



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS GLICOSILADAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG MÉXICO, PHIPPS Y TOKIO RECONOCIDAS POR TLR2 Y TLR4

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

VIRIDIANA GARCÍA RUIZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. enero, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS GLICOSILADAS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS*  
BCG MÉXICO, PHIPPS Y TOKIO RECONOCIDAS POR TLR2 Y TLR4

**RECONOCIMIENTOS**

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

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

Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Ciencias Químicas, UNAM
Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Durante mis estudios de maestría gocé de una beca otorgada por el CONACyT. Este trabajo fue apoyado por los proyectos de DGAPA IN227611 y IN214713-3, CONACyT SALUD 2007-C01-68729 y SALUD2010-C01-140998.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en enero 2015.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Baltazar Becerril Luján	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Julio César Carrero Sánchez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. María Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. Luz María López Marín	Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme continuar formando parte de su grupo de trabajo, por su asesoría, sus consejos, sus observaciones, su tiempo.

A la Dra. Patricia Orduña Estrada por sus comentarios, asesoría técnica y consejos.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico para asistir a los congresos.

A los miembros de mi jurado: Dra. Clara Espitia Pinzón, Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. Julio César Carrero Sánchez, Dra. María Soledad Funes Argüello y Dra. Luz María López Marín, por sus observaciones, comentarios y su tiempo para revisar mi tesis.

## DEDICATORIA

*A la Universidad Nacional Autónoma de México que me dio la oportunidad de seguir aprendiendo durante mis estudios de maestría y a los profesores que contribuyeron en mi formación académica.*

*A mi tía Mimi. Tía hermosa, sigues presente en nuestros corazones.*

*A mis padres (las personas que siempre dan sin esperar nada a cambio).*

- *Papi: muchas gracias por ser incondicional, por ayudarme, gracias por enseñarme a ser congruente, a luchar, a madurar, a dejar los miedos y tomar decisiones y que éstas tienen consecuencias... a ser libre.*
- *Mamita: muchas gracias por ayudarme, comprenderme, escucharme, enseñarme a dar siempre todo, a levantarme temprano y empezar con energía el día para hacer las cosas, por hacer mis días más felices con tu sentido del humor y por darme todo lo que necesité.*

*A mis hermanas Beatriz e Itzel. Gracias por su apoyo, sus risas, sus consejos, su amistad, su tiempo y su presencia.*

*A los mejores amigos que pude haber escogido en la vida: Abraham, Brenda, Evelin, Gonzalo, Iván, Jorge Lojero, Jorge Oscar, Karen, Oscar, Osmara y Tania, por ser la familia que escogí, por compartir miles de aventuras conmigo y por impulsarme con sus ejemplos.*

*A mis cuñados, abuelito, tías, tíos, primas, primos y sobrinos, ustedes que siempre están presentes en mis pensamientos.*

*A mis compañeros de laboratorio: Arturo, Claudia, Gaby, Tvette, Xatia, Xenia, Lalo, María, Marianela, Maribel, Marisa, Natalia, Raúl, René, Rubén, Ruth, Sebastian, Stephanie, Luis Contreras, Luis Salazar, Patty, Pafé, y Furiko, por hacerme sentir como en casa cuando estoy en el laboratorio, por su ayuda, sus consejos y sus risas.*

*Viridiana García Ruiz.*

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	vii
Resumen	viii
1. Introducción.....	1
1.1 Tuberculosis.....	1
1.1.1 Tuberculosis en México.....	1
1.1.2 Vacunación contra la tuberculosis.....	3
1.2 Complejo <i>M. tuberculosis</i> (CMT).....	3
1.2.1 Pared celular de las micobacterias.....	4
1.2.1.1 Material tipo cápsula.....	4
1.2.1.2 Ácidos micólicos.....	5
1.2.1.3 Arabinogalactana.....	6
1.2.1.4 Peptidoglicano.....	6
1.2.1.5 Membrana celular.....	6
1.3 <i>M. bovis</i> BCG.....	7
1.3.1 Características morfológicas de las cepas BCG.....	8
1.3.2 Características bioquímicas de las cepas BCG.....	8
1.3.3 Características genotípicas de las cepas BCG.....	10
1.3.4 Características proteicas de las cepas BCG.....	11
1.3.5 Características inmunológicas de las cepas BCG.....	12
1.4 Glicosilación.....	12
1.4.1 Tipos de glicosilación.....	13
1.4.1.1 N-glicosilación.....	13
1.4.1.2 O-glicosilación.....	14
1.4.2 Glicosilación en micobacterias.....	14
1.5 Importancia de las estructuras glicosiladas en el reconocimiento por receptores.....	15 15
1.5.1 Receptores que reconocen estructuras glicosiladas.....	16
1.5.1.1 TLRs.....	16
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general.....	20
4.1 Objetivos particulares.....	20
5. Metodología.....	21
5.1 Cultivo de las cepas BCG.....	21

5.2	Obtención de las proteínas de pared celular de las cepas BCG.....	21
5.3	Cultivo de la línea celular 293-hTLR2-CD14 y 293-hTLR4-MD2-CD14....	22
5.4	Ensayo de ligandos.....	23
5.5	Separación de proteínas en geles de 1D.....	24
5.6	Transferencia de proteínas de pared celular de las cepas BCG.....	25
5.7	Identificación de proteínas glicosiladas de pared celular de las cepas BCG en geles de 1D.....	25
5.8	Identificación de proteínas de pared celular de BCG México por espectrometría de masas.....	27
6.	Resultados.....	29
6.1	Cultivos de cepas BCG.....	29
6.2	Obtención de proteínas de pared celular de las cepas BCG.....	29
6.3	Proteínas de las cepas BCG que se unieron a células que sobre- expresan TLRs.....	31
6.4	Proteínas de pared celular de las cepas BCG glicosiladas.....	34
6.5	Identificación de proteínas secuenciadas de BCG México por espectrometría de masas.....	38
7.	Discusión.....	40
8.	Conclusiones.....	48
9.	Anexos.....	49
9.1	Medio sólido Middlebrook 7H10.....	49
9.2	Tinción de Ziehl-Neelsen.....	49
9.3	Medio líquido Sauton.....	50
9.4	Medio DMEM.....	50
9.5	Conteo celular en cámara de Neubauer.....	50
9.6	Solución amortiguadora de fosfatos PBS.....	51
9.7	Solución amortiguadora TDSET.....	51
9.8	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	51
9.9	Curva patrón para determinar la cuantificación de proteínas de pared....	52
9.10	Solución de mantenimiento de las células.....	52
9.11	Solución de tinción con Silver-Blue.....	52
9.12	Funciones de las proteínas de pared celular de BCG México identificadas por espectrometría de masas.....	53
10.	Referencias.....	56

## ABREVIATURAS

1D	Geles en una dimensión
2D	Geles en dos dimensiones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Fosfatasa Alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
C-	Carboxilo terminal
CLRs	Receptores tipo lectina-C
DMEM	Medio modificado Dulbecco's Modified Eagle
DO	Densidad óptica
DU	Unidades de duplicación
Gbps	Proteínas de unión a glicanos
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Agua desionizada
HEK 293 TLR2	Células HEK 293 que sobre-expresan receptores TLR2
HEK 293 TLT4	Células HEK 293 que sobre-expresan receptores TLR4
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-	Interleucina
MAA	Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i>
MAL	MyD88 adaptador similar
N-	Amino terminal
N-	Glicosilación de tipo N-
ND	No determinado
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NOD	Receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido
O-	Glicosilación de tipo O-
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de iones hidrógeno
PPD	Purificado protéico del cultivo de <i>M. tuberculosis</i>
PRRs	Receptor de patrones de reconocimiento
RD	Regiones deletadas
REDOX	Óxido-reducción
RLRs	Receptores tipo Gen Inducible-ácido retinóico
SDS-PAGE	Geles desnaturizantes de poliacrilamida
SFB	Suero fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TBS	Solución amortiguadora de Tris-Base
Th1	Linfocitos Th1
Th2	Linfocitos Th2
THP-1	Línea celular THP-1
Ticam1	TIR- dominio que contiene molécula adaptadora 1
TIR	Dominio para señalización homólogo al receptor
TIRAP	TIR- de dominio que contiene molécula adaptadora
TLR	Receptores tipo Toll
TN	Toda la noche
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	TIR adaptador de inducir interferón $\beta$
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
ZN	Tinción Ziehl-Neelsen

## RESUMEN

La vacuna *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) es la única vacuna disponible para prevenir la tuberculosis, sin embargo, muestra una eficacia protectora del 0-80% contra la tuberculosis pulmonar. Existen diversas cepas BCG, las cuales presentan diferencias inmunológicas, genéticas, bioquímicas y proteicas. Algunas proteínas tienen modificaciones postraduccionales como la glicosilación, que les confieren una microheterogenicidad. Se han realizado estudios con algunas bacterias del complejo *M. tuberculosis* (CMT), al cual también pertenecen las cepas BCG, en donde se han identificado y reportado proteínas glicosiladas con manosa y ácido siálico, glicosilaciones importantes en el reconocimiento de estas bacterias por las células del hospedero.

Hasta el momento se conoce que las proteínas glicosiladas de las cepas BCG son reconocidas por diferentes receptores como los Receptores Tipo Toll (TLRs), los receptores tipo lectinas y el receptor de manosa. Los TLR-2 y TLR-4 son los receptores más estudiados en la interacción hospedero-micobacterias, ya que son capaces de reconocer diferentes estructuras de la pared celular como lipoproteínas y lipoarabinomanana por TLR-2 y proteínas glicosiladas por TLR-4.

En este proyecto se obtuvieron las proteínas de la pared celular de las cepas BCG México, Phipps y Tokio. Posteriormente, se realizó un ensayo de ligandos en el cual se pusieron en contacto las proteínas de la pared celular obtenidas previamente con células que sobre-expresan TLR-2 (HEK293-TLR2) o células que sobre-expresan TLR-4 (HEK293-TLR4). El tipo de glicosilación de las proteínas que fueron capaces de unirse a los receptores TLR-2 y TLR-4 fue determinado con dos diferentes lectinas; aglutinina de *Galanthus nivalis* y *Maackia amurensis*. Los resultados obtenidos mostraron que las proteínas de pared celular de las cepas BCG México, Phipps y Tokio que interaccionan con TLR-2 y/o TLR-4 presentan glicosilaciones de tipo manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y/o ácido siálico unido (2-3) a galactosa.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que se transmite por vía aérea y es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. La transmisión se da a través de gotas de saliva expulsadas al toser o estornudar por un individuo enfermo (Conditions, 2006; WHO, 2013). El número de casos nuevos de tuberculosis a nivel mundial en el 2012 fue de 8.6 millones (Ver Figura 1), de las cuales 1.3 millones de personas murieron por esta enfermedad y 320,000 murieron co-infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (WHO, 2012).

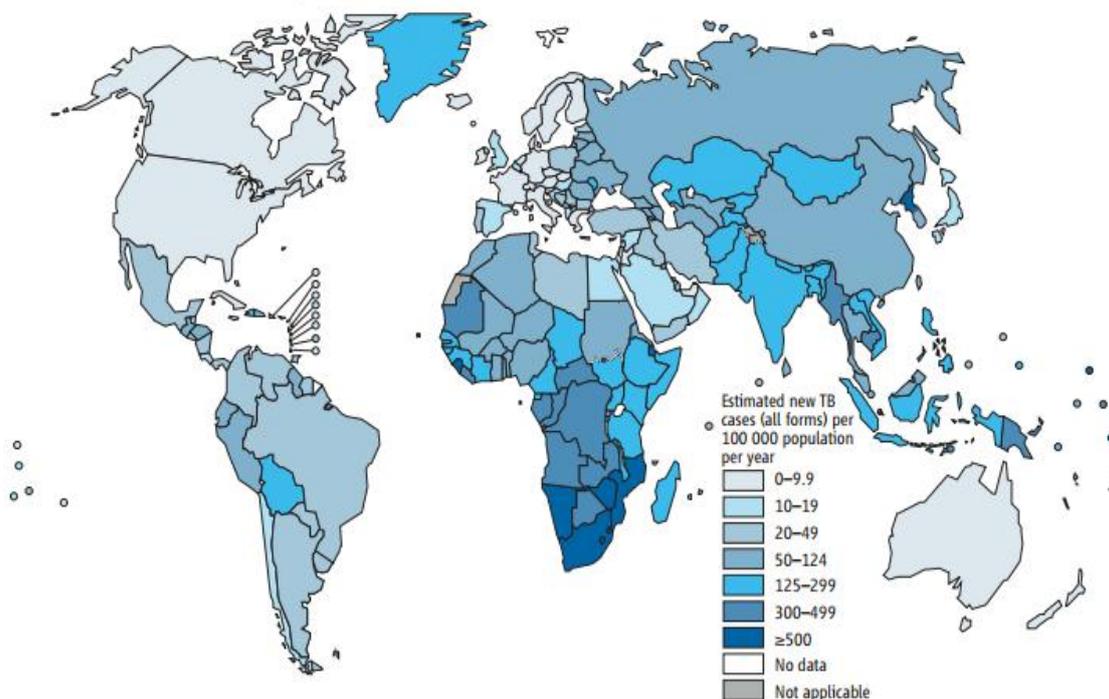
*M. tuberculosis* ingresa al organismo a través de los pulmones y se disemina vía torrente sanguíneo, el sistema linfático o por extensión directa a otros órganos. La tuberculosis pulmonar es la forma más contagiosa de la enfermedad y constituye más del 80% de los casos (Aït-Khaled N, 2010), el resto corresponde a tuberculosis meníngea y tuberculosis extra-pulmonar, denominada miliar (Mehta, Dutt, Harvill, & Mathews, 1991). Se considera que un caso de tuberculosis pulmonar que no recibe tratamiento infecta al año de 10 a 15 personas (Salud, 2013). De las personas que están infectadas con *M. tuberculosis*, alrededor del 10% desarrolla la enfermedad en alguna etapa de su vida (Aït-Khaled N, 2010; CENAVE, 2008; José A. Caminero Luna, 2002). Debido a lo anterior, la tuberculosis pulmonar es considerada un problema de salud pública.

#### 1.1.1 Tuberculosis en México

En México, la incidencia de la tuberculosis fue de 21,426 casos en el año 2012, de los cuales 80.7% fueron de tuberculosis pulmonar, 1.5% de tuberculosis meníngea y 17.8% de tuberculosis extra-pulmonar. De acuerdo al Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) de la Secretaría de Salud (SS), la incidencia de tuberculosis mostró un incremento del año 1990 a 1997. Posteriormente, se presentó una disminución hasta el año 2006, año a partir del cual la incidencia de tuberculosis se ha mantenido constante (Figura 2) (Salud, 2012).

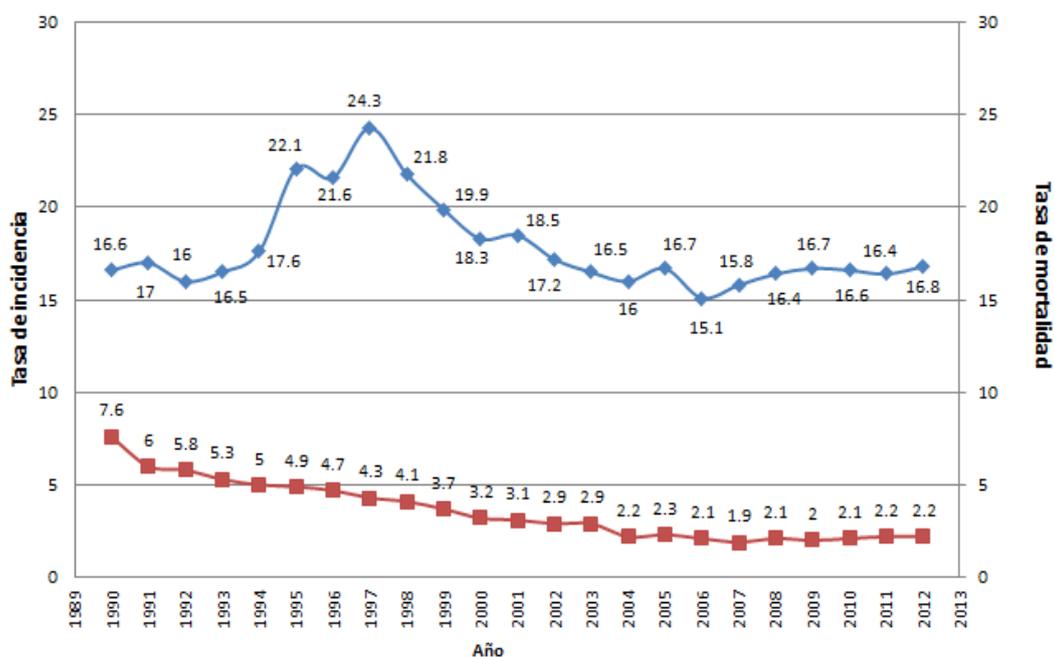
En México, la proporción de la incidencia de tuberculosis entre hombres y mujeres es 1:1.5. Adicionalmente, la tuberculosis afecta principalmente a la población

entre los 15 y 45 años de edad, presentándose una mayor mortalidad en los extremos de la vida (Claudia, 2004; Córdova-Villalobos José Ángel, 2009).



**Figura 1.** Mapa de la tasa de incidencia de la tuberculosis a nivel mundial en el año 2012. En la imagen se representan en colores los nuevos casos de tuberculosis en todas sus formas por cada 100,000 habitantes por año (WHO, 2012).

### Incidencia y mortalidad de la tuberculosis en todas sus formas en México



**Figura 2.** Gráfica de la tasa de incidencia de la tuberculosis en todas sus formas en México, de 1990-2012. Gráfica realizada con los resultados publicados en la CENAPRE, SS. La tasa se encuentra representada en casos por cada 100,000 habitantes, la incidencia se muestra en la línea azul y la mortalidad en la línea roja (Salud, 2012).

### 1.1.2 Vacunación contra la tuberculosis

La vacuna BCG es la única vacuna disponible hasta el momento para la prevención de la tuberculosis. Ésta presenta una eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar que va desde 0-80% a nivel mundial (Colditz et al., 1994), mientras que para la tuberculosis miliar y meníngea es de alrededor del 80% (Andersen & Doherty, 2005; Aronson & Schneider, 1950). Actualmente, la cobertura global de vacunación con BCG es mayor al 80% en países endémicos. Aunque la BCG es utilizada en humanos desde 1921, en México se comenzó a aplicar a la población general desde 1950 (Luca & Mihaescu, 2013). La administración de la BCG es por vía intradérmica y se aplica en niños de 0-1 años de acuerdo a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2004).

### 1.2 Complejo *M. tuberculosis* (CMT)

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. La bacteria *M. tuberculosis* forma parte del CMT que comprende 7 especies estrechamente relacionadas y responsables de la tuberculosis en diferentes hospederos (Brosch et al., 2002). Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos, inmóviles, pleomórficos (rectos o ligeramente curvos), no capsulados y no forman esporas ni flagelos. Además poseen una pared gruesa, con un elevado contenido lipídico que supone el 60% del peso seco de la micobacteria, constituida por cuatro capas que se mencionan con detalle a continuación.

Las micobacterias del CMT presentan en su genoma un alto contenido de G+C (61-71%) y tienen un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias genéticas idénticas de ARN ribosomal 16S (*16S ARNr*). Se han identificado deleciones específicas y mutaciones en genes como: *katG*, *gyrA*, *oxyR*, *pncA* y *mmp16*, así como, 15 regiones de diferencia (RD) a partir de *M. tuberculosis* y las diferentes especies del CMT, que son regiones deletadas (Brosch et al., 2002). Cada una de las especies del CMT difiere en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. Así, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* infectan al humano, *M. bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina y en algunos países como en México, a humanos (Macias Parra et al., 2011), *M. microti* causa tuberculosis en ratones de campo (Brosch et al., 2002; de Jong, Antonio, & Gagneux, 2010), *M. caprae* afecta a cabras y los hospederos de *M. pinnipedii* son leones marinos y focas (Hershberg et al., 2008), sin embargo, *M.*

*canetti*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedii* también fueron encontradas en humanos (Djelouadji, Raoult, Daffe, & Drancourt, 2008). En éste grupo se encuentra la vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin).

### 1.2.1 Pared celular de las micobacterias

Todas las micobacterias, tienen diferentes componentes que forman su pared celular y que les confieren características como; impermeabilidad a diferentes componentes, transporte selectivo y resistencia a medicamentos (Hett & Rubin, 2008) (Ver Figura 3).

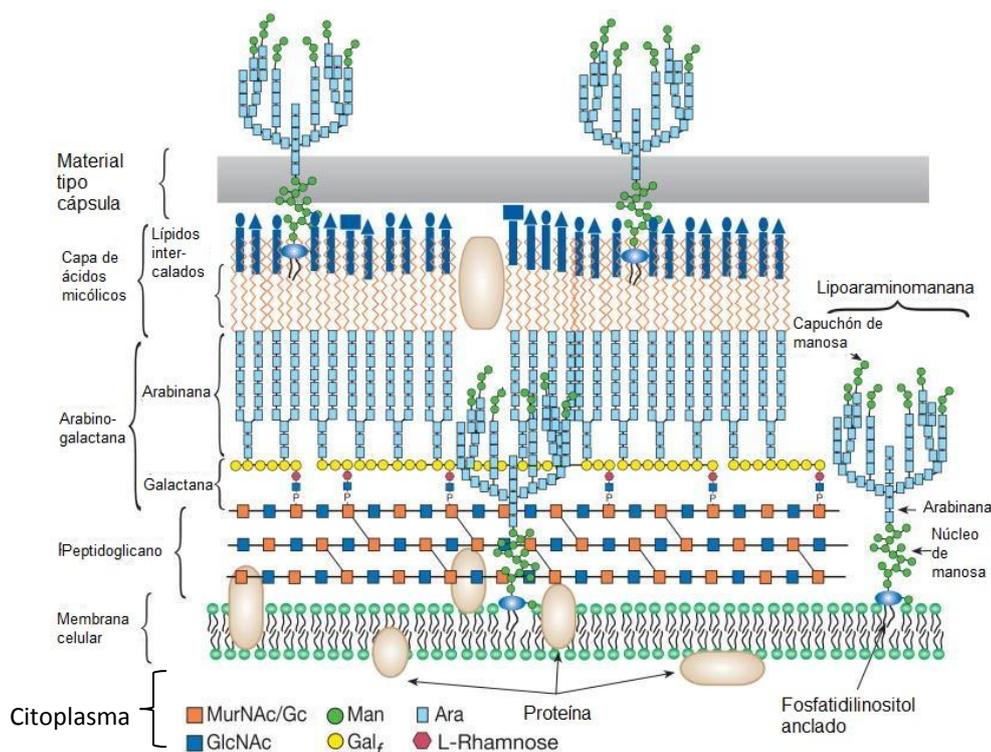
La capa interna de la pared celular está constituida de peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico. Esta capa da rigidez y forma a la bacteria. También posee arabinogalactanas que se encuentran unidos a los ácidos micólicos, los cuales son ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono) con una gran importancia taxonómica. La capa más externa (material tipo cápsula) de la pared se encuentra constituida por lípidos como el “*factor cordón*” (trehalosa 6, 6'-dimicolato) y por mucósidos. En conjunto, esta composición de la pared le confiere a las micobacterias una escasa permeabilidad celular que es responsable, entre otras cosas, de la ineficacia de múltiples agentes antimicrobianos, así como, de la característica de ácido-alcohol resistencia (BAAR) que presentan las micobacterias. Esto último resulta útil para la identificación de las micobacterias al microscopio. Además, determinados componentes de la pared, como el lipoarabinomanana, intervienen en la patogenia y favorecen la supervivencia del microorganismo en el interior de los macrófagos (Barksdale & Kim, 1977; Esko, Doering, & Raetz, 2009; Manuel Casal, 2009).

A continuación se describen de manera detallada los diferentes componentes de la pared celular de las micobacterias (ver Figura 3).

#### 1.2.1.1 Material tipo cápsula

La capa externa en las micobacterias contiene principalmente proteínas, polisacáridos, pequeñas cantidades de lípidos, proteasas y lipasas implicados en la adhesión celular, penetración de los bacilos en la célula huésped y patogenicidad. El

material tipo cápsula también representa una barrera pasiva al impedir la difusión de macromoléculas hacia el interior al igual que enzimas secretadas potencialmente implicadas en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, en particular la catalasa/peroxidasa y superóxido dismutasa, que participan en la resistencia activa de la micobacteria a los mecanismos microbicidas del hospedero (Daffe & Draper, 1998; Daffe & Etienne, 1999).



**Figura 3.** Estructura de la pared celular de las micobacterias. Las capas (del exterior al interior) son: material tipo cápsula, ácidos micólicos con lípidos intercalados, arabinogalactana, peptidoglicano y membrana celular. En la pared celular se encuentran embebidas proteínas y lipoarabinomana (Esko et al., 2009).

### 1.2.1.2 Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos son importantes en la supervivencia de *M. tuberculosis* ya que le confieren resistencia contra los fármacos hidrofóbicos, deshidratación y ayudan a que la micobacteria evada el sistema inmune del hospedero. Los ácidos micólicos son ácidos grasos que contienen diferentes grupos funcionales como son los dobles enlaces (ceto, éster, epoxi, metoxi) y el anillo de ciclopropano. Los  $\alpha$ -ácidos, ceto-ácidos y metoxi-micólicos son las clases principales de ácidos micólicos, cada uno de ellos difiere en su capacidad para atraer neutrófilos y macrófagos e inducir o adoptar una estructura antigénica para el reconocimiento de anticuerpos. Los ácidos micólicos, pertenecen a una familia de más de 500 especies, poseen de 60-90 átomos de

carbono y se les llama también ácidos eumicólicos (de Souza et al., 2008; Kaur, Guerin, Skovierova, Brennan, & Jackson, 2009; Verschoor, Baird, & Grooten, 2012).

### **1.2.1.3 Arabinogalactana**

La función sugerida de la arabinogalactana es el anclaje de los ácidos micólicos al peptidoglicano. La función de la galactana aún es desconocida, aunque se sugiere que participa en la producción de la región hidrofóbica entre las capas de peptidoglicano y ácidos micólicos. El modelo más reciente de esta estructura indica que contiene 125 residuos glicosilados distribuidos en un dominio de galactana que consiste de 30 residuos de galactofuranosa (Gal $f$ ); 3 dominios arabinana, con 31 residuos de arabinofuranosa (Ara $f$ ); y una unión específica que asegura la unión covalente al peptidoglicano que está formada de un residuo de ramnosilo unido a un residuo de N-acetilglucosaminosil-1fosfato. La galactana está formada de unidades repetidas del disacárido  $\{\rightarrow 6\text{-D-Gal}\beta 1\rightarrow 5\text{-DGal}\beta 1\}$  (Kaur et al., 2009).

### **1.2.1.4 Peptidoglicano**

Existen dos modelos de la estructura secundaria del peptidoglicano. Uno predice que el peptidoglicano y la galactana son paralelos a la membrana plasmática. Esta orientación concuerda con los modelos tradicionales. Sin embargo, el otro modelo sugiere que el peptidoglicano y las cadenas de arabinogalactana están en espiral y perpendicular al plano de la membrana plasmática. Existen evidencias que soportan ambos modelos, lo cual continúa siendo un tema de debate. El peptidoglicano es un polímero complejo que forma una capa rígida fuera de la membrana que proporciona la forma celular y la fuerza para soportar la presión osmótica, también es considerado un andamio para las estructuras que conforman la pared celular. El peptidoglicano está compuesto por cadenas lineales de N-acetil- $\alpha$ -D-glucosamina (GlcNAc) y ácido murámico sustituidos con cadenas laterales de péptidos que están fuertemente ligados para proporcionar integridad estructural (Kaur et al., 2009; Mishra, Driessen, Appelmelk, & Besra, 2011).

### **1.2.1.5 Membrana celular**

La membrana celular es una bicapa lipídica donde se encuentran proteínas que están involucradas en metabolismo y procesos de biosíntesis. (Gu et al., 2003) En esta estructura se encuentran embebidas proteínas implicadas en la virulencia (GroEL-1 y

GroEL-2), metabolismo de lípidos (FadD2), transportadores (PstS) y algunas proteínas hipotéticas conservadas (S. Sinha et al., 2002).

### 1.3 *M. bovis* BCG

La vacuna BCG fue desarrollada por Albert Charles Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur en Lille, Francia a principios del siglo XX. Calmette y Guérin trabajaron durante 13 años con una cepa de *M. bovis* aislada de mastitis bovina realizando 230 cultivos subsecuentes de la cepa en un medio de cultivo de papa glicerizada adicionado con bilis de buey, lo que llevó a la obtención de una cepa atenuada en comparación con la cepa virulenta de *M. bovis* (Behr & Small, 1999).

En la primera inoculación reportada (antes de la primera vacunación notificada) (Toida, 2000) se informó que un hombre no identificado recibió 44,000 bacilos por vía intravenosa, resultando "inofensivos". Posteriormente, en 1921 Weil y Hallein realizaron con éxito la vacunación de un niño, lo que llevó a la vacunación de 664 niños en 1924. A partir de éste año la cepa de la vacuna BCG fue distribuida a nivel mundial con la finalidad de prevenir la tuberculosis (Bonah, 2005; Hawgood, 1999; Toida, 2000).

A partir de que se comprobó la pérdida de la virulencia de la cepa de *M. bovis*, y de la eficacia para prevenir la muerte causada por la tuberculosis, la BCG se distribuyó a diferentes países del mundo, originando diferentes cepas BCG. Los nombres que recibieron los cultivos de las cepas BCG fueron asignados de acuerdo al país que la recibió, al Instituto, laboratorio o la persona que se encargó del cultivo y preparación de la vacuna (Ritz & Curtis, 2009). Durante este período, las cepas BCG fueron preservadas por cultivos subsecuentes bajo diferentes condiciones y en diferentes medios, fue entonces cuando se observaron cambios a diferentes niveles entre las cepas BCG como morfológicos, genéticos, proteicos e inmunológicos (Rodríguez-Alvarez, Mendoza-Hernandez, Encarnacion, Calva, & Lopez-Vidal, 2009). Es importante señalar que la cepa BCG obtenida por Calmette-Guérin no existe más y en la actualidad sólo contamos con las cepas BCG mantenidas y cultivadas en laboratorios de diferentes países.

A continuación se mencionan a detalle las diferencias a entre las cepas BCG a diferentes niveles.

### **1.3.1 Características morfológicas de las cepas BCG**

Las cepas BCG difieren en cuanto al tamaño, textura y forma de las colonias observadas en medios de cultivo sólido, lo cual se debe a los diferentes métodos que se emplearon en cada laboratorio para preservar estas cepas. Existe un estudio en el cual se documentaron diferencias morfológicas cuando las cepas BCG se cultivan en medio mínimo Sauton, el cual se comparó con el crecimiento en papa glicerinada y se demostró que desde el cuarto pase las cepas BCG crecen en forma de gránulos, (en lugar de películas en la superficie del líquido), menos profusamente, con menor rapidez y el tamaño de los bacilos disminuye, al igual que su capacidad para producir reacciones locales en cobayos. Si después de esto se realiza un solo paso en medio con papa glicerinada, la BCG restaura sus características (Aronson & Schneider, 1950; Van Deirse & Senechal, 1950).

### **1.3.2 Características bioquímicas de las cepas BCG**

Las pruebas bioquímicas se utilizan como una técnica para la identificación de especies bacterianas. En el caso de las cepas BCG, recientemente se estudiaron ocho características bioquímicas: reducción de nitratos, niacina, catalasa, hidrólisis de Tween 80, ureasa, pirazinamidasas, la degradación de *p*-amino salicilato y la resistencia a hidracida del ácido 2-tiofeno carboxílico de catorce cepas BCG: Rusia, Moreau, Tokio, Sueca, Birkhaug, Danesa, Glaxo, México, Tice, Connaught, Montreal, Phipps, Australia y Pasteur. Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre las pruebas de reducción de nitratos, niacina e hidrólisis de Tween 80 (ver Tabla 1) (Hayashi et al., 2010). Estos cambios impactan en la susceptibilidad mostrada por las cepas al estrés ambiental, estrés oxidativo, estrés nitrosativo y cambios de pH entre las cepas BCG (Sohaskey & Modesti, 2009).

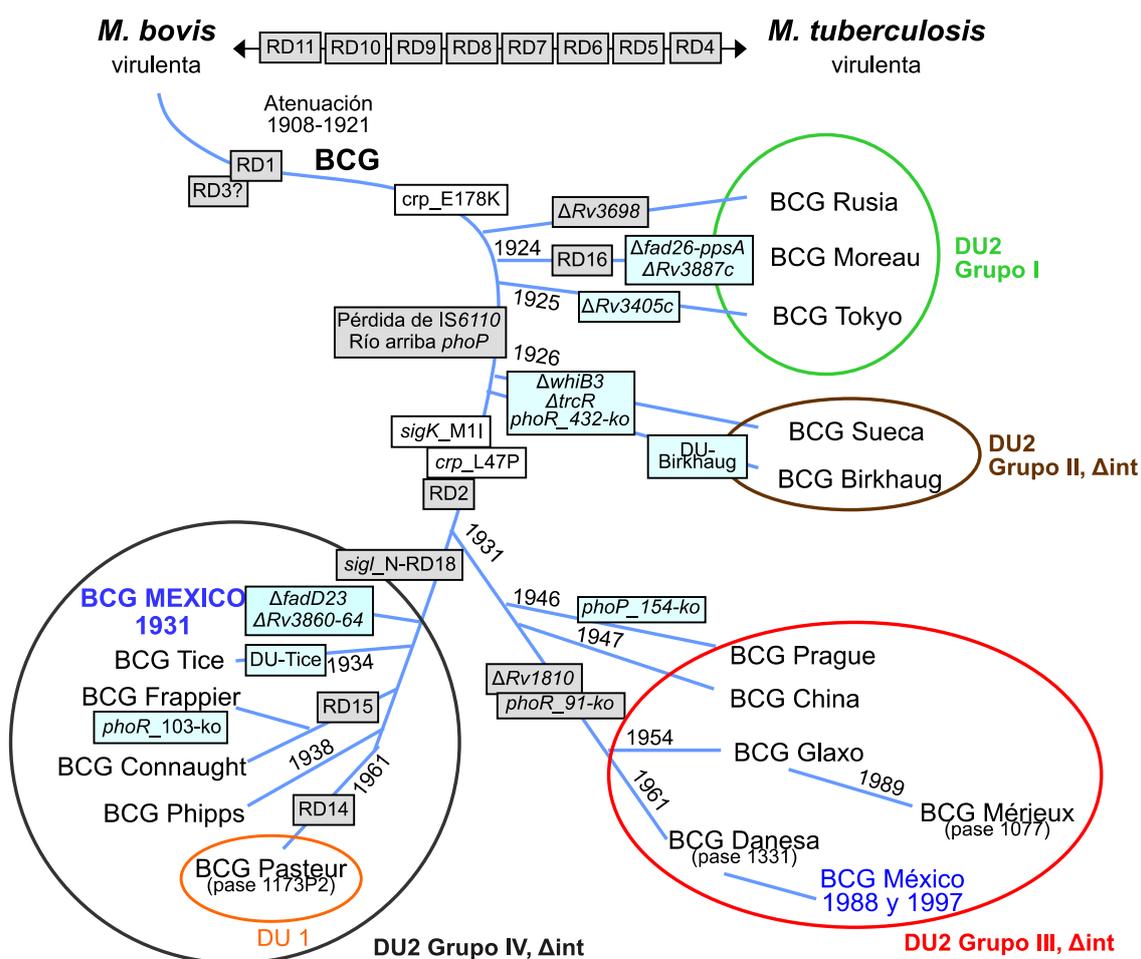
**Tabla 1.** Características bioquímicas de catorce cepas de *M. bovis* BCG (Hayashi et al., 2010).

Organismo	Reducción de nitratos	Acumulación de niscina	Hidrólisis de Tween 80	Ureasa	Pirazinamidasa		Degradación PAS	Resistencia a TCH (µg/mL)		Catalasa TA		Catalasa a 68°C	Tolerancia H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tolerancia a NO	pH óptimo	Viabilidad en THP-1		Viabilidad en BM	
					Día 4	Día 7		1	10	Columna de burbujas (mm)	actividad					-IFN-γ	+IFN-γ	-IFN-γ	+IFN-γ
BCG																			
Rusia	+	+	-	+	-	-	-	+	-	9.3±2.4	Bajo	-	+	-	6.6	+	+	+	+
Moreau	+	+	±	+	-	-	-	+	-	7.1±1.8	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Japón	+	+	-	+	-	-	-	+	-	14.8±2.3	Bajo	-	+	+	6.6	+	+	+	+
Sueca	+	+	±	+	-	-	-	+	-	6.7±1.7	Bajo	-	-	-	8-9	-	-	+	+
Birkhaug	+	+	-	+	-	-	-	+	-	11.8±2.3	Bajo	-	+	-	8-9	+	+	-	-
Danesa	+	-	±	+	-	-	-	+	-	9.4±2.4	Bajo	-	-	+	7-8	+	+	-	+
Glaxo	+	-	-	+	-	-	-	+	-	7.4±1.1	Bajo	-	-	+	7-8	-	-	-	-
Mexico	-	-	-	+	-	-	-	+	-	6.4±1.8	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tice	+	-	-	+	-	-	-	+	-	6.3±1.6	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Connaught	+	-	±	+	-	-	-	+	-	7.9±1.9	Bajo	-	+	-	7-8	-	-	-	+
Montreal	+	+	±	+	-	-	-	+	-	6.0±2.3	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phipps	+	+	±	+	-	-	-	+	-	6.0±2.2	Bajo	-	-	-	6.6	-	-	-	-
Australia	-	-	±	+	-	-	-	+	-	6.1±2.1	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pasteur	-	-	±	+	-	-	-	+	-	7.3±2.6	Bajo	-	-	+	6.6	+	+	-	+
<i>M. bovis</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	5.4±0.7	Bajo	-	+	+	6.6	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>																			
H37Rv	+	+	±	+	+	+	-	+	+	8.4±1.1	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
H37Ra	+	+	±	+	+	+	-	+	+	10.0±1.6	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. avium</i>																			
7245	-	-	-	-	+	+	-	+	+	35.8±13.0	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2151SmO	-	-	-	-	+	+	-	+	+	27.6±3.5	Bajo	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. smegmatis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	+	14.0±1.3	Bajo	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(+) Reacción positiva, (-) reacción negativa, (±) ligeramente positiva, (ND) no determinado, PAS; *p*-amino salicilato y TA; temperatura ambiente.

### 1.3.3 Características genóticas de las cepas BCG

Al comparar los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* se encontraron deleciones genéticas, RD que ya se habían encontrado en las cepas del complejo *M. tuberculosis*. Actualmente se han descrito alrededor de 15 RDs en las micobacterias del complejo. En cuanto a las RDs, la RD1 separa a las cepas BCG de la cepa virulenta de *M. bovis* (Mahairas, Sabo, Hickey, Singh, & Stover, 1996). La RD1 es una deleción de nueve genes, entre los que se encuentran: *pe35*, *ppe68*, *esat-6*, *cfp10*. Mientras que la RD2, separa a las cepas BCG tempranas de las tardías, siendo las primeras obtenidas antes de 1927 del Instituto Pasteur (Brosch et al., 2002). Además, se describieron dos duplicaciones en tándem (DU1 y DU2), las cuales presentan variaciones entre las cepas BCG (Brosch et al., 2000), siendo la DU1 única de BCG Pasteur.



**Figura 4.** Genealogía de las cepas BCG (Orduna et al., 2011). En esta imagen se agrupan las cepas BCG de acuerdo a tres características: las RDs, DUs y el año en que fueron obtenidas las cepas BCG a partir del Instituto Pasteur.

La secuenciación del genoma de BCG Pasteur 1173P2 y su posterior análisis permitió la construcción de una genealogía refinada de cepas BCG, la cual tiene como marcadores las regiones RD mencionadas anteriormente y la DU2, lo que permitió agrupar a las cepas BCG en cuatro grupos (DU2 tipo I-IV) de acuerdo al tamaño en las secuencias (ver Figura 4) (Brosch et al., 2000).

#### 1.3.4 Características proteicas de las cepas BCG

Diversos análisis proteómicos mostraron que existen diferencias en la expresión de proteínas entre cepas filogenéticamente relacionadas. El análisis de los proteomas de las fracciones celulares de BCG Danesa y BCG Phipps demostró que existen 168 proteínas únicas para BCG Danesa y 90 para BCG Phipps, de las cuales se identificaron por espectrometría de masas 13 y 4 proteínas para BCG Danesa y BCG Phipps, respectivamente. Las proteínas identificadas participan en la virulencia, detoxificación, adaptación, metabolismo de lípidos, síntesis de proteínas de pared celular y los procesos celulares, intermediarios del metabolismo y respiración, al igual que proteínas hipotéticas (Rodríguez-Alvarez et al., 2009).

La proteína inmunogénica MPB64 (MPB64) y proteína inmunogénica principalmente secretada (MPB70) son unas de las primeras proteínas inmunogénicas descritas en diferentes micobacterias. Las cepas BCG derivadas del Instituto Pasteur antes de 1927 secretan éstos antígenos; mientras que, las cepas BCG posteriores no las secretan, de ahí se clasificaron en dos grupos: BCG tempranas (Rusia, Moreau, Tokio, Sueca, Birkhaug) y BCG tardías (Praga, Mérieux, Danesa, Pasteur, Phipps, Connaught, Frappier, Tice y México) (Charlet et al., 2005; Toida, 2000).

La producción de los ácidos metoximicólicos es otra característica que permitió clasificar a las cepas BCG en tempranas y tardías. Las cepas BCG desarrolladas después de 1931 no producen estos ácidos debido a una mutación puntual en el gen *mma3* que codifica para la sintasa de ácidos metoximicólicos (Behr, Schroeder, Brinkman, Slayden, & Barry, 2000). Los ácidos metoximicólicos ayudan a las micobacterias a mantener la integridad celular, a evitar la deshidratación, evitar fármacos hidrofóbicos y al crecimiento en el interior del macrófago (de Souza et al., 2008).

### **1.3.5 Características inmunológicas de las cepas BCG**

Existe un gran número de estudios que se realizaron para conocer las diferencias entre las diferentes cepas BCG tanto de la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa. En este texto sólo mencionaré algunos ejemplos.

La protección que confieren las cepas BCG Pasteur, Danesa, México, Sueca, Tice, Phipps, Frappier, Connaught, Birkhaug y Moreau fueron estudiadas en un modelo murino de la tuberculosis pulmonar progresiva, donde se observó que BCG Phipps confirió una mayor protección a diferencia de BCG Tice. En este estudio BCG Phipps confirió una menor área neumónica, menor número de UFC en pulmón a los 2 ( $10^{5.32}$ ) y 4 meses ( $10^{5.68}$ ), en comparación con el control con  $10^{6.94}$  a los 2 y  $10^7$  a los 4 meses, una menor cantidad de citocinas proinflamatorias (IL-2, IFN- $\gamma$ ) y una mayor cantidad de citocinas anti-inflamatorias, (IL-4 e IL-10) (Castillo-Rodal et al., 2006).

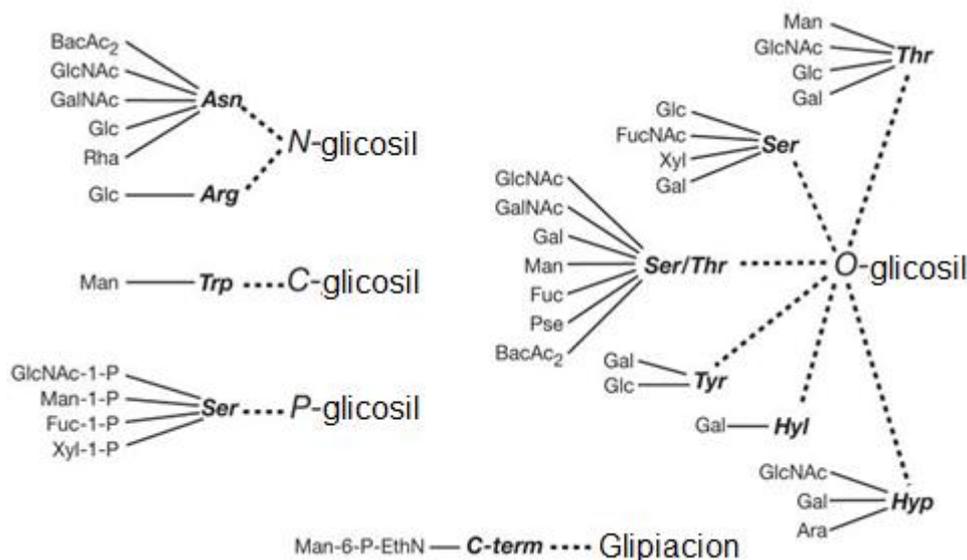
Adicionalmente Hayashi y colaboradores en el 2010, realizaron un estudio con las cepas BCG, donde mostraron que las cepas BCG tempranas (Rusia, Moreau, Tokio, Suecia y Birkhaug) conservan tres tipos de ácidos metoximicólicos en su pared celular ( $\alpha$ , metoxi y ceto), dichas cepas fueron las que tuvieron una mayor producción de óxido nítrico (especie reactiva de nitrógeno), IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  cuando se estimularon macrófagos de diferentes líneas celulares humanas (Hayashi et al., 2009).

## **1.4 Glicosilación**

La glicosilación es considerada una modificación postraduccional que consiste en la unión covalente de los hidratos de carbono a un polipéptido, lípidos, polinucleótidos o a un compuesto orgánico. Dicha unión es catalizada por enzimas denominadas glicosiltransferasas (Jones, Rosenberg, Betenbaugh, & Krag, 2009; Nothhaft & Szymanski, 2010; Stanley, Schachter, & Taniguchi, 2009).

Uno de los aspectos característicos de esta modificación postraduccional es el fenómeno de la microheterogeneidad (Figura 5). Este término indica la gran variedad de estructuras de azúcares adjuntas que forman los glicanos y el tipo de célula que las presentan, tanto eucariotas como procariontas. Ésta micro-heterogeneidad varía

considerablemente de sitio de glicosilación a otro, de la glicoproteína y de un tipo de célula a otro. Por lo tanto, una proteína existe en numerosas glicofomas, cada forma confiere diferente propiedad (Doz et al., 2007; Sweet et al., 2008).



**Figura 5.** Representación esquemática de los cinco tipos de glicosilación encontrados en la naturaleza (*N*-, *C*- *P*- *O*-glicosilación y gliptación). Azúcares encontrados en cada tipo de glicosilación: arabinosa (Ara), 2-acetamido-2,6-dideoxi-D-galactosa (BacAc<sub>2</sub>), fucosa (Fuc), *N*-acetilfucosamina (FucNAc), galactosa (Gal), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), glucosa (Glc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa (Man), ácido pseudamínico (pse), ramnosa (Rha) y xilosa (Xyl). Aminoácidos a los que se encuentran unidos los azúcares: arginina (Arg), asparagina (Asn), hidroxilisina (Hyl), hidroxiprolina (Hyp), serina (Ser), treonina (Thr), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Fosfato (P), residuo de aminoácido carboxi-terminal (*C-term*). Gliptación es el proceso por el que se añade un glicosilfosfatidilinositol (GPI) de anclaje a la membrana a una secuencia de azúcares que serán parte de una proteína (Varki & Sharon, 2009).

Existen diferentes tipos de glicosilación: en el carbono (*C*-), nitrógeno (*N*-), oxígeno (*O*-) y fósforo (*P*-), las formas más comunes son la *N*- y la *O*-. En las bacterias sólo se han descrito los tipos *N*- y *O*-. (Dell, Galadari, Sastre, & Hitchen, 2010; Nothaft & Szymanski, 2010; Stanley et al., 2009).

### 1.4.1 Tipos de glicosilación

#### 1.4.1.1 *N*-glicosilación

En la glicosilación de tipo *N*- el glicano está unido de forma covalente a las proteínas en un residuo de asparagina, mediante un enlace *N*-glicosídico. Cinco diferentes *N*-glicanos fueron reportados, de los cuales la *N*-acetilglucosamina es el más común (Asn-GlcNAcβ1) (Behr & Small, 1999; Weerapana & Imperiali, 2006).

La N-acetilglucosamina fue descubierta por el análisis bioquímico de las glicoproteínas más abundantes en el suero, como las inmunoglobulinas. Diferentes estudios muestran que no todas las asparaginas sufren el proceso de glicosilación, sino que la glicosilación ocurre en una secuencia consenso (Asparagina-X-Serina/Treonina) donde X es cualquier aminoácido, excepto prolina (Stanley et al., 2009).

#### 1.4.1.2 O-glicosilación

La O-glicosilación es una modificación común donde un glicano se une covalentemente a residuos de serina y treonina. Los O-glicanos se unen covalentemente a la N-acetilgalactosamina (GalNAc) en su forma  $\alpha$  en el residuo -OH de la serina o treonina mediante un enlace O-glucosídico (Hart & Akimoto, 2009).

En la glicosilación de tipo O- no existe una secuencia consenso debido a que hay diferentes transferasas involucradas en el proceso de glicosilación. Se sabe que residuos de prolina cercanos a los aminoácidos que sufren glicosilación favorecen las estructuras  $\beta$  y se propuso la glicosiltransferasa que reconoce a la prolina para llevar a cabo su función de transferencia de glicanos (Nothaft & Szymanski, 2010).

#### 1.4.2 Glicosilaciones en las micobacterias

Las proteínas glicosiladas o lípidos glicosilados que están expuestos fácilmente al sistema inmune del hospedero participan en la patogénesis de la enfermedad por micobacterias, estas estructuras glicosiladas evolucionaron para tener moléculas muy parecidas a células humanas (Torrelles & Schlesinger, 2010). Entre los azúcares que presentan las micobacterias se encuentra manosa y ácido siálico (Espitia & Mancilla, 1989; García-Ruiz, 2011), entre otros.

En un estudio reciente se demostró que la proteína adhesina Apa de *M. tuberculosis* con O-glicosilación es crucial para su antigenicidad de células T humanas al igual que en un modelo murino de infección en el cuál se determinaron citocinas anti-y pro-inflamatorias tras la inmunización con la proteína Apa sintética con y sin manosilación (Nandakumar et al., 2013).

En un estudio realizado por Mancilla y colaboradores, mostraron la presencia de proteínas glicosiladas mediante la unión de la lectina Concanavalina A, a proteínas de filtrado de cultivo separadas por electroforesis en geles de 1D. Se observaron proteínas glicosiladas con manosa en bandas de 55, 50 y 38 kDa, aproximadamente (Espitia & Mancilla, 1989). Una de estas proteínas de masa molecular 38 kDa, es la PstS-1 que demostró ser importante en la adhesión de las micobacterias a los macrófagos (Esparza et al., 2014).

La presencia de ácido siálico se observó en un trabajo previo realizado por García-Ruiz y colaboradores en el cuál realizó la identificación de proteínas glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) en *M. microti* y dos de sus recombinantes (*M. microti*-Ag85B y *M. microti*-PstS-1) en geles de 2D mediante el uso de la lectina MAA.

### **1.5 Importancia de estructuras glicosiladas en el reconocimiento por receptores.**

Las funciones biológicas de glicanos se dividen en dos categorías: 1) las propiedades estructurales y las propiedades moduladoras y 2) el reconocimiento por otras moléculas, es decir, las proteínas de unión a glicanos (Gbps). Las Gbps se dividen a su vez en dos grupos principales; 1) Intrínsecas, que reconocen glicanos del mismo microorganismo y 2) Extrínsecas, que reconocen glicanos de un organismo diferente. Las Gbps extrínsecas consisten especialmente en adhesinas microbianas de virulencia, aglutininas o toxinas, pero algunas también median relaciones simbióticas. También existe otra clasificación de receptores que reconocen glicosilaciones, los Receptores de Patrones de Reconocimiento (PRRs), entre los cuales se encuentran: TLR, Receptores tipo Gen Inducible-ácido retinóico (RLRs), Receptores tipo lectina-C (CLRs), receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótido (NOD) y sensores de DNA (Mahla, Reddy, Prasad, & Kumar, 2013). Dentro de estos receptores, algunos de los receptores que interaccionan con las micobacterias son los receptores tipo lectina, DC-SIGN, Scavenger, tipo NOD, tipo RIG-I, y TLRs.

### 1.5.1 Receptores que reconocen estructuras glicosiladas de micobacterias

Las micobacterias han evolucionado una serie de mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, por lo tanto son capaces de replicarse y sobrevivir a diferentes condiciones de estrés. Las micobacterias al entrar en contacto con el hospedero son reconocidas ya que las micobacterias cuentan con estructuras conservadas que se encuentran en su superficie denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

#### 1.5.1.1 TLRs

La familia de los TLR es la más estudiada dentro de los receptores de patrones de reconocimiento (PRRs). Se descubrieron originalmente sobre la homología con proteína Toll de *Drosophila melanogaster* de donde deriva su nombre. Las proteínas de *D. melanogaster* desempeñan un papel en la formación dorso-ventral durante la embriogénesis, así como, en la respuesta antifúngica. Estructuralmente, los TLR son glicoproteínas integrales caracterizadas por dos dominios; el primer dominio es de unión a algún ligando extracelular que contiene dominios ricos en leucina y el segundo dominio para señalización homólogo al del receptor (TIR). La unión a través de la interacción TLRs en la interacción PAMP y TLR provoca la oligomerización del receptor, que posteriormente desencadena la transducción de señales intracelulares. Hasta la fecha, se han identificado 10 TLRs en humanos, y cada uno de ellos reconocen distintos PAMPs derivados de diversos patógenos microbianos, incluyendo virus, bacterias, hongos y protozoarios. A continuación se muestra en la Tabla 2 el resumen la unión de los TLRs a su ligando (Mogensen, 2009).

La señalización de TLRs en la superficie de los macrófagos conduce a la contratación de varias proteínas adaptadoras incluidos MyD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88), TIRAP/MAL (TIR de dominio que contiene el adaptador / MYD88 adaptador similar), Ticam1/TRIF (TIR-de Dominio que contiene molécula adaptadora 1/TIR adaptador de inducir interferón beta), y TRAM (molécula adaptadora relacionados TRIF-). Esto conduce posteriormente a la activación de una serie de moléculas de señalización de la vía que culmina en la translocación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) en el núcleo y la activación de genes de respuesta inmune, tales como citocinas, quimiocinas, y la sintasa de óxido nítrico. La estimulación hacia TLR-2 conduce altos niveles de IL-10 e IL-12, generando una respuesta de tipo Th2 y

la estimulación hacia TLR-4 conduce altos niveles de IL-12 e IFN- $\alpha$ , generando una respuesta de tipo Th1 (Arentz & Hawn, 2007; Killick et al., 2013).

**Tabla 2.** Se muestran los tipos TLRs, la localización celular, estructuras y el origen de las estructuras que reconocen (Mogensen, 2009).

Receptor	Localización celular	Estructuras que reconocen	Origen de las estructuras que reconocen
TLR1/TLR2	Superficie celular	Triacil lipopéptidos	Bacteria
TLR2/TLR6	Superficie celular	Diacil lipopéptidos Ácido lipoteicoico	Mycoplasma Bacterias grampositivas
TLR2	Superficie celular	Lipoproteínas Peptidoglicano  Lipoarabinomanana Porinas Glicoproteínas de la envoltura Mucina GPI Fosfolipomanana Zymosan B-glicanos	Varios patógenos Bacterias grampositivas y gramnegativas Micobacterias <i>Neisseria</i> Virus  Protozoarios <i>Candida</i> Hongos Hongos
TLR3	Superficie celular/endosomas	dsRNA	Virus
TLR4	Superficie celular	LPS Glicoproteínas de la envoltura Glicoinositolfosfolípidos Manana HSP70	Bacterias gramnegativas  Protozoarios <i>Candida</i> Hospedero
TLR5	Superficie celular	Flagelina	Bacterias flageladas
TLR7/ TLR8	Endosoma	ssARN	Virus de ARN
TLR9	Endosoma	CpGADN	Virus, bacterias y protozoarios

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Debido a que las proteínas glicosiladas de las micobacterias desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento inicial del hospedero, resulta de interés determinar el perfil de proteínas glicosiladas presente en diferentes cepas BCG, que son reconocidas por células que sobre-expresan receptores TLR-2 y TLR-4, lo que contribuirá a explicar las diferencias en la respuesta inmune inducida por cada cepa BCG.

### **3. HIPÓTESIS**

Las cepas BCG México, Phipps y Tokio mostrarán diferencias en los perfiles de glicosilación de las proteínas reconocidas por los receptores TLR-2 y TLR-4.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los perfiles de glicosilación de las proteínas de pared de BCG México, Phipps y Tokio reconocidas por células que sobre-expresan TLR-2 y/o TLR-4.

##### **5.1 Objetivos particulares**

- a) Extraer las proteínas de pared celular de BCG México, Phipps y Tokio mediante métodos físico-químicos.
- b) Realizar el ensayo de ligandos entre las líneas celulares HEK293-TLR2 y HEK293-TLR4 y las proteínas de pared celular de BCG México, Phipps y Tokio.
- c) Identificar el tipo de glicosilación que tienen las proteínas de pared de BCG México, Phipps y Tokio capaces de unirse a las células HEK293-TLR2 y HEK293-TLR4 mediante la unión a lectinas.
- d) Secuenciar las proteínas de pared celular glicosiladas con manosa y/o ácido siálico unido (2-3) a galactosa mediante espectrometría de masas.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Cultivo de las cepas BCG**

Las cepas utilizadas durante el desarrollo experimental fueron las siguientes: BCG México, Phipps y Tokio. Cada cepa se cultivó en medio sólido Middlebrook 7H10 (Beckton-Dickinson, USA) a 37°C, en el cuál se observaron las características macroscópicas. A partir de las colonias aisladas se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen (Z-N) que permitió observar sus características microscópicas. Para ello, se utilizó el microscopio óptico, Leica DMLS™ (Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Germany).

Posteriormente, las cepas se cultivaron en medio líquido Sauton (ver anexo, sección 9.3) a 37°C, en agitación constante (150g) hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> entre 0.6 y 0.8, que corresponde a la fase media logarítmica de las cepas BCG y densidad óptica a la cual corresponde aproximadamente 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias. Una vez que las cepas BCG alcanzaron la D.O. antes mencionada, se realizó una tinción de Ziehl-Neelsen, donde se observaron sus características microscópicas y se corroboró que la morfología correspondía con la descrita en el paso anterior. Los medios de cultivo de cada una de las cepas BCG se cosecharon por centrifugación a 4°C, 5,000g, durante 15 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se conservó a 4°C hasta su uso.

### **5.2 Obtención de las proteínas de pared celular de las cepas BCG**

Para obtener las proteínas de pared celular, el paquete celular se descongeló a 4°C y se recuperaron por centrifugación con agua desionizada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) a 4°C, 10,000g durante 15 min. Después, el paquete celular se resuspendió en Solución Salina de fosfatos (PBS) pH 7.4 estéril a 4°C, 10,000g, durante 10 min. Posteriormente, al paquete celular bacteriano se le adicionó PBS pH 7.4 a 4°C para obtener una suspensión bacteriana de 1 g de paquete celular/mL de la suspensión. A la suspensión bacteriana se le agregó solución amortiguadora de lisis ( $\beta$ -mercapto-etanol 0.022% v/v y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M, pH 6. (He & De Buck, 2010a, 2010b) y se le adicionó lisozima a una concentración final de 2.4 mg de lisozima/mL de suspensión y se incubó a 37°C,

durante 24 h. Finalmente, la pared celular (sobrenadante) se separó de los protoplastos (botón celular) por centrifugación a 4°C, 22,000g, durante 40 min.

El sobrenadante se lisó por sonicación con el equipo Ultrasonic Precursor™ (Cole Parmer Corporation) aplicando 15 pulsos de 100 mV (1 minuto encendido y 1 minuto apagado) a 4°C. Durante la sonicación se agregó inhibidor de proteasas azida de sodio al 0.05% y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de y 1 mM. Finalmente, las proteínas de pared se obtuvieron centrifugando tres veces el sobrenadante a 4°C, 22,000g, durante 40 min. A las proteínas extraídas se le adicionó inhibidores de proteasas; azida de sodio al 0.05% y PMSF a una concentración final de y 1 mM. Posteriormente, las proteínas de pared se concentraron en tubos Amicon® Ultra (Millipore) de punto de corte 3 kDa a 4°C, 5,000g, durante 4 horas y se cuantificaron por el método de Bradford descrito en los anexos, sección 9.4. Las proteínas de pared de cada cepa BCG se etiquetaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **5.3 Cultivo de la línea celular 293-hTLR2-CD14 y 293-hTLR4-MD2-CD14**

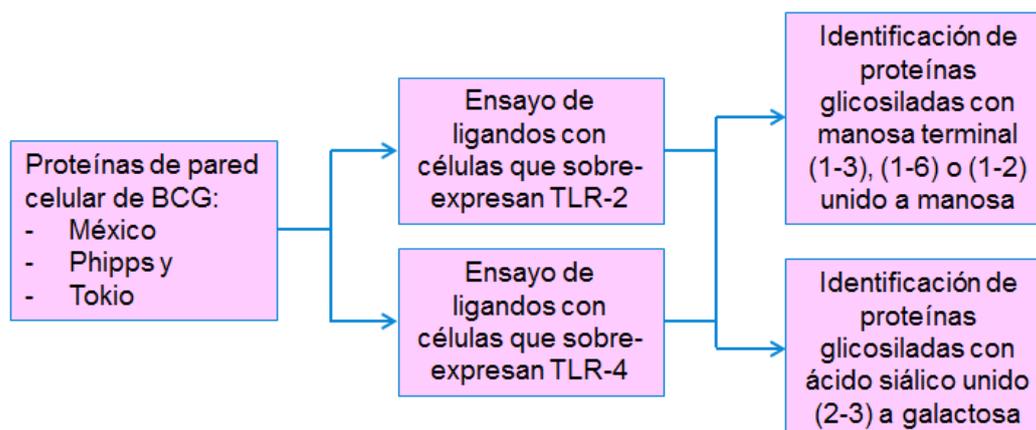
Para fines prácticos, a partir de esta sección, las líneas celulares 293-hTLR2-CD14 y 293-hTLR4-MD2-CD14 se abrevian como HEK293TLR-2 y como HEK293TLR-4, respectivamente.

Cada línea celular se descongeló a 37°C y posteriormente las células se lavaron con medio modificado Dulbecco's-Eagle (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-glutamina, vitaminas, aminoácidos no esenciales, blasticidina 10 µg/mL e higromicina 50 µg/mL por centrifugación a 3,000g a temperatura ambiente (TA), durante 5 min. Posteriormente, las células se incubaron en el medio DMEM modificado a 37°C, con un 95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub> (Nunc, EasYFlask, 7mL Thermo Scientific®). Las células se incubaron hasta obtener una confluencia de aproximadamente 90%, hasta obtener aproximadamente 70x10<sup>6</sup> en tubos siliconizados (Sigmacote, Sigma®). Las células se contaron con la cámara de Neubauer (ver Anexos, Sección 9.5).

#### 5.4 Ensayo de ligandos

Las células se trataron de la siguiente manera: Se resuspendió con PBS pH 7.0, a 4°C, 2,500g, durante 5 min. y se les agregó glutaraldehído 2.5% en PBS y se incubaron a 4°C durante 1 hora. Después se realizaron 5 lavados con PBS a 4°C, 2,500g, durante 5 min. Posteriormente, las células se bloquearon con glicina 0.2 M a TA, durante 1 hora. Las células se lavaron 5 veces en PBS y 3 veces en solución amortiguadora TDSET (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, deoxicolato 0.2%, SDS 0.1% y Tritón X-100 al 1%, pH 7.0). Finalmente, las células fueron almacenadas en alícuotas de  $1 \times 10^6$  células/mL en 200  $\mu$ L de solución amortiguadora TDSET a -20°C. El tratamiento celular se realizó con material siliconizado (Arroyo & Alderete, 1995).

Una vez que se tienen  $1 \times 10^6$  células tratadas, cada una de las líneas celulares se pusieron en contacto con 200  $\mu$ g de proteínas de pared celular de cada una de las cepas BCG a 4°C en agitación, durante 18 h (por ejemplo:  $1 \times 10^6$  células HEK293TLR-2 y 200  $\mu$ g proteínas de pared de BCG México). Al término de la incubación, las células se separaron por centrifugación a 4°C, 800g, durante 10 min. Las proteínas sin unirse a las células HEK293 se descartaron (sobrenadante) y el botón celular (células HEK y proteínas de las cepas BCG que se unieron a estas células) se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución amortiguadora TDSET. Después se les agregó 50  $\mu$ L del amortiguador de Laemmli (SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%, 0.004% azul de bromofenol y Tris-HCl 0.125 M, a pH 6.8) para disolver la unión entre los receptores sobre-expresados TLR-2 o TLR-4 y las proteínas de pared celular de las cepas BCG. Las muestras se colocaron en un baño de agua a temperatura de ebullición durante 3 min y después se centrifugaron a TA, 2,000g, durante 10 min. En el sobrenadante se obtuvieron las proteínas que se unieron a células HEK293TLR-2 o HEK293TLR-4 y en el botón celular las células HEK293TLR-2 o HEK293TLR-4. Las proteínas del sobrenadante se separaron de acuerdo a su masa molecular por electroforesis, en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Como control positivo se utilizó Derivado Protéico Purificado (PPD) del cultivo de *M. tuberculosis* y como control negativo se emplearon las células sin estar en contacto con las proteínas de pared de las cepas BCG. En la Figura 6, se muestran los ensayos realizados por duplicado.



**Figura 6.** Esquema general de los ensayos de unión de las proteínas de pared celular de las cepas BCG a las células HEK293 que sobre-expresan los receptores TLR-2 y TLR-4.

### 5.5 Separación de proteínas en geles en una dimensión (1D)

Las proteínas de pared celular se separaron de acuerdo a su masa molecular en dos geles SDS-PAGE al 12%, uno de los geles se colocó en solución de tinte con Silver-blue durante toda la noche (TN) y el otro se transfirió a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Ver punto 5.6). En este ensayo se incluyó el marcador de masa molecular Precisión Plus Protein™ dual color de 250-10 kDa (Bio-Rad Laboratories), el control positivo y negativo para el ensayo de ligandos previamente descrito y el control positivo y negativo para identificar glicosilación con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y ácido siálico unido (2-3) a galactosa. Las muestras se diluyeron con amortiguador de Laemmli en una proporción 1:1. En la Tabla 3, se muestran los controles utilizados para la separación electroforética de las proteínas.

**Tabla 3.** Controles utilizados.

Control	Unión a células que sobre-expresan TLRs	Glicosilación analizada	
		manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa	ácido siálico unido (2-3) a galactosa
Positivo	PPD	Carboxipeptidasa Y	Fetúina
Negativo	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Transferrina	

PPD=Derivado Protéico Purificado del cultivo de *M. tuberculosis*.

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo en una cámara (Mini-Protean® BioRad™) a 100 V, durante 3 horas. Posteriormente, uno de los geles

se colocaron en solución de tratamiento (etanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v) durante dos horas y posteriormente en solución de tinción Silver-Blue (ácido fosfórico 10% m/v, sulfato de amonio 10% m/v, azul de coomasie G-250 0.12% m/v, metanol 20% m/v) en agitación, durante TN. La imagen se adquirió con el densitómetro Molecular Imager GS-800™ (Bio-Rad Laboratories) para su análisis con el programa Quantity One™ (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories). El otro gel en donde se separaron las proteínas de pared celular de las cepas BCG, se utilizó para ser transferido como se menciona en el punto 5.6.

### **5.6 Transferencia de proteínas de pared celular de las cepas BCG**

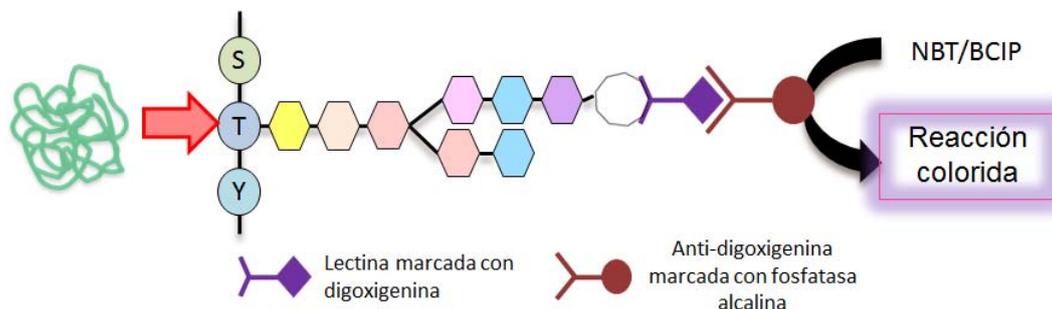
Uno de los geles obtenidos en el paso anterior se colocó en solución amortiguadora de Towbin (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3), al mismo tiempo la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se incubó en metanol a TA, durante 10 segundos, en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> a TA, durante 5 min y en solución amortiguadora de Towbin 10 min. Después la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se realizó en la cámara en semi-seco Trans-Blot™ (Bio-Rad Laboratories) con solución amortiguadora de Towbin, a 10V durante 2 horas.

Al término de la transferencia, la membrana se coloca en solución de bloqueo (Blocking Reagent™, Amersham Biosciences), diluida 1:10 en solución amortiguadora de tris (TBS) a un pH 7.5, a 4°C y en agitación (150g) durante TN.

### **5.7 Identificación de proteínas glicosiladas de pared celular de las cepas BCG en geles de 1D**

Para la identificación de glicosilaciones, se utilizó el kit DIG Glycan Differentiation™ (Amersham Biosciences) que se basó en el uso de lectinas de diferentes organismos marcadas con digoxigenina que se unen específicamente a algún azúcar y a su vez la anti-digoxigenina marcada con fosfatasa alcalina se une a estas lectinas. Posteriormente se adicionan los cromógenos 4-nitro azul cloruro de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (NBT/BCIP) que por acción de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo una reacción de tipo óxido-reducción (REDOX). El sustrato NBT/BCIP al hidrolizarse da un color café en el sitio de unión entre la lectina y el

azúcar. En la Figura 7, se muestra la representación gráfica del fundamento para la identificación de proteínas glicosiladas a través de lectinas.



**Figura 7.** Representación gráfica de la identificación de azúcares con lectinas DIG Glycan Differentiation Kit, Roche Applied Science™. La lectina marcada con digoxigenina se une específicamente a un azúcar, la anti-digoxigenina marcada con fosfatasa alcalina se une a esta lectina. La fosfatasa alcalina y los colorantes NBT/BCIP llevan a cabo una reacción de óxido-reducción que genera un compuesto colorido. Serina (S), Treonina (T), Tirosina (Y), NBT (4-nitro azul cloruro de tetrazolio) y BCIP (5-bromo-4cloro-3-indolil-fosfato).

En la Tabla 4, se muestran las lectinas utilizadas, el tipo de glicosilación que identifican y la dilución a la que se utilizó. La lectina MAA también identifica el ácido siálico unido (2-3) a galactosa con O-glicosilación.

**Tabla 4.** Lectinas utilizadas para identificar azúcares y dilución a la que se utilizó.

Lectina	Azúcar que identifica	Dilución
Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa, terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa	1:1000
Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	Ácido siálico unido (2-3) a galactosa	1:200

Una vez que se tiene la membrana en solución de bloqueo, la membrana se mantuvo en TBS a TA, en agitación a 150g, por 10 min y se incubó con solución amortiguadora de cloruros (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, en TBS a pH 7.5) a TA, en agitación, por 10 min. Al término, la membrana se incubó con la lectina de interés diluida en TBS, en agitación, durante una hora (las diluciones utilizadas se muestran en la Tabla 4). Posteriormente se incubó con TBS a TA durante 10 min. Al término se incubó con anti-digoxigenina-AP™ (Amersham Biosciences) a una dilución 1:1,000 en TBS a TA, en agitación, durante una hora. Para detectar la unión de la lectina a las proteínas glicosiladas se utilizaron los colorantes cloruro de NBT/BCIP en una dilución 1:50 en solución amortiguadora de Tris-ácido (Tris-HCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.05 M y NaCl 0.1 M, pH 9.5). Para ello, la membrana se incubó con los colorantes

mencionados a TA, sin agitación por 2 min. para observar el precipitado de color café o negro. Posterior a la identificación de las lectinas, se tomó la imagen con el densitómetro Molecular Imager GS-800™ (Bio-Rad Laboratories) y se realizó el análisis con el programa Quantity One™ (1-D Analysis Software, Bio-Rad Laboratories). Para cada lectina, se realizó un ensayo independiente de electroforesis y transferencia en las condiciones mencionadas anteriormente al menos por duplicado.

### **5.8 Identificación de proteínas de pared celular de BCG México por espectrometría de masas**

A partir del gel con las proteínas de pared celular de BCG México, se identificaron las bandas de las proteínas que se unieron a células que sobre-expresan TLR-2 y/o TLR-4 y que además tuvieron glicosilación con manosa, terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y/o ácido siálico unido (2-3) a galactosa y se enviaron secuenciar las proteínas por espectrometría de masas. Para ello, las bandas fueron desteñidas con 50% de metanol (v/v), 5% de ácido acético (v/v), durante 12 horas. Posteriormente se incubó con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) 100 mM. Las proteínas se redujeron con Ditiotreitól (DTT) 50 mM durante 45 min y se alquilaron con Iodacetamida 30 mM durante 2 horas. Después las proteínas se incubaron con 100 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Al término se deshidrataron completamente con acetonitrilo 100% y se llevaron a sequedad total.

Las proteínas se incubaron con tripsina de porcino modificada a una concentración final de 20 ng/ $\mu\text{L}$  y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Los péptidos se extrajeron una solución de 50% (v/v) de acetonitrilo y 5% (v/v) de ácido fórmico por sonicación y se llevaron a sequedad total. Los péptidos fueron resuspendidos en 20  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 1% (v/v), se desalaron y concentraron por Ziptip C18 y finalmente los péptidos se eluyeron en 12  $\mu\text{L}$  de fase móvil ( $\text{H}_2\text{O}_d$  97%, acetonitrilo 3%, ácido fórmico 0.1%).

Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas con las condiciones proporcionadas en la Tabla 5.

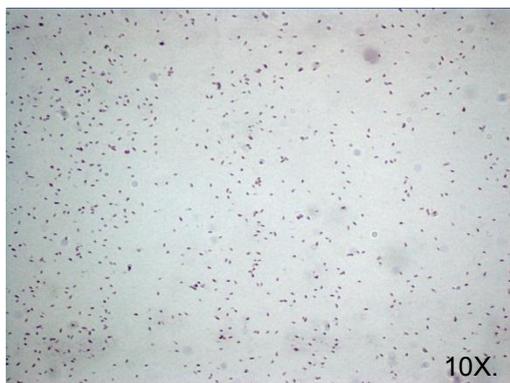
**Tabla 5.** Condiciones de análisis de péptidos por espectrometría de masas.

Equipo utilizado	Espectrómetro de Masas Modelo Synapt G2S, Marca Waters, con tiempo de vuelo
Introducción de la muestra	Cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY, Waters™
Columna	nanoACQUITY UPLC 1.7 µm, BEH130 C18, 100 µMX100 mm
Pre columna	2G nanoACquity UPLC Trap Colum 5 µm 180UmX20mm
Temperatura de la columna	35°C
Fase móvil	Fase A: Agua MilliQ con 0.1% de ácido fórmico Fase B: Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico
Velocidad de flujo de la fase móvil	0.45 nL/min
Gradiente cromatográfico (100 min)	0 min 95% A, 5%B 10 min 95% A, 15%B 75 min 95% A, 40%B 76 min 95% A, 80%B 81 min 95% A, 80%B 84 min 95% A, 5%B
Modo de ionización	Electrospray
Temperatura de la cámara de ionización	100°C
Voltaje del capilar	3.5 kV
Voltaje del cono	30 V
Intervalo de masas	50-200 Da
Péptido de referencia	(Glu1)-fibrinopéptido B
Rampa de energía de colisión en la trampa	15-45 V
Velocidad de escaneo	0.5 seg
Detección de iones	Positivos
Resolución	20,000

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Cultivos de cepas BCG

Para obtener cultivos puros, las cepas BCG México, Phipps y Tokio se cultivaron durante 4 semanas, las colonias obtenidas fueron bacilares, pequeñas de 2-4 mm de diámetro. Las colonias de BCG Tokio se observaron microscópicamente de un menor tamaño en comparación con BCG México y Phipps. Por otra parte, con la tinción de Z-N se comprobó que no había contaminación por el colorante azul de metileno. En la Figura 8, se muestra la observación al microscopio de BCG México vista 10 veces su tamaño normal. Comprobando que la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes teñidos de color rojo.



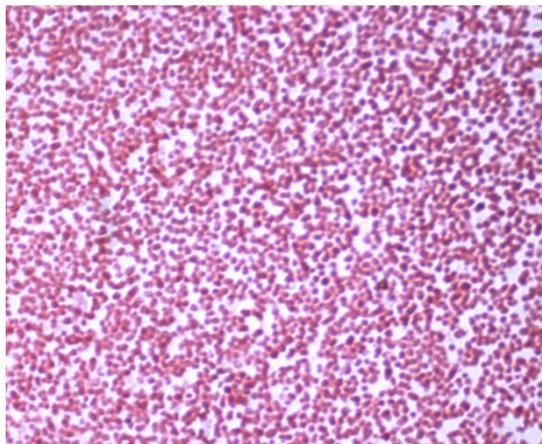
**Figura 8.** Bacilos ácido alcohol resistentes de BCG México con tinción de Ziehl-Neelsen.

Una vez que se obtuvieron colonias aisladas en el medio Middlebrook 7H-10, las tres cepas se cultivaron hasta por dos semanas hasta tener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8 que corresponde a  $10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) que corresponde a los cultivos de cepas BCG en la fase media logarítmica.

### 6.2 Obtención de proteínas de pared celular de cepas BCG

Los cultivos de las cepas BCGs se trataron mediante métodos físico-químicos que nos permitieron obtener las proteínas de pared de cada cepa BCG. Durante el proceso de extracción de las proteínas de pared celular, cada evento realizado y mencionado en la metodología se comprobó mediante tinciones de Gram y la observación al microscopio. En la Figura 9, se muestran los protoplastos teñidos de color rojo, por la tinción Gram que se usó para comprobar que se perdió la ácido

alcohol resistencia, ya que las micobacterias se tiñen débilmente de grampositivas y en la Figura 9, se muestra la tinción de gramnegativas.



**Figura 9.** Protoplastos de BCG México teñidas con Gram.

Con la obtención de las proteínas de la pared celular de las cepas BCG concentradas, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford que se realiza con una curva patrón de BSA (Se muestran en el anexo 9.11).

En la Tabla 6, se muestra la absorbancia a la cual se cosecharon cada una de las cepas BCG, la concentración después de que se concentraron las proteínas y el rendimiento en la obtención de las proteínas de pared celular de las cepas BCG a partir de la masa celular obtenida en la cosecha de las cepas BCG.

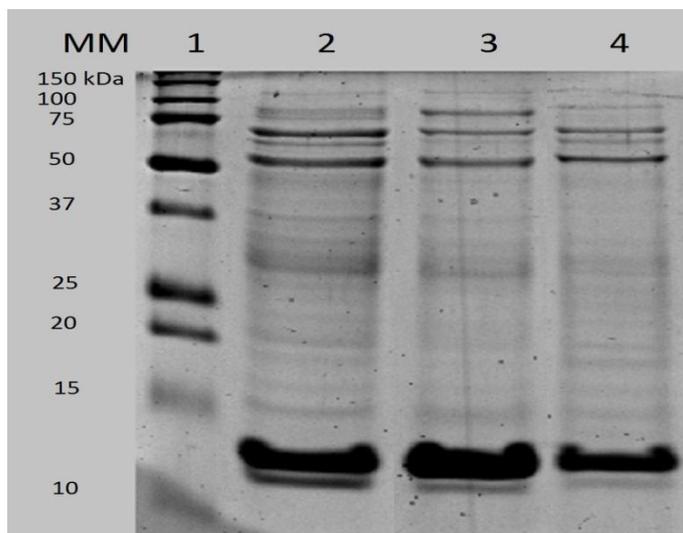
El rendimiento en la extracción de las proteínas de pared celular de las cepas BCG fue entre 25 y 30%, siendo el mayor rendimiento para las proteínas de pared celular de BCG México.

**Tabla 6.** Absorbancia, concentración de proteínas obtenida y rendimiento de BCG México, Phipps y Tokio.

<b>Cepas BCG</b>	<b>Absorbancia a 600 nm</b>	<b>Concentración de proteína (µg/mL)</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
México	0.7	9	30.4
Phipps	0.8	7	28.5
Tokio	0.8	7	25.6

La separación de las proteínas de pared celular de las BCG se realizó mediante electroforesis SDS PAGE al 12%, para determinar si los perfiles de las proteínas fueron parecidos y con este gel, no se observan las proteínas degradadas

(Ver Figura 10). El perfil proteico mostró que la mayoría de las proteínas tienen una masa molecular de entre 10-150 kDa.



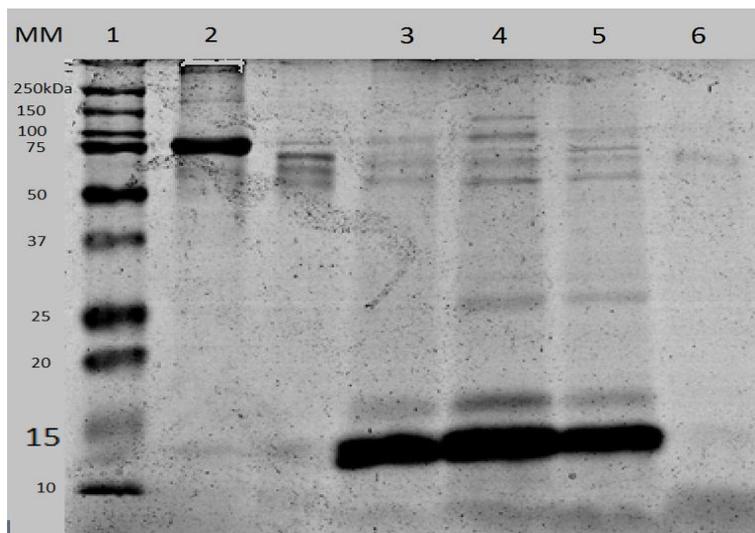
**Figura 10.** Perfil electroforético de proteínas de pared de las cepas BCG. Carril 1; MM, Carril 2; BCG México, Carril 3; BCG Phipps, Carril 4; BCG Tokio. Gel de SDS-PAGE 12% teñido con Silver-Blue.

### 6.3 Proteínas de pared celular de las cepas BCG que se unieron a células que sobre-expresan TLRs

Una vez que se realizó el ensayo de ligandos por el contacto de las proteínas de pared celular de las cepas BCG y las células que sobre expresan TLR-2 o TLR-4. La separación electroforética de las proteínas que se unieron a los diferentes receptores se realizó con la finalidad de obtener perfiles de proteínas unidas a TLR-2 o TLR-4.

Las proteínas de pared celular que se unieron a las células que sobre-expresan el receptor TLR-2 se muestran en la Figura 12, en donde se observan diferencias en los perfiles proteicos de las cepas BCG. Se detectaron 6 bandas de proteínas para BCG México, 9 para Phipps y 8 para Tokio con masas moleculares entre 12 y 138 kDa (Ver Tabla 7). También se observó que hay una banda en aproximadamente 138 kDa en BCG Phipps, pero ausente para México y Tokio. Hay 2 bandas en aproximadamente 27 y 30 kDa que se observan en BCG Phipps y Tokio, pero no para México. En la Figura 12, también se observan diferentes bandas de proteínas de PPD que se unieron a células que sobre-expresan TLR-2 que fueron utilizadas como control positivo. En cuanto al control negativo no se muestra en la Figura 12, ya que no se

observó ninguna banda que se unió a células que sobre-expresan TLR-2 ya que el control negativo fue agua. De la Figura 12, se concluye que los perfiles proteicos de proteínas de pared de las cepas BCG fueron diferentes en su proporción y existe reconocimiento de TLR-2 para un mayor número de proteínas de pared celular de BCG Phipps y un menor número de bandas de proteínas de pared celular de BCG México.



**Figura 11.** Perfil electroforético de proteínas de pared celular de cepas BCG que se unieron a las células HEK 293 que sobre-expresa TLR-2. Carril 1, MM, Carril 2; PPD, Carril 3; BCG México, Carril 4; Phipps, Carril 5; BCG Tokio y Carril 6, Control positivo, fetuina. Gel de SDS-PAGE al 12% teñido con Silver-Blue.

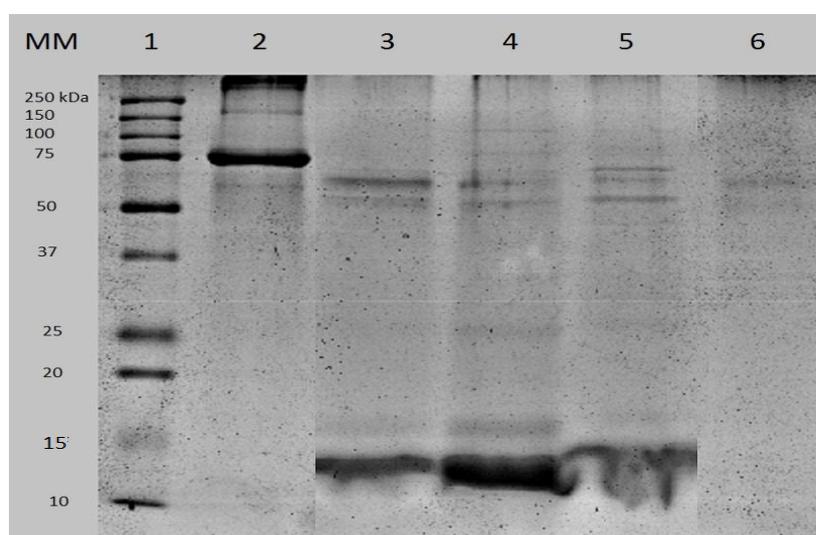
**Tabla 7.** Masa molecular de proteínas de pared celular de las cepas BCG que se unen a las células HEK 293 que sobre-expresan TLR-2

<b>México</b>	<b>Phipps</b>	<b>Tokio</b>
<b>(kDa)</b>	<b>(kDa)</b>	<b>(kDa)</b>
-	138	-
95	95	95
76	73	73
66	66	66
50	50	50
-	30	30
-	27	27
14	14	14
12	12	12

(-); Bandas de proteínas no observadas.

Las proteínas de pared celular de las cepas BCG que se unieron a células que sobre-expresan TLR-4 se observan en la Figura 13, las diferencias en el número de

proteínas identificadas fueron 4 bandas de proteínas para BCG México, 7 para Phipps y 6 para Tokio. Se identificó una banda en aproximadamente 116 kDa que se observa en BCG Phipps, pero no se detectó en México ni Tokio, 2 bandas de aproximadamente 70 y 26 kDa que se observaron en BCG Phipps y Tokio, pero no en México. Las masas moleculares de las proteínas detectadas en los perfiles electroforéticos se muestran en la Tabla 8, la masa molecular de las proteínas van desde 12 a 116 kDa. De la Figura 13, se concluye que los perfiles de proteínas que se unieron a TLR-4 son distintos entre las cepas BCG y se observó un mayor reconocimiento por TLR-4 para las proteínas de pared celular de BCG Phipps y un menor número de proteínas reconocidas de la pared celular de BCG México.



**Figura 12.** Perfil electroforético de proteínas de pared celular que se unieron a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-4. Carril 1, MM, Carril 2; PPD, Carril 3; BCG México, Carril 4; Phipps, Carril 5; BCG Tokio y Carril 6, Control positivo, fetuina, SDS PAGE al 12%.

**Tabla 8.** Masa molecular de proteínas de pared celular que se unen a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-4.

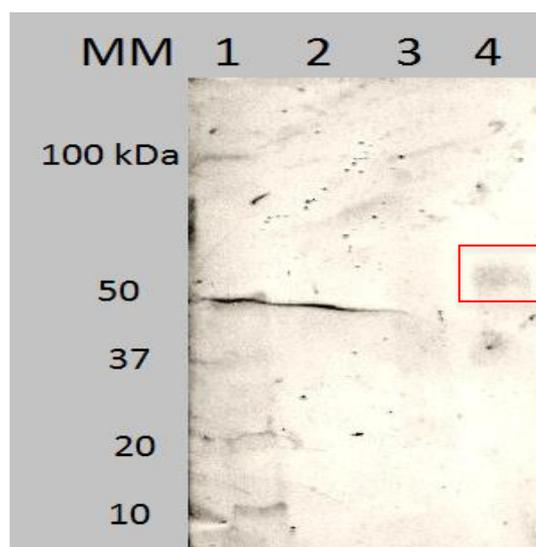
México (kDa)	Phipps (kDa)	Tokio (kDa)
-	116	-
-	70	70
63	62	64
55	53	54
-	26	26
14	14	14
12	12	12

(-); Bandas de proteínas no observadas.

#### 6.4 Proteínas de pared celular de cepas BCG glicosiladas

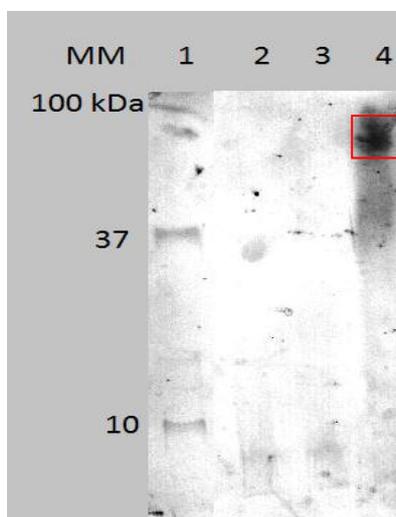
Debido a que en estudios realizados por nuestro grupo de trabajo anteriormente se observaron proteínas glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y ácido siálico (2-3) a galactosa en cepas de *M. microti*, se llevó a cabo la búsqueda de este tipo de glicosilaciones en las cepas BCG. Para ello, una vez que se identificaron un gran número de bandas de proteínas de pared celular que se unen a los receptores TLR-2 y/o TLR-4, se determinaron cuáles bandas tienen glicosilaciones.

Las proteínas glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa fueron identificadas por su unión a células que sobre-expresan TLR-2 y posteriormente su unión a lectina que se muestran en la Figura 14. En la membrana de PVDF incubada con GNA y revelada con NBT/BCIP, se identificó una banda en aproximadamente 56 kDa. Esta banda de proteínas no fue identificada dentro de las proteínas que se a células que sobre-expresan TLR-2 en BCG Phipps y Tokio. Con la Figura 14, se concluye que hay proteínas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa que se unieron a células que sobre-expresan TLR-2 en BCG México y no en BCG Phipps y Tokio. La proteína de aproximadamente 56 kDa corresponde al perfil proteico de pared celular de BCG México que se unió a células que sobre-expresan TLR-2 mostradas en la Figura 12, y cuyas bandas se observan también en las cepas BCG Phipps y Tokio.



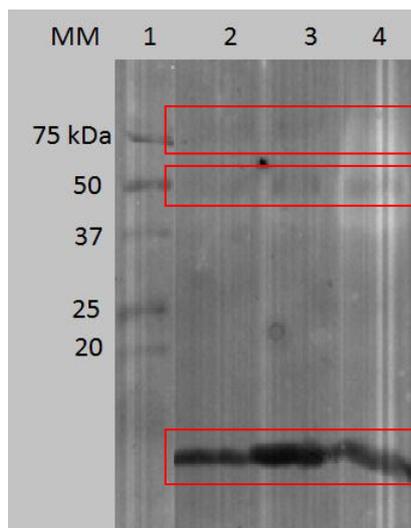
**Figura 13.** Perfil de proteínas de pared celular que se unen a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-2 con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa. Carril 1, MM, Carril 2; BCG Tokio, Carril 3; Phipps, Carril 4; BCG México. Membrana de PVDF incubada con la lectina GNA y revelada con NBT/BCIP.

Las proteínas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa fueron identificadas por su unión a células que sobre-expresan TLR-4 y posteriormente su unión a lectina que se muestran en la Figura 15. En la membrana de PVDF incubada con GNA y revelada con NBT/BCIP se observó una banda en aproximadamente 76 kDa con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa que se unen a células que sobre-expresan TLR-4 y sin detectarse bandas en BCG México ni para BCG Phipps. Con la Figura 15, se mostró que los TLR-4 son capaces de unirse a proteínas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa de las proteínas de BCG Tokio y que esta banda correspondió a la mostrada en la banda de la Figura 13, en donde se observó que hay unión de las células que sobre-expresan TLR-4 para BCG Phipps y Tokio.



**Figura 14.** Perfil de proteínas de pared celular que se unen a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-4 con manosa terminal. Carril 1, MM, Carril 2; BCG México, Carril 3; Phipps, Carril 4; BCG Tokio. Membrana de PVDF incubada con la lectina GNA y revelada con NBT/BCIP.

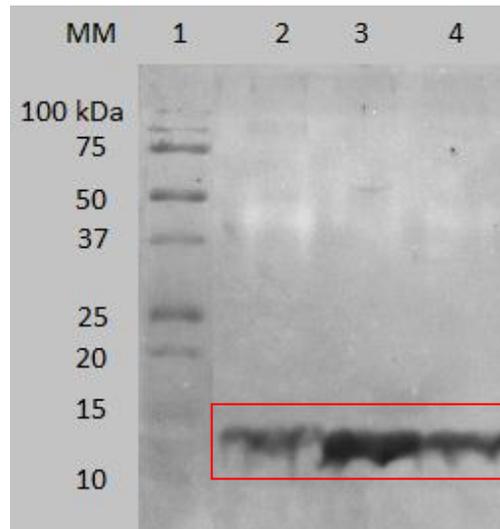
Las proteínas de la pared celular de las cepas BCG con ácido siálico (2-3) unido a galactosa fueron identificadas por su unión a células que sobre-expresan TLR-2 y posteriormente, su unión a lectina que se muestran en la Figura 16. Se observaron tres bandas de 12, 50 y 73 kDa para cada una de las cepas BCG con este tipo de glicosilación. De la Figura 16, se concluye que en los perfiles proteicos no se observaron diferencias en la unión de las proteínas de pared celular con ácido siálico unido (2-3) a galactosa y a las células que sobre-expresan TLR-2. Las masas moleculares de proteínas de pared celular de las BCG identificadas en la Figura 16, correspondieron a las bandas mostradas en la Figura 13.



**Figura 15.** Proteínas de pared celular con ácido siálico que se unen a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-2. Carril 1, MM, Carril 2; BCG México, Carril 3; Phipps, Carril 4; BCG Tokio. Membrana de PVDF incubada con la lectina MAA y revelada con NBT/BCIP.

Las proteínas de la pared celular de las cepas BCG con ácido siálico (2-3) unido a galactosa fueron identificadas por su unión a células que sobre-expresan TLR-4 y posteriormente a su unión a lectina que se muestran en la Figura 17. Hay una banda de aproximadamente 12 kDa para cada cepa BCG que tienen ácido siálico unido (2-3) a galactosa y que se unieron a TLR-4. En la Figura 17, se concluye que en los perfiles proteicos no se observaron diferencias en la unión de las proteínas de pared celular con ácido siálico unido (2-3) a galactosa y las células que sobre-expresan TLR-4 y que la masa molecular de proteínas de pared celular de las BCG identificadas en la Figura 17, correspondieron a las bandas mostradas en la Figura 13.

De acuerdo a todos los resultados descritos anteriormente, en la Tabla 9, se muestran resumidas las masas moleculares de las bandas de proteínas que se unieron a las células que sobre-expresan los diferentes receptores y el tipo de glicosilación que presentaron.



**Figura 16.** Proteínas de pared celular con ácido siálico que se unen a células HEK 293 que sobre-expresan TLR-4. Carril 1, MM, Carril 2; BCG México, Carril 3; Phipps, Carril 4; BCG Tokio. Membrana de PVDF incubada con la lectina MAA y revelada con NBT/BCIP.

**Tabla 9.** Masas moleculares de las proteínas que se unieron a células que sobre-expresan TLRs y el tipo de glicosilación que presentan.

	Proteínas unidas a TLR-2 (kDa)			Proteínas unidas a TLR-4 (kDa)		
	BCG México	BCG Phipps	BCG Tokio	BCG México	BCG Phipps	BCG Tokio
	-	138	-	-	-	-
	-	-	-	-	116	-
	95	95	95	-	70	70
	76*	73	73	63	62	64
	66	66	66	-	-	-
	50*	50	50	55	53	54
	-	30	30	-	-	-
	-	27	27	-	26	26
	14	14	14	14	14	14
	12*	12	12	12	12	12
Número de bandas	6	9	8	4	7	6
M	1	0	0	0	0	1
AS	3	3	3	1	1	1
M y AS	1	0	0	0	0	0

(-); No hubo unión entre las proteínas de pared celular y las células que sobre expresan TLRs, (M); proteínas de pared de las cepas BCG glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa, (AS) proteínas de pared de las cepas BCG glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) a galactosa, Rosa; proteínas celular de cepas BCG glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa, Amarillo; proteínas de pared celular de cepas BCG glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) a galactosa y Anaranjado; proteínas de pared celular de cepas BCG glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y ácido siálico unido (2-3) a galactosa.

## **6.5 Identificación de proteínas de pared celular de BCG México por espectrometría de masas**

Una vez que se tiene la información de las bandas de proteínas de pared que se unen a células que sobre-expresan TLR-2 y TLR-4, al igual que el tipo de glicosilación que presentan. Se identificaron las proteínas de pared celular de BCG México con las siguientes características: se unieron a TLR-2 y TLR-4, son proteínas con glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y ácido siálico unido (2-3) a galactosa, debido a que en nuestro grupo de trabajo se cuenta con la secuencia del genoma de BCG México y que estamos interesados en la caracterización de esta cepa, se seleccionaron las bandas de BCG México que corresponden a las masas moleculares de 76, 50 y 12 kDa marcadas con asterisco en la Tabla 9. A la banda de aproximadamente 76 kDa se le nombró Banda A, a la de aproximadamente 50 kDa, Banda B y a la de aproximadamente 12 kDa, Banda C.

En la Tabla 10, se muestran el número de proteínas identificadas en cada banda, las funciones metabólicas en las cuáles están participando y el tipo de glicosilación que posiblemente presentan. Ya que en las bandas obtenidas en geles de 1D se pueden encontrar varias proteínas en una misma masa molecular. En la Tabla 10, se puede observar que existen diferentes funciones en las que participan las proteínas identificadas como ciclo de Krebs, metabolismo de ácidos micólicos, regulación, adhesión pero también se encuentran proteínas con funciones desconocidas y proteínas hipotéticas, es decir que son proteínas que tienen dominios parecidos a otras proteínas en la base de datos con los cuáles se puede predecir su función.

Las funciones de las proteínas de cada una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se encuentran enlistadas en el anexo 9.11, en la Tabla 18 para la banda A, Tabla 19 para la banda B y Tabla 20 para la banda C. Dentro de estas proteínas se encuentran funciones interesantes como proteínas de estrés universal, oxidoreductasas, proteínas inmunogénicas, proteínas que participan en el metabolismo de ácidos micólicos, proteínas de adhesión y proteínas que participan en la glicosilación de proteínas.

**Tabla 10.** Número de proteínas de pared celular de BCG México identificadas por espectrometría de masas, funciones y posible tipo de glicosilación.

Banda de proteínas	Funciones metabólicas	Posible glicosilación
A (10)	Ciclo de Krebs Síntesis de ácidos micólicos Metabolismo de ARNm Formación de uniones glicosídicas Chaperoninas Metabolismo del acetato Traducción de proteínas Degradación de aminoácidos	AS
B (26)	Traducción de proteínas Oxidoreductasa Ciclo de Krebs Síntesis de ácidos grasos Chaperoninas Ferrodoxina	M y AS
C (20)	Metabolismo ARN Traducción de proteínas Chaperoninas Desconocida Adhesión celular Proteína universal de estrés Proteínas de secreción Oxidoreductasas Exportación de proteínas Proteína anti-oxidante Proteína hipotética	AS

(n); Número de proteínas identificadas, (M); proteínas de pared de BCG México glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa, (AS); proteínas de pared de las cepas BCG glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) a galactosa.

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizaron las cepas BCG México, Phipps y Tokio porque de dos de estas BCG existen los genomas completos (Tokio y México) y se encuentran disponibles, al igual que los proteomas de BCG México y Phipps, lo que proporciona una herramienta importante en la búsqueda de información acerca de estas cepas. BCG Tokio se encuentra en el grupo de las cepas BCG tempranas, DU2 grupo I, mientras que la cepa BCG Phipps y México, se encuentran en el grupo de las cepas BCG tardías, DU2 grupo IV.

Hasta el momento una de las grandes incógnitas que se ha planteado en el estudio de las cepas BCG es: ¿Qué cepa BCG es la que confiere una mayor eficacia protectora y cuál es la mejor opción para utilizarla en la vacunación? Muchas de los estudios que se han realizado para responder éstas preguntas son el análisis y comparación de las diferentes cepas BCG a diferentes niveles. Se sabe que las cepas tempranas que tienen diferencias genotípicas en relación a las tardías, mediante el análisis de los genes codificantes para la expresión de los antígenos MPB64 y MPB70, están sólo presentes en las cepas BCG tempranas pero ausentes en las cepas BCG tardías. Una mutación puntual no sinónima en un simple nucleótido en *mmA3* causa una sustitución de glicina a ácido aspártico en la posición 293, lo cual impide la producción de ácidos metoximicólicos en las cepas BCG tardías. La producción de ácidos metoximicólicos se sugiere que afectaría en la morfología y las actividades inmunomoduladoras y persistencia en animales (Belley et al., 2004; Uenishi, Fujita, Kusunose, Yano, & Sunagawa, 2008). En cuanto a la proteína MPB64 es un antígeno inmunogénico basado en la respuesta tanto en las células T como en la producción de anticuerpos en la inmunización de ratones (Harboe et al., 1986; Kalra et al., 2007). Mientras que, el antígeno de secreción MPB70 induce una fuerte respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado, para estimular la proliferación de linfocitos T y la producción de anticuerpos en animales infectados con *M. bovis* (Harboe et al., 1986; Vordermeier et al., 2000). Pero poco se sabe acerca de las diferencias en el tipo de glicosilaciones que presentan las proteínas de las diferentes subcepas y los receptores que reconocen dichas glicosilaciones. Este trabajo muestra dos tipos de glicosilaciones que presentan las proteínas de pared de las cepas BCG México, Phipps y Tokio que fueron reconocidas por los receptores TLR.

Aún con toda esta información acerca de las cepas BCG, se sigue discutiendo cuál de estas opciones es la mejor, puesto que se siguen realizando más estudios como lo son la pérdida de la región RD1 que es común para todas las cepas BCG. Análisis genómicos de las cepas BCG han mostrado la pérdida de uno o más genes en su genoma, tal es el caso de BCG Tokio que perdió la región Rv3405c. Otro ejemplo es la región RD2, la cual está ausente en las cepas BCG tardías derivadas del Instituto Pasteur a partir de 1931, para BCG México y Phipps tienen una delección en la región *N-RD18*. La región *N-RD18*, es un segmento de 1,5 kb que se encuentra sólo en algunas cepas BCG (Pasteur, Phipps, Frappier, Connaught, Tice) derivadas del Instituto Pasteur después de 1933 (Mostowy, Tsolaki, Small, & Behr, 2003). La región *N-RD18* contiene los genes que codifican para SigI, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa. SigI está presente en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pero está ausente en *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. mairium* y *M. smegmatis* (Manganelli et al., 2004). Sin embargo, el papel de SigI en la virulencia de las cepas BCG sigue siendo desconocida (Joung & Ryoo, 2013). La cepa BCG México tiene delecciones en los genes *fadD23* y *Rv3860-64*. La región *fadD23* está asociada a la unión de las micobacterias al macrófago, que se sugiere están involucrados en vías de señalización de estas células (Orduna et al., 2011). Finalmente, la región *Rv3860-64* se encuentran genes que codifican para proteínas hipotéticas conservadas (BCG3923, BCG3924 y BCG3926) y otro gen putativo (*whiB6*) que es un regulador transcripcional que pertenece a la familia de WhiB que son proteínas que forman un sistema oxidoreducción en *M. tuberculosis* (Alam, Garg, & Agrawal, 2009; Orduna et al., 2011). Con este proyecto se proporcionó información acerca de las proteínas que son reconocidas por los receptores TLR-2 y TLR-4, al igual que el tipo de glicosilación que podrían estar reconociendo estos receptores y específicamente proteínas de pared celular de BCG México que posiblemente tienen glicosilación (Bulut et al., 2005) y/o ácido siálico unido (2-3) a galactosa mediante el análisis por espectrometría de masas.

Conocemos de la existencia de estudios en los que se evaluaron a las distintas cepas BCG. Por ejemplo, con base a los resultados en obtenidos en nuestro grupo se realizó un estudio de un modelo murino en el cual se vacunaron a los ratones Balb/C con 10 diferentes cepas de BCG, entre ellas BCG México y Phipps. Después se retaron con *M. tuberculosis* H37Rv, en este estudio se identificaron las células CD4+, CD8+, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10. También se determinó el área neumónica y número de UFC, en este estudio, se observó que BCG Phipps presentó una mayor protección (Castillo-Rodal et al., 2006). Otro estudio, mostró que las cepas de BCG tempranas

indujeron una mayor actividad para inducir la producción de óxido nítrico, interleucina 1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 y IFN- $\alpha$  en células epiteliales A549, en la línea celular monocítica THP-1 y en células de médula ósea de ratón en presencia de IFN- $\gamma$  (Hayashi et al., 2009), que puede estar relacionado con el reconocimiento de los receptores TLR-2 y TLR-4, al activarse vías de señalización que desencadenan en la producción de dichas citocinas.

Se identificaron perfiles proteicos de pared celular de las cepas BCG México, Phipps y Tokio que son reconocidas por células que sobre-expresan TLR-2 o TLR-4 mediante el ensayo de ligandos. Las células HEK293 que sobre expresan los receptores TLR-2 o TLR-4 son células que se han utilizado como modelo para el reconocimiento de los receptores TLR a diferentes estructuras microbianas (D. Sinha, Ghosh, Mukherjee, Biswas, & Biswas, 2014), sin embargo, aunque se debió incluir las células HEK293 sin transfectar, no se utilizaron ya que este tipo de células expresan otros tipos de receptores como TLR-1, TLR-3, TLR-5, TLR-6 y NOD-1 que hasta el momento este tipo de receptores no reconocen estructuras de las micobacterias (Killick et al., 2013). Con los ensayos de ligandos, se lograron identificar diferentes bandas proteicas de proteínas de pared celular de BCG México, Phipps y Tokio que posiblemente presentan glicosilación con manosa y ácido siálico. En estudios posteriores, se sugiere realizar este tipo de ensayos en geles de dos dimensiones y posteriormente realizar el ensayo de ligandos con proteínas purificadas de cada cepa BCG. Por ejemplo, se utilizaron éstas células que sobre expresan TLR-2 para saber si la porina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 es reconocida por el receptor TLR-2. Para ello se realizó la identificación de la unión de la porina al receptor TLR-2 mediante Western-Blot y citometría de flujo (D. Sinha et al., 2014).

Los receptores TLR forman parte de la inmunidad innata que se presenta cuando las micobacterias entran al organismo. Los receptores TLR-2 y TLR-4 han sido uno de los más estudiados en el reconocimiento inicial de la micobacteria (Akira, 2004). Se ha descrito que el receptor TLR-2 reconoce lipoarabinomanana de las micobacterias, algunos reportes mencionan que el co-receptor de TLR-2 que es el CD14 tiene propiedades de lectina, lo que puede explicar por qué este tipo de receptores puede reconocer estructuras glicosiladas (Palaniyar, Nadesalingam, & Reid, 2002). Esto debido a que el receptor TLR-2 tiene que actuar en conjunto con el CD14. Se sabe que el TLR-2 es capaz de reconocer diferentes tipos de estructuras

manosiladas que se encuentran en las micobacterias (lipoarabinomanana, de *M. tuberculosis*, phospho-*myo*-inositol de *M. smegmatis* y lipoarabinosa de *M. chelonae*). Por lo que, posiblemente las proteínas manosiladas reconocidas en estos experimentos fueron reconocidas por el receptor TLR-2 (Dao et al., 2004; Sukhithasri, Nisha, Biswas, Anil Kumar, & Biswas, 2013).

En este proyecto se identificaron proteínas glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa que pueden estar siendo reconocidas por el receptor TLR-4. El receptor TLR-4 reconoce lipopolisacárido en bacterias gramnegativas, manosa en el género *Candida* (Mogensen, 2009) y en las micobacterias, se sabe que reconocen fosfatidilinositol manosilado y algunas proteínas de choque térmico 65/70 (Abel et al., 2002; Bulut et al., 2005) (Abel et al., 2002; Szymanski & Wren, 2005), sin embargo, no hay nada descrito acerca de este tipo de glicosilaciones en proteínas del género *Mycobacterium*.

Aunque no existe ninguna evidencia de que los receptores TLR-2 o TLR-4 reconocen ácido siálico, en este trabajo se abre una nueva pregunta de qué otro tipo de azúcares son capaces de reconocer este tipo de receptores y las implicaciones que tiene en el sistema inmune y reconocimiento de este tipo de estructuras. También es importante mencionar que en futuros experimentos se debe realizar ensayos en los que se desglicosile las proteínas, mediante ensayos enzimáticos. Interesantemente, se identificó la proteína de choque térmico chaperonina GroEL que tiene glicosilación con ácido siálico unido (2-3) a galactosa que ya se había encontrado en geles de 2D de extracto celular de *M. microti* (García-Ruiz, 2011).

Las proteínas de pared celular de las cepas de BCG que se estudiaron de la superficie bacteria desempeñan un papel fundamental en la interacción entre la célula bacteriana y su entorno. Además de que participan en la adhesión y la invasión de las células, en la detección de las condiciones químicas y físicas del medio exterior y el envío de señales apropiadas para el compartimiento citoplasmático, así como, proteínas con capacidad para generar respuesta inmune del huésped y por su capacidad de toxicidad. Por lo tanto, las proteínas expuestas en la superficie son propuestas como blancos potenciales para generar fármacos dirigidos a combatir infecciones y enfermedades bacterianas (Lindahl, Stalhammar-Carlemalm, & Areschoug, 2005; Niemann, Schubert, & Heinz, 2004). La purificación de proteínas de

la pared de las cepas de BCG muestra una gran cantidad de proteínas en el perfil electroforético proteico obtenido. Nuestros hallazgos son consistentes con reportes previos con respecto al número de bandas y al rendimiento, esto al compararlos con los reportados para *M. smegmatis*, en donde las proteínas fueron obtenidas con sonicación, disruptor, lisozima o la purificación de proteínas a través de un método mecánico con lisozima. Nosotros encontramos que la mejor forma para lisar las micobacterias es el uso de la lisozima y la sonicación, ya que se obtuvo un rendimiento de 25-30%. Además, el riesgo de exposición a aerosoles generados por la prensa French durante la lisis micobacterias, lo convierte en un proceso de alto riesgo para su manejo y control (Rezwan, Laneelle, Sander, & Daffe, 2007). Del mismo modo, las micobacterias requieren para su manejo adecuado de un nivel de bioseguridad III y las prensas que localizamos se encuentran en espacios abiertos sin protección alguna, por lo que este proceso fue descartado.

En un trabajo reciente se purificaron las proteínas de pared celular de *M. smegmatis* MC2 155, se separaron las proteínas de pared celular en geles de una dimensión y mediante el uso de tripsina se analizaron los diferentes puntos por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Con estos resultados se realizó un gel de 2D virtual, se describieron un total de 390 proteínas de la pared celular, de las cuales 79 son proteínas hipotéticas conservadas, además de algunos datos interesantes; como que el 16.15% de estas proteínas están involucradas en la traducción y transcripción, 7.17% en el transporte y metabolismo de aminoácidos, el 5.90% en la producción y conversión de energía, el 5.9% modificación postraducciona, el recambio protéico y chaperonas, el 4.87% en replicación, recombinación y reparación. Adicionalmente, el 4.62% de las proteínas no se les asignó ninguna función y 14.36% de las proteínas no tenían relación (He & De Buck, 2010a, 2010b).

Dada la importancia de las proteínas de pared celular en la interacción tanto con células epiteliales, macrófagos, células dendríticas entre otras y la evidencia de diferencias a nivel genómico, proteómico e inmunológico entre las cepas de BCG, en este trabajo realizamos estudios de los perfiles proteicos de la pared y membrana de las BCG México, Phipps y Tokio, de lo cual no existen trabajos previos. Para ello empleamos geles de una dimensión de SDS-PAGE ya que el rendimiento de las proteínas de la pared celular que están unidas a la membrana es bajo, y por lo general

se acepta que las proteínas de membrana están muy poco representadas en geles de electroforesis bidimensional (2-DE) (Schluesener, Fischer, Kruij, Rogner, & Poetsch, 2005). Además, la resolución electroforética de 2-DE presenta contaminantes como los micolatos que son parte constitutiva de la pared celular de *M. smegmatis* (He & De Buck, 2010a, 2010b). Los perfiles electroforéticos de las 3 cepas BCG que se estudiaron fueron similares. Nuestro trabajo contribuye al aislamiento de proteínas de pared y al perfil de proteínas en geles de una dimensión.

Los procesos postraduccionales cumplen con diferentes funciones como lo son: la variación antigénica, adhesión a tejidos en el hospedero, protección, estabilidad en la estructura de las proteínas, comunicación celular y reconocimiento por células del hospedero (Nothhaft & Szymanski, 2010). Por lo que, en este trabajo se detectaron glicosilaciones en las proteínas purificadas de pared celular de cepas BCG y encontramos glicosilaciones con manosa terminal y ácido siálico ligado (2-3) a galactosa (García-Ruiz, 2011).

La manosa es un azúcar que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es una hexosa que se encuentra clasificada dentro de los azúcares neutros. Las micobacterias contienen una gran cantidad de manosa en su estructura capaz de ser reconocidos por TLR2, 4 y 9. Hasta el momento se describe que el fosfadil mio-inositol manósido (PIM), lipomanana (LM) y lipoarabinomamana (LAM) son capaces de inducir la señalización a través de TLR2 y 4 (Mishra et al., 2011).

Las lipoproteínas son los principales ligandos para TLR2, pero los PIM pueden ser capaces de señalar a través de TLR2, dependiendo de su grado de acilación y manosilación (Doz et al., 2007; Gilleron, Nigou, Nicolle, Quesniaux, & Puzo, 2006; Nigou et al., 2008). Existe una relación positiva entre la longitud de la cadena de manosas y los lipoglicanos para activar TLR2 (Nigou et al., 2008). El lipoglicano tiene una cadena de manosa accesible (si se compara con arabinosa) que mostró ser un potente inductor de señalización TLR2-, aunque esta actividad se limita a las formas tri- y tetra aciladas (Ac1/Ac2LM) (Quesniaux et al., 2004). La señalización por los TLRs se verá reflejada en la inducción de citocinas. En un estudio en el cuál los macrófagos humanos son estimulados con lipomanana se demostró que existe un aumento en la producción de metaloproteinasa 9 de matriz (MMP-9). Esto se debe a la regulación negativa de la transcripción del inhibidor de MMP-9, inhibidor tisular de

metaloproteinasas-1, y dependiente de TLR2 (Elass et al., 2005). Además, en un modelo de granuloma la lipomanana induce la fusión del granulomas macrófago dependiente de TLR2 (Puissegur et al., 2007).

En cuanto a proteínas manosiladas en las micobacterias se han estudiado las proteínas de 19 y 42 kDa, donde se demostró la interacción con los TLR, especialmente con TLR2 (Pai et al., 2004; Shin et al., 2008; Wilkinson et al., 2009). En nuestro trabajo únicamente se detectaron manosas terminales que sugieren una interacción con el reconocimiento por TLR2 y TLR4. Sin embargo, se requiere de estudios más específicos para conocer si estas estructuras glicosiladas son reconocidas por los receptores o sí sólo facilitan este reconocimiento.

El ácido siálico (SiA) es el único azúcar de 9 carbonos presente en las superficies celulares, al cual se le atribuyen diferentes funciones como el mantenimiento de la integridad celular, como única fuente de carbono y nitrógeno, reconocimiento molecular y puede participar en los procesos de señalización y evasión de la respuesta inmune y actuar frente a condiciones oxidativas (Vimr, Kalivoda, Deszo, & Steenbergen, 2004). Hasta el momento la función específica del ácido siálico en las micobacterias no se conoce. Pero en nuestro trabajo describimos las primeras evidencias de que las proteínas de pared celular de las cepas BCG contienen ácido siálico y que éste azúcar es reconocido por células HEK293 que sobre-expresan TLR2 o TLR4. Es de interés el estudio del ácido siálico ya que recientemente se han descrito diferentes estudios en los cuales las bacterias utilizan SiA de diferentes fuentes: a) a través de transportadores, b) síntesis de *novo*, c) metabolitos simples o d) catabolismo (Vimr et al., 2004) y también porque en las bacterias el SiA constituye un componente importante de microorganismos con cápsula, y además se puede encontrar en proteínas glicosiladas en diferentes estructuras celulares como es el caso de *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni* y *Streptococcus agalactiae*, entre otros (Severi, Hood, & Thomas, 2007; Szymanski & Wren, 2005).

Con las proteínas identificadas por espectrometría de masas, se realizó un análisis en la base BCG List, PubMed y Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> y <http://tuberculist.epfl.ch/> respectivamente) para

buscar la localización celular de cada proteína y asegurar que estas proteínas se encuentran en la pared celular de BCG México.

Se identificaron diferentes proteínas de pared celular de BCG México, que participan en diferentes procesos metabólicos que posiblemente tienen glicosilación con manosa y/o ácido siálico y que son reconocidas por TLR-2 y TLR-4. Sin embargo, se requiere realizar la identificación de estas proteínas en geles de dos dimensiones y posteriormente hacer la identificación del tipo de glicosilación con lectinas para confirmar completamente qué proteína tiene este tipo de glicosilación y cuál de todas las proteínas en cada banda se unieron a los receptores TLR-2 y/o TLR-4. Se sabe que la expresión de las proteínas es diferente para cada subcepa y en este trabajo sólo se identificaron las proteínas de BG México por espectrometría de masas ya que en nuestro grupo de laboratorio se secuenció el genoma y se tienen también el proteoma de extracto celular de esta cepa (Orduna et al., 2011), sin embargo, se debe considerar que existen diferencias en la expresión de proteínas entre las cepas BCG y que se requiere hacer un análisis posterior con las cepas BCG Phipps y BCG México. Por ejemplo, se sabe que en estudios comparativos entre los proteomas de la fracción celular de BCG Phipps y BCG Danesa, y se encontraron 168 proteínas únicas para BCG Phipps y 90 para BCG Dinamarca. Mientras que, los proteomas de BCG México, Danesa, Phipps y Tokio, se encontraron 812, 794, 791 y 701 proteínas, respectivamente, donde se reveló que 185 puntos fueron comunes entre éstas las cepas BCG y 136 puntos fueron únicos para BCG México (Orduna et al., 2011).

Las proteínas alquil hidropéroxido reductasa C (AhpC), la proteína de filtrado de cultivo 17 (CFP17) y las chaperonas GroEL1 y GroEL2 se encontraron sobre-expresadas en BCG Phipps, mientras que para BCG Danesa hubo una sobre-expresión de GroEL2, TB39.8, la proteínas de 35 kDa y una probable alcohol deshidrogenasa. Todas estas proteínas están involucradas en la detoxificación y adaptación al medio de las diferentes micobacterias (Rodríguez-Alvarez et al., 2009).

## **8. CONCLUSIONES**

- ✓ Las proteínas glicosiladas de pared celular de las cepas BCG México, Phipps y Tokio fueron reconocidas por células que sobre-expresan TLR-2 oTLR-4.
  
- ✓ Éstas proteínas de pared de las cepas BCG México, Phipps y Tokio tienen modificaciones postraduccionales con manosa terminal y ácido siálico.
  
- ✓ Proteínas con glicosilación manosa terminal y ácido siálico unido, que participan en la síntesis de ácidos micólicos, oxidoreductasas, adhesión celular, proteínas de secreción y función desconocida, entre otras funciones se observaron en la pared celular de BCG México.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Medio sólido Middlebrook 7H10

Se preparó medio Middlebrook 7H10 (DIFCO™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, 19 g del polvo liofilizado fueron disueltos en 900 mL de agua desionizada conteniendo 5 mL de glicerol. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C. Posteriormente, se vació a placas Petri y una vez gelificado se mantuvo a 4°C hasta su uso.

El medio Middlebrook 7H10 contiene los siguientes componentes mencionados en la Tabla 11, por cada litro de agua:

**Tabla 11.** Reactivos que contiene el medio Middlebrook 7H10.

Reactivo	Cantidad (g)	Reactivo	Cantidad (g)
Sulfato magnésico	0.025	Albúmina bovina (fracciónV)	5.0
Citrato férrico de amonio	0.04	Catalasa	0.004
Citrato sódico	0.4	Piridoxina	0.001
Sulfato de amonio	0.5	Sulfato de zinc	0.001
Glutamato monosódico	0.5	Sulfato de cobre	0.001
Fosfato disódico	1.5	Biotina	0.0005
Fosfato monopotásico	1.5	Cloruro de calcio	0.0005
Agar	17.0	Verde malaquita	0.0025
Cloruro sódico	0.85	Glicerol	5.0
Glucosa	2.0	Ácido oleico	0.05 mL

### 9.2 Tinción de Ziehl-Neelsen

La tinción de Ziehl-Neelsen se realizó de la siguiente forma, en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar de seguridad Clase II (LABCONCO™) se hizo un frotis de cada una de las cepas y se dejó secar al aire libre. Posteriormente, se fijó el frotis por calentamiento (a 60°C) durante 30 min. Se le agregó fucsina fenicada durante 10 min (controlando la emisión de vapores en una campana de flujo laminar), se lavó con alcohol-ácido hasta quitar el exceso de colorante y se le agregó azul de metileno de Loeffler durante 3 min, a TA. El frotis se lavó con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se dejó secar a TA.

### 9.3 Medio líquido Sauton

El medio Sauton contiene los siguientes reactivos, en las siguientes concentraciones:

**Tabla 12.** Reactivos que contiene el medio Sauton.

Reactivo	Concentración
Asparagina	30.3 mM
ácido cítrico	10.4 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.9 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mM
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·Fe·H <sub>3</sub> N	0.4 mM
Tween 80	0.05%
glicerol	1.5%

Los cuales se disolvieron en aproximadamente 800 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se ajustó a pH 7.4. Después se aforó hasta 1,000 mL y se esterilizó 15 min a 121°C.

### 9.4 Medio DMEM

Se disuelve un sobre (13.5 g) del medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco®, Life technologies™) en aproximadamente 800 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y posteriormente, se le agrega 3.7 g de NaHCO<sub>3</sub> y se agita perfectamente.

En una campana de flujo laminar y en condiciones de asepsia se le adicionan 25 mL de HEPES 1 M, pH 7.4 y se agita hasta disolver. Finalmente, se ajusta el pH a 7.4 y se le agrega H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> c.b.p. 1 litro.

El medio se filtra por una membrana de 0.22 µm en condiciones de esterilidad.

### 9.5 Conteo celular en cámara de Neubauer

Se tomaron 10 µL del medio con células y se diluyeron en 40 µL del solución amortiguadora de azul de tripano (BioRad). Se colocaron 20 µL de esta suspensión en la cámara de Neubauer y se realizó el conteo celular de 10 campos. Se realizaron los

cálculos necesarios para obtener el número de células total, tomando en cuenta el factor de dilución.

### 9.6 Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS)

El PBS está contituido por los siguientes reactivos:

**Tabla 13.** Reactivos para la preparación de PBS.

Reactivo	Concentración
NaCl	140 mM
KCl	2.68 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,014 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76 mM
Ajustar el pH a 7.4	

### 9.7 Solución amortiguadora TDSET

La solución amortiguadora contiene los siguientes reactivos:

**Tabla 14.** Reactivos para la solución amortiguadora TDSET.

Reactivo	Concentración
Tris-HCl pH 7.0	10 mM
EDTA	10 mM
Deoxicolato de sodio	0.2%
SDS	0.1%
Tritón X-100	1.0%

### 9.8 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La curva se realizó por duplicado, como se indica en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Curva patrón de BSA.

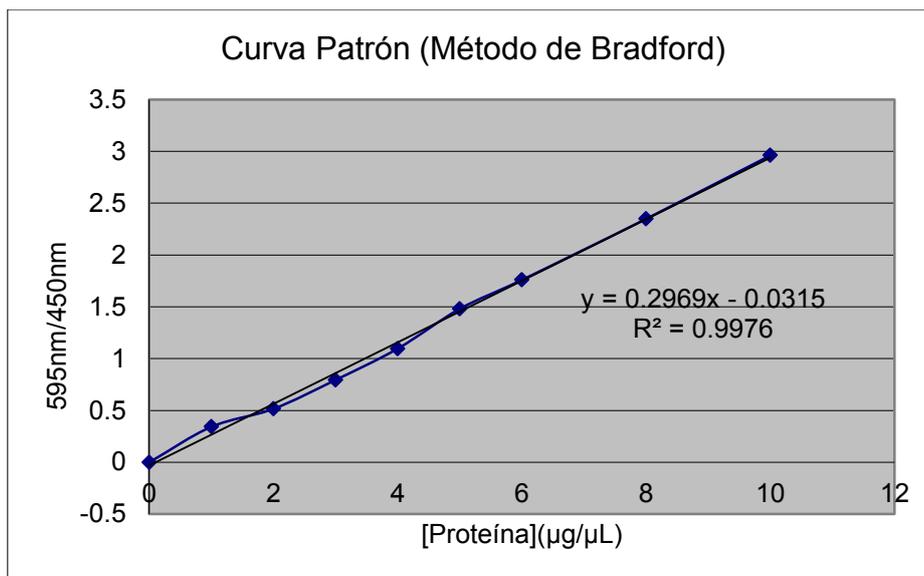
BSA a una concentración de 1 mg/mL (μL)	0	1	2	3	4	5	6	8	10
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> (μL)	50	49	48	47	46	45	44	42	40
Agregar 200 μL del Reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer a una longitud de onda (λ) de 595 y 450 nm									

Por otra parte, las muestras se prepararon por duplicado como se muestra en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Preparación de las muestras de pared celular por el método de Bradford.

Filtrado de cultivo ( $\mu\text{L}$ )	1
$\text{H}_2\text{O}_d$ ( $\mu\text{L}$ )	49
Agregar 200 $\mu\text{L}$ del Reactivo de Bradford, incubar 5 min en la oscuridad y leer a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 595 y 450 nm	

### 9.9 Curva patrón para determinar la cuantificación de proteínas de pared.



**Figura 17.** Curva Patrón de BSA para cuantificación de proteínas de pared por el método de Bradford.

### 9.10 Solución de mantenimiento de las células

La solución de tratamiento contiene los siguientes reactivos:

**Tabla 17.** Reactivos de la solución de tratamiento.

Reactivo	Concentración
Metanol	40%
Ácido acético	10%

### 9.11 Solución de tinción con Silver-Blue

A. Agregar los siguientes componentes a una décima parte del volumen total de agua:

- a) Ácido fosfórico a una concentración final del 10% m/v

- b) Sulfato de amonio a una concentración final de 10% m/v
- B. Cuando se haya disuelto todo el sulfato de amonio, añadir azul de Coomassie G-250 a una concentración final de 0.12%
- C. Cuando el sólido se haya disuelto, agregar metanol a una concentración final de 20% (La solución resultante es verde bandera).
- D. Agregar agua desionizada a un volumen del 80% del volumen final (La solución se tornará azul)

Esta solución es coloidal, no se necesitará filtrar y es estable durante 6 meses. Se almacenará en frasco ámbar, a TA.

### 9.12 Funciones de las proteínas de pared celular de BCG México identificadas por espectrometría de masas

A continuación se muestran las funciones de las proteínas de pared celular de BCG México que posiblemente tienen glicosilación con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y/o ácido siálico unido (2-3) a galactosa de BCG México que fueron identificadas por espectrometría de masas.

**Tabla 18.** Proteínas de la banda A identificadas por espectrometría de masas. (Proteínas de pared celular de BCG México posiblemente glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) a galactosa).

No. de proteína	Función	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
1	Participa en la utilización de glicolato. Cataliza la condensación e hidrólisis subsecuente de acetil coenzima A y glioxilato para formar malato y coenzima A	80.352	4.853
2	Proteína acarreadora de acilo implicada en la extensión meromicolato	12.516	3.791
3	Implicada en la degradación de RNAm. Cataliza la fosforólisis de polirribonucleótidos monocatenados procesivo en dirección 3' a 5'	79.685	4.5381
4	Cataliza la reacción de condensación de la síntesis de ácidos grasos a un aceptor acilo de dos carbonos del malonil-ACP	43.288	4.9482
5	Cataliza la isomerización de citrato a isocitrato vía <i>cis</i> -aconitato	103.960	5.1182
6	Enzima bifuncional es catalasa y peroxidasa	80.511	4.8765
7	Cataliza la elongación de N-ácido graso acetil coenzima A con metilmalonil coenzima A como agente para alargar los ácidos grasos y formar micocerósidos	224.254	4.8794
8	Activa la leucina con su ARNt específico	107.528	4.9014
9	Cataliza la transferencia de un grupo metil de 5-metiltetrahidrofolato a homocisteína resultando en la formación de metionina	81.531	4.9585
10	Promueve el replegado y montaje correcto de polipéptidos no plegados que se generan en condiciones de estrés	66.79	4.6553

**Tabla 19.** Proteínas de la banda B identificadas por espectrometría de masas. (Proteínas de pared celular de BCG México posiblemente glicosiladas con manosa terminal (1-3), (1-6) o (1-2) unido a manosa y ácido siálico unido (2-3) a galactosa).

No. de proteína	Función	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
1	Cataliza la formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP	42.992	4.7168
2	Cataliza la reoxidación de grupos dihidrolipoil	49.208	5.4521
3	Posible oxidoreductasa	48.021	4.6978
4	Convierte piruvato a fosfoenolpiruvato	50.667	5.3086
5	Ayuda al correcto plegamiento de proteínas	66.79	4.6553
6	Puede desempeñar un papel clave en la regulación de la concentración intracelular de adenosilhomocisteína	54.289	4.8926
7	Modificador de proteína que se une covalentemente a residuos de lisina de las proteínas sustrato, blanco de la degradación proteasomal	6.94	3.8027
8	Cataliza la conversión de L-glutamato a L-glutamina	53.536	4.8677
9	Cataliza la condensación y posterior hidrólisis de la acetil-coenzima A y glioxilato para formar malato y coenzima A	80.352	4.853
10	Cataliza la conversión de succinato semialdehído a succinato	48.514	4.7637
11	Cataliza la adición reversible de agua a fumarato para dar L-malato	50.11	5.165
12	Proteína acil acarreadora involucrada en la extensión meromicolato	12.516	3.791
13	Convierte sulfuro de hidrógeno y ferredoxina oxidada a sulfito y ferredoxina reducida	62.073	5.9927
14	Convierte la L-serina y L-homocisteína a L-cistationina	48.604	4.9922
15	Previene el mal plegamiento y promueve el replegamiento y montaje correcto de polipéptidos no plegados generados en condiciones de estrés	55.843	4.7959
16	Cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato	67.21	4.7373
17	Participa en la exportación de proteínas. Funciona como una peptidil-prolil cis-trans isomerasa	50.601	4.229
18	Probablemente participa en la conversión de propanoil coenzima A a S-metil malonil coenzima A	59.317	5.0317
19	Activa la L-arginina con su ARNt específico	59.672	5.2427
20	Cataliza la fosforólisis de polirribonucleótidos de cadena sencilla en dirección 3' a 5'	79.685	4.5381
21	Componente del complejo de la piruvato deshidrogenasa, que cataliza la conversión global de piruvato a acetil Coenzima A y CO <sub>2</sub>	100.154	5.5547
22	Convierte fosfatidil colina en fosfocolina	55.734	6.3691
23	Cataliza la oxidación de L-histidinol a L-histidinaldehído y luego a L-histidina	45.35	4.6729
24	Actividad de catalasa y peroxidasa que no se encuentra descrita por completo	80.511	4.8765
25	Activa la L-arginina con su ARNt específico	59.167	4.8706
26	Cataliza la síntesis de hidroximetilpirimidina fosfato en tiamina de amino imidazol ribotido en un radical S-adenosil-L-metionina radical (SAM) reacción dependiente	59.86	5.1035

**Tabla 20.** Proteínas de la banda C identificadas por espectrometría de masas. (Proteínas de pared celular de BCG México posiblemente glicosiladas con ácido siálico unido (2-3) a galactosa).

No. de proteína	Función	Masa molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
1	Necesario para la eficiencia de la ARN polimerasa en la elongación de la transcripción	17.843	4.7065
2	Posiblemente involucrada en la activación de análogos oxazol	16.337	8.9634
3	Forma parte del tallo ribosómico que ayuda al ribosoma a interactuar con factores de traducción unidos a GTP	13.432	4.3887
4	Función desconocida: Proteína hipotética conservada	12.536	4.1938
5	Previene el mal plegamiento y promueve el replegamiento y montaje correcto de polipéptidos no plegados generados en condiciones de estrés	56.692	4.6523
6	Previene el mal plegamiento y promueve el replegamiento y montaje correcto de polipéptidos no plegados generados en condiciones de estrés	56.692	4.6523
7	Necesario para la difusión extrapulmonar. Media la adherencia a las células epiteliales mediante la unión a glicoconjugados sulfatados presentes en la superficie de estas células; se une heparina, sulfato de dextrano, fucoidan y sulfato de condroitina. Promueve la hemaglutinación de eritrocitos de determinadas especies hospedadoras. Induce agregación de micobacterias	21.521	9.6636
8	Proteína universal de estrés	15.303	5.4199
9	Proteína acil acarreadora de extensión meromicolato	12.516	3.791
10	Transferencia reversible de un grupo adenilil de ATP a 4'-fosfopanteteina para formar difosfato coenzima A y pirofosfato	17.616	5.4404
11	Proteína de secreción inmunogénica	16.503	4.7197
12	Proteína de unión a ADN que tiene función de estructura y regulación de ADN	12.091	10.4839
13	Ayuda al plegamiento de las proteínas	66.79	4.6553
14	Desconocida	20.285	6.0381
15	Cataliza la formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP	42.992	4.7168
16	Funciona como una peptidil-prolil cis-trans isomerasa. Participa en la exportación de proteínas	50.601	4.229
17	Se une al ARNr 23S	16.159	9.5771
18	Se une al ARNr 23S	19.463	9.9946
19	Tiene actividad antioxidante. Pudo eliminar peróxidos o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	16.885	4.1587
20	Participa activamente en la respuesta al choque hiperosmótico y el calor mediante la prevención de la agregación de las proteínas de estrés desnaturalizado, en asociación con DnaK y GrpE.	24.517	4.1968

## 10. REFERENCIAS

- Abel, B., Thieblemont, N., Quesniaux, V. J., Brown, N., Mpagi, J., Miyake, K., . . . Ryffel, B. (2002). Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, *169*(6), 3155-3162.
- Aït-Khaled N, A. E., Armengol R, Bissell K, Boillot F, Caminero J A, Chiang C-Y, Clevenbergh P, Dlodlo R, Enarson D A, Enarson P, Fujiwara P I, Harries A D, Heldal E, Hinderaker S G, Lienhardt C, Monedero I, Rieder H L, Rusen I D, Trébucq A, Van Deun A, Wilson N. Manejo. (2010). *Manejo de la tuberculosis. Una guía esencial de buenas práctica.* (J. B. Bianchi, Trans. Edith Alarcón ed.). Paris, France: 2010.
- Akira, S. T., K. (2004). Toll-like receptor signalling. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Immunol*, *4*(7), 499-511. doi: 10.1038/nri1391
- Alam, M. S., Garg, S. K., & Agrawal, P. (2009). Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEBS J*, *276*(1), 76-93. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06755.x
- Andersen, P., & Doherty, T. M. (2005). The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. [Review]. *Nat Rev Microbiol*, *3*(8), 656-662. doi: 10.1038/nrmicro1211
- Arentz, M., & Hawn, T. R. (2007). Tuberculosis Infection: Insight from Immunogenomics. *Drug Discov Today Dis Mech*, *4*(4), 231-236. doi: 10.1016/j.ddmec.2007.11.003
- Aronson, J. D., & Schneider, P. (1950). The problem of standardization of BCG vaccine. *Am J Public Health Nations Health*, *40*(5), 533-544.
- Arroyo, R., & Alderete, J. F. (1995). Two Trichomonas vaginalis surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Arch Med Res*, *26*(3), 279-285.
- Barksdale, L., & Kim, K. S. (1977). Mycobacterium. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Bacteriol Rev*, *41*(1), 217-372.
- Behr, M. A., Schroeder, B. G., Brinkman, J. N., Slayden, R. A., & Barry, C. E., 3rd. (2000). A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in Mycobacterium bovis BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol*, *182*(12), 3394-3399.
- Behr, M. A., & Small, P. M. (1999). A historical and molecular phylogeny of BCG strains. [Comparative Study Historical Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Vaccine*, *17*(7-8), 915-922.
- Belley, A., Alexander, D., Di Pietrantonio, T., Girard, M., Jones, J., Schurr, E., . . . Behr, M. A. (2004). Impact of methoxymycolic acid production by Mycobacterium bovis BCG vaccines. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Infect Immun*, *72*(5), 2803-2809.
- Bonah, C. (2005). The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921-1933. [Historical Article]. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, *36*(4), 696-721. doi: 10.1016/j.shpsc.2005.09.003
- Brosch, R., Gordon, S. V., Buchrieser, C., Pym, A. S., Garnier, T., & Cole, S. T. (2000). Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in Mycobacterium bovis BCG Pasteur. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Yeast*, *17*(2), 111-123. doi: 10.1002/1097-0061(20000630)17:2<111::AID-YEA17>3.0.CO;2-G
- Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., . . . Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(6), 3684-3689. doi: 10.1073/pnas.052548299

- Bulut, Y., Michelsen, K. S., Hayrapetian, L., Naiki, Y., Spallek, R., Singh, M., & Arditi, M. (2005). Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*, *280*(22), 20961-20967. doi: 10.1074/jbc.M411379200
- Castillo-Rodal, A. I., Castanon-Arreola, M., Hernandez-Pando, R., Calva, J. J., Sada-Diaz, E., & Lopez-Vidal, Y. (2006). Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, *74*(3), 1718-1724. doi: 10.1128/IAI.74.3.1718-1724.2006
- CENAVE. (2008). Retrieved 2009, from <http://www.cenave.gob.mx/tuberculosis/CURSO%20HG/2010/LUNES/TB%20actual%202010.pdf>
- Claudia, R. H. (2004). DIFERENCIAS DE GÉNERO EN LAS REDES DE APOYO SOCIAL ENTRE LOS PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR: ESTUDIO CUALITATIVO EN DOS POBLADOS DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, *17*(2), 10.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V., & Mosteller, F. (1994). Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. [Meta-Analysis Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *JAMA*, *271*(9), 698-702.
- Conditions, N. N. C. C. f. C. (2006). Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control *Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*. London: Royal College of Physicians.
- Córdova-Villalobos José Ángel, H.-Á. M., Ortiz-Domínguez Maki Esther, Martínez-Ampudia Laura, Sotelo-Morales Julio, Fernández-Del Castillo Bernardo Emilio, Olmos-Tomasini Carlos Amado, Lezana-Fernández Miguel Ángel. (2009). Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. [Informe]. *Informe, Secretaría de Salud*, 83.
- Charlet, D., Mostowy, S., Alexander, D., Sit, L., Wiker, H. G., & Behr, M. A. (2005). Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis BCG strains due to a start codon mutation in sigK. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Microbiol*, *56*(5), 1302-1313. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04618.x
- Daffe, M., & Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. [Review]. *Adv Microb Physiol*, *39*, 131-203.
- Daffe, M., & Etienne, G. (1999). The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Tuber Lung Dis*, *79*(3), 153-169. doi: 10.1054/tuld.1998.0200
- Dao, D. N., Kremer, L., Guerardel, Y., Molano, A., Jacobs, W. R., Jr., Porcelli, S. A., & Briken, V. (2004). Mycobacterium tuberculosis lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Infect Immun*, *72*(4), 2067-2074.
- de Jong, B. C., Antonio, M., & Gagneux, S. (2010). Mycobacterium africanum--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *PLoS Negl Trop Dis*, *4*(9), e744. doi: 10.1371/journal.pntd.0000744
- de Souza, M. V., Ferreira Mde, L., Pinheiro, A. C., Saraiva, M. F., de Almeida, M. V., & Valle, M. S. (2008). Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against Mycobacterium tuberculosis. [Review]. *ScientificWorldJournal*, *8*, 720-751. doi: 10.1100/tsw.2008.99

- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int J Microbiol*, 2010, 148178. doi: 10.1155/2010/148178
- Djelouadji, Z., Raoult, D., Daffe, M., & Drancourt, M. (2008). A single-step sequencing method for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex species. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(6), e253. doi: 10.1371/journal.pntd.0000253
- Doz, E., Rose, S., Nigou, J., Gilleron, M., Puzo, G., Erard, F., . . . Quesniaux, V. F. (2007). Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGIRR-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 282(36), 26014-26025. doi: 10.1074/jbc.M702690200
- Elass, E., Aubry, L., Masson, M., Denys, A., Guerardel, Y., Maes, E., . . . Kremer, L. (2005). Mycobacterial lipomannan induces matrix metalloproteinase-9 expression in human macrophagic cells through a Toll-like receptor 1 (TLR1)/TLR2- and CD14-dependent mechanism. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, 73(10), 7064-7068. doi: 10.1128/IAI.73.10.7064-7068.2005
- Esko, J. D., Doering, T. L., & Raetz, C. R. H. (2009). Eubacteria and Archaea. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY).
- Esparza, M., Palomares, B., Garcia, T., Espinosa, P., Zenteno, E., & Mancilla, R. (2014). PstS-1, the 38-kDa *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein, is an adhesin, which binds the macrophage mannose receptor and promotes phagocytosis. *Scand J Immunol*. doi: 10.1111/sji.12249
- Espitia, C., & Mancilla, R. (1989). Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Exp Immunol*, 77(3), 378-383.
- García-Ruiz, V. (2011). *Caracterización de la PstS-1 de Mycobacterium tuberculosis recombinada en Mycobacterium microti*. Bachelor, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Gilleron, M., Nigou, J., Nicolle, D., Quesniaux, V., & Puzo, G. (2006). The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2. *Chem Biol*, 13(1), 39-47. doi: 10.1016/j.chembiol.2005.10.013
- Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle, J. T., & Chen, X. (2003). Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Mol Cell Proteomics*, 2(12), 1284-1296. doi: 10.1074/mcp.M300060-MCP200
- Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M. E., Torres, M. L., Ramirez, C., & Cruz, N. (1986). Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Infect Immun*, 52(1), 293-302.
- Hart, G. W., & Akimoto, Y. (2009). The O-GlcNAc Modification. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY).
- Hawgood, B. J. (1999). Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. [Biography Historical Article]. *Toxicon*, 37(9), 1241-1258.
- Hayashi, D., Takii, T., Fujiwara, N., Fujita, Y., Yano, I., Yamamoto, S., . . . Onozaki, K. (2009). Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. [Comparative Study Research

- Support, Non-U.S. Gov't]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56(2), 116-128. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00559.x
- Hayashi, D., Takii, T., Mukai, T., Makino, M., Yasuda, E., Horita, Y., . . . Onozaki, K. (2010). Biochemical characteristics among Mycobacterium bovis BCG substrains. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEMS Microbiol Lett*, 306(2), 103-109. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01947.x
- He, Z., & De Buck, J. (2010a). Cell wall proteome analysis of Mycobacterium smegmatis strain MC2 155. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Microbiol*, 10, 121. doi: 10.1186/1471-2180-10-121
- He, Z., & De Buck, J. (2010b). Localization of proteins in the cell wall of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K10 by proteomic analysis. *Proteome Sci*, 8, 21. doi: 10.1186/1477-5956-8-21
- Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P. M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., . . . Gagneux, S. (2008). High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Biol*, 6(12), e311. doi: 10.1371/journal.pbio.0060311
- Hett, E. C., & Rubin, E. J. (2008). Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(1), 126-156, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.00028-07
- Jones, M. B., Rosenberg, J. N., Betenbaugh, M. J., & Krag, S. S. (2009). Structure and synthesis of polyisoprenoids used in N-glycosylation across the three domains of life. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Biochim Biophys Acta*, 1790(6), 485-494. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.030
- José A. Caminero Luna, M. C. R., Vicente Ausina Ruiz, José M. Pina Gutiérrez y Jesús Sauret Valet. (2002). *Diagnóstico de la tuberculosis. Recomendaciones SEPAR*. México, D.F.: 1999 Retrieved from <http://www.separ.es/doc/publicaciones/normativa/rec13.pdf>.
- Joung, S. M., & Ryoo, S. (2013). BCG vaccine in Korea. *Clin Exp Vaccine Res*, 2(2), 83-91. doi: 10.7774/cevr.2013.2.2.83
- Kalra, M., Grover, A., Mehta, N., Singh, J., Kaur, J., Sable, S. B., . . . Khuller, G. K. (2007). Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Immunol*, 125(2), 173-183. doi: 10.1016/j.clim.2007.07.007
- Kaur, D., Guerin, M. E., Skovierova, H., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2009). Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Adv Appl Microbiol*, 69, 23-78. doi: 10.1016/S0065-2164(09)69002-X
- Killick, K. E., Ni Cheallaigh, C., O'Farrelly, C., Hokamp, K., MacHugh, D. E., & Harris, J. (2013). Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Cell Microbiol*, 15(9), 1484-1495. doi: 10.1111/cmi.12161
- Lindahl, G., Stalhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. (2005). Surface proteins of Streptococcus agalactiae and related proteins in other bacterial pathogens. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Clin Microbiol Rev*, 18(1), 102-127. doi: 10.1128/CMR.18.1.102-127.2005
- Luca, S., & Mihaescu, T. (2013). History of BCG Vaccine. *Maedica (Buchar)*, 8(1), 53-58.
- Macias Parra, M., Kumate Rodriguez, J., Arredondo Garcia, J. L., Lopez-Vidal, Y., Castanon-Arreola, M., Balandrano, S., . . . Gutierrez Castellon, P. (2011). Mycobacterium tuberculosis Complex Genotype Diversity and Drug Resistance Profiles in a Pediatric Population in Mexico. *Tuberc Res Treat*, 2011, 239042. doi: 10.1155/2011/239042
- Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C., & Stover, C. K. (1996). Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. [Comparative Study]. *J Bacteriol*, 178(5), 1274-1282.

- Mahla, R. S., Reddy, M. C., Prasad, D. V., & Kumar, H. (2013). Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. [Review]. *Front Immunol*, 4, 248. doi: 10.3389/fimmu.2013.00248
- Manganelli, R., Provvedi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., & Smith, I. (2004). Sigma factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *J Bacteriol*, 186(4), 895-902.
- Manuel Casal, A. G., Nuria Martín, Santiago Moreno y M<sup>a</sup> Carmen Nogales. (2009). Procedimientos en Microbiología Clínica, 2010, from <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9.htm>
- Mehta, J. B., Dutt, A., Harvill, L., & Mathews, K. M. (1991). Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis. A comparative analysis with pre-AIDS era. [Comparative Study]. *Chest*, 99(5), 1134-1138.
- Mishra, A. K., Driessen, N. N., Appelmelk, B. J., & Besra, G. S. (2011). Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. [Review]. *FEMS Microbiol Rev*, 35(6), 1126-1157. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00276.x
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 240-273, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00046-08
- Mostowy, S., Tsolaki, A. G., Small, P. M., & Behr, M. A. (2003). The in vitro evolution of BCG vaccines. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vaccine*, 21(27-30), 4270-4274.
- Nandakumar, S., Kannanganat, S., Dobos, K. M., Lucas, M., Spencer, J. S., Fang, S., . . . Sable, S. B. (2013). O-mannosylation of the *Mycobacterium tuberculosis* adhesin Apa is crucial for T cell antigenicity during infection but is expendable for protection. [Clinical Trial Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003705. doi: 10.1371/journal.ppat.1003705
- Niemann, H. H., Schubert, W. D., & Heinz, D. W. (2004). Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. [Review]. *Microbes Infect*, 6(1), 101-112.
- Nigou, J., Vasselon, T., Ray, A., Constant, P., Gilleron, M., Besra, G. S., . . . Puzo, G. (2008). Mannan chain length controls lipoglycans signaling via and binding to TLR2. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, 180(10), 6696-6702.
- Nothaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Microbiol*, 8(11), 765-778. doi: 10.1038/nrmicro2383
- Orduna, P., Cevallos, M. A., de Leon, S. P., Arvizu, A., Hernandez-Gonzalez, I. L., Mendoza-Hernandez, G., & Lopez-Vidal, Y. (2011). Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG Mexico 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Genomics*, 12, 493. doi: 10.1186/1471-2164-12-493
- Pai, R. K., Pennini, M. E., Tobian, A. A., Canaday, D. H., Boom, W. H., & Harding, C. V. (2004). Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Infect Immun*, 72(11), 6603-6614. doi: 10.1128/IAI.72.11.6603-6614.2004
- Palaniyar, N., Nadesalingam, J., & Reid, K. B. (2002). Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Immunobiology*, 205(4-5), 575-594. doi: 10.1078/0171-2985-00156

- Puissegur, M. P., Lay, G., Gilleron, M., Botella, L., Nigou, J., Marrakchi, H., . . . Altare, F. (2007). Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta1 integrin-mediated pathway. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, *178*(5), 3161-3169.
- Quesniaux, V. J., Nicolle, D. M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., . . . Ryffel, B. (2004). Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, *172*(7), 4425-4434.
- Rezwan, M., Laneelle, M. A., Sander, P., & Daffe, M. (2007). Breaking down the wall: fractionation of mycobacteria. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Microbiol Methods*, *68*(1), 32-39. doi: 10.1016/j.mimet.2006.05.016
- Ritz, N., & Curtis, N. (2009). Mapping the global use of different BCG vaccine strains. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Tuberculosis (Edinb)*, *89*(4), 248-251. doi: 10.1016/j.tube.2009.03.002
- Rodriguez-Alvarez, M., Mendoza-Hernandez, G., Encarnacion, S., Calva, J. J., & Lopez-Vidal, Y. (2009). Phenotypic differences between BCG vaccines at the proteome level. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Tuberculosis (Edinb)*, *89*(2), 126-135. doi: 10.1016/j.tube.2008.12.001
- Salud, S. d. (2012). *Presentación de resultados de la misión de Evaluación del Programa de Control de la Tuberculosis en México*. Huatulco, Oaxaca: Secretaría de Salud Retrieved from [www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/reuniones\\_sinave/rodic13/03dic/031213-04-pinetr-eval-progtb.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/reuniones_sinave/rodic13/03dic/031213-04-pinetr-eval-progtb.pdf).
- Salud, S. d. (2013, 11 de febrero del 2013). Breve historia de la tuberculosis en México Retrieved 27 febrero del 2013, 2013, from <http://www.spps.salud.gob.mx/avisos/1436-breve-historia-tuberculosis-mexico.html>
- Schluesener, D., Fischer, F., Kruip, J., Rogner, M., & Poetsch, A. (2005). Mapping the membrane proteome of *Corynebacterium glutamicum*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proteomics*, *5*(5), 1317-1330. doi: 10.1002/pmic.200400993
- Severi, E., Hood, D. W., & Thomas, G. H. (2007). Sialic acid utilization by bacterial pathogens. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Microbiology*, *153*(Pt 9), 2817-2822. doi: 10.1099/mic.0.2007/009480-0
- Shin, D. M., Yang, C. S., Lee, J. Y., Lee, S. J., Choi, H. H., Lee, H. M., . . . Jo, E. K. (2008). Mycobacterium tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C zeta in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Microbiol*, *10*(9), 1893-1905. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01179.x
- Sinha, D., Ghosh, A. K., Mukherjee, S., Biswas, R., & Biswas, T. (2014). Antigenic relatedness defines Toll-like receptor 2 is crafted on ligand blueprint. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Immunobiology*, *219*(10), 798-801. doi: 10.1016/j.imbio.2014.06.007
- Sinha, S., Arora, S., Kosalai, K., Namane, A., Pym, A. S., & Cole, S. T. (2002). Proteome analysis of the plasma membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp Funct Genomics*, *3*(6), 470-483. doi: 10.1002/cfg.211
- Sohaskey, C. D., & Modesti, L. (2009). Differences in nitrate reduction between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* are due to differential expression of both narGHJ and narK2. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *FEMS Microbiol Lett*, *290*(2), 129-134. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01424.x

- Stanley, P., Schachter, H., & Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY).
- Sukhithasri, V., Nisha, N., Biswas, L., Anil Kumar, V., & Biswas, R. (2013). Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Microbiol Res*, *168*(7), 396-406. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.005
- Sweet, L., Zhang, W., Torres-Fewell, H., Serianni, A., Boggess, W., & Schorey, J. (2008). Mycobacterium avium glycopeptidolipids require specific acetylation and methylation patterns for signaling through toll-like receptor 2. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Biol Chem*, *283*(48), 33221-33231. doi: 10.1074/jbc.M805539200
- Szymanski, C. M., & Wren, B. W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Microbiol*, *3*(3), 225-237. doi: 10.1038/nrmicro1100
- Toida, I. (2000). Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. [Comment Historical Article Letter]. *Tuber Lung Dis*, *80*(6), 291. doi: 10.1054/tuld.2000.0237
- Torrelles, J. B., & Schlesinger, L. S. (2010). Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Tuberculosis (Edinb)*, *90*(2), 84-93. doi: 10.1016/j.tube.2010.02.003
- Uenishi, Y., Fujita, Y., Kusunose, N., Yano, I., & Sunagawa, M. (2008). Comprehensive analysis of mycolic acid subclass and molecular species composition of Mycobacterium bovis BCG Tokyo 172 cell wall skeleton (SMP-105). *J Microbiol Methods*, *72*(2), 149-156. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.016
- Van Deinse, F., & Senechal, F. (1950). BCG on Sauton's medium; effect of a long series of subcultures on the morphological and biological properties of BCG cultures. *Bull World Health Organ*, *2*(3), 347-354.
- Varki, A., & Sharon, N. (2009). Historical Background and Overview. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor (NY).
- Verschoor, J. A., Baird, M. S., & Grooten, J. (2012). Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Prog Lipid Res*, *51*(4), 325-339. doi: 10.1016/j.plipres.2012.05.002
- Vimr, E. R., Kalivoda, K. A., Deszo, E. L., & Steenbergen, S. M. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Microbiol Mol Biol Rev*, *68*(1), 132-153.
- Vordermeier, H. M., Cockle, P. J., Whelan, A. O., Rhodes, S., Chambers, M. A., Clifford, D., . . . Hewinson, R. G. (2000). Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vaccine*, *19*(9-10), 1246-1255.
- Weerapana, E., & Imperiali, B. (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Glycobiology*, *16*(6), 91R-101R. doi: 10.1093/glycob/cwj099
- WHO. (2004). Weekly Epidemiological Record (Vol. 4). Switzerland: World Health Organization
- WHO. (2012). *Global tuberculosis report 2012*. Geneva: WHO.
- WHO. (2013, March 2014). Tuberculosis, Key facts. *Fact sheet N°104* Retrieved april, 2013, 2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>

Wilkinson, K. A., Newton, S. M., Stewart, G. R., Martineau, A. R., Patel, J., Sullivan, S. M., . . .  
Wilkinson, R. J. (2009). Genetic determination of the effect of post-translational  
modification on the innate immune response to the 19 kDa lipoprotein of  
*Mycobacterium tuberculosis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Microbiol*, 9,  
93. doi: 10.1186/1471-2180-9-93