa
IFN- γ	Interferón gamma
LAM	Lipoarabinomanana
LC-NSI-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a nanoelectrospray-espectrometría de masas en tándem.
mAGP	Complejo macromolecular ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglicano
ManLAM	Lipoarabinomanana manosilada
MNT	Micobacterias no tuberculosas
MOTT	Otras micobacterias además de <i>M. tuberculosis</i> (del inglés Mycobacteria other than tuberculosis)
MPT 32	Proteína de secreción rica en alanina y prolina; de unión a fibronectina
MPT 51	Complejo antigénico 85C
MS	Espectrometría de masas (del inglés “mass spectrometry”)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTB 48	Antígeno de 47.6 kDa
MTC28	Antígeno de 28-kDa de secreción, rico en prolina.
MM	Masa molecular

NAM	Ácido N-acetilmurámico
NCBI	Centro Nacional para la Información en Biotecnología (del inglés National Center for Biotechnology Information)
NSI	Nanoelectrospray
OADC	Ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa
PE_PGRS	Familia de proteínas ricas en glicina
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PILAM	Lipoarabinomana con una molécula de fosfoinositol y arabinosa
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PPD	Derivado proteico purificado
PPD-S	Estándar del derivado proteico purificado
PVC	Policloruro de vinilo
Q	Cuadrupolo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TB7.7	Antígeno Rv2654
TIGR	Instituto de Investigación Genómica (del inglés “The Institute for Genomic Research”)
UFC	Unidades formadoras de colonia
UT	Unidades de tuberculina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
2-D PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida de doble dimensión

Unidades

cm	Centímetro
g	Gramo
g	Gravedad
h	Hora
kDa	kilodalton
M	Molar
mA	Miliamperio

Mpb	Mega pares de bases
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
V	Volt
V/h	Volt/hora
W	Watt
° C	Grado Celsius
%	Por ciento
% m/v	Por ciento en masa/volumen
% v/v	Por ciento en volumen/volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro o micra

Fórmulas químicas

CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
N ₂	Nitrógeno molecular
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amonio
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
O ₂	Oxígeno molecular

ANTECEDENTES

El género *Mycobacterium*

En 1896, Lehmann y Neumann propusieron por vez primera el término *Mycobacterium* para clasificar al bacilo de la tuberculosis y al de la lepra (*M. tuberculosis* y *M. leprae*, respectivamente). El género *Mycobacterium* es el único que pertenece a la familia Mycobacteriaceae, al orden de los Actinomycetales y a la clase Actinomycetes. Las micobacterias están muy relacionadas con los géneros *Corynebacterium*, *Caseobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tuskamurella*, también del orden Actinomycetales [1,2,3].

Las micobacterias son bacterias aeróbicas, aunque algunas se desarrollan en condiciones de microaerofilia. Son bacilos ligeramente curvos o rectos (figura 1) que miden 0.2 – 0.6 x 1.0 – 10 μm aproximadamente. Son inmóviles y no esporuladas. Las especies patógenas de crecimiento lento presentan una estructura semejante a una cápsula. Sus colonias son blancas o productoras de pigmentos β -carotenoides; lisas o rugosas. Muestran un desarrollo ramificado y semejante a micelios con fragmentación en elementos bacilares y cocoides. Asimismo, poseen una composición de guanina más citosina (G + C) de 61-71 mol % (excepto *M. leprae*: 54- 57 mol %) [1,2,3,4].

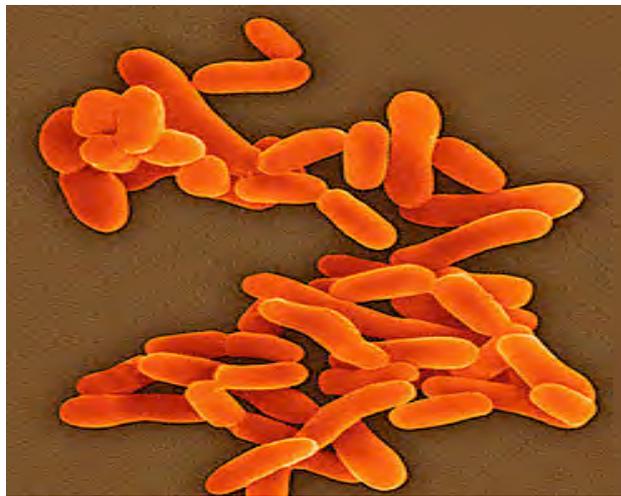


Figura 1. *Mycobacterium tuberculosis*. Micrografía de barrido electrónico (3000x). Dennis Kunkel Microscopy, 2004.

Las micobacterias se caracterizan por la complejidad de su pared celular. Ésta consta de una capa externa y una interna alrededor de la membrana plasmática [5,6,7]. La capa externa está conformada por lípidos y proteínas. Los lípidos, constituyentes del 60% de su peso seco, generalmente se encuentran asociados a la pared, con algunos ácidos grasos de cadena larga y corta. Los lípidos unidos a polisacáridos son la lipoarabinomanana (LAM), lipomanana, ftiocerol dimicocerosato, dimicolato de trehalosa (factor cordón), sulfolípidos y manósidos de fosfatidilinositol. En las especies patógenas de lento crecimiento, la LAM tiene un residuo de manosa en la porción terminal de arabinosa (ManLAM), mientras que las especies de rápido crecimiento carecen de ese residuo y en su lugar contienen una molécula de fosfoinositol y una arabinosa (AraLAM o PILAM). El componente principal de la capa interna es el complejo macromolecular de ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP). Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de 60 a 90 átomos de carbono, α -alquilados y β -hidroxilados. El peptidoglucano o mureína consiste en unidades repetidas de N-acetilglucosamina enlazadas al ácido N-acetilmurámico (NAM), aunque algunos de estos ácidos tienen un N-glicolil en vez del grupo acetilo. La cadena peptídica en este caso es el ácido L-alanil-D-iso-glutaminil-meso-diaminopimélico-D-alanina (DAP). El arabinogalactano es el principal polisacárido de la pared micobacteriana y está compuesto exclusivamente de un polímero de D-galactofuranosa y D-arabinofuranosa, ambos extremadamente raros en la naturaleza. El arabinogalactano es indispensable para preservar la estructura y para anclar los ácidos micólicos al peptidoglucano [5,6,7] (figura 2).

La pared celular le confiere a las micobacterias ciertas características, como el menor tamaño en relación a otras bacterias; la resistencia a la desecación como a la decoloración con alcohol-ácido; la baja permeabilidad a muchos compuestos químicos y fármacos. Asimismo, les proporciona el carácter hidrofóbico y las hace refractarias al ataque por hidrólisis enzimática. Finalmente, las moléculas como la lipoarabinomanana y el dimicolato de trehalosa (factor cordón) tienen un papel fundamental en la vida intracelular, en el establecimiento de la infección y en la patogénesis, al interactuar con los componentes de la respuesta inmune y promover la inhibición de sus funciones efectoras [3,4,6].

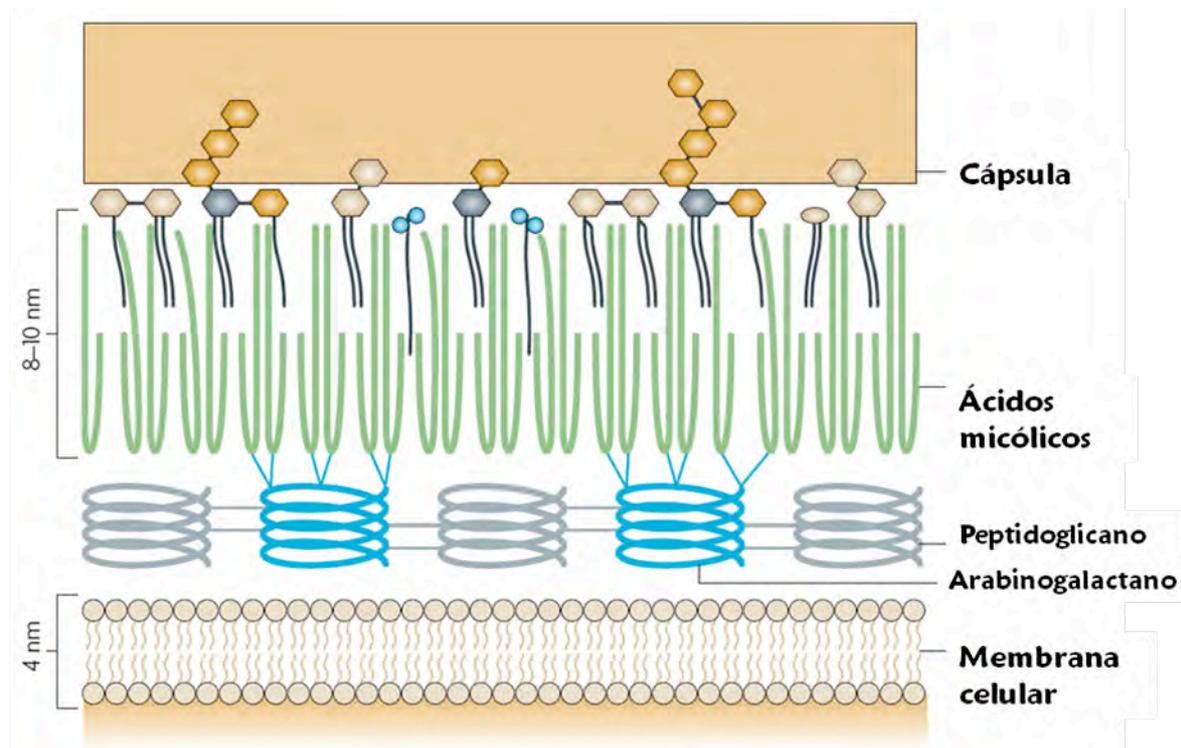


Figura 2. Estructura básica de la pared de micobacterias. La pared celular está compuesta principalmente de tres estructuras unidas covalentemente: peptidoglicano (espirales grises); arabinogalactano (espirales azules) y ácidos micólicos (líneas verdes). Hacia el exterior de la pared existen varios lípidos (glicolípidos, dimicocerosatos de ftiocerol, factor cordón, sulfolípidos, lipoarabinomanana y fosfatidilinositol manósidos) intercalados entre los ácidos micólicos. Estos lípidos son específicos para las micobacterias. La cápsula está constituida principalmente por polisacáridos como glucano y arabinomanana. Tomado de Nature Reviews Microbiology, 2007 [8].

Clasificación de las micobacterias

Los criterios mínimos aceptados para clasificar a las micobacterias son: a) la capacidad para resistir la decoloración con alcohol-ácido; b) la presencia de ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono y c) un contenido de guanina más citosina (G+C) de 61 a 71 mol %. Las características bioquímicas y fenotípicas han sido sumamente importantes en el estudio de las micobacterias; sin embargo, los métodos moleculares han impactado significativamente en su identificación y especiación durante los últimos años. Se reconocen actualmente más de 150 especies [2,9].

Dentro del género existen especies que son parásitos obligados, saprófitos y especies intermedias que pueden ser aisladas de muestras clínicas, agua, suelo, y otras fuentes

ambientales. En cuanto a criterios clínicos, las micobacterias se clasifican en tres grupos principales. El primero incluye a los patógenos estrictos para el hombre y los animales, como los miembros del complejo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y *M. lepraemurium*. En la segunda categoría se incluyen a las micobacterias potencialmente patógenas para el ser humano y los animales. La mayoría de ellas se encuentran en la naturaleza y ocasionan enfermedad bajo ciertas condiciones. Finalmente, el tercer grupo está conformado por especies saprófitas o no patógenas [2,4].

La clasificación basada en el riesgo que representan para causar infección en el hombre (Tabla 1), también empleada para las micobacterias, consiste en las siguientes categorías [2]:

Grupo I. Riesgo de infección bajo para el individuo y la comunidad. Las enfermedades ocasionadas descritas son raras o nulas [2].

Grupo II. Riesgo moderado para el individuo y la comunidad. Las especies involucradas se consideran patógenos potenciales u oportunistas [2].

Grupo III. Riesgo de transmisión por vía aérea; la enfermedad después de la infección es severa y a veces fatal. El riesgo para el individuo es alto pero moderado para la comunidad. Las especies generalmente se agrupan como patógenos estrictos [2].

Grupo IV. Riesgo alto de infección para el individuo y con frecuencia fatal; riesgo alto para la comunidad [2].

Micobacterias no tuberculosas

Las micobacterias saprófitas y potencialmente patógenas para el humano han sido referidas en la literatura como “micobacterias atípicas” (debido a que se creía eran cepas inusuales de *M. tuberculosis*), “micobacterias anónimas”, “micobacterias ambientales patógenas facultativas”, “micobacterias ambientales potencialmente patógenas” y “bacilos MOTT” (por las siglas en inglés Mycobacteria Other Than Tuberculosis). No obstante, el

término Micobacterias No Tuberculosas (MNT), acuñado por la Sociedad de Tórax Americana, es el aceptado actualmente y el más utilizado en la literatura [1,3,9,10,11].

Tabla 1. Clasificación de las micobacterias de acuerdo al riesgo de infección en humanos [2].

Grupo de riesgo I		Grupo de riesgo II	Grupo de riesgo III
<i>M. agri</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. achiense</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. brandei</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. genavense</i>	
<i>M. brumae</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. chitae</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. intracellulare</i>	
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. kansasii</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. confluentis</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. cookii</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. peregrinum</i>	
<i>M. diernhorefi</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. shimodei</i>	
<i>M. duvalii</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. fallax</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. gadium</i>	<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. tokaiense</i>		
<i>M. gilvum</i>	<i>M. triplex</i>		
<i>M. gordonae</i>	<i>M. triviale</i>		
<i>M. hassiacum</i>	<i>M. vaccae</i>		
<i>M. hiberniae</i>			
<i>M. hodleri</i>			
<i>M. interjectum</i>			
<i>M. komossense</i>			

La velocidad de crecimiento es un rasgo distintivo entre las especies de MNT. Las micobacterias de crecimiento lento requieren más de 7 días para producir colonias en medio sólido a partir de un inóculo líquido bajo condiciones ideales de cultivo. Las de rápido crecimiento, por definición, necesitan menos de 7 días cuando han sido subcultivadas en medio Löwenstein-Jensen. Sin embargo, los aislamientos clínicos necesitan en promedio 3 semanas para formar colonias visibles [1,2,3].

La mayoría de especies crecen en medios con sustratos simples. Hay otras que requieren suplementos como micobactina, hemina u otros compuestos de hierro. El desarrollo se favorece con CO₂ y ácidos grasos. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28 y 45° C. En comparación con otras bacterias, los tiempos de duplicación son de aproximadamente 20 h. La formación de pigmentos carotenoides es una propiedad observada con mayor frecuencia en especies saprófitas que en las potencialmente patógenas. En base a esta última y a la velocidad de crecimiento surgió la clasificación de Runyon a finales de la década de 1950, la cual divide a las MNT en cuatro grupos [2,3,12] (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de Runyon [12].

Grupo	Nombre	Características coloniales	Ejemplos
I	Fotocromógenos	Colonias visibles en un periodo de 2 a 4 semanas y producen pigmento en presencia de luz.	<i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. marium</i> y <i>M. szulgai</i> (a 25° C).
II	Escotrocromógenos	Colonias observables en un periodo de 2 a 4 semanas y forman pigmento tanto en presencia de luz como en ausencia de ella.	<i>M. gordonae</i> , <i>M. aurum</i> , <i>M. flavescens</i> y <i>M. scrofulaceum</i> .
III	No cromógenos	Colonias perceptibles en un lapso de 2 a 4 semanas. No producen pigmento ni bajo la luz ni en la oscuridad.	<i>M. avium</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. intracellulare</i> y <i>M. celatum</i> .
IV	De rápido crecimiento	Colonias visibles después de 3 a 5 días. Carecen de pigmentación	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>M. mucogenicum</i> .

Hábitats

A diferencia del complejo *M. tuberculosis* y de *M. leprae*, las MNT forman una parte integral del medio ambiente natural en los mantos acuíferos dulces y salados, en el suelo y en la vegetación decadente [1,10,11,13,14,15,16]. Tienen la capacidad de establecer simbiosis con amibas y protozoarios (v. gr. *Acanthamoeba* spp., *Dictyostelium*, *Tetrahymena*) [17]. Son

abundantes en los nichos ecológicos donde las condiciones climatológicas son adecuadas para su crecimiento, incluidos los ambientes creados por el hombre: sistemas de suministro de agua urbanos, canales de aguas negras, regaderas, albercas y acuarios [17,18].

Importancia de las MNT

Importancia clínica

A principios del siglo pasado hubo varios informes de nuevas especies de micobacterias potencialmente patógenas para el humano, basados en un número pequeño de casos. Fue durante los primeros años de la década de 1950 cuando se reconoció la capacidad de las MNT para ocasionar enfermedad en el hombre, tras la disminución de la incidencia de la tuberculosis debido a la introducción de la estreptomina en 1944. Las enfermedades descritas causadas por MNT fueron de tipo pulmonar, linfadenitis cervical y lesiones cutáneas. La patología a nivel pulmonar fue la más común, principalmente en individuos masculinos y en su sexta década de vida. La mayoría de los pacientes presentaban factores predisponentes como pneumoconiosis, bronquiectasis o silicosis; o bien la exposición al polvo y aerosoles era constante en sus ocupaciones, tales como la minería y la metalurgia. Las especies detectadas fueron *M. kansasii*, *M. avium* y *M. intracellulare*. Posteriormente, el panorama de las enfermedades debidas a MNT cambió radicalmente tras la emergencia de la epidemia del SIDA, al ser consideradas como la principal causa de infecciones oportunistas, sobre todo a nivel diseminado [10,14,15,16,19,20,21,22].

El diagnóstico de las enfermedades causadas por MNT se incrementó en Estados Unidos y en Europa debido al desarrollo de nuevas técnicas de aislamiento microbiológico y de la identificación por pruebas moleculares. En los países en vías de desarrollo, donde la tuberculosis es endémica, la información epidemiológica es poco conocida debido a la carencia del personal especializado para identificar a las especies involucradas. Además, la notificación de los casos nuevos no es obligatoria ante las autoridades de salud [23].

Del total de MNT conocidas, una tercera parte es responsable de originar patologías en el humano, tanto en individuos inmunosuprimidos como en inmunocompetentes. El curso de

la enfermedad y el desarrollo de la infección dependen de la especie de MNT, de la presencia de factores de riesgo y de la entidad clínica. Las MNT producen principalmente cuatro clases de patologías: enfermedad pulmonar, linfadenitis, enfermedad cutánea y en tejido blando y enfermedad diseminada [9,10,11,18,20,21,24].

a) Enfermedad pulmonar. Es la manifestación clínica más común causada por MNT. El complejo *M. avium* y *M. kansasii* son las principales especies identificadas. Los pacientes generalmente son adultos varones de 60 años o más, que cuentan con uno o más factores de riesgo como tabaquismo, bronquiectasis, fibrosis quística y un sistema inmunológico debilitado. En las mujeres, la enfermedad se presenta en no fumadoras, siendo *M. intracellulare* la principal especie asociada. *M. abscessus* ocasiona el 80% de enfermedad pulmonar debida a las MNT de rápido crecimiento y se le considera oportunista en la fibrosis quística pulmonar. Otras especies de importancia, cuya distribución geográfica es variable son: *M. fortuitum*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. asiaticum*, y *M. chelonae*. Una tercera presentación clínica es una reacción de hipersensibilidad tras la exposición a aerosoles, relacionada con *M. avium* [4,9,12,15,16,19,20,21,22,25,26,27,28].

b) Linfadenitis. La infección de los ganglios linfáticos submandibulares, submaxilares, cervicales o preauriculares en niños entre 1 a 5 años de edad es la presentación más común de linfadenitis causada por MNT. *M. scrofulaceum*, además de *M. avium* y *M. intracellulare*, es la especie a la que más se le atribuyen estos casos [1,9,10,16,20,21,26,28,29].

c) Enfermedad cutánea y en tejido blando. *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, y *M. chelonae* infectan piel y tejido subcutáneo. Éstas forman abscesos en la piel herida, así como lesiones en las vainas de los tendones y en las articulaciones. *Mycobacterium marinum* se encuentra constantemente en granulomas en codos, rodillas, pies y manos. *Mycobacterium ulcerans* ocasiona una patología conocida úlcera de Buruli, que es la tercer micobacteriosis en significancia. Se caracteriza por heridas necróticas en niños y adultos jóvenes que progresan hasta causar deformaciones severas [10,11,20,21,24,28].

d) Enfermedad diseminada. Esta modalidad se presenta en adultos con SIDA y en individuos susceptibles por la terapia con inmunosupresores posterior a transplantes de corazón y de

riñón, por el uso crónico de corticoesteroides y leucemia. *M. avium* se localiza a nivel sistémico y en las heces [11,20,28].

e) Otras patologías debidas a MNT. *M. avium* subespecie *paratuberculosis* es el agente etiológico de la enfermedad de Johne en rumiantes, cuyos síntomas son la enteritis crónica con diarrea persistente, disminución de la ingesta y pérdida de peso. Representa un problema serio para la ganadería. Existen algunos estudios, basados en técnicas moleculares como la hibridación *in situ* que proponen que *M. avium* subespecie *paratuberculosis* podría ocasionar la enfermedad de Crohn en el humano. No obstante, este dato aún requiere confirmarse [30,31].

En ausencia de alguna evidencia de transmisión de persona a persona, se formuló una hipótesis que indica que la vía de infección por MNT proviene de fuentes ambientales. Las enfermedades de tipo pulmonar se adquieren por la inhalación de aerosoles. La linfadenitis cervical es resultado de la ingestión de agua y suelo contaminados con MNT. Las lesiones en piel y tejido blando son consecuencia de la introducción de material extraño (astillas, arena, agujas no estériles, instrumentos quirúrgicos y cosméticos). En los pacientes con SIDA se piensa que la enfermedad de tipo diseminado es contraída posiblemente por vía respiratoria, por el tracto gastrointestinal o por ambos [11,16,17,18,28].

El agua se ha propuesto como el principal vehículo de transmisión, al aislarse las MNT de fuentes naturales, pero sobre todo, de los ambientes artificiales como los sistemas de distribución de agua. Las micobacterias sobreviven con trazas de materia orgánica y minerales presentes en el agua. Gracias a su compleja pared celular son resistentes al cloro y a la mayoría de los principales agentes descontaminantes (*M. avium* es 500 veces más resistente que *Escherichia coli*). Las micobacterias forman biopelículas en superficies como PVC, plástico, caucho, silicón, celulosa, cobre y vidrio. Las biopelículas juegan un papel importante como reservorio de MNT y como un mecanismo de protección ante los agentes antimicrobianos y a las condiciones adversas. Una prueba determinante del papel del agua como principal vehículo de transmisión de MNT está relacionada con los casos de micobacteriosis ocupacionales, sobre todo en las actividades que implican diversión y esparcimiento (limpiadores de albercas, acuarios, salvavidas), así como aquellas que están relacionadas con el procesamiento de metales como consecuencia de la exposición a los aerosoles generados en estas labores. Los

brotos intrahospitalarios se vinculan a la contaminación de abastecimientos de agua, ya que numerosas especies de MNT, sobre todo de crecimiento rápido, han causado enfermedad pulmonar, infecciones en articulaciones y abscesos cutáneos posteriores a cirugías, broncoscopía y diálisis [2,10,11,14,15,16,17,18,32].

MNT y tuberculosis

Actualmente la tuberculosis se define como una enfermedad infecto-contagiosa que se identifica por la presencia de lesiones semejantes a tubérculos y necrosis caseosa, siendo el pulmón el principal órgano afectado [4,33,34,35,36,37].

La Organización Mundial de la Salud declaró el estado de emergencia global contra la tuberculosis en 1993. Cada año surgen de 8 a 10 millones de casos nuevos y fallecen de 2 a 3 millones de personas (figura 3), de manera que es necesario redoblar los esfuerzos en materia de prevención, tratamiento y control de esta enfermedad [34,35,37,38,39,40,41].

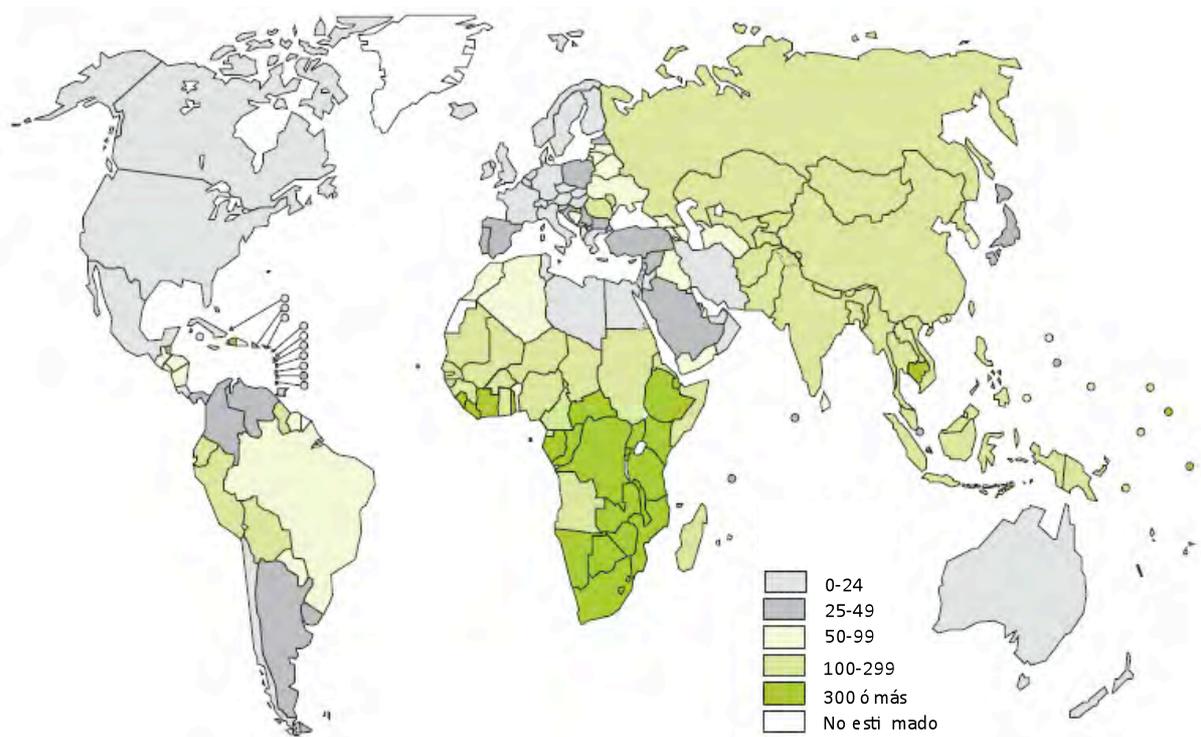


Figura 3. Distribución mundial de la tuberculosis. Casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes estimados para el año de 2005. Organización Mundial de la Salud, 2007 (www.who.int).

Hoy en día, la única medida preventiva contra la tuberculosis es la vacunación con el Bacilo de Calmette y Guérin (BCG), una cepa atenuada de *M. bovis*. No obstante, algunos de los ensayos clínicos realizados para evaluar su eficacia protectora han demostrado resultados contradictorios, con un intervalo en la eficacia protectora de la vacuna BCG que va desde 0 a 80 %, y de un 50% en promedio. Se han planteado diversas explicaciones para esta variabilidad. Una de ellas, sustentada experimentalmente en modelos animales y en pruebas con humanos, establece que la sensibilización previa con MNT interfiere en la eficacia protectora de la vacuna BCG [42,43].

Fenner fue el primero en examinar la posibilidad que las MNT pueden conferir protección contra la tuberculosis, al observar que los animales previamente sensibilizados con *M. avium* sobrevivían ante una infección con *M. tuberculosis*. La evidencia anterior se favoreció con otros trabajos en los que se obtuvieron resultados semejantes utilizando *M. avium*, *M. kansasii* y *M. intracellulare*. Sin embargo, Comstock y Palmer reportaron una baja protección de

la BCG en un ensayo llevado a cabo en Georgia y Alabama. El resultado del análisis estadístico realizado tanto en los grupos inmunizados como en los controles negativos a la tuberculina llevó a concluir que la vacunación en estos últimos no representaba una garantía de protección contra la tuberculosis, al menos en Estados Unidos. Los datos no concordaron con lo informado por otras investigaciones en las que la eficacia de la vacunación se reflejaba en una reducción de la tuberculosis. Para tratar de explicar estas diferencias, Palmer y Long sugirieron la existencia de interferencia en la vacunación con BCG y las infecciones por MNT. Después, Palmer y Edwards dieron a conocer un estudio en el que algunos individuos mostraron una respuesta cutánea a derivados proteicos obtenidos de MNT, interpretándose lo anterior como un indicativo de la presencia de infecciones por estas micobacterias. Los bajos niveles de eficacia de la BCG fueron observados en zonas donde la exposición a MNT era constante. Finalmente, estos autores presentaron pruebas en las que los cobayos infectados con MNT respondían menos a la vacunación que los controles normales [44].

Como consecuencia de lo anterior, se propusieron dos hipótesis que plantean la relación de las MNT con la vacunación con BCG. La hipótesis del “bloqueo” indica que la inmunidad previa conferida por las MNT restringe el desarrollo de la BCG. La hipótesis del “enmascaramiento”, por otro lado, establece que la BCG no proporciona ninguna inmunidad adicional a la que ya fue inducida por la exposición natural a las MNT. No obstante, los estudios para elucidar el verdadero papel de estas bacterias en la vacunación continúan llevándose a cabo. Algunos ya han demostrado que *M. avium* induce un efecto negativo en la vacunación con BCG [42,43,45,46].

Por otra parte, para identificar a los individuos infectados con *M. tuberculosis*, aunque no presenten los síntomas de la enfermedad (tuberculosis latente) se utiliza una prueba basada en la observación hecha por Robert Koch de que la infección produce una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado [47,48,49].

En 1890, Koch preparó un reactivo conocido como tuberculina a partir de cultivos de *M. tuberculosis* inactivados por calor, filtrados y evaporados hasta el 10% del volumen original. El propósito inicial de este producto fue el desarrollo de un tratamiento contra la tuberculosis. No obstante, éste mostró ser una herramienta diagnóstica útil en aquel entonces. En 1940 Florence Seibert obtuvo una sustancia conocida como derivado proteico purificado (PPD), por

calor y filtración de cultivos de *M. tuberculosis*, concentrándolos por precipitación con ácido tricloroacético o sulfato de amonio neutro. Este lote es el estándar internacional. Todos los PPD deben demostrar una potencia similar. La unidad estándar de 5 unidades de tuberculina (UT) se definen como la respuesta de hipersensibilidad retardada de 10 mm contenida en una dosis de 0.1 mg/0.1 mL de PPD-S. El reactivo se administra a una dosis de 0.1 mL de 5 UT PPD por vía intradérmica en el antebrazo. El resultado se lee midiendo el diámetro de la induración producida entre 48 y 72 h después de la administración del reactivo (figura 4). La interpretación se lleva a cabo en función de los siguientes criterios, establecidos por la Sociedad de Tórax Americana [36,37,47,48,50,51,52](tabla 3).

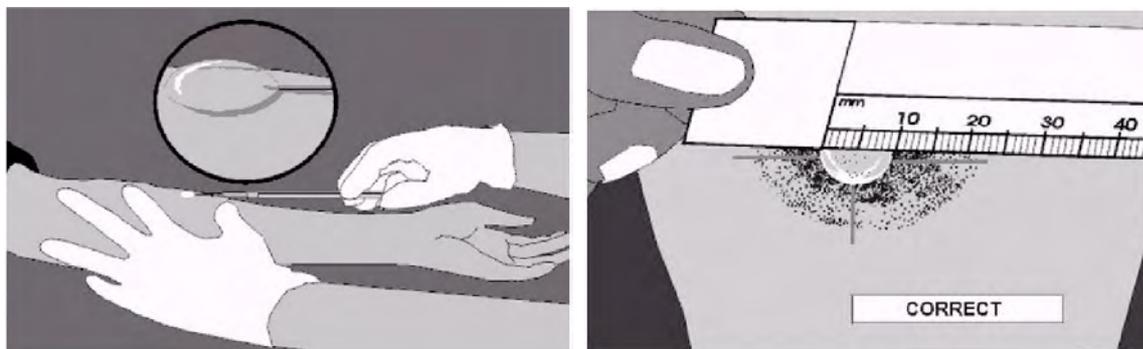


Figura 4. Reacción cutánea al PPD. La prueba se realiza administrando 0.1 mL de PPD en la zona dorsal del antebrazo, utilizando una jeringa de 3/8 de pulgada y de calibre 26-27. La lectura se realiza tras 48 h de la aplicación del PPD midiendo el diámetro de la induración resultante. Clinical Medicine & Research [48].

Tabla 3. Características clínicas de los individuos que deben recibir tratamiento para la tuberculosis latente en función del diámetro de induración de la reacción cutánea al PPD [48].

Diámetro de la induración	Características clínicas
5 mm	<p>Infección con VIH.</p> <p>Contacto reciente con una persona con tuberculosis activa.</p> <p>Cambios en la radiografía de tórax, consistentes con tuberculosis.</p> <p>Receptores de transplantes de órganos y otras condiciones que requieran el equivalente a 15 mg/día de prednisona durante 1 mes.</p>
10 mm	<p>Individuos nacidos en países con alta prevalencia de tuberculosis.</p> <p>Alcoholismo y uso de drogas por vía intravenosa.</p> <p>Residencia en prisiones y campamentos de refugiados.</p> <p>Personal de laboratorio que procesa muestras con micobacterias.</p> <p>Personal de salud conviviente con pacientes tuberculosos.</p>
15 mm	No existen factores de riesgo conocidos para tuberculosis.

El PPD es una mezcla compleja, constituida por aproximadamente 200 antígenos: proteínas de masas moleculares pequeñas, algunos polisacáridos y lípidos. La gran mayoría de estas moléculas son comunes en las micobacterias e incluso entre las bacterias del orden de los Actinomycetales, de modo que existe reactividad cruzada, siendo difícil discriminar si la respuesta observada ha sido inducida por *M. tuberculosis* o MNT [49,52,53,54,55]. En el grupo de Weir se evaluó la respuesta del IFN- γ al término de la estimulación de células de sangre periférica con PPD de diferentes especies de micobacterias en niños del Reino Unido y adultos de Malawi, poblaciones de baja y alta incidencia de tuberculosis, respectivamente. En ambas se encontró que la mayoría de individuos respondieron a dicho estímulo, en mayor medida la población de Malawi. En otra investigación efectuada por este mismo grupo examinaron la respuesta de IFN- γ inducida por PPD de nueve especies de micobacterias. De manera interesante, el PPD de *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum* presentaron la mayor respuesta en comparación con las demás, siendo sobre todo especies filogenéticamente más relacionadas a *M. tuberculosis* [56,57,58].

Los ensayos basados en el IFN- γ (IGRA, interferon gamma release assays) fueron desarrollados para reemplazar la prueba cutánea al PPD, dada la baja especificidad de éste.

Estas pruebas se fundamentan en que la infección con *M. tuberculosis* estimula una respuesta mediada por linfocitos Th1. Por lo tanto, este tipo de ensayos miden el IFN- γ liberado por los linfocitos T de memoria. Las primeras versiones utilizaron PPD como antígeno. Ahora, existen alternativas más específicas, como son el antígeno blanco de secreción temprana de 6 kDa (ESAT-6; early secretory antigen target), la proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa (CFP-10; de culture filtrate protein) y TB7.7 (antígeno Rv2654). Las versiones comerciales son el T-SPOT TB (Oxford Immunotec, Oxford UK) y el QUANTIFERON-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia). Sin embargo, algunas especies de MNT como *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai* expresan las proteínas ESAT-6 y CFP-10, restando especificidad a la prueba [36,37,49,50,51,52].

Análisis proteómico para el estudio de *Mycobacterium*

Dado el panorama anterior y la necesidad de desarrollar nuevos reactivos de diagnóstico, el estudio de proteínas del género *Mycobacterium* ha sido una de las principales vías para la búsqueda de proteínas específicas de *M. tuberculosis*, para la construcción de vacunas de subunidades y BCG recombinantes [59,60,61,62,63].

La proteómica o estudio del proteoma se define como el estudio de las proteínas en una célula u organismo determinado, en un ambiente fijo y en una etapa específica de su ciclo celular, incluyendo su abundancia relativa, distribución, modificaciones post-traduccionales, así como funciones e interacciones con otras macromoléculas. En las últimas décadas, la proteómica ha avanzado significativamente en las técnicas de separación de proteínas: la electroforesis de doble dimensión (2-D PAGE) y la cromatografía líquida; así como también en la espectrometría de masas y la bioinformática. La electroforesis de 2-D PAGE ha demostrado ser un método eficiente para la separación de las proteínas basado en su punto isoelectrónico (pI) y masa molecular (MM) con la capacidad de resolver hasta 10,000 proteínas en un mismo gel, de detectarlas en concentraciones inferiores a 1 ng y de evaluar sus modificaciones post-traduccionales [64,65].

El genoma de *M. tuberculosis* (aproximadamente 4.4 Mbp) completado en 1998 por Cole ha facilitado los análisis proteómicos de este patógeno [33,66]. Durante varios años, las

proteínas se han estudiado con la finalidad de identificar nuevos candidatos a vacunas, factores de virulencia y proteínas específicas útiles en el diagnóstico [35,41,61]. Uno de los primeros estudios de caracterización y comparación de antígenos de *Mycobacterium* por 2D-PAGE fue reportado por Wright et al. [67]. El primer mapa de 2D-PAGE de filtrado de cultivo fue reportado por Nagai et al., en el que se identificaron 12 proteínas por el análisis de secuencia N-terminal [41,68]. El grupo de Jungblut ha publicado comparaciones de las proteínas obtenidas de sobrenadante y de células de *M. tuberculosis* (cepas H37Rv y Erdman) y de BCG (subcepas Chicago y Copenhagen), encontrando diferencias substanciales que podrían explicar la variabilidad en la eficacia de la vacuna [39,40,65,69,70]. Más adelante, surgieron otras investigaciones con distintos propósitos, en las que se consideran las diferencias entre aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* contra la cepa tipo H37Rv, así como también la evaluación de la expresión de proteínas como resultado de la fagocitosis [61,71,72].

En los estudios proteómicos reportados se han dado a conocer las proteínas del extracto celular y las secretadas al medio de cultivo. Estas últimas se conocen también como proteínas de filtrado de cultivo (PFC) debido a que los concentrados de cultivos de *M. tuberculosis* se utilizaron para producir la tuberculina por vez primera. Durante los años 70s y 80s inició la búsqueda y caracterización de este tipo de proteínas, sobre todo en pruebas de inmunización con animales. Los animales vacunados con las PFC fueron más resistentes a un reto con *M. tuberculosis* que aquellos inmunizados con micobacterias muertas, concluyéndose que estas proteínas son reconocidas durante la infección con *M. tuberculosis*. En 1991 Andersen y colaboradores demostraron que existía una fuerte correlación entre la replicación bacteriana en el hospedero y la reactividad de células T hacia las proteínas de secreción. Se ha propuesto que éstas son una evidencia de la etapa en la que las micobacterias se encuentran más activas en comparación con otras etapas de su desarrollo y es precisamente en este punto donde existe una interacción importante con el sistema inmune. Como consecuencia, es preciso incluir este conjunto de proteínas en cualquier estudio [38,53,59,62,68,73,74,75,76].

Una de las aplicaciones de los estudios proteómicos, como se mencionó anteriormente, es la posibilidad de diseñar con un diagnóstico temprano de tuberculosis a través de biomarcadores proteicos. Algunas de estas alternativas se investigan por diversos grupos de investigación internacional. El primer intento por desarrollar una prueba serológica fue

realizado por Arloing en 1898, con una prueba de aglutinación sin éxito. Posteriormente, se dieron avances importantes con la identificación y purificación de antígenos, tales como: el antígeno de 38-kDa, Mtb81 (malato sintasa), MTB 48, α -cristalina (14-kDa), ESAT6, CFP-10, MTC28, tiol peroxidasa, MPT 51, MPT 32, Ag85A y Ag85B, el complejo antigénico 45/47-kDa, el antígeno de 16-kDa y las proteínas ricas en glicina PE_PGERS [59,60,61,62]. Por otro lado, con respecto a las MNT, otros equipos de investigación aplican este tipo de estrategias en la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad de Johne en el ganado, mediante el análisis de las proteínas de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* [77,78]. Para otras especies, solamente se han examinado los perfiles proteicos por SDS-PAGE [53].

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se acepta que varias especies del género *Mycobacterium* son responsables de causar enfermedad en el ser humano y la diferenciación entre una infección por *M. tuberculosis* y por MNT es compleja, por lo que la identificación de proteínas únicas en estas especies será de gran utilidad para el diseño de reactivos específicos para su diferenciación.

HIPÓTESIS

Se encontrarán proteínas únicas en los aislamientos clínicos de MNT, las cuales tendrán potencial como biomarcadores para diferenciar la infección pulmonar por MNT de la de *M. tuberculosis*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar proteínas únicas de MNT de aislamientos clínicos y compartidas con las de *M. tuberculosis* H37Rv.

Objetivos particulares

- Obtener los proteomas del filtrado de cultivo y del extracto celular de las dos especies de MNT aisladas con mayor frecuencia de pacientes con enfermedad pulmonar.
- Comparar *in silico* los patrones electroforéticos de las MNT con el de *M. tuberculosis* H37Rv.
- Identificar por espectrometría de masas las proteínas únicas de las MNT y las comunes con *M. tuberculosis* H37Rv.

METODOLOGÍA

Cepas de estudio

Aislamientos clínicos de MNT

Se utilizaron dos de las cepas de MNT aisladas con más frecuencia de pacientes con enfermedad pulmonar: *M. avium* y *M. abscessus*. La búsqueda y acopio de los casos clínicos asociados a estas especies fue llevado a cabo por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias en colaboración con la Escuela Nacional de Enfermería y Obstetricia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la selección de los aislamientos, se recibió una primera base de datos del periodo 2000-2004 con 241 casos con estudio positivo a MNT, la cual fue depurada en primera instancia tomando como referencia de exclusión pacientes con diagnóstico de VIH. De éstos quedó un total de 87 casos, es decir, un 36% de los mismos. Una nueva revisión de los expedientes se realizó para verificar diagnóstico, estudios posteriores y tratamiento. Finalmente, la muestra elegida fue de 45 casos.

Identificación de los aislamientos de MNT

Para confirmar la identidad de los aislamientos clínicos de trabajo, se realizó el análisis del polimorfismo del gen que codifica para la proteína de choque térmico *hsp65* descrito por Telenti et al. (J. Clin. Microbiol. 1993 31:175-178; <http://app.chuv.ch.prasite>).

Cultivo de las cepas de estudio

Cultivo primario

Una alícuota de 100 µL de cada uno de los aislamientos se sembró en 50 mL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO Laboratories, Detroit MI USA) suplementado con ADC (albúmina-dextrosa-catalasa; Becton Dickinson, Ireland). La incubación se llevó a cabo bajo agitación a 150 rpm y a una temperatura 37° C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6.

Cultivo secundario y cosecha

Una alícuota de 500 μL del cultivo primario (cuya $\text{DO}_{600\text{nm}}$ fue 0.6) se sembró en 250 mL de medio Sauton bajo las condiciones de agitación y temperatura anteriores. La densidad óptica se midió cada 24 h hasta alcanzar nuevamente una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.6. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g, a 4° C durante 15 min. El paquete celular se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2, 0.01 M) y se resuspendió en la misma solución, adicionada con glicerol a una concentración final del 10%. Finalmente, la suspensión bacteriana resultante se almacenó en alícuotas de 1 mL a -70° C hasta su uso.

Cinéticas de crecimiento

A cada MNT se le determinó su velocidad de desarrollo mediante las cinéticas de crecimiento correspondientes. Se trabajó con las alícuotas almacenadas a -70° C.

Para la cinética correspondiente a *M. avium* se empleó un inóculo de 75 μL ; para la de *M. abscessus*, de 25 μL . Dichos volúmenes se inocularon por duplicado en 250 mL de medio Sauton y se incubaron de acuerdo a los parámetros de cultivo mencionados. Las lecturas de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ se registraron cada 24 h. Con los datos de las lecturas se construyó una gráfica de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ como función del tiempo para localizar la fase logarítmica. Para verificar que el comportamiento de la cinética fuese reproducible, se hizo la réplica correspondiente.

Cultivos de trabajo

Se prepararon cultivos en medio Sauton de la misma forma en la que se obtuvieron las cinéticas. Una vez que los cultivos llegaron a fase logarítmica y a una $\text{DO}_{600\text{nm}} > 1$, se cosecharon por centrifugación a 5000 x g, a 4° C durante 15 min. El sobrenadante y el paquete celular se procesaron de manera independiente para obtener las proteínas correspondientes.

Cuantificación de las micobacterias

Las micobacterias se cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} en medio Middlebrook 7H10 (DIFCO Laboratories, Detroit MI, USA) suplementado con OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa; Becton Dickinson, Ireland). Las placas se incubaron invertidas a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. La cuenta bacteriana se realizó al día 3 para *M. abscessus* y al día 17 para *M. avium*.

Obtención de proteínas

Proteínas de filtrado de cultivo

Al sobrenadante de los cultivos se le adicionó PMSF, EDTA disódico y azida de sodio a concentraciones finales de 1 mM, 100 µM y 0.05% m/v respectivamente. Este sobrenadante se filtró por membrana de 0.45 µm y de 0.22 µm en condiciones de esterilidad. A continuación, se redujo el volumen hasta 1.5 mL mediante ultrafiltración con el sistema AMICON™: primero se utilizó una celda con agitación constante y una membrana de punto de corte de 3 kDa (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Después se centrifugó en una unidad de filtración con membrana de 5 kDa (Millipore Corporation, County Cork, Ireland), a 5000 x g a 4° C. Finalmente, el volumen disponible se centrifugó al vacío hasta 750 µL.

Proteínas de extracto celular

El paquete bacteriano se resuspendió con agua desionizada estéril, se lavó por centrifugación a 5000 x g, 15 min a 4° C y se ajustó a una concentración de 100 mg de bacterias/mL. Para la preparación del extracto, se tomaron 3 mL de la suspensión obtenida y las células se lisaron con ultrasonido (Ultrasonic Processor, Cole Parmer Corporation, Vernon Hills, Illinois, USA). Los pulsos se administraron en intervalos de un minuto, manteniendo la muestra en hielo y agregando inhibidores de proteasas (PMSF y EDTA disódico a concentraciones finales de 20 mM y 1 mM respectivamente). Para *M. abscessus*, se aplicaron 15 pulsos, mientras que para *M. avium*, 18 pulsos. Al término, las muestras se centrifugaron por 20 min a 14000 rpm, a 4° C, recuperando el sobrenadante. Éste se almacenó en alícuotas a -70° C hasta su uso. Previamente a los

ensayos de electroforesis bidimensionales, se descongelaron las alícuotas en hielo y las proteínas se precipitaron utilizando el método del ácido tricloroacético/acetona.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford utilizando BSA como estándar [79] y se visualizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12.0%.

Electroforesis de doble dimensión (2-DE)

Primera dimensión: isoelectroenfoque

Las muestras se solubilizaron en 180 μ L de una solución constituida por urea 9 M, CHAPS 4%, DTT 100 mM, anfolinas (Bio-Lyte pH 3-10; Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) 0.1% y azul de Bromofenol 0.001%. La cantidad de proteína fue de 80 μ g. La mezcla resultante se utilizó para rehidratar tiras de gradiente de pH inmóvil (ReadyStrip™, IPG strips. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), de intervalo 4-7 y 11 cm de longitud, por aproximadamente 16 h. Finalizado el tiempo de rehidratación, se procedió al isoelectroenfoque hasta completar 52,000 V/h (Multiphor II Electrophoresis Unit (flatbed system); Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) en tres etapas: i) a 500 V, 1 mA, 5W a 1 V/h; ii) el voltaje se incrementó hasta 2500 V, 1 mA, 5 W y iii) a 2500 V, 1 mA, 5W para 49,500 V/h.

Segunda dimensión: SDS-PAGE

Con el propósito de promover la transferencia de las proteínas a la segunda dimensión, al concluir el isoelectroenfoque las tiras se introdujeron en un tubo con solución de equilibrio (Urea, 6M; glicerol, 30% v/v; Tris pH 8.8, 50 mM; SDS, 2% w/v; azul de bromofenol, 0.002%) en presencia de DTT 70 mM, incubando durante 15 min. A continuación, las tiras se colocaron en solución de equilibrio y Iodoacetamida 193 mM durante 15 min. Enseguida, se depositaron sobre geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12.0 % (16 cm x 18 cm x 1mm) con 5 μ L de marcador de masa molecular (Precision Plus Protein™ Standars Dual Color; 250-10 kDa. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). La electroforesis (Tris-Glicina) se desarrolló en una

cámara vertical Hoefer SE 600 (Pharmacia Biotech, USA) a 50 V 30 min; 100 V 2 h y 150 V.

Revelado de los geles y obtención de imagen en formato digital

Al finalizar la electroforesis, los geles se colocaron en una solución compuesta por etanol al 40% y ácido acético al 10% en agua a 4° C durante toda la noche. A continuación se lavaron y se realizó un pretratamiento con tiosulfato de sodio pentahidratado (0.2 g/L) durante 1 min; se impregnaron con una solución de nitrato de plata (2g/L) y 0.75 mL de formaldehído al 37% durante 20 min en agitación constante y oscuridad; se revelaron con carbonato de sodio (60 g/L), tiosulfato de sodio (4 mg/L) y formaldehído al 37% (0.5 mL/L) hasta visualizar los puntos de las proteínas separadas (aproximadamente 10 min) y al final la reacción se detuvo con una solución de ácido acético al 1%. La imagen se capturó en formato digital con un densitómetro (Molecular Imager GS-800™ Calibrated Densitometer. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) con ayuda del programa Quantity One™ 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) a una resolución de 63.5 μm x 63.5 μm.

Análisis de los geles bidimensionales

El análisis de los geles se hizo con el programa PDQuest (PDQuest™ 2-D Analysis Software Version 8.0. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Como criterio de reproducibilidad entre ensayos se comparó el número total de píxeles. Cada imagen y su réplica fueron utilizadas para construir un gel maestro (imagen sintética), el que se incluyeron todos los puntos presentes en experimentos independientes. Los geles maestros obtenidos de cada cepa fueron comparados entre sí para buscar puntos comunes y puntos únicos de cada una, con apoyo de las herramientas del programa (experimento de alto nivel) (figura 5). Las imágenes de los geles correspondientes a las MNT de aislamientos clínicos se confrontaron con las de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv -elaboradas previamente en el grupo. Cabe mencionar que a lo largo de todo el análisis se realizó una inspección con ayuda de los geles originales.

De los resultados del análisis anterior, se seleccionaron algunos puntos para su identificación.

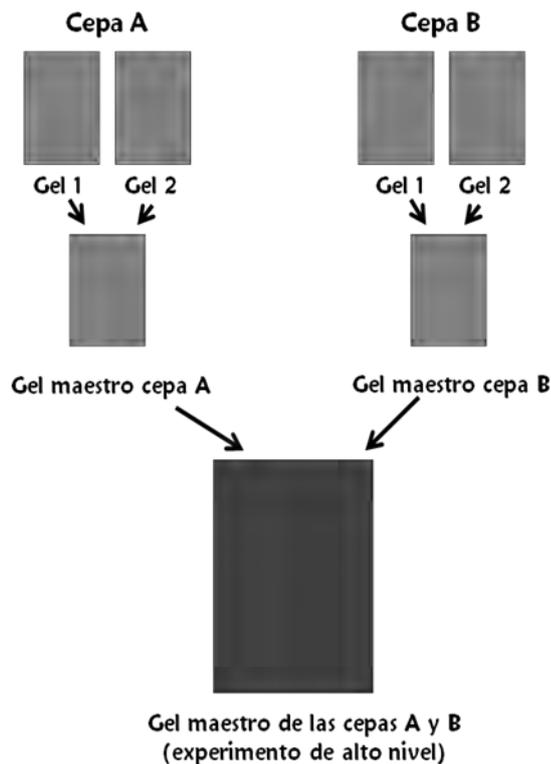


Figura 5. Esquema simplificado de la construcción de los gels maestros. De cada cultivo y su duplicado se obtienen los gels 1 y 2. El gel maestro (imagen sintética) incluye todos los puntos resueltos en los gels 1 y 2. Los gels maestros de cada cepa se analizan para elaborar otro gel maestro (experimento de alto nivel). En esta escala de análisis es donde se localizan puntos compartidos y únicos de las especies estudiadas.

Identificación de proteínas

Para identificar las proteínas de interés, se realizaron gels bidimensionales preparativos de las proteínas de MNT como se describió en las secciones 5.4.1 y 5.4.2. Cabe señalar que se utilizó el gel de filtrado de cultivo de *M. avium* para la identificación de proteínas compartidas entre las tres cepas. Para las proteínas de extracto celular se dispuso del gel de *M. abscessus*. La cantidad de proteína utilizada fue de 150 μg . Éstos se revelaron con la tinción de azul de Coomassie coloidal descrita por Candiano *et al.* ("Silver Blue") [80].

Los puntos de interés se cortaron manualmente del gel en fragmentos de 0.5-1 mm^3 y se colocaron en tubos de microfuga de 1.5 mL. El colorante y el SDS residual se removieron mediante dos lavados de 12 y 4 h, respectivamente, con una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 5% (v/v).

Los fragmentos se deshidrataron con acetonitrilo 100% y se secaron completamente por centrifugación con vacío. Las proteínas se redujeron mediante la hidratación de los fragmentos de gel con una solución DTT 10 mM en bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 100 mM pH 8.0. Los geles se incubaron en esta solución a 56° C durante 1 h. Posteriormente, se retiró la solución de DTT y se añadió una solución de iodoacetamida 100 mM en el mismo amortiguador incubando durante 45 minutos en obscuridad a temperatura ambiente.

A continuación, la solución de iodoacetamida se retiró y los fragmentos del gel se deshidrataron con acetonitrilo 100% y se rehidrataron con NH_4HCO_3 100 mM incubando 10 min a temperatura ambiente. Los fragmentos del gel se deshidrataron nuevamente con acetonitrilo y se secaron por centrifugación con vacío.

La digestión de las proteínas se realizó mediante la rehidratación de los fragmentos en una solución de tripsina modificada grado secuenciación en NH_4HCO_3 50 mM para obtener una concentración final de tripsina de 20 ng/ μL . La rehidratación se llevó a cabo en hielo durante 45 min con agitación ocasional. Los fragmentos del gel se concentraron en el fondo del tubo mediante su centrifugación durante 60 s descartando el exceso de la solución de tripsina y se añadieron 10 mL de amortiguador para su incubación a 37° C durante 12-16 h.

Los péptidos obtenidos a partir de la digestión se extrajeron colectando los sobrenadantes de una incubación con NH_4HCO_3 20 mM y de tres incubaciones de 30 min cada una con sonicación y agitación en la solución de extracción de acetonitrilo 50% (v/v) y ácido fórmico 5% (v/v). El volumen del extracto se redujo a un volumen menor a 20 μL por evaporación centrifugando con vacío a temperatura ambiente. Las sales que pudieron interferir con la ionización por electrospray (ESI) se eliminaron y los extractos se concentraron empleando puntas de pipeta con medio de cromatografía en fase reversa C_{18} (Zip Tip) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Millipore, Bedford, MA, USA).

A continuación, un volumen de 8 μL de cada muestra fue introducida a una columna Zorbax C18 (75 μm de diámetro x 15 cm de largo) y los péptidos se separaron

con un gradiente de elución de 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico, 60% de acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico a una velocidad de flujo de 0.25 μ L y una duración de 60 min.

El análisis de la secuencia de los péptidos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa de iones lineal (3200 Q TRAP, Applied Biosystems) acoplado en línea a un automuestreador (Agilent 1100 Series) con un sistema de cromatografía líquida de alta precisión (LC). En este sistema, se adquirió un espectro de resolución incrementada (EMS) para determinar la intensidad y relación m/z de los péptidos eluidos. Los péptidos que mostraron una mayor intensidad se sometieron a un análisis de espectro de resolución incrementado para la determinación de su carga. Los péptidos con cargas entre +2 y +4 seleccionados se fragmentaron con voltaje y colisión con N₂. La energía de colisión fue seleccionada de acuerdo con la masa y carga de cada péptido.

Los iones producto fueron concentrado y su masa analizada en Q₃

Las proteínas fueron identificadas a partir de los espectros MS/MS empleando la base de datos Mascot (<http://www.matrixscience.com>), restringiéndose la búsqueda al complejo *M. tuberculosis*.

En todos los casos, los espectros obtenidos fueron verificados manualmente.

RESULTADOS

Cinéticas de crecimiento

La fase logarítmica de las MNT se determinó en las gráficas obtenidas de sus cinéticas de crecimiento. Ambas micobacterias exhibieron etapas descritas para los microorganismos en condiciones de cultivo *in vitro* (figura 6). En la fase lag o inicial, como consecuencia de la introducción de las bacterias en un medio líquido nuevo, la división celular no puede comenzar inmediatamente porque las células se están adaptando al nuevo ambiente. Por ejemplo, se encuentran preparando enzimas para utilizar los nutrientes ahora disponibles. Una vez que las bacterias se han ambientado al nuevo medio, las células comienzan su crecimiento y duplicación a una tasa que es máxima para la especie en las condiciones existentes. Durante esta etapa, llamada fase exponencial o logarítmica, el número de células se divide a una velocidad constante. El crecimiento de los microorganismos se puede medir cuantificando el número de células; determinando el incremento del peso seco de la biomasa en un intervalo de tiempo dado; analizando la captación de un sustrato en particular; midiendo la cantidad de una sustancia radiactiva incorporada y por aumento en la densidad óptica. Posteriormente, las células detienen su crecimiento e ingresan a la fase estacionaria por varias razones. Entre éstas se encuentran la baja disponibilidad de nutrientes, poco oxígeno en el medio y acumulación de metabolitos nocivos (alcoholes, ácidos, bases, radicales libres). Finalmente, al ya no haber sustratos proporcionados por los nutrientes, las células no pueden producir energía y mueren. Incluso son blancos fáciles de enzimas autolíticas. Algunas bacterias mueren pocas horas después de haber ingresado a esta fase; sin embargo, otras pueden mantenerse viables por algún tiempo [81,82].

Los datos de DO_{600nm} se graficaron en una función logarítmica dependiente del tiempo. Para localizar la fase exponencial, se tomaron aquellos puntos en los que hubiese incrementos de la densidad óptica (como indicativo del crecimiento de las micobacterias, en este caso) y la pendiente se mantuviese prácticamente sin cambio (asumiendo lo expuesto anteriormente, la pendiente representa la velocidad de duplicación constante. Ver anexo I para una explicación más detallada).

El punto de la fase logarítmica que se consideró para la cosecha de las células en esta etapa de crecimiento fue a una DO_{600nm} mayor de 1.0 por las siguientes razones: i) en este valor de densidad óptica se observó que las velocidades de crecimiento de las

dos especies seleccionadas concordaron con lo reportado en la literatura (sección 1.3); ii) se asegura que la cantidad de proteína es suficiente para los ensayos de 2D-PAGE porque en esta etapa la composición de macromoléculas, como DNA, RNA y proteínas, es mayor que en otras fases [82] y iii) en algunos estudios de proteomas de MNT se ha considerado este punto para cosechar las células [83]. El punto de la fase logarítmica de *M. abscessus* que se empleó para los cultivos de trabajo fue en el día 4, a una DO_{600nm} de 1.2. Por otro lado, las células de *M. avium* se cosecharon hasta una densidad de 1.4 en el día 21. Las micobacterias se cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas en medio Middlebrook 7H10. El resultado de la cuenta fue de 1.12×10^{10} UFC/mL para *M. avium*, mientras que para *M. abscessus* fue de 1.92×10^{12} .

Finalmente, se observó que *M. avium* es una especie de crecimiento lento en comparación con *M. abscessus*. La primera requirió de aproximadamente 34 días para completar las fases lag, exponencial y estacionaria, en tanto que la segunda necesitó 13 días solamente (figura 6).

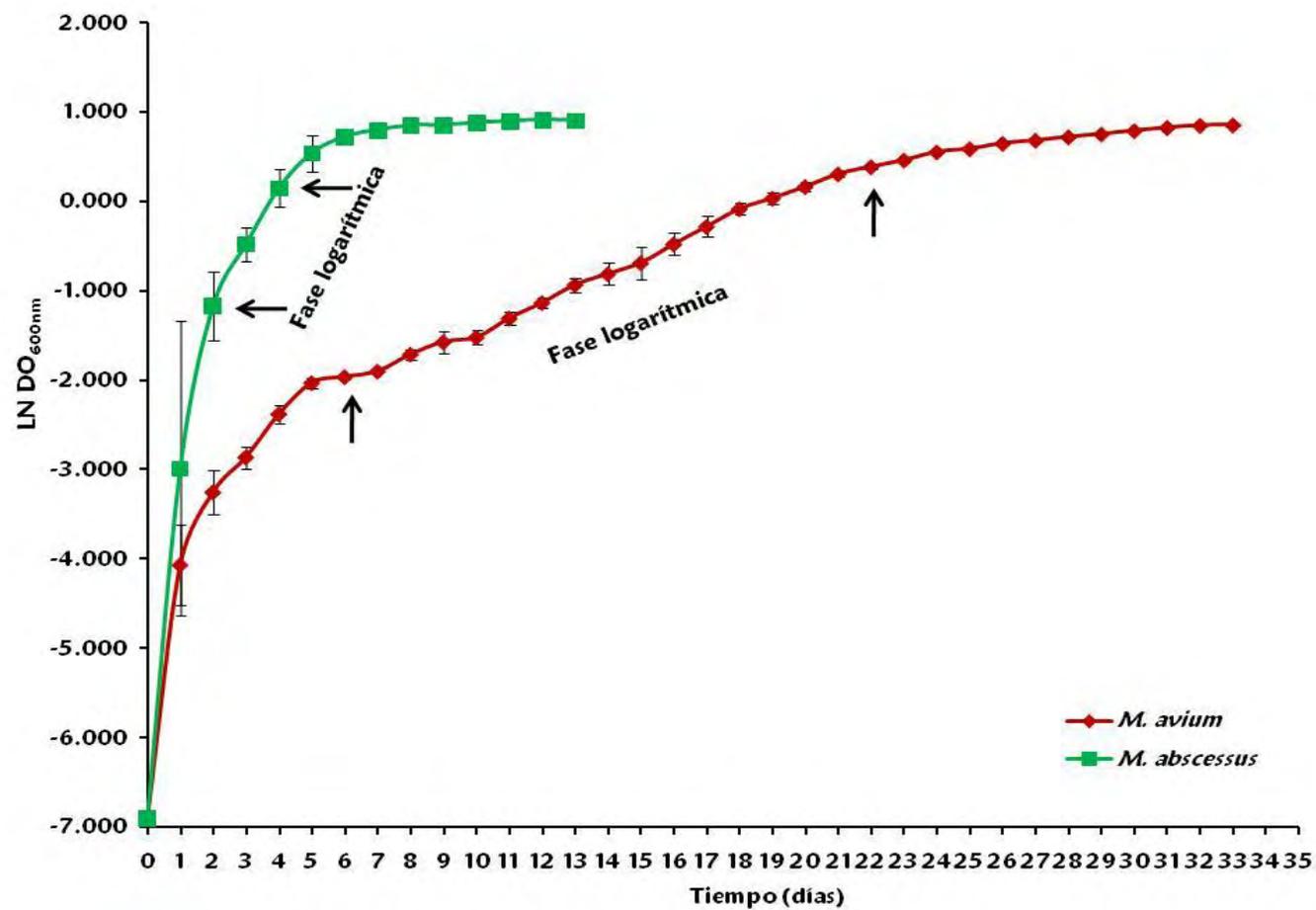


Figura 6. Cinéticas de crecimiento de *M. avium* y *M. abscessus*. En el gráfico se representa la DO_{600nm} como una función logarítmica del tiempo. Las flechas señalan el inicio y el final de la fase logarítmica para cada especie. *M. abscessus* es de crecimiento rápido en comparación con *M. avium*, pues la primera ya está en la fase estacionaria cuando la segunda apenas inicia la fase logarítmica. Las barras verticales indican la desviación estándar de dos determinaciones.

Electroforesis de doble dimensión

Para obtener los geles maestros con el programa PDQuest™ se verificó que el coeficiente de variación entre las réplicas correspondientes cumpliera con el criterio propuesto por Molloy *et al.* el cual debe ser no a mayor al 31.2% [84]. En la tabla 4 se muestran los datos del número total de píxeles. El coeficiente de variación entre réplicas se mantuvo por debajo del límite.

Tabla 4. Densidad total de píxeles.

	Número de píxeles					
	<i>M. avium</i>		<i>M. abscessus</i>		<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	
	Filtrado de cultivo	Extracto celular	Filtrado de cultivo	Extracto celular	Filtrado de cultivo	Extracto celular
Gel 1	4588125	4583485	4407689	4600288	4427974	4105640
Gel 2	4307394	4439526	4287114	4655452	4811760	4413864
Promedio	4447759.5	4511505.5	4347401.5	4627870	4619867	4259752
Desviación estándar	198506.8	101794.4	85259.4	39006.8	271377.7	217947.2
Coefficiente de variación (%)	4.4	2.2	1.9	0.8	5.9	5.1

Respecto a la cuenta total llevada a cabo con el programa PDQuest™, la electroforesis permitió resolver alrededor de 100 a 300 puntos para los filtrados de cultivo y de 500 a 600 para los extractos celulares. El gel de proteínas de filtrado de cultivo correspondiente a *M. abscessus* mostró un número menor de puntos en contraste con *M. avium* y con *M. tuberculosis* H37Rv. Por otro lado, se obtuvieron menos puntos de los extractos celulares provenientes de los aislamientos clínicos de MNT que del extracto de *M. tuberculosis* H37Rv. La mayoría de puntos resueltos (aproximadamente 80%) se distribuyeron en los siguientes intervalos: entre 4.0 y 6.5 de punto isoeléctrico y entre 10 a 100 kDa en masa molecular (anexo II). La tabla 5 proporciona la información en relación al número de puntos obtenidos para cada ensayo por cepa.

Asimismo, muestra el total de puntos con los que se construyeron sus respectivos geles maestros.

Tabla 5. Cuenta total de puntos en los geles individuales y maestros.

Cepa	Ensayo 1		Ensayo 2		Gel maestro	
	Filtrado de cultivo	Extracto celular	Filtrado de cultivo	Extracto celular	Filtrado de cultivo	Extracto celular
<i>M. avium</i>	279	368	211	412	344	530
<i>M. abscessus</i>	103	424	86	411	118	585
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	275	548	266	610	284	736

Los geles maestros de las cepas se compararon entre sí, considerando los puntos en común y los presentes únicamente en cada una, con el propósito de construir un gel maestro para el filtrado de cultivo y otro para el extracto celular (experimento de alto nivel, figura 5). En la figura 7 se esquematizan las imágenes de los mismos.

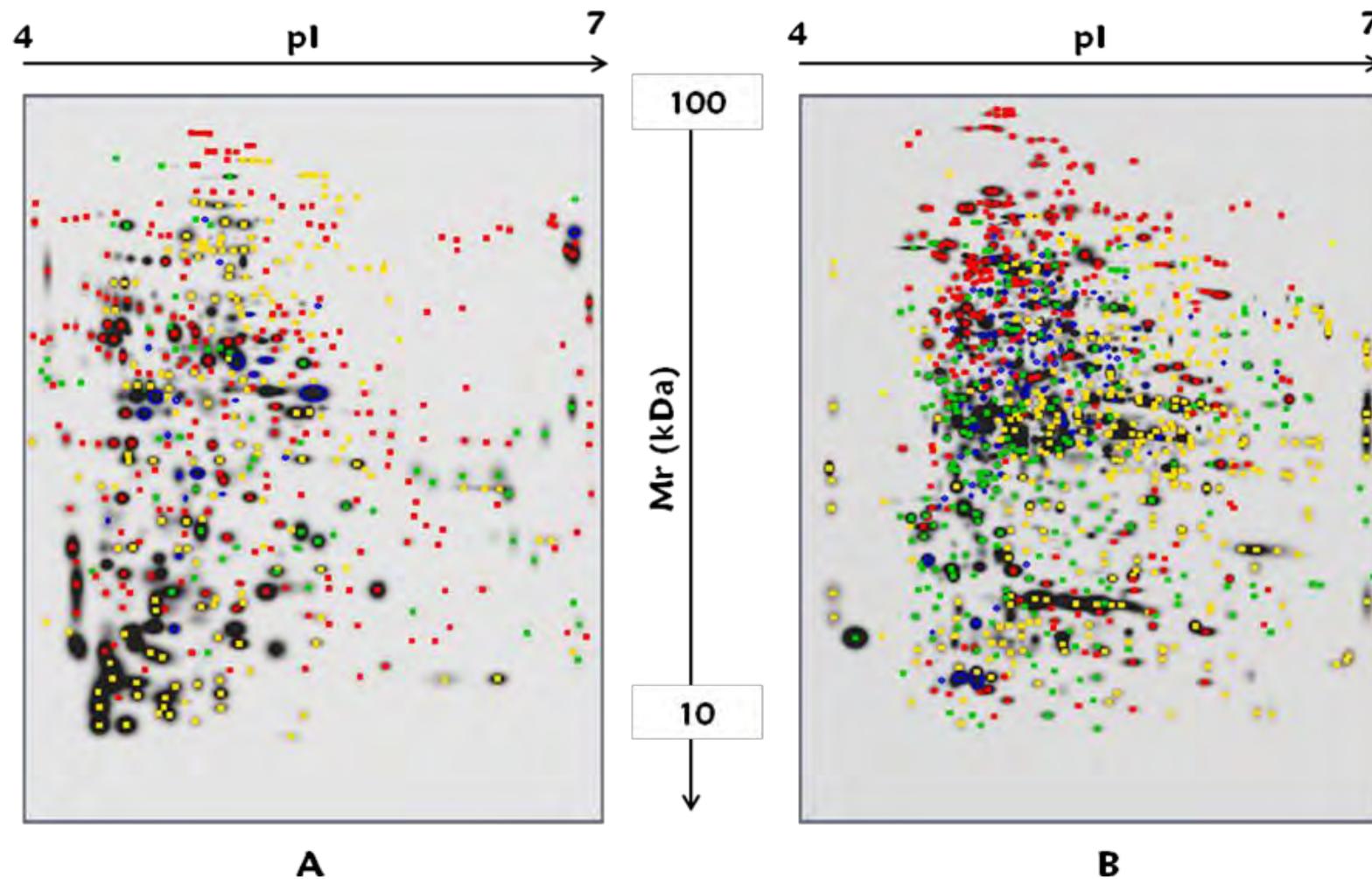


Figura 7. Geles maestros de **A)** Filtrado de cultivo y **B)** Extracto celular. Las circunferencias azules indican los puntos compartidos entre las tres cepas; los cuadros rojos representan los únicos en *M. avium*. Los verdes son los puntos únicos encontrados en *M. abscessus* y los amarillas, los de *M. tuberculosis* H37Rv.

El total de puntos mostrados en las imágenes anteriores derivó de unión de las cifras indicadas en la columna “gel maestro” de la tabla 5. El gel maestro del filtrado de cultivo se construyó con 595 puntos. De éstos, solamente 23 fueron compartidos entre las tres cepas. Por otra parte, al determinar cuáles estuvieron presentes exclusivamente en cada especie, 182 fueron de *M. tuberculosis* H37Rv; 239, de *M. avium* y 60 de *M. abscessus*. En el análisis correspondiente al extracto celular, las tres cepas aportaron al gel maestro una cuenta total de 1298 puntos, de los cuales 115 se encontraron presentes en las tres. El número de puntos exclusivos fueron: 364 para *M. tuberculosis* H37Rv; 269 para *M. avium* y 236 para *M. abscessus*.

Los valores restantes que contribuyeron a las cuentas anteriores de 595 y 1298 fueron los puntos compartidos solamente entre dos especies de micobacterias. En el filtrado de cultivo, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. avium* tuvieron 61 puntos comunes; *M. avium* y *M. abscessus*, 21, mientras que *M. tuberculosis* H37Rv y *M. abscessus*, solamente concordaron con 9. En los extractos celulares, *M. tuberculosis* y *M. avium* contaron con 83; *M. avium* y *M. abscessus*, con 57; *M. tuberculosis* H37Rv y *M. abscessus* tuvieron 174 puntos compartidos. Los resultados de lo anterior están resumidos en porcentajes en la figura 8.

Identificación de proteínas

En función de dicha evaluación, se eligieron algunos puntos para su identificación por espectrometría de masas, tanto del conjunto de puntos únicos como el de los compartidos entre las tres especies de micobacterias (figuras 9 y 10). En total se identificaron 21 proteínas. La tabla 6 es una síntesis de la información relacionada con las mismas.

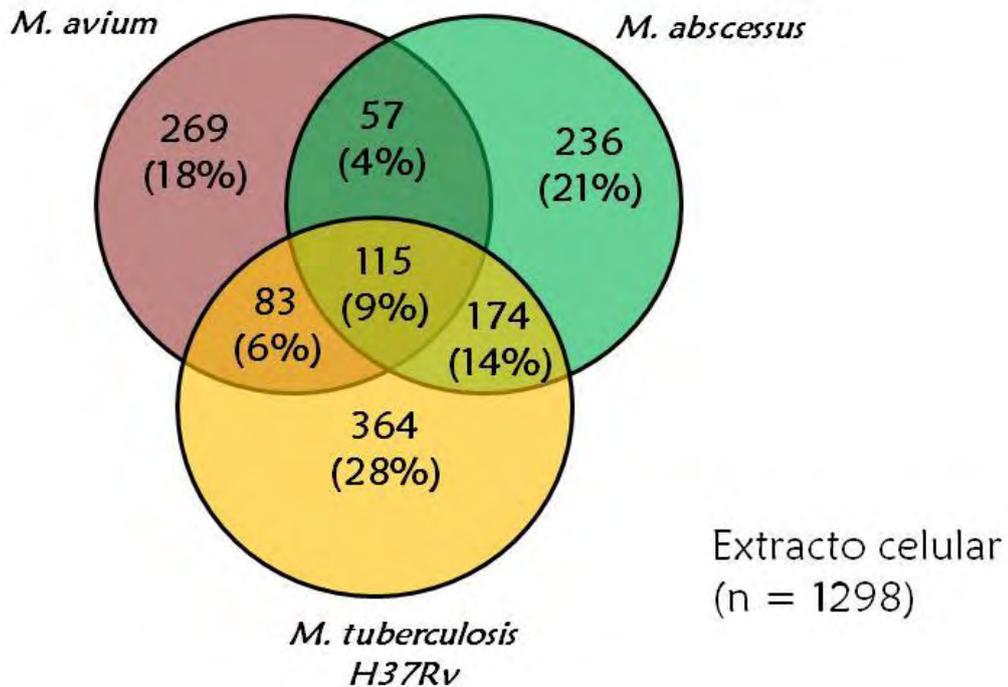
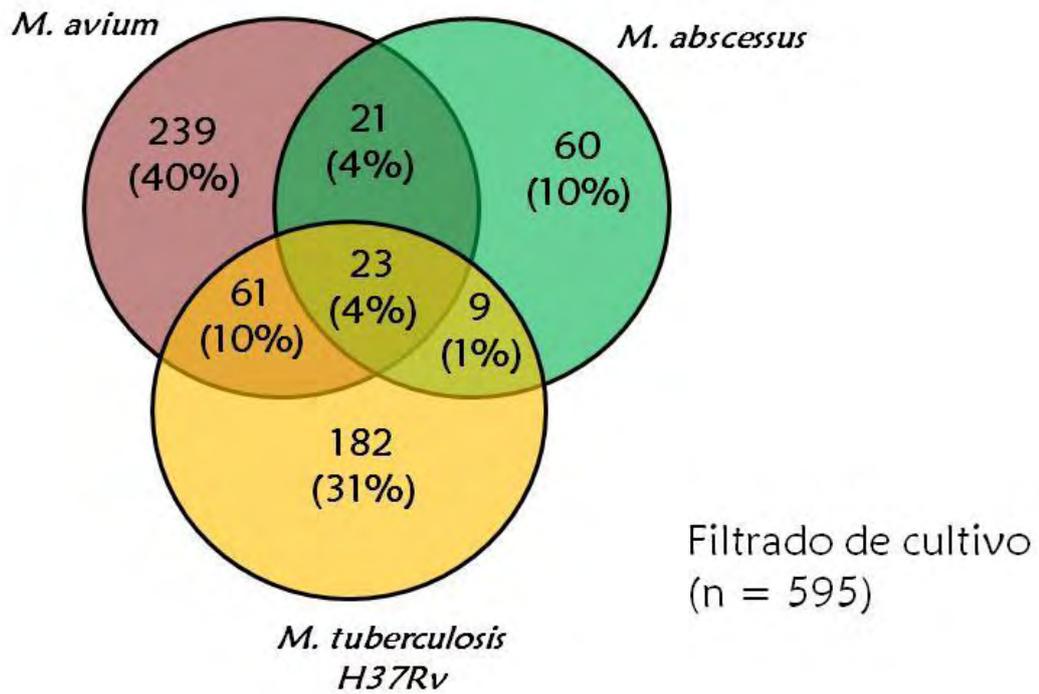


Figura 8. Comparación de los puntos únicos y compartidos entre las cepas estudiadas. Los números indicados en cada conjunto y en las intersecciones indican el total de puntos ya sea compartidos, únicos o compartidos solamente en pares de cepas. El porcentaje es la cifra señalada entre paréntesis. Las cepas compartieron un 4.0% de puntos en el filtrado de cultivo y 9.0% en el extracto celular.

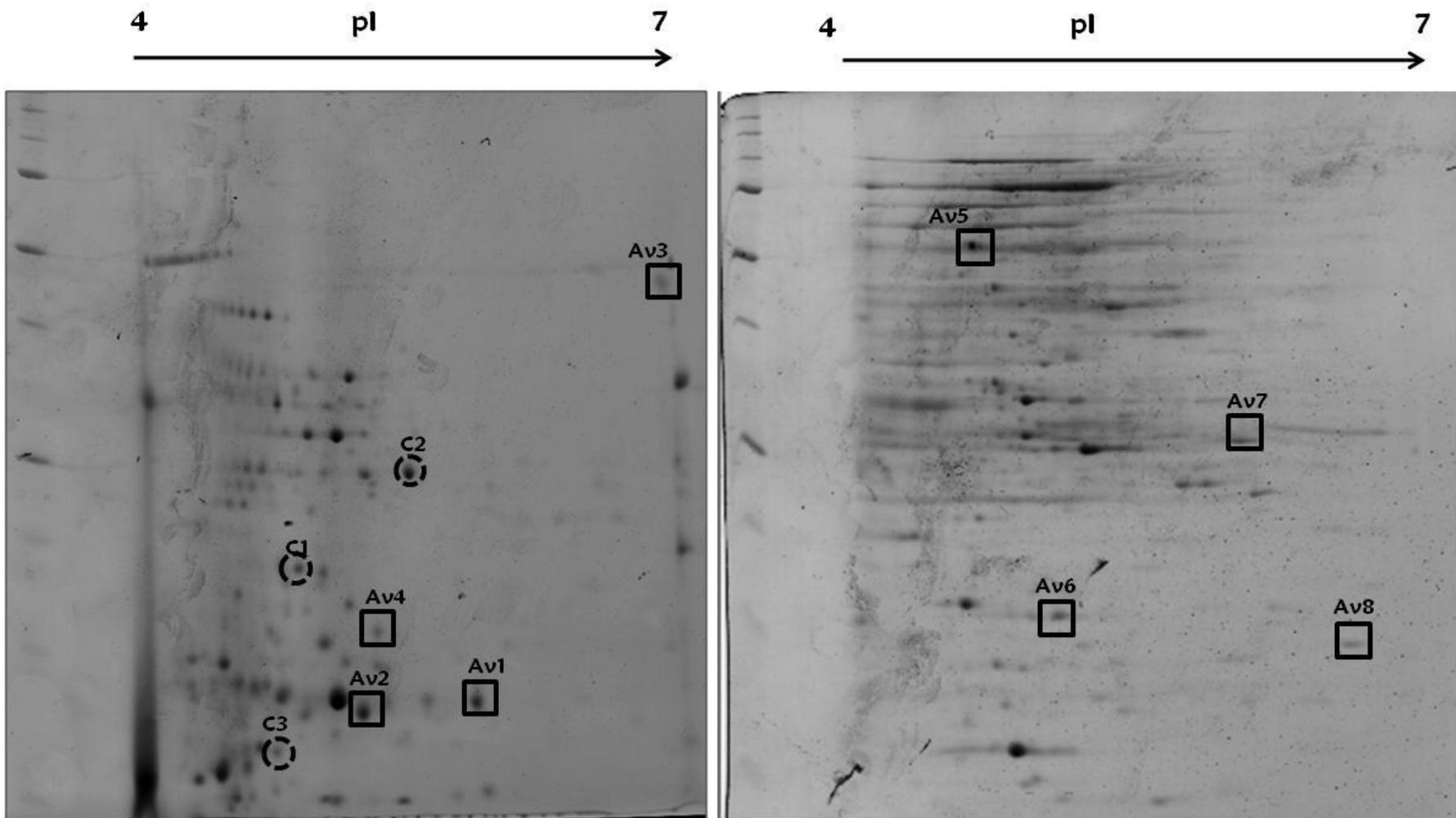


Figura 9. Geles de *M. avium* de filtrado de cultivo (izquierda) y de extracto celular (derecha). Se muestran los puntos que fueron seleccionados para su identificación por espectrometría de masas. Los círculos fueron puntos compartidos entre las tres especies. Los cuadros fueron puntos únicos en esta cepa.

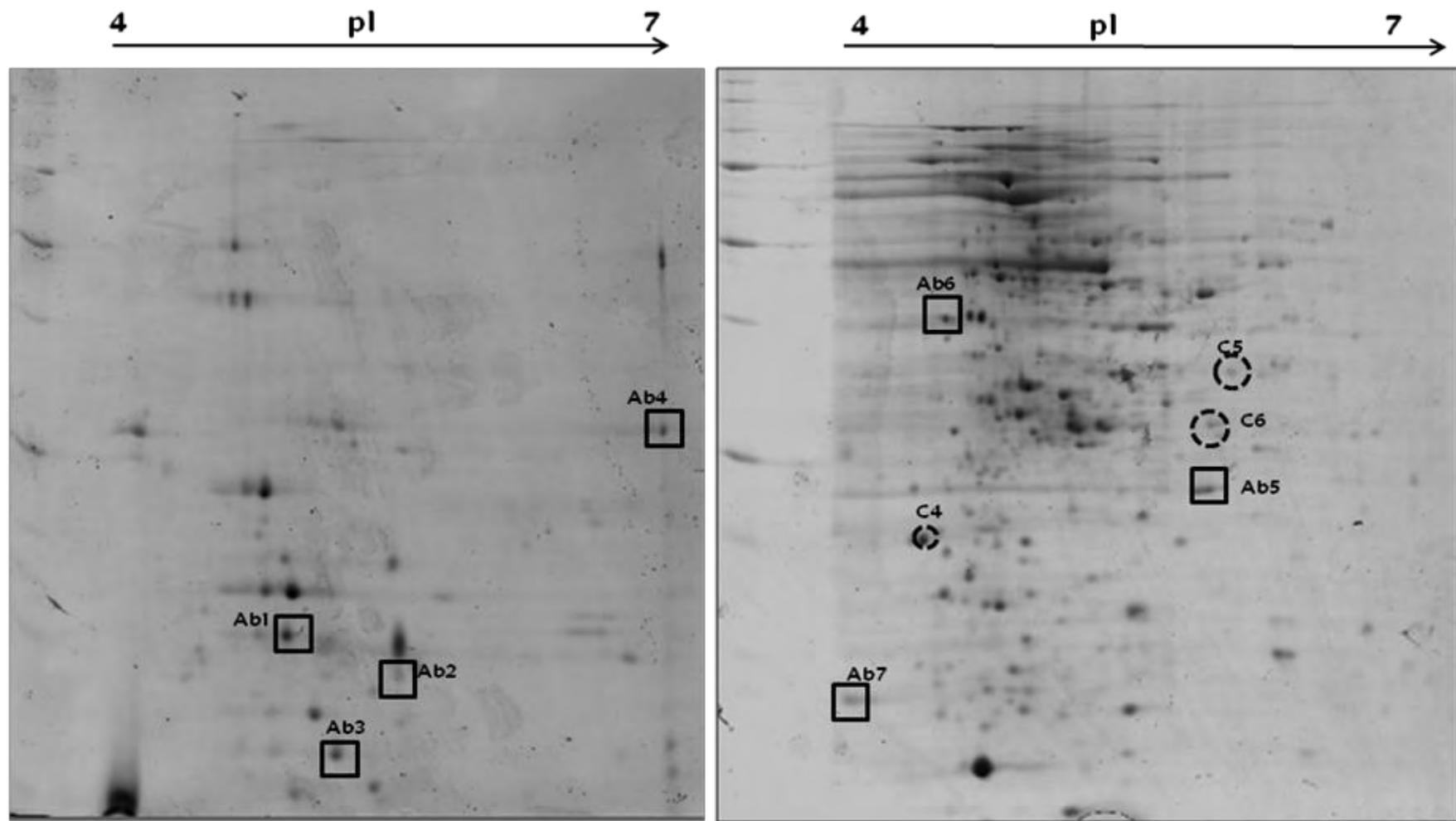


Figura 10. Geles de *M. abscessus* de filtrado de cultivo (izquierda) y de extracto celular (derecha). Se muestran los puntos que fueron seleccionados para su identificación por espectrometría de masas. Los círculos fueron puntos compartidos entre las tres especies. Los cuadros fueron puntos únicos en esta cepa.

Tabla 6. Proteínas de micobacterias identificadas por espectrometría de masas.

CLAVE DEL PUNTO	PROTEÍNA		**PUNTAJE GLOBAL	No. PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	% DE SECUENCIA
	Nombre	Función*			
<i>Proteínas de filtrado de cultivo comunes</i>					
C1	Proteína hipotética (MAP1693c)	Desconocida	91	3	15
C2	Proteína hipotética de 23.2 kDa	Desconocida (7)	54	2	11
C3	GroES	Plegamiento de proteínas (0)	175	3	45
<i>Proteínas de extracto celular comunes</i>					
C4	Proteína hipotética conservada (MAB_2403)	Desconocida	134	3	33
C5	Proteína de 35 kDa rica en alanina	Desconocida (10)	68	2	17
C6	Enoil reductasa acarreadora de acilos (NADH)	Biosíntesis de ácidos micólicos (1)	150	5	31

Tabla 6. Proteínas de micobacterias identificadas por espectrometría de masas (continuación).

CLAVE DEL PUNTO	PROTEÍNA		**PUNTAJE GLOBAL	No. PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	% DE SECUENCIA
	Nombre	Función*			
<i>Proteínas de filtrado de cultivo únicas de M. avium</i>					
Av1	Proteína hipotética (MAP1508)	Desconocida	49	2	19
Av2	Proteína hipotética (MAV_4695)	Desconocida	100	2	36
Av3	Proteína hipotética (MAP0081)	Desconocida	47	2	4
Av4	Posible proteína secretada rica en alanina y valina	Desconocida (3)	51	2	12
<i>Proteínas de extracto celular únicas de M. avium</i>					
Av5	Proteína de la familia xyppx	Desconocida	48	2	5
Av6	Proteína hipotética (MAP1885c)	Desconocida	41	1	6
Av7	Enzima multifuncional peroxisomal tipo 2	Metabolismo de ácidos grasos (1)	395	7	42

Tabla 6. Proteínas de micobacterias identificadas por espectrometría de masas (continuación).

CLAVE DEL PUNTO	PROTEÍNA		**PUNTAJE GLOBAL	No. DE PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	% DE SECUENCIA
	Nombre	Función*			
Proteínas de extracto celular únicas de <i>M. avium</i>					
Av8	Proteína putativa de la familia de proteínas de estrés universal	Adaptación a condiciones adversas (3)	136	4	36
Proteínas de filtrado de cultivo únicas de <i>M. abscessus</i>					
Ab1	Proteína hipotética (MAB_3075c)	Desconocida	152	2	26
Ab2	Proteína hipotética conservada (MAB_4114)	Desconocida	37	1	7
Ab3	Proteína hipotética conservada (posiblemente de unión a fibronectina)	Mediadora de la unión a las células del hospedero (3)	74	3	11
Áb4	Proteína hipotética conservada(MAB_0318c)	Desconocida (10)	141	3	17

Tabla 6. Proteínas de micobacterias identificadas por espectrometría de masas (continuación).

CLAVE DEL PUNTO	PROTEÍNA		**PUNTAJE GLOBAL	No. DE PÉPTIDOS IDENTIFICADOS	% DE SECUENCIA
	Nombre	Función*			
Proteínas de extracto celular únicas de <i>M. abscessus</i>					
Ab5	Probable superóxido dismutasa (Mn)	Catálisis de la conversión de radicales superóxido a H ₂ O ₂ y O ₂ (0)	118	2	13
Ab6	Proteína ribosomal 50S L7/L12	Síntesis de proteínas (2)	134	3	25
Ab7	Pirofosfatasa inorgánica	Hidrólisis del pirofosfato	112	1	14

*Clasificación propuesta por el Instituto de Investigación Genómica (TIGR): 0= virulencia, desintoxicación y adaptación; 1= metabolismo de lípidos; 2= vías de señalización; 3= pared celular y procesos celulares; 4= RNA estables; 5= elementos de inserción y fagos; 6= PE/PPE; 7= metabolismo intermediario y respiración; 8= desconocida; 9= proteínas reguladoras; 10= proteínas hipotéticas conservadas. A algunas proteínas no se les ha asignado una categoría funcional, por lo que no se indica en la tabla el número correspondiente.

** El puntaje global se obtiene a partir de una prueba de probabilidad que se expresa como $-10\log_{10}P$ para cada espectro basado en dos niveles de significancia: 1) identidad, que se calcula en función del número de veces que el ion precursor coincide con lo que haya en la base de datos (match) y el error especificado por el usuario ($p < 0.05$); 2) homología, más sensible a la calidad del espectro [85].

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se compararon los patrones electroforéticos de las proteínas de filtrado de cultivo y de extracto celular de dos de las cepas de MNT de aislamientos clínicos más frecuentes de enfermedad pulmonar: *M. avium* y *M. abscessus*. Asimismo, éstos se contrastaron con los de *M. tuberculosis* H37Rv para la búsqueda de proteínas únicas y compartidas. Algunas de ellas fueron seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas.

La selección de las dos especies evaluadas, como se mencionó anteriormente, se basó en su frecuencia de aislamiento de pacientes con enfermedad pulmonar, siendo *M. avium* la que más se ha detectado en dicha patología en casi todo el mundo. Cabe señalar además que, de acuerdo a varias evidencias, es la especie responsable de ejercer un efecto negativo sobre la respuesta inmune inducida por BCG, como consecuencia de la exposición constante a esta MNT [58]. A dicho suceso se atribuye la variación en la eficacia de la vacuna. Una explicación probable para ello esté relacionada con la compartición de antígenos entre *M. avium* y BCG. Por otra parte, *M. abscessus* contribuye con el 80% de los casos de padecimientos pulmonares debidos a las MNT del grupo de crecimiento rápido. Está considerada entre los principales patógenos oportunistas en los cuadros de fibrosis quística pulmonar y es de las más resistentes a los tratamientos antifímicos [9,27,28,44].

Los aislamientos clínicos mostraron una cinética de crecimiento *in vitro* similar a las de otras especies analizadas en otras investigaciones (como *M. avium* subespecie *paratuberculosis*), bajo condiciones de cultivo como las implementadas en este caso [83]. La fase logarítmica sustenta el hecho de que, durante esta etapa, la bacteria se divide más activamente en comparación con otras etapas de desarrollo, condición reflejada durante la enfermedad donde las defensas del hospedero no restringen el crecimiento de la micobacteria [68]. Por otro lado, el interés por estudiar las proteínas de filtrado de cultivo (producidas durante el desarrollo de la micobacteria) reside en la observación de que algunas de ellas tienen la capacidad de estimular una respuesta inmune celular, según estudios en los que BCG recombinada con antígenos extracelulares confiere protección contra la tuberculosis en modelos animales [53,59,61,62,75,86,87]. Asimismo ya se ha evaluado ampliamente la posibilidad de evaluar proteínas de *M. tuberculosis* como marcadores de infección, [60,61,62,63]. En el campo de las MNT sólo están disponibles algunos exámenes

relacionados con *M. avium* subespecie *paratuberculosis* [82], por lo que este estudio representa una primera etapa de la búsqueda de proteínas de otras especies (*M. avium* y *M. abscessus*) para tal propósito.

Hay pocos datos de las diferencias en la expresión de proteínas entre los aislados clínicos contra las cepas de referencia [61,71]. La información proporcionada por aislamientos humanos es indispensable, sobre todo porque las cepas adaptadas a condiciones de laboratorio no proporcionan todos los detalles sobre su patogenicidad; algunos incluso los han perdido. El ejemplo más representativo de este fenómeno es la BCG, la cual derivó de una cepa virulenta de *M. bovis*. Se ha demostrado que BCG perdió una región de 9.5 kb conocida como RD-1. En ésta se encuentran genes que codifican para dos proteínas denominadas ESAT-6 y CFP-10. Ambas cumplen funciones indispensables en la patogenicidad de *M. tuberculosis* [8,88]. Dadas las implicaciones del panorama anterior, fue de utilidad seleccionar aislamientos clínicos.

2D-PAGE permitió resolver aproximadamente 100 a 300 puntos en los filtrados de cultivo y de 400 a 600 en los extractos celulares; éstos se distribuyeron en el intervalo de 4.0 a 6.5 de pI y de 10 a 100 kDa de masa molecular, observación que concuerda con los antecedentes. No obstante, en las publicaciones anteriores se resolvieron alrededor de 600 puntos en los filtrados de cultivo y 1000 en los extractos celulares de *M. tuberculosis* (cepas H37Rv y Erdman) y *M. bovis* BCG (cepas Chicago y Copenhagen) [89]. La explicación quizás esté vinculada con las características intrínsecas de cada cepa de micobacterias y con su origen. En una publicación anterior se reportan los resultado de contrastar las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, cepas H37Rv y CDC 1551, con el aislamiento clínico de la cepa K, la más común en Corea del Sur. Se hallaron aproximadamente 600 puntos para las cepas H37Rv y CDC 1551, mientras que en el aislamiento clínico fueron solamente 400 [61]. Las proteínas provenientes de las cepas tipo, adaptadas a las condiciones de laboratorio, como se mencionó anteriormente, reflejan el panorama de su expresión durante condiciones no restrictivas, a diferencia de la infección donde el entorno es otro [71,90,91,92]. No obstante, los modelos *in vivo* mostrarían ese panorama.

En cuanto a la cifra correspondiente a los puntos detectados en el filtrado de cultivo, éste fue menor en *M. abscessus* comparado con *M. avium* y *M. tuberculosis*. Wiker propone que las proteínas encontradas al exterior de la célula tienen funciones específicas; algunas participan en la remodelación constante de la pared celular tras la duplicación de los bacilos. También sugiere que los sistemas de secreción de proteínas de micobacterias son maquinarias demandantes que contribuyen al lento desarrollo de *M. tuberculosis* [68]. En contraste, *M. abscessus* es una especie de rápido crecimiento y posiblemente su regulación de la expresión proteica tenga características únicas. En relación a esta aseveración, en el grupo de Ohara se examinó la expresión de proteínas de secreción, específicamente de unión a fibronectina como el complejo antigénico 85 (85A, 85B y 85C) y las proteínas MPB/MPT51. Estas moléculas fueron secretadas de forma abundante al medio extracelular por *M. tuberculosis* y por *M. bovis* BCG. En contraste, en el filtrado de cultivo de *M. avium*, 85B y MPT51 fueron detectados en concentraciones altas, mas no fue el caso para 85A y 85C, a pesar de la presencia del gen que codifica para ellos. La diferencia en la secreción la atribuyeron a una probable regulación a nivel transcripcional. Para *M. abscessus*, dicho evento tendrá que confirmarse [102].

Se lograron identificar 21 proteínas: 3 compartidas en el filtrado de cultivo y 3 en el extracto celular; 4 proteínas únicas en el filtrado de cultivo y 4 en la fracción celular de *M. avium*. En *M. abscessus* fueron 4 proteínas únicas en el filtrado de cultivo y 3 en la fracción celular. Éstas se clasificaron en las siguientes categorías funcionales acorde con el TIGR (The Institute for Genomic Research): virulencia, desintoxicación y adaptación (2 proteínas identificadas); metabolismo de lípidos (2); vías de señalización (1); procesos celulares y pared celular (3); metabolismo intermediario y respiración (2). Varias investigaciones sugieren que los genes involucrados en la regulación de otros genes, en la captación de metales, reparación de DNA, termotolerancia, tolerancia osmótica y al pH, así como aquellos relacionados con biosíntesis, degradación o metabolismo basal de lípidos, carbohidratos y nucleótidos son los más importantes en la infección [41,71,90,91,92]; justamente corresponden a estas categorías y a la de proteínas reguladoras. De la misma manera fueron localizadas 11 proteínas hipotéticas y de función desconocida, lo cual es una manifestación física de la expresión de los genes que las codifican. Investigaciones futuras serán encauzadas a estudiar la función específica que éstas desempeñan en las micobacterias.

Se identificaron dos proteínas que participan en procesos de virulencia, detoxificación y adaptación. GroE5 (C3), común entre las dos cepas de MNT y *M. tuberculosis* H37Rv, es un antígeno ampliamente estudiado, fuertemente reconocido por linfocitos T de pacientes con tuberculosis y animales infectados y asociado con una alta producción de IFN- γ . Se ha encontrado en altas concentraciones en el filtrado de cultivo. La presencia de esta proteína se debe a su estabilidad por ser una proteína de choque térmico, a su liberación durante la duplicación celular y a que finalmente es requerida para el plegamiento de proteínas de la membrana y la pared celular [68,93,94,95]. Entonces, en virtud de que es abundante en el filtrado de cultivo, a que induce la respuesta inmunitaria y a que es común entre las tres cepas, es probable que sea uno de los componentes del PPD que explique la baja especificidad de este reactivo [93].

La probable superóxido dismutasa (Ab5), otra proteína de la categoría funcional de virulencia, desintoxicación y adaptación, se considera un mecanismo de defensa ante las especies reactivas de oxígeno producidas por los macrófagos. Cataliza la conversión del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Éste, entre otras estrategias de evasión de la respuesta inmune, ha permitido a las micobacterias sobrevivir intracelularmente y persistir en el hospedero. Por otro lado, cabe mencionar que esta proteína se identificó como única en *M. abscessus*, pese a que *M. tuberculosis* y *M. avium* tienen el gen que codifica para ella y en otros estudios de tipo proteómico ya la han reportado. Esto podría deberse a un cambio en su movilidad electroforética; quizás por una modificación post-traduccional, que la hace una especie de proteína distinta. Otra característica es el hecho de que su cofactor pudiese ser el manganeso, en tanto que en *M. tuberculosis* se han descrito dos superóxido dismutasas, cuyos cofactores son hierro y cobre-zinc [65,73,74,95].

Entre las proteínas descritas en el proteoma de micobacterias, están involucradas aquellas que participan en el metabolismo de lípidos, biomoléculas componentes esenciales de la compleja pared celular. La enoil reductasa (C6), compartida entre las especies estudiadas, cataliza la elongación de ácidos grasos y es blanco de la isoniazida, uno de los fármacos antifímicos. Sin embargo, debido al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* multifármaco-resistentes y a que el tratamiento de patologías pulmonares por MNT no es el mismo que para *M. tuberculosis* (de hecho, *M. abscessus* es de las más resistentes a los

esquemas indicados para la tuberculosis), esta proteína representa un blanco terapéutico en el diseño de fármacos más eficaces que la isoniazida [96,97,98]. La enzima multifuncional peroxisomal tipo 2 (Av7), del extracto celular de *M. avium* interviene en la β -oxidación de ácidos grasos, por lo que se esperaba encontrar una enzima de esta naturaleza. Los ácidos grasos confieren a las micobacterias una elevada hidrofobicidad, que les permite resistir los tratamientos antifímicos y los agentes descontaminantes del agua, la cual se ha sugerido es el principal vehículo de transmisión de MNT [5,15,17,99].

La proteína ribosomal 50S L7/L12 (Ab6), de acuerdo al análisis *in silico*, se clasificó como única de *M. abscessus*. Sin embargo, también está codificada en los genomas de *M. avium* y *M. tuberculosis* e igualmente ha sido detectada anteriormente en geles bidimensionales. De acuerdo a un estudio realizado en 1999 por Kitaura y colaboradores, se le ha contemplado como otro de los principales componentes del PPD. Se propone que las modificaciones post-traduccionales, particularmente una acilación en el extremo N-terminal de la subunidad L12, son responsables de su actividad en la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado por su reconocimiento por el sistema inmune. En cuanto a la proteína localizada en *M. abscessus*, probablemente exista otro tipo de modificación que influya en su movilidad electroforética y quizás, en su capacidad para inducir una respuesta inmune de tipo celular, sobre todo si este antígeno es reconocido tras una exposición a MNT o a *M. tuberculosis*. Esta aseveración deberá confirmarse [65,93].

En *M. avium* se reconocieron dos proteínas involucradas en la categoría funcional de pared celular y procesos celulares. Una de ellas (Av4) es una posible proteína secretada rica en alanina y valina, encontrada en el filtrado de cultivo. Varias proteínas de esta naturaleza y ricas en otros aminoácidos hidrofóbicos como prolina, leucina y glicina han sido reportadas en *M. tuberculosis* (Rv2668, Rv2693c, Rv2721c, Rv2905, Rv3881c por ejemplo). No obstante, sus funciones son desconocidas [38,89]. Por otra parte, la proteína de la familia de proteínas de estrés universal (en este trabajo es Av8) fue descrita por primera vez en *E. coli*. Su síntesis fue inducida cuando la bacteria se creció bajo condiciones carentes de uno o varios nutrientes como carbono, nitrógeno, fosfato, sulfato, aminoácidos esenciales; en presencia de metales pesados, oxidantes y antibióticos, bajo choque térmico y daño al DNA. Se propone que esta clase de proteínas en las micobacterias interviene en su supervivencia bajo condiciones de hipoxia, probablemente el contexto de la infección

[54,97]. Un homólogo (MAP1754c) ya había sido encontrado en un estudio en el que se comparó la expresión proteica de *M. avium* subespecie *paratuberculosis* cultivada in vitro contra un aislamiento clínico obtenido de la mucosa intestinal de una oveja. Dicha proteína se halló expresada precisamente en esta última condición, de modo que se sugiere que es requerida para resistir condiciones adversas durante la infección [82].

En el filtrado de cultivo de *M. abscessus* se encontró una proteína hipotética conservada, posiblemente de unión a fibronectina (Ab3). La unión a fibronectina es un fenómeno bien documentado en especies como *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. avium* y *M. smegmatis*. La unión e internalización de *M. bovis* BCG, *M. avium* y *M. leprae* es dependiente de la unión a fibronectina. En *M. abscessus*, además de ser indispensable para el proceso anterior, probablemente desempeñe un papel indispensable en adhesión al epitelio del tracto respiratorio durante la fibrosis quística pulmonar, por lo que se le ha dado importancia recientemente. Otros patógenos como *S. aureus* y *P. aeruginosa* utilizan la fibronectina como molécula de adhesión en dicha patología [76,100,101,102,103,104,105].

En relación a proteínas mediadoras de metabolismo intermediario y respiración se identificó una proteína hipotética de 23.2 kDa (C2), compartida entre las tres cepas. Su función es desconocida. Sin embargo, en el TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>) corresponde a esta categoría pues podría tratarse de la proteína Rv2036. También se halló la pirofosfatasa inorgánica en el extracto celular de *M. abscessus* (Ab7). Su papel es controlar los niveles celulares de pirofosfato inorgánico, que interviene en todos los procesos biosintéticos que requieren ATP. Esta proteína es ubicua y está altamente conservada entre diferentes especies de patógenos intracelulares. Por ejemplo, en *Legionella pneumophila*, el gen que la codifica se induce durante la infección de la línea celular U937 y se regula en respuesta al estímulo ambiental. Sin embargo, en *M. tuberculosis* está expresada constitutivamente, *in vivo* e *in vitro*, y su producción es independiente de los estímulos ambientales, lo que no sugiere su participación importante durante la infección [106,107]. Por último, esta proteína fue otro ejemplo de que se expresaron proteínas no específicas de cada especie, pero sí de especies proteicas únicas. Según Jungblut, el término especie proteica se define como la unidad más pequeña de la clasificación de proteínas, definida por su estructura química [65].

Como se mencionó anteriormente, se encontraron varias proteínas hipotéticas y de función desconocida:

La proteína MAP1693c (C1), una proteína hipotética de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* fue compartida en el filtrado de cultivo entre las cepas acorde con el resultado obtenido del análisis *in silico*. A pesar de que no se ha comprobado experimentalmente su función, en un estudio en el que se realizó un alineamiento por BLAST de su secuencia de aminoácidos con el de otras proteínas de *M. tuberculosis*, se le clasificó como una peptidil-prolil-cis-trans isomerasa. Ésta ya ha sido encontrada en filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* y se ha demostrado que su expresión disminuye cuando el hierro disponible es escaso en el medio de cultivo, lo que sugiere que está relacionada con la captación del cofactor. Por otro lado, ya se ha examinado su potencial como biomarcador de la enfermedad de Johne en rumiantes porque se ha demostrado que las peptidil-prolil-cis-trans isomerasas son inductoras de la respuesta inmune [77,78,108,109]. En virtud de estar compartida, tal vez no sea un buen candidato para discriminar entre la infección por MNT la ocasionada por *M. tuberculosis*.

C4, una proteína hipotética conservada (MAB_2403) fue común en las tres especies evaluadas. La poca información disponible sobre ella (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) señala que tiene un dominio FHA (del inglés “Fork-head associated”) al cual se le asocia en procesos de señalización celular y de fosforilación de serina y treonina. En otros estudios con *M. tuberculosis* se describió que la proteína GarA cuenta con dicho dominio. GarA es sustrato de PknB, una “like-kinase de *M. tuberculosis*. Probablemente está implicada en transducción de señales [106,108]. PknG, otra cinasa descrita en *M. tuberculosis* está asociada con la regulación del glutamato. En cuanto a sus implicaciones biológicas, se propone que se secreta en el citosol del macrófago y que inhibe la fusión del fagosoma y del lisosoma, uno de los eventos que favorece la supervivencia de *M. tuberculosis* dentro del macrófago [110]. Tanto en *M. avium* como en *M. abscessus* se tendrá que comprobar si la proteína identificada en este trabajo tiene el dominio FHA y si promueve las mismas funciones que PknG.

C5, el antígeno de 35 kDa se ha descrito en otros estudios de proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv. Es una proteína rica en alanina y valina, codificada por el gen

Rv2744c. En BCG, se encontró por primera vez en una investigación en la que se compararon las subcepas Phipps y Dinamarca. Se desconoce su función [38,89].

Av1, Av2 y Av3 proteínas hipotéticas del filtrado de cultivo de *M. avium*. Av1 ó MAP1508 al parecer es una proteína “esat-6 like”. Como se mencionó previamente, la proteína ESAT-6 se encuentra codificada en una región conocida como RD-1, cuyos productos están asociados con la patogenicidad de *M. tuberculosis* y su pérdida, con la atenuación de la BCG. ESAT-6 incluso se ha propuesto como un marcador específico de tuberculosis. En *M. tuberculosis* la secreción de ESAT-6 está mediada por un sistema de secreción conocido como ESX-1, involucrado en la lisis de las células del hospedero, formación de granulomas, supresión de la síntesis de citocinas, arresto del fagosoma, translocación bacteriana y la interacción con receptores de tipo Toll [8,111]. La presencia de esta proteína podría explicar la capacidad de *M. avium* para producir patología pulmonar en este caso.

No se conoce información al respecto sobre Av2 (MAV_4695), por lo que es pertinente investigarla. Por último, Av3 (MAP0081) contiene un dominio de unión a FAD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), lo que sugiere que podría tratarse de una proteína que participe en reacciones de óxido-reducción del metabolismo micobacteriano [112].

Otras proteínas encontradas solamente en el extracto celular de *M. avium* fueron Av5 y Av6. Av5 fue reconocida como una proteína de la familia xyppx, cuyo gen ortólogo en *M. tuberculosis* es Rv0020c. Posee un dominio FHA, cuyas funciones ya se describieron [106, 107,108]. Av6 ó MAP1885c posiblemente se trate de una proteína de unión a fosfatidil-etanolamina con actividad inhibitoria de proteasas, implicada en procesos de señalización celular durante el desarrollo, modulación de la actividad catalítica de cinasas o serín proteasas y en el reconocimiento de lípidos. Todas estas funciones tendrían que ser examinadas, sobre todo durante la infección [112].

Finalmente, en *M. abscessus* se identificaron 3 proteínas hipotéticas en el filtrado de cultivo. Ab1 y Ab2, MAB_3075c y MAB_4114, respectivamente son proteínas no caracterizadas. Dado que el genoma de *M. abscessus* fue completado apenas en marzo de 2008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), existe muy poca información sobre un

gran número de las proteínas predichas. De modo que una de las perspectivas de este trabajo es indagar sobre la identidad y la función de dichas proteínas. Ab4, MAB_0318c tampoco ha sido caracterizada por completo. No obstante, se sabe que podría tener un dominio semejante al de las hidrolasas del peptidoglicano bacteriano, en particular de la N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa. Estas enzimas catalizan la ruptura del enlace amida entre el N-acetilmureína y la L-alanina del péptido. Se secretan por la presencia de un péptido señal y se encargan de la ruptura de la pared durante la división celular [113]. Debido a su función, son atractivas como blancos terapéuticos y pudiese evaluarse su capacidad para inducir respuesta inmune.

Si bien algunas de las proteínas encontradas en este estudio ya han sido descritas previamente en los filtrados de cultivo, membrana y extractos celulares de cepas de *M. tuberculosis* y de BCG [35,39,69], existen pocos antecedentes en los que se den a conocer los proteomas de las MNT [83]; tampoco están disponibles aquellos en los que se establezca una comparación con *M. tuberculosis* H37Rv. El presente estudio aporta información preliminar sobre mapas proteicos de *M. avium* y *M. abscessus* que sirven como referencia para la selección de proteínas con potencial para discriminar entre la infección por MNT contra *M. tuberculosis* -que representa un factor de riesgo para la progresión a enfermedad pulmonar- basada en la presencia y ausencia entre cepas.

Aplicaciones futuras de este tipo de estudios servirán para entender los procesos necesarios para la supervivencia de las micobacterias en el hospedero (mediante la medición de la expresión de proteínas en condiciones in vivo o carentes de algún nutriente, por ejemplo), para explicar por qué son diferentes a *M. tuberculosis* (en cuanto a sus características macro y microscópicas y a su capacidad para sobrevivir en el medio ambiente) y para la búsqueda de otras proteínas que puedan utilizarse en el desarrollo de fármacos más eficaces que los que actualmente se utilizan [9,41].

CONCLUSIONES

1. Se encontró un mayor número de proteínas en los extractos celulares que en los filtrados de cultivo.
2. Se encontró un menor número de proteínas en los proteomas de los extractos celulares de las MNT en comparación con *M. tuberculosis* H37Rv.
3. Cerca de una quinta parte de las proteínas obtenidas en las MNT y un tercio de las de *M. tuberculosis* fueron únicas.
4. La mayoría de las proteínas identificadas fueron hipotéticas.
5. Las proteínas identificadas correspondieron a los grupos funcionales de virulencia, desintoxicación y adaptación; metabolismo de lípidos; vías de señalización; proceso celulares y pared celular y metabolismo intermediario y respiración.

PERSPECTIVAS

1. Determinar la frecuencia de las proteínas identificadas en los aislamientos clínicos de MNT.
2. Evaluar su potencial uso como biomarcadores en el diagnóstico clínico.
3. Examinar su probable utilidad como candidato vacunal.
4. Determinar la función de las proteínas hipotéticas.

REFERENCIAS

14. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN, Jr. (1999) Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 65: 2492-2496.
15. Falkinham JO, 3rd (2003) Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 9: 763-767.
16. Petrinni B (2006) Nontuberculous mycobacterial infections. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 38: 246-255.
17. Vaerevijck MJM, Huys G, Palomino JC, Swings J, Portaels F (2005) Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 29: 911-934.
18. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO (2004) Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 17: 98-106.
19. Field SK, Cowie RL (2006) Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest* 129: 1653-1672.
20. Henry MT, Inamdar L, O'Riordain D, Schweiger M, Watson JP (2004) Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J* 23: 741-746.
21. Katoch VM (2004) Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* 120: 290-304.
22. Piersimoni C, Scarparo C (2008) Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 8: 323-334.
23. Behr MA (2008) Mycobacterium du jour: what's on tomorrow's menu? *Microbes Infect* 10: 968-972.
24. Buijtels PC, Petit PL, Verbrugh HA, van Belkum A, van Soolingen D (2005) Isolation of nontuberculous mycobacteria in Zambia: eight case reports. *J Clin Microbiol* 43: 6020-6026.
25. Ellis SM (2004) The spectrum of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease. *European Radiology* 14: 34-42.
26. Han XY, Tarrand JJ, Infante R, Jacobson KL, Truong M (2005) Clinical significance and epidemiologic analyses of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* among patients without AIDS. *J Clin Microbiol* 43: 4407-4412.
27. Petrinni B (2006) *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *Apmis* 114: 319-328.

28. Wagner D, Young LS (2004) Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection* 32: 257-270
29. O'Brien DP, Currie BJ, Krause VL (2000) Nontuberculous mycobacterial disease in northern Australia: a case series and review of the literature. *Clin Infect Dis* 31: 958-967.
30. Chamberlin W, Graham DY, Hutten K, El Zimaity HMN, Scharwitz MR, et al. (2001) Review article: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as one cause of Chron's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 15: 337-346.
31. Greenstein RJ (2003) Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect Dis* 3: 507-514.
32. Porteous NB, Redding SW, Jorgensen JH (2004) Isolation of non-tuberculosis mycobacteria in treated dental unit waterlines. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98: 40-44.
33. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
34. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C (2003) Tuberculosis. *Lancet* 362: 887-899.
35. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, et al. (1999) Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 33: 1103-1117.
36. Katoch VM (2004) Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res* 120: 418-428.
37. Nahid P, Pai M, Hopewell PC (2006) Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc* 3: 103-110.
38. Malen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 7: 1702-1718.
39. Mattow J, Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Lamer S, et al. (2001) Identification of proteins from *Mycobacterium tuberculosis* missing in attenuated *Mycobacterium bovis* BCG strains. *Electrophoresis* 22: 2936-2946.
40. Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, Stein M, Mann P, et al. (2004) Application of mycobacterial proteomics to vaccine design: improved protection by *Mycobacterium bovis* BCG prime-Rv3407 DNA boost vaccination against tuberculosis. *Infect Immun* 72: 6471-6479.
41. Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, et al. (2000) Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* 21: 3740-3756.

42. Weir RE, Black GF, Nazareth B, Floyds S, Stenson S, et al. (2006) The influence of previous exposure to environmental mycobacteria on the interferon-gamma response to bacille Calmette-Guérin vaccination in southern England and northern Malawi. *Clin Exp Immunol* 146.
43. Howard CJ, Kwong LS, Villarreal-Ramos B, Sopp P, Hope JC (2002) Exposure to *Mycobacterium avium* primes the immune system of calves for vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Exp Immunol* 130: 190-195.
44. Collins FM (1971) Immunogenicity of various mycobacteria and the corresponding levels of cross-protection developed between species. *Infect Immun* 4: 688-696.
45. de Lisle GW, Wards BJ, Buddle BM, Collins DM (2005) The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 73-79.
46. Young SL, Slobbe L, Wilson R, Buddle BM, de Lisle GW, et al. (2007) Environmental strains of *Mycobacterium avium* interfere with immune responses associated with *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 75: 2833-2840.
47. Reichman LB (1979) Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest* 76: 764-770.
48. Ayub A, Yale SH, Reed KD, Nasser RM, Gilbert SR (2004) Testing for latent tuberculosis. *Clin Med Res* 2: 191-194.
49. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356: 1099-1104.
50. Kunst H (2006) Diagnosis of latent tuberculosis infection: the potential role of new technologies. *Respir Med* 100: 2098-2106.
51. Pai M, Kalantri S, Dheda K (2006) New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis. Part I. Latent tuberculosis. *Future Drugs* 6: 413-422.
52. Rothel JS, Andersen P (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the Mantoux test imminent? *Future Drugs* 3: 981-993.
53. Rowland SS, Ruckert JL, Cummings PJ (1999) Low molecular mass protein patterns in mycobacterial culture filtrates and purified protein derivative. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 23: 21-25.
54. Kvint K, Nachin L, Diez A, Nystrom T (2003) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol* 6: 140-145.
55. Vekemans J, Ota MO, Sillah J, Fielding K, Alderson MR, et al. (2004) Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design. *Infect Immun* 72: 381-388.

56. Weir RE, Fine PE, Nazareth B, Floyds S, Black GF, et al. (2003) Interferon-gamma and skin test responses of schoolchildren in southeast England to purified protein derivatives from *Mycobacterium tuberculosis* and other species of mycobacteria. *Clin Exp Immunol* 134.
57. Black GF, Fine PEM, Warndorff DK, Floyd S, Weir RE (2001) Relationship between IFN-gamma and skin test responsiveness to *Mycobacterium tuberculosis* PPD in healthy, non-BCG-vaccinated young adults in Northern Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 5: 664-672.
58. Black GF, Dockrell HM, Crampin AC, Floyd S, Weir RE, et al. (2001) Patterns and implications of naturally acquired immune responses to environmental and tuberculous mycobacterial antigens in northern Malawi. *J Infect Dis* 184: 322-329.
59. Weldingh K, Rosenkrands I, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P (2005) Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* 43: 57-65.
60. Castro CM, Porras TM, Guerrero MI, León CI, Mojica MA, et al. (2005) Utilidad de una prueba serológica multiantigénica en el diagnóstico de tuberculosis. *Biomédica* 25: 55-64.
61. Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, et al. (2004) Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4: 3299-3307.
62. Armor YB, Shashkina S, Spencer J, Rendon A, Catanzaro A, et al. (2005) Immunological characterization of novel secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 61: 139-146.
63. Kulshrestha A, Gupta A, Verma N, Sharma SK, Tyagi AK, et al. (2005) Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. *Protein Expr Purif* 44: 75-85.
64. Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665-3685.
65. Jungblut P, Thiede B, Zimny-Arndt U, Muller EC, Scheler C, et al. (1996) Resolution power of two-dimensional electrophoresis and identification of proteins from gels. *Electrophoresis* 17: 839-847.
66. Camus JC, Pryor MJ, Medigue C, Cole ST (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148: 2967-2973.
67. Wright GL, Affronti LW, Reich M (1972) Characterization and comparison of mycobacterial antigens by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Infect Immun* 4: 482-490.

68. Wiker HG (2001) Liberation of soluble proteins from live and dead mycobacterial cells and the implications for pathogenicity of tubercle bacilli hypothesis. *Scand J Immunol* 54: 82-86.
69. Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, et al. (2003) Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis* 24: 3405-3420.
70. Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Raupach B, Mattow J, Lamer S, et al. (1999) A dynamic two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet. *Electrophoresis* 20: 2172-2180.
71. Betts JC, Dodson P, Quan S, Lewis AP, Thomas PJ, et al. (2000) Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology* 146 Pt 12: 3205-3216.
72. Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, Butcher PD (2001) Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147: 459-471.
73. Andersen P (1994) Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 62: 2536-2544.
74. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I (1991) Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 59: 1905-1910.
75. Collins FM, Lamb JR, Young DB (1988) Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect Immun* 56: 1260-1266.
76. Wiker HG, Harboe M (1992) The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 56: 648-661.
77. Cho D, Shin SJ, Talaat AM, Collins MT (2007) Cloning, expression, purification and serodiagnostic evaluation of fourteen *Mycobacterium paratuberculosis* proteins. *Protein Expr Purif* 53: 411-420.
78. Cho D, Sung N, Collins MT (2006) Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. *Proteomics* 6: 5785-5794.
79. Zor T, Selinger Z (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Chemistry* 236.
80. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, et al. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327-1333.

81. Singleton P (2003) Crecimiento y reproducción. Bacterias en biología, biotecnología y medicina. 5a. ed: Acribia, S. A. pp. 54-60.
82. White D (2007) Growth and cell division. The Physiology & Biochemistry of prokaryotes. 3rd. ed: Oxford University Press. pp. 53-62.
83. Hughes V, Smith S, Garcia-Sanchez A, Sales J, Stevenson K (2007) Proteomic comparison of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* grown in vitro and isolated from clinical cases of ovine paratuberculosis. Microbiology 153: 196-205.
84. Molloy MP, Brzezinski EE, Hang J, McDowell MT, VanBogelen RA (2003) Overcoming technical variation and biological variation in quantitative proteomics. Proteomics 3: 1912-1919.
85. Kapp E, Schutz F (2007) Overview of tandem mass spectrometry (MS/MS) database search algorithms. Curr Protoc Protein Sci Chapter 25: Unit25 22.
86. Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Birk-Rasmussen P (1998) Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. Infect Immun 66: 3492-3500.
87. Trajkovic V, Natarajan K, Sharma P (2004) Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. Microbes Infect 6: 513-519.
88. Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P (2008) Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. Tuberculosis (Edinb) 88: 510-517.
89. Rodríguez-Álvarez M, Mendoza-Hernández G, Encarnación S, Calva JJ, López-Vidal M (2009) Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. Tuberculosis (Edinb) 89: 126-135.
90. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. Mol Microbiol 43: 717-731.
91. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol 48: 77-84.
92. Sasseti CM, Rubin EJ (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 12989-12994.
93. Kitaura H, Kinomoto M, Yamada T (1999) Ribosomal protein L7 included in tuberculin purified protein derivative (PPD) is a major heat resistant protein inducing strong delayed-type hypersensitivity. Scand J Immunol 50: 580-587.

94. Qamra R, Mande SC, Coates AR, Henderson B (2005) The unusual chaperonins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 85: 385-394.
95. Tullius M, Harth G, Horwitz MA (2001) High Extracellular Levels of *Mycobacterium tuberculosis* Glutamine Synthetase and Superoxide Dismutase in Actively Growing Cultures Are Due to High Expression and Extracellular Stability Rather than to a Protein Specific Export Mechanism. *Infect Immun* 69: 6348-6363.
96. Takayama K, Wang C, Besra GS (2005) Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 18: 81-101.
97. O'Brien KL, Dietz HC, Romagnoli M, Eiden J (1996) Evaluation of *inhA* gene and catalase peroxidase gene among isoniazid-sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Molecular and Cellular Probes* 10: 1-6.
98. Massengo-Tiasse RP, Cronan JE (2009) Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell Mol Life Sci*.
99. Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, K. H (2006) Peroxisomal beta-oxidation-a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1413-1426.
100. Zhao W, Schorey JS, Groger R, Allen PM, Brown EJ, et al. (1999) Characterization of the binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein FAP. *The Journal of Biological Chemistry* 19: 4521-4526.
101. Westerlund B, Korhonen TK (1993) Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 9: 687-694.
102. Ohara N, Ohara-Wada N, Kitaura H, Nishiyama T, Matsumoto S, et al. (1997) Analysis of the genes encoding the antigen 85 complex and MPT51 from *M. avium*. *Infect Immun* 65: 3680-3684.
103. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, et al. (1988) Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 56: 3046-3051.
104. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, et al. (2002) Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 70: 620-630.
105. Woods DE, Bass JA, Johanson WG, Jr., Straus DC (1980) Role of adherence in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 30: 694-699.

106. Cooperman BS, Baykov AA, Lahti R (1992) Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* 17: 262-266.
107. Triccas JA, Gicquel B (2001) Analysis of stress- and host cell-induced expression of the *Mycobacterium tuberculosis* inorganic pyrophosphatase. *BMC Microbiol* 1: 3.
108. Göthel SF, Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55: 423-436.
109. Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, Gibson BW (1999) Fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun* 67: 327-336.
110. O'Hare HM, Duran R, Cervenansky C, Bellinzoni M, Wehenkel AM, et al. (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* 70: 1408-1423.
111. Simeone R, Bottai D, Brosch R (2009) ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* 12: 4-10.
112. Dym O, Eisenberg D (2001) Sequence structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Science* 10: 1712-1718.
113. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32: 259-286.

ANEXOS

Anexo I

Cinética de crecimiento

La ecuación de crecimiento exponencial

Durante la fase exponencial, cada célula da origen a dos células nuevas. La ecuación del crecimiento exponencial es:

$$x = x_0 2^Y \quad (1)$$

En donde x es la respuesta utilizada para medir el crecimiento (número de células, masa o algún componente celular). x_0 es el valor inicial en tanto que Y es el número de generaciones. Si se calcula el \log_{10} en ambos lados de la ecuación 1, entonces:

$$\log x = \log x_0 + 0.301Y \quad (2)$$

Si se considera a “g” como el tiempo de generación, es decir, el tiempo por generación, por lo tanto $g = t/Y$. Representado de otra manera sería $Y = t/g$. La ecuación 2 expresada en otros términos sería:

$$\log x = \log x_0 + (0.301/g)(t) \quad (3)$$

La ecuación anterior corresponde a la de una línea recta, de manera que cuando se grafica x en función de t, la pendiente es $0.301/g$ y la ordenada al origen es x_0 .

En la fase logarítmica, las células se dividen a una velocidad constante. Debido a que los cambios en el número de células son dependientes del tiempo, se tiene que:

$$dx/dt = kx, \quad \text{ó} \quad dx/x = kdt \quad (4)$$

Integrando la ecuación 4:

$$\ln x = kt + \ln x_0 \quad \text{ó} \quad x = x_0 e^{kt} \quad (5)$$

Si se transforman a \log_{10} ambos miembros de la ecuación (5):

$$\log x = 0.4342(kt) + \log x_0 \quad \text{ó} \quad \log x = kt/2.303 + \log x_0 \quad (6)$$

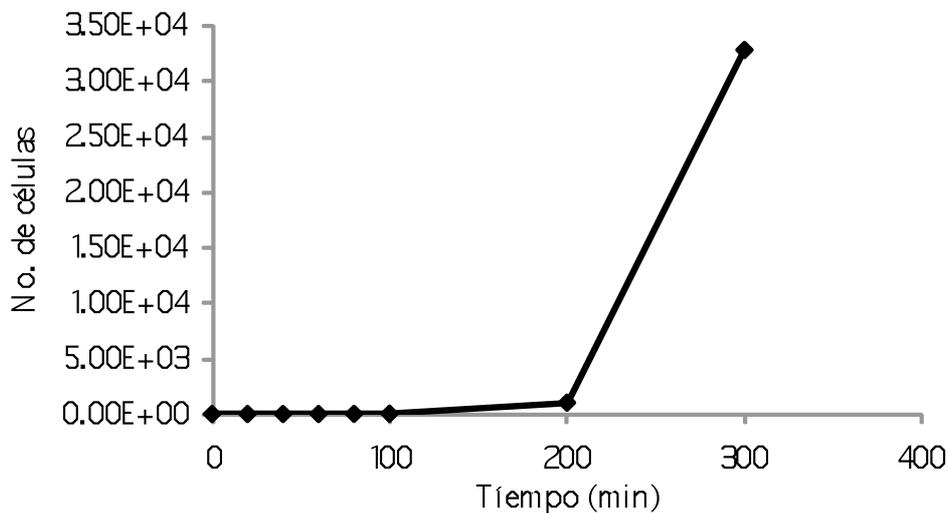
La ecuación (6) también da una línea recta como en la ecuación (3). Ya que la pendiente en este caso es igual a $0.301/g$, $k = 0.693/g$. Entonces, k y g varían de manera recíproca con la constante de proporcionalidad de 0.693 .

A continuación se presenta un ejemplo en el que se consideran las premisas anteriores. En la tabla A1 se muestran los datos de la duplicación de *E. coli*. Cada uno de los exponentes de la tabla representa el logaritmo en base 2 del número de células correspondientes.

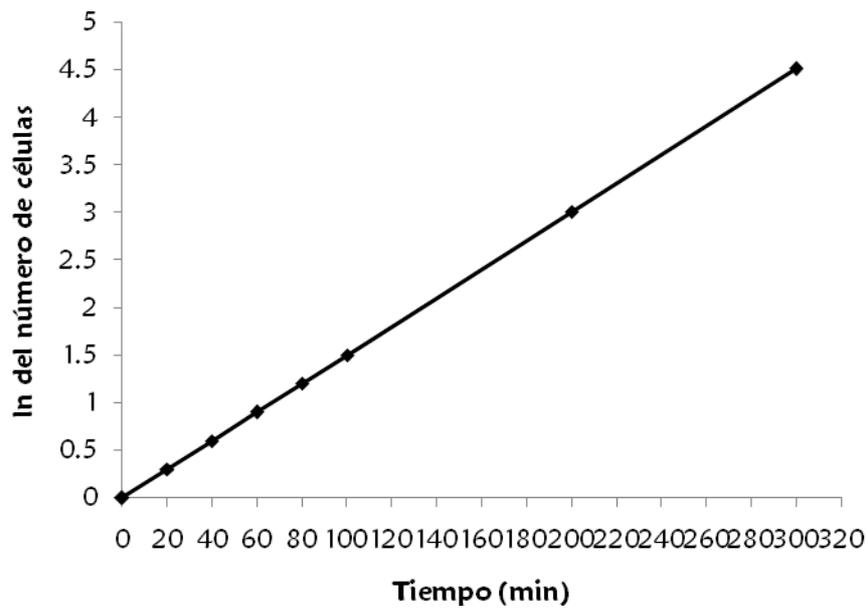
Tabla A1. Incremento del número de células con el tiempo para *E. coli* creciendo en condiciones óptimas en fase logarítmica.

Tiempo (min)	0	20	40	60	80	100	200	300
No. de generaciones (rondas de división celular)	0	1	2	3	4	5	10	15
No. de células	1	2	4	8	16	32	1024	32768
No. de células como potencia de 2	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^{10}	2^{15}

Si se grafican los datos de número de células como función del tiempo en una escala aritmética simple, no refleja el gran número de células:



Por otro lado, si se grafican en una escala logarítmica se obtiene una línea recta como explica el modelo matemático:



La ecuación correspondiente a esta recta es:

$$\ln x = 0.015t \quad (7)$$

En donde 0.015, la pendiente, representa k , es decir, la velocidad a la que las células de *E. coli* se duplican. En virtud de que el número de células depende del tiempo, el coeficiente de correlación es 1.

Otra forma de calcular la pendiente, asumiendo la implicación de la ecuación (4), en la que los cambios en el número de células son función de los cambios del tiempo:

$$[\ln(\text{no. de células al } t_2) - \ln(\text{no. de células al } t_1)] / (t_2 - t_1) \quad (8)$$

Expresado de otra manera es:

$$\Delta \ln(\text{no. de células}) / \Delta t \quad (9)$$

Entonces, de los datos de la tabla A1, si se aplica la ecuación (9) se tiene que:

Tiempo (min)	No. de células	ln (número de células)	$\Delta \ln (\text{no. de células})/\Delta t$
0	1	0	-
20	2	0.301	0.015
40	4	0.602	0.015
60	8	0.903	0.015
80	16	1.204	0.015
100	32	1.505	0.015
200	1024	3.010	0.015
300	32,768	4.515	0.015

Así pues, tomando en cuenta las aseveraciones anteriores que fueron ilustradas con el ejemplo anterior, fue posible calcular la fase logarítmica de las cinéticas de crecimiento de *M. avium* y *M. abscessus*.

Nota: La explicación del modelo fue adaptada de la referencia no. 82. El modelo se tomó de la referencia no. 81.

Anexo II

Distribución de los puntos resueltos por 2D-PAGE por punto isoeléctrico

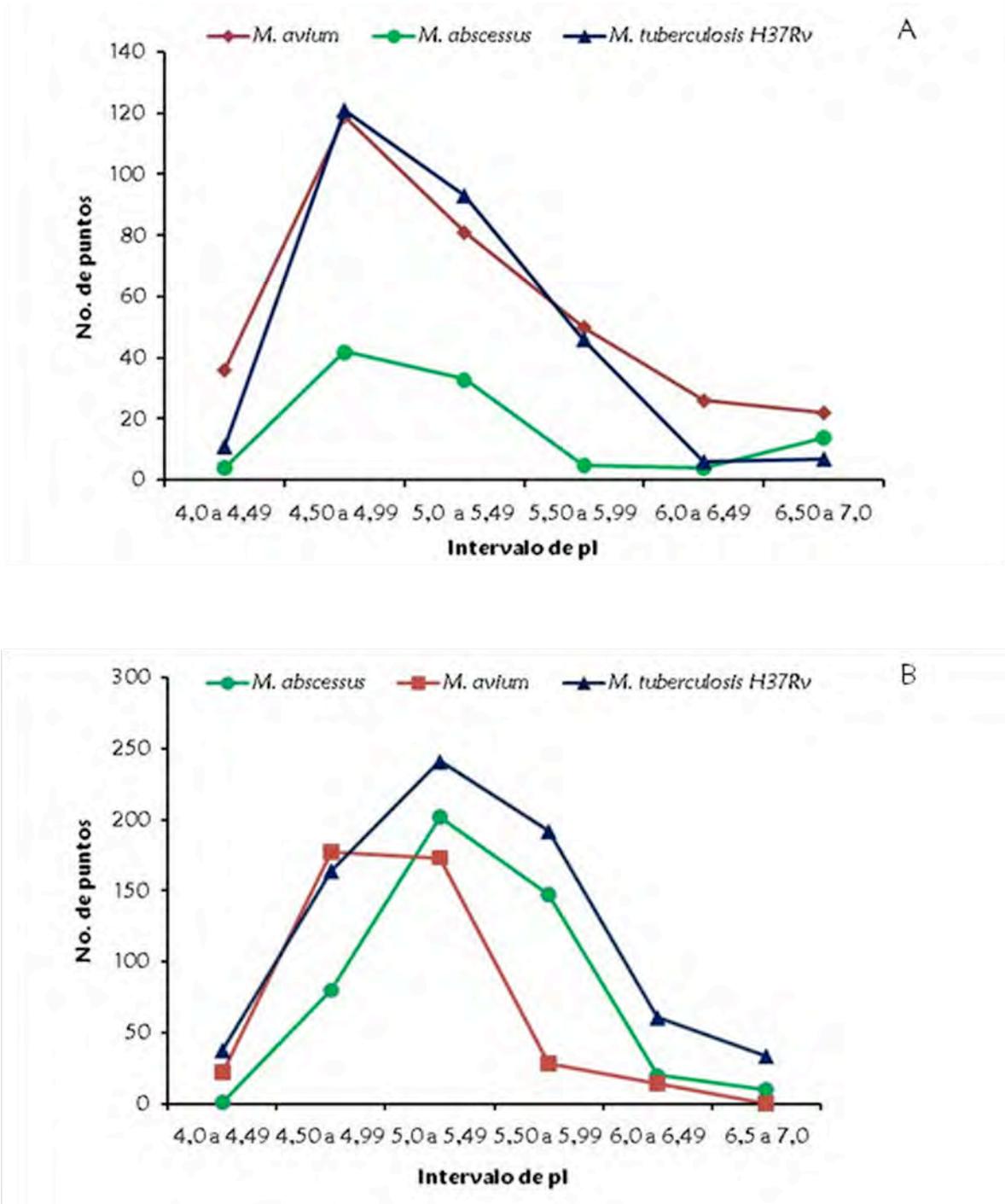


Figura A1. Distribución de los puntos por pI de A) filtrado de cultivo y B) extracto celular.

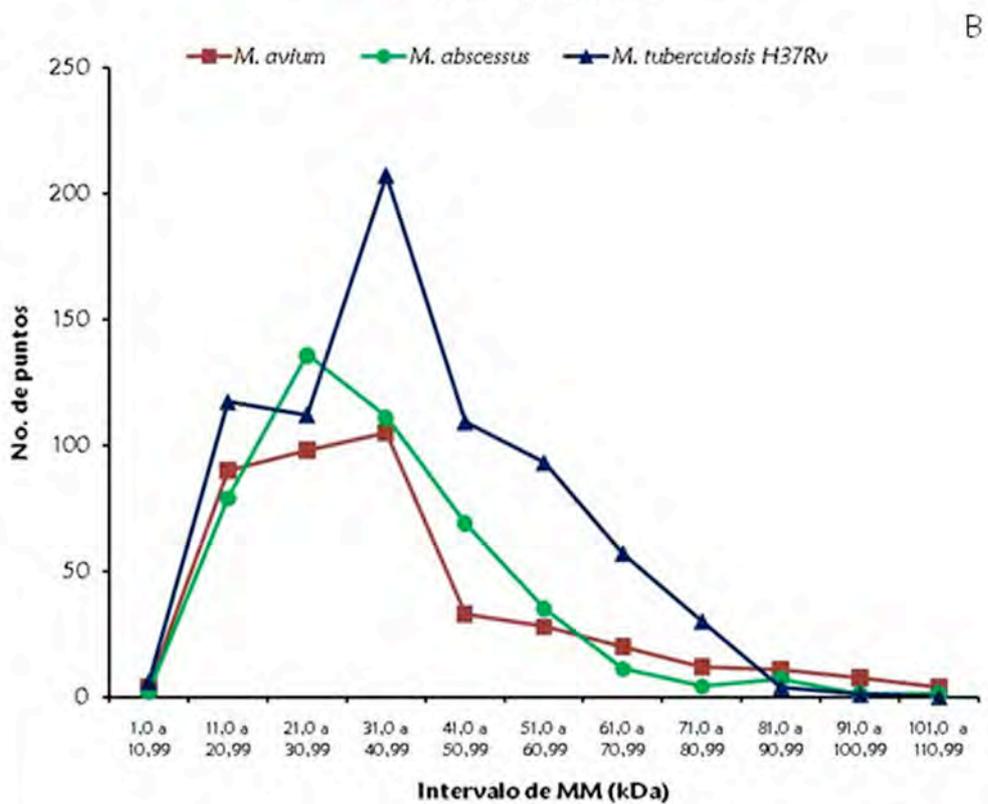
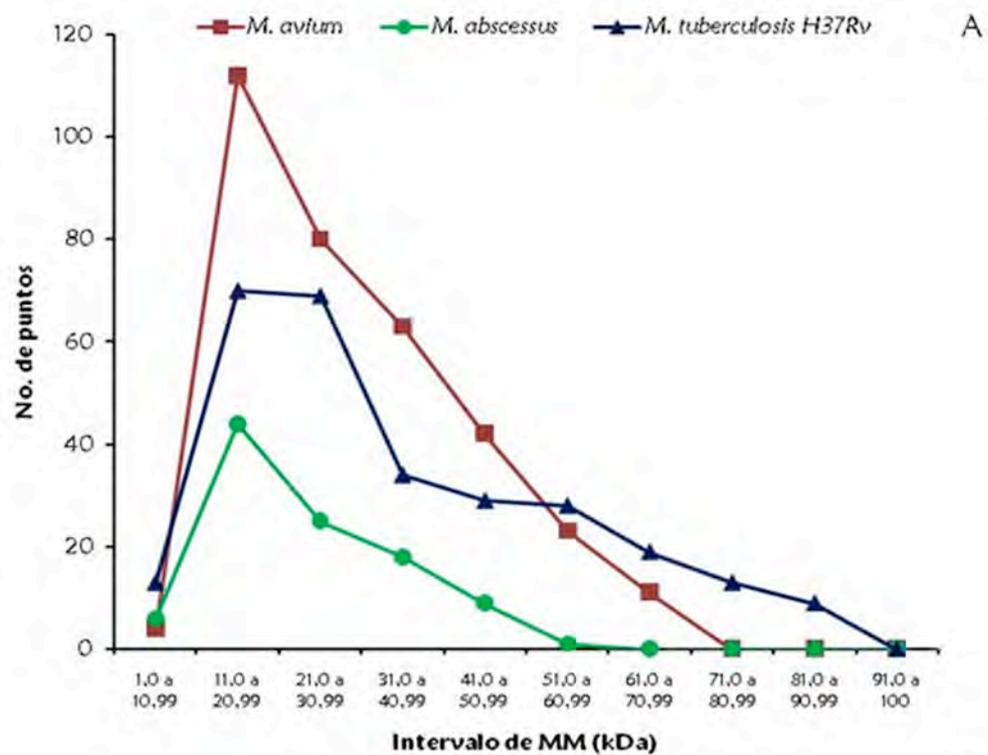


Figura A2. Distribución de los puntos por MM de A) filtrado de cultivo y B) extracto celular.

Anexo III

Datos de los genomas de las especies utilizadas en el presente trabajo*

Propiedad	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i> 104	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10	<i>M. abscessus</i>**
Tamaño del genoma (pb)	4,411,532	5,475,491	4,829,781	5,067,172
Contenido G+C (%)	65 %	68%	69%	64%
Molécula	DNA	DNA	dsDNA	DNA
Genes	4048	5313	4399	4970
Genes que codifican para proteínas	3989	5120	4350	4920
RNA estructural	50	50	49	50
Pseudogenes	8	143	Ninguno	Ninguno
Fecha	2001/09/07	2006/11/29	2001/12/27	2008/03/01

*Información obtenida de la página del NCBI (12/04/2009).

***M. abscessus* tiene un plásmido de 23,319 nucleótidos, con un 67% G+C; 21 genes que codifican para proteínas, sin RNA estructural ni pseudogenes.