

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE *M. bovis* BCG
RECONOCIDAS POR EL SUERO DE SUJETOS SANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENOMICAS

PRESENTA

ING. EN B. CLAUDIA VIRIGINIA DORANTES TORRES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA

MEXICO D.F

ENERO 2011

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Mauricio Castañón Arreola, Dr. en C.
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

ASESORES

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez
Centro de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica, ICyT DF

El presente proyecto fue realizado en el laboratorio 4 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. Mauricio Castañón Arreola y bajo la asesoría de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y del Dr. Máximo Berto Martínez Benítez.

El presente trabajo se realizó con el financiamiento otorgado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, para la realización del proyecto “Identificación de proteínas de *M. tuberculosis* con valor predictivo para el diagnóstico de infección latente y tuberculosis activa” (ICyT-DF PIFUTP08-101); y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto No. 86802, beca 266665).



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mauricio Castañón Arreola, por brindarme un espacio dentro de su equipo de trabajo, por todas sus enseñanzas y por su paciencia durante la realización de este trabajo

A Fernando y Payan, por todo aquello que me enseñaron, por compartir los buenos y los malos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A todos los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas, por brindarme su apoyo y enseñanzas cuando lo necesite.

A la Dra. Itzel, por su apoyo incondicional durante mi estancia en el DF.

A todos mis compañeros del Posgrado en Ciencias Genómicas, que día con día me regalaron una sonrisa al llegar

A Caty, Lulú y Vivi, por su apoyo en todos los asuntos administrativos

DEDICATORIA

A mi Hija

Esa princesita que con solo una sonrisa, se convierte en mi luz para seguir adelante

A mis padres

Por todas sus enseñanzas, y sobre todo, por ese apoyo incondicional que me brindan siempre

A mi hermano:

Mi compañero de travesuras y proyectos

A mi abuelita Juanita:

Por haber sido como mi segunda madre, y ser parte importante en mi formación como persona.

A mi abue Eufra:

Por todo su apoyo y comprensión que me da con tanto amor

A los FIATOS

Por haberse convertido en mi familia en el DF, y enseñarme el verdadero valor del amor y la amistad

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	- 1 -
Epidemiología	- 1 -
Género <i>Mycobacterium</i>	- 5 -
Complejo " <i>Mycobacterium tuberculosis</i> "	- 8 -
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	- 8 -
Inmunopatología de la infección con <i>M. tuberculosis</i>	- 9 -
Inmunidad innata frente a <i>M. tuberculosis</i>	- 12 -
Inmunidad adaptativa frente a <i>M. tuberculosis</i>	- 14 -
Diagnóstico de la Tuberculosis	- 14 -
<i>M. bovis</i> BCG	- 18 -
Hipótesis del enmascaramiento	- 20 -
JUSTIFICACIÓN	- 22 -
OBJETIVO GENERAL	- 23 -
OBJETIVOS PARTICULARES	- 24 -
METODOLOGÍA	- 26 -
Recolección de muestras	- 26 -
Cultivo de <i>M. bovis</i> BCG (Danesa 1331)	- 26 -
Extracción de proteínas	- 27 -
Cuantificación de proteínas	- 27 -
SDS-PAGE	- 28 -
Ensayos de ELISA	- 28 -

Electroforesis en doble dimensión (2D)	- 29 -
Tinción de los geles de 2D	- 30 -
Análisis de los patrones de 2D	- 32 -
Western Blot	- 32 -
<i>Transferencia de proteínas</i>	- 32 -
<i>Visualización de la transferencia</i>	- 33 -
<i>Protocolo de Western Blot</i>	- 33 -
Tinción con Coomassie coloidal G-250	- 34 -
Análisis de espectrometría de masas	- 34 -
Análisis Bioinformático	- 35 -
RESULTADOS	- 37 -
Recolección de muestras	- 37 -
Ensayos de ELISA	- 39 -
Cultivo y extracción de proteínas de <i>M. bovis</i> BCG	- 42 -
Electroforesis en doble dimensión	- 44 -
Western Blot	- 47 -
Western Blot en 2D	- 52 -
Identificación por espectrometría de masas	- 53 -
Análisis Bioinformático	- 55 -
DISCUSIÓN	- 59 -
CONCLUSIONES	- 65 -
PERSPECTIVAS	- 66 -
REFERENCIAS	- 67 -

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Incidencia mundial de TB en el año 2008
- Figura 2** Incidencia de TB pulmonar en la Republica Mexicana en el año 2008
- Figura 3** Incidencia de TB pulmonar en el Distrito Federal
- Figura 4** Genero *Mycobacterium*
- Figura 5** Etapas De la infección con *M. tuberculosis*
- Figura 6** Respuesta inmune montada ante la estimulo con *M. tuberculosis*
- Figura 7** Representación grafica de la hipótesis del bloqueo y enmascaramiento
- Figura 8** Estrategia experimental
- Figura 9** Sitios de muestreo
- Figura 10** Distribución de sueros según su rango de edad
- Figura 11** Ensayos de ELISA para IgG's totales
- Figura 12** Número de muestras con IgG's totales que reconocen PFC de *M. bovis*
BCG
- Figura 13** Ensayos de ELISA para IgA's
- Figura 14** Número de muestras con IgA's que reconocen PFC de *M. bovis* BCG
- Figura 15** SDS-PAGE de integridad
- Figura 16** Gel maestro para PFC's
- Figura 17** Gel maestro para proteínas de ET
- Figura 18** Transferencia de SDS-PAGE
- Figura 19** Transferencia de electroforesis en 2D
- Figura 20** Western blot en 1D, contra PFC's de *M. bovis* BCG

- Figura 21** Western Blot en una dimensión contra proteínas de ET de *M. bovis* BCG
- Figura 22** Western Blot en una dimensión de un "pool" de sueros de sujetos sanos y otro "pool" de sueros de pacientes y contactos de TB, contra P FC de *M. bovis* BCG
- Figura 23** Western Blot en 2D
- Figura 24** Secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados por espectrometría de masas

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1** Especies de Micobacterias no tuberculosas aisladas de agua.
- Tabla 2** Presencia de los antígenos ESAT-6 y CPF-10 en las micobacterias
- Tabla 3** Antígenos utilizados para el diagnostico de la TB en pruebas serológicas.
- Tabla 4** Porcentajes de identidad de los antígenos utilizados en pruebas serológicas con respecto a sus homólogos en otras micobacterias.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
2D-PAGE	Doble dimensión
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Seroalbúmina bovina
Células NK	Células asesinas naturales (<i>Natural killer</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DTT	Dithiothreitol
ET	Extractos totales
G+C	Contenido de guaninas y citocinas
H	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IAA	Iodacetamida
IFN- γ	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-8	Interleucina 8

MCH-II	Complejo mayor de histocompatibilidad
MFR	Multifarmacorresistente
Min	Minutos
mM	Milimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Normalidad
Nm	Nanómetros
V	Voltios
O₂	Oxígeno molecular
PFC	Proteínas de Filtrado de Cultivo
PPD	Derivado proteico purificado
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSA	Secretaria de salud
TB	Tuberculosis
TGF-β	Factor de crecimiento transformante Beta
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- alfa
V/hr	Volts/horas
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB-1D	Western Blot en una dimensión
WB-2D	Western Blot en doble dimensión
XMFR	Extremadamente multifarmacorresistente

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades que han acompañado al hombre desde tiempos muy remotos. Es causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, siendo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y *Mycobacterium bovis* las más importantes en términos de salud, ya que son las causantes de la tuberculosis humana; sin embargo también pueden presentarse casos de infección con *M. africanum* y *M. canetti* (1). Hoy en día la TB sigue siendo considerada un problema de salud pública, principalmente en aquellos países que se encuentran en vías de desarrollo como China, la India, Rusia, Pakistán, Vietnam, Indonesia y algunos países del continente africano Etiopía, Sudáfrica, Kenia, El Congo y Nigeria (2).

Epidemiología

En el año 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró un estado de emergencia global contra la TB debido a la reemergencia de la enfermedad; y a partir del año 2004 se planteó como una meta del programa de control de la TB el reducir los casos nuevos de TB, además de contar con nuevos métodos de diagnóstico para una mejor detección de la enfermedad en estadios tempranos, así como tratamientos más cortos y efectivos dentro del programa de control de la TB (3).

Con las medidas adoptadas, para el año 2007 se logró disminuir la prevalencia mundial de 296 casos/100,000 habitantes en 1990 a 206 casos/100,000 habitantes para ese año(4). Esto refleja una menor prevalencia en los países industrializados con respecto a los países en vías de desarrollo, como China, la India, Rusia, Pakistán, Vietnam e Indonesia, en los cuales se concentra la mayoría de los casos de TB (5). Además de que se observó un incremento significativo en el número de casos de TB en individuos mayores de 15 años. En estos países registra una prevalencia mayor a 500 casos/100,000 habitantes (Figura 1), y una mortalidad de aproximadamente 2 millones de decesos al año. La OMS estima que actualmente más de 2000 millones de personas (aproximadamente 1/3 de la población mundial) están infectadas con el bacilo de la tuberculosis, sin presentar ningún síntoma (6).

Los principales obstáculos para alcanzar un buen control de la TB son: a) la falta de apego al tratamiento, b) la aparición de cepas multirresistentes a fármacos (MFR y XMFR) y c) la co-infección con el VIH (4). Además de éstos, existen otros factores que debilitan el sistema inmune y predisponen al individuo a la infección con *M. tuberculosis*; entre ellos se enlistan la diabetes, la hipercolesterolemia, el alcoholismo, las deficiencias nutrimentales y el estrés (7). Otros limitantes en el control de la TB son la falta de métodos diagnósticos de bajo costo y de fácil acceso a las comunidades rurales en donde la TB es endémica, así como la necesidad de nuevas vacunas capaces de brindar una protección mayor a la que confiere la vacuna *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) (8).

En México los datos reportados en 2008, por la Secretaria de Salud muestran que a nivel nacional se presentó una incidencia de 14.1 casos nuevos/100,000 habitantes,

observándose una mayor incidencia en los estados de Baja California (40.5 casos/100,000 hab), Guerrero (33.1 casos/100,000 hab) y Tamaulipas (31.9 casos/100,000 hab) (Figura 2). Además de ello, la SSA reportó que la mortalidad por TB pulmonar en hombres es 2.4 veces mayor que la encontrada en mujeres (9).

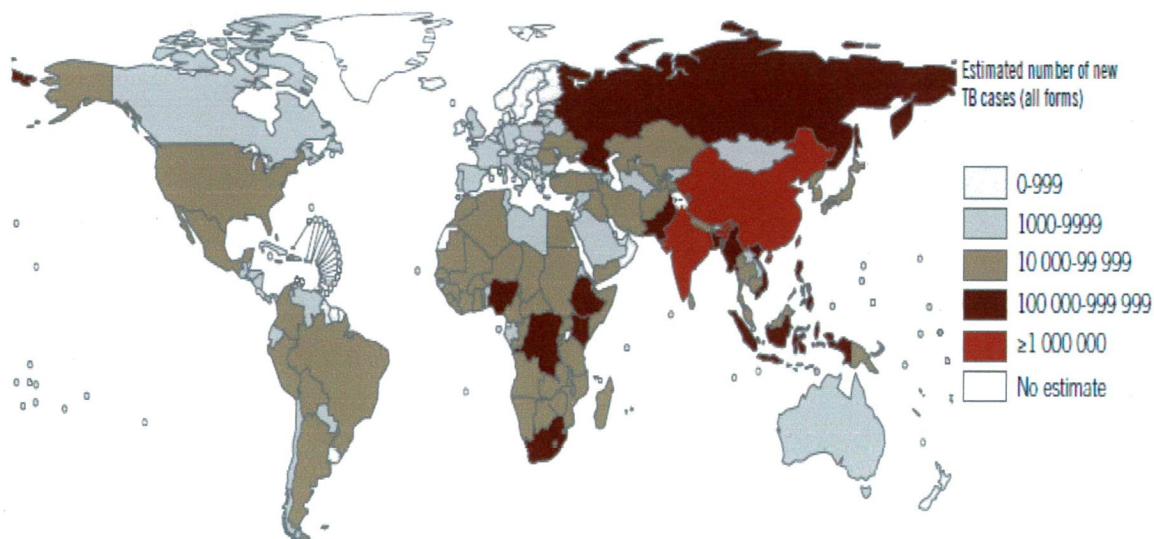


Figura 1. Incidencia mundial de TB pulmonar en el año 2008. En el mapa se muestran la incidencia de casos nuevos de TB reportados a la OMS por más de 180 países del mundo. China, la India, Rusia, Pakistán, Vietnam e Indonesia presentan la mayor incidencia, seguidos por los países africanos como Etiopía, Sudáfrica, Kenia, El Congo y Nigeria que rebasan la media mundial de 139 casos nuevos/100,000 habitantes. (STOP TB 2011).

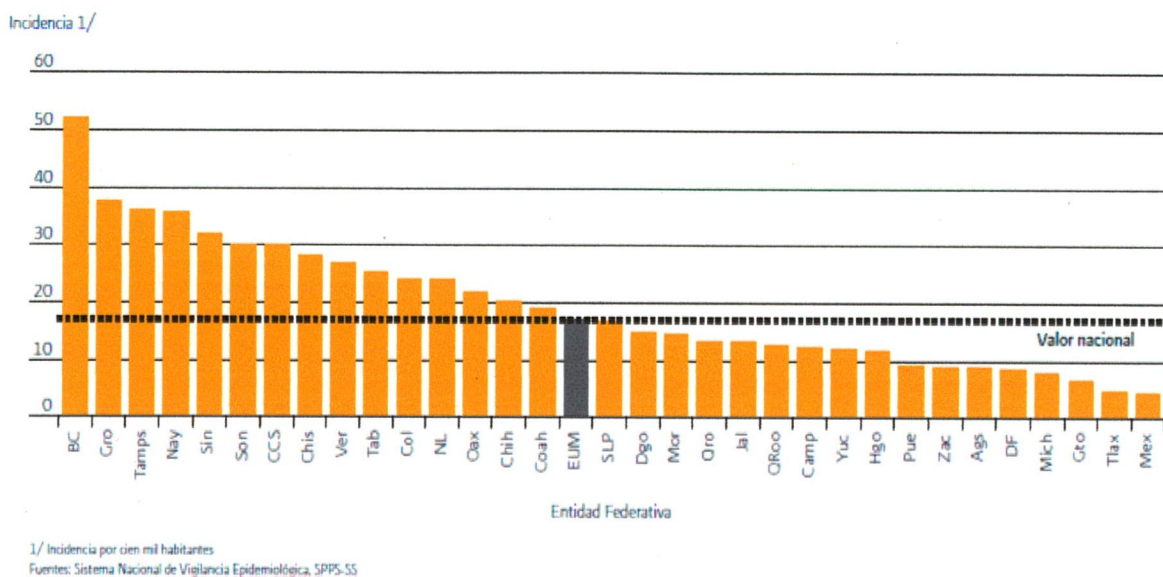


Figura 2. Incidencia de TB pulmonar en la República Mexicana. En la gráfica se muestra la incidencia de TB pulmonar reportada en el 2008 en la República Mexicana, observándose una mayor incidencia en el estados de Baja California con más de 50 casos por cada 100 000 habitantes y seguido por los estados de Guerrero, Tamaulipas, Nayarit y Sinaloa que se poseen una incidencia de casi el doble de la media nacional (EUM) (SSA 2008).

En el Distrito Federal la SSA reportó un total de 465 casos para el año 2008, presentándose con mayor frecuencia en personas de 25 a 40 años de edad (Figura 3), lo cual se correlaciona con la hipótesis que sustenta que la eficacia protectora de la vacuna *M. bovis* BCG comienza a decaer en esta edad (10).

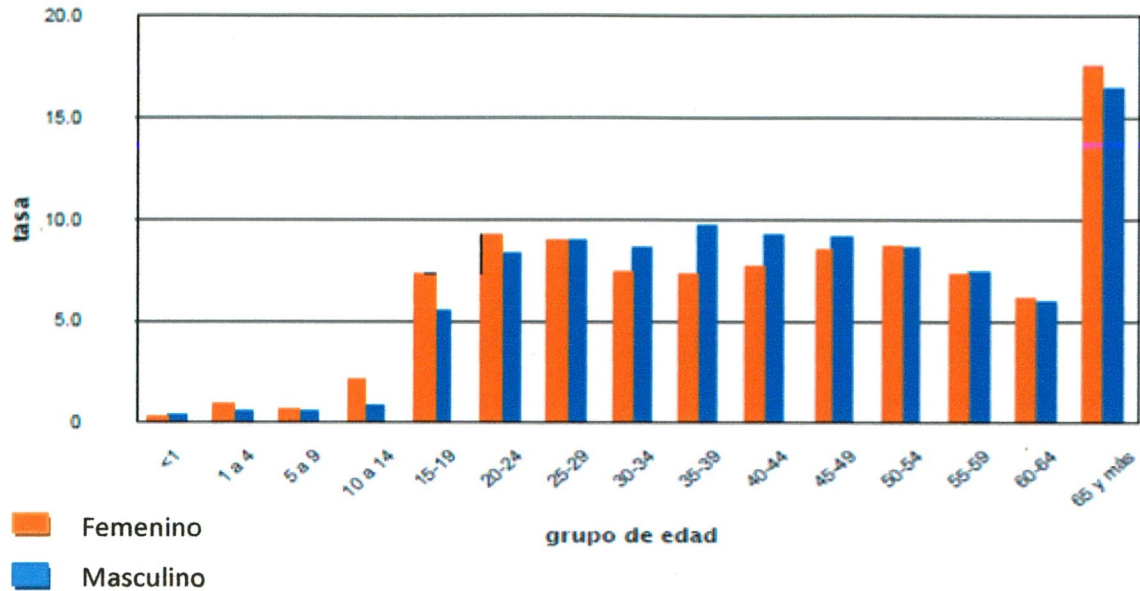


Figura 3. Incidencia de TB pulmonar en el Distrito Federal. En la gráfica se muestran los casos nuevos de TB reportados por la SSA en el año 2008, distribuidos acorde a la edad y el género. Se observa un incremento en el número de casos a partir de los 15 años, sin embargo, la mayor incidencia se presenta en personas ≥ 65 años (SSA 2008).

Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* agrupa a más de 117 especies, sin embargo, se distingue por incluir dos especies que provocan dos de las patologías más conocidas a lo largo de la humanidad: la tuberculosis y la lepra, causadas por *M. tuberculosis* y *M. leprae*, respectivamente. Sin embargo, la mayoría de las especies contenidas en el género *Mycobacterium* no son patógenas para el hombre, por lo que se hace referencia a ellas como micobacterias no tuberculosas (MNT's) (Figura 4). Estas especies son de vida libre y se pueden encontrar en agua (municipal, drenajes, albercas públicas, spas, grifos de agua, regaderas, etc), en el suelo, como comensales de algunos protozoarios,

y en ocasiones, causando patologías en animales y humanos (Tabla 1) (11). Una característica de los miembros de este género, es que poseen una pared celular muy compleja conformada por una gran cantidad de compuestos impermeables que hacen a estos organismos resistentes a numerosos fármacos, así como a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido, por ello se les ha denominado bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (12, 13).

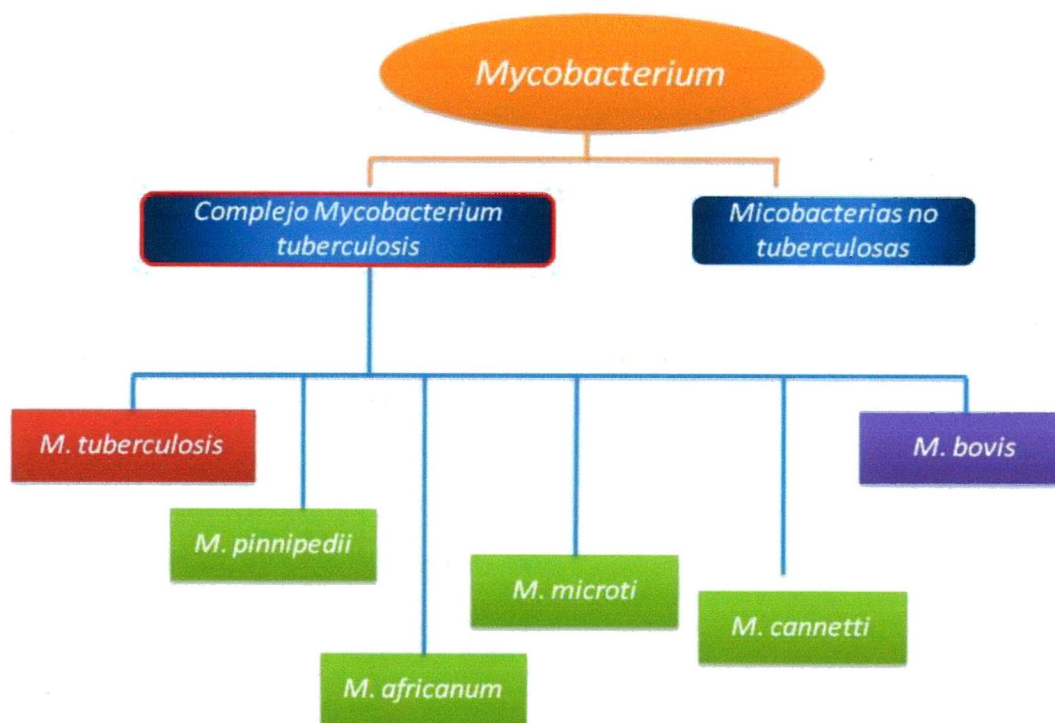


Figura 4. Género *Mycobacterium*. En la figura se muestran las micobacterias no tuberculosas o de vida libre, y aquellas pertenecientes al complejo "*Mycobacterium tuberculosis*" (NCBI-taxonomy).

Las MNT's se distinguen de las micobacterias del complejo "*Mycobacterium tuberculosis*" y de *M. leprae* por no ser patógenos obligados; sin embargo, comparten características similares entre ellas como: la alta cantidad de lípidos que componen su pared celular, el alto contenido de G+C en su genoma, la presencia de familias multigénicas y una gran homología que ha dificultado el diagnóstico oportuno de la enfermedad (11).

Tabla 1

Especies de Micobacterias no tuberculosas aisladas de cuerpos de agua

MICOBACTERIA	AGUA	SUELOS	OTROS
<i>M. gordonae</i>	Acuarios, agua potable, baños, regaderas maquinas de hielo		
<i>M. avium</i>	Plantas de tratamiento, agua potable Spas, tuberías, agua de uso residencial	Tierra aislada de pantanos	
<i>M. fortuitum</i>	Río Grande México, plantas de tratamiento, agua de hospitales, maquinas de hielo	Suelo en Malawi	
<i>M. scrocefulaceum</i>	Río Grande México, tuberías viejas, baños de hospitales		
<i>M. muconogenicum</i>	Maquinas de hielo, plantas tratadoras de agua	Tierra	
<i>M. kansasii</i>	Plantas tratadoras de agua, maquinas de hielo, albercas publicas		
<i>M. chelonae</i>			Animales domésticos
<i>M. xenopi</i>	Ríos en Finlandia		
<i>M. botniense</i>	Ríos en Finlandia		
<i>M. marinum</i>	Albercas publicas		Peces, ranas
<i>M. ulcerans</i>	Agua potable	Tierra	Insectos, animales salvajes y peces

Complejo “*Mycobacterium tuberculosis*”

Dentro del género *Mycobacterium* se encuentra el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, en el cual se han agrupado todas aquellas micobacterias causantes de tuberculosis o capaces de producir lesiones similares en humanos y algunas especies de animales. El complejo incluye a las especies: *M. tuberculosis* (principal agente etiológico de la TB humana), *M. africanum* (causante de algunos casos de TB en el continente africano), *M. canettii*, *M. bovis* (causante de TB en el ganado), *M. microti* (causante de TB en ratones), *M. pinnipedii* (causantes de la TB en lobos marinos). Una peculiaridad de las especies del complejo es que comparten más de un 99% de identidad en su genoma (14, 15).

Mycobacterium tuberculosis

En 1882, Robert Koch describió el agente etiológico de la TB humana y lo denominó *Bacterium tuberculosis*, este nombre fue sustituido por el de *Mycobacterium tuberculosis* en el año de 1896 por Lehman y Neuman (16). *M. tuberculosis* es un bacilo de 3 a 5 µm de longitud, inmóvil, no esporulado, con abundantes gránulos citoplasmáticos y un alto contenido de G+C (65 %) en la composición de su DNA (16-18). Este patógeno es intracelular y aerobio obligado, además de tener una predilección por el tejido pulmonar debido a la tensión de O₂ que existe en él. Sin embargo, también pueden presentarse casos de tuberculosis extrapulmonar contraída por vía digestiva, urogenital, cutánea, a través de mucosas lesionadas o por la

diseminación del bacilo durante la primoinfección (19, 20). Su crecimiento está subordinado a la presencia de oxígeno y al pH circundante. Su multiplicación es muy lenta (se divide cada 16 a 20 horas) debido a que sólo posee un operón de rRNA y, ante circunstancias adversas puede entrar en estado latente, pudiendo retrasar su multiplicación desde algunos días hasta varios años (11, 17).

Inmunopatología de la infección con *M. tuberculosis*

La primera etapa de la infección por *M. tuberculosis* comienza después de que el bacilo ha entrado al organismo por la inhalación de microgotas de saliva expulsadas por un individuo infectado con TB activa al toser o estornudar (21). Una vez que los bacilos llegan a los alvéolos pulmonares se inicia una serie de mecanismos destinados a su eliminación. Se estima que sólo en el 20-50% de las personas expuestas a *M. tuberculosis* el bacilo resistirá a la respuesta inmune innata mediada por los macrófagos alveolares, reproduciéndose en ellos, infectando a otras células cercanas y activando la respuesta inmune. El hospedero monta entonces una respuesta celular dando lugar a la infiltración de basófilos, neutrófilos y células dendríticas al lugar de la infección, las cuales se organizan a fin de contener al bacilo en una estructura denominada "granuloma" (22). En aproximadamente el 90-95% de los casos se contendrá la multiplicación del bacilo y éste permanecerá en un estado "latente" dentro del granuloma (Figura 5).

La TB latente se ha definido como un estado quiescente, en el cual no se presentan signos ni síntomas de una infección activa. De aquellas personas que lograron

contener la infección en un estado latente sólo el 5-10% desarrollara TB activa a lo largo de su vida (Figura 5) (23). La reactivación de la infección latente puede deberse a diversos factores que inmunosuprimen al individuo como lo es la co-infección con el VIH, la diabetes, el alcoholismo, el tabaquismo, el uso de inmunosupresores para el tratamiento de otras enfermedades como la artritis reumatoide, entre otros (24).

En contraste, en el 5-10% de los casos que no logran contener la infección primaria el bacilo se multiplica y disemina por el organismo mientras que el hospedero desarrolla una respuesta inmune agresiva y prolongada que ocasiona inflamación y daño tisular que provocan los signos y síntomas característicos de la enfermedad.

El desarrollo de una respuesta inmune eficaz contra un patógeno invasor se logra a través de la compleja interacción de numerosas células del sistema inmune, incluidas las células T, células B, células "Natural Killer" (NK) y macrófagos. En la infección por *M. tuberculosis*, la inmunidad protectora es mediada por citocinas proinflamatorias que controlan inicialmente la infección (3). Una vez que el bacilo ha entrado a él hospedero, diversos receptores como los Toll-like receptors (TLR), los receptores 3 del complemento, los receptores de manosa, los receptores "scavenger" y las moléculas de adhesión-3 presentes en la superficie de los macrófagos y de las células dendríticas reconocen componentes de la micobacteria tales como lipoproteínas, regiones CpG presentes en el DNA y lipoarabinomana entre otros (25) .

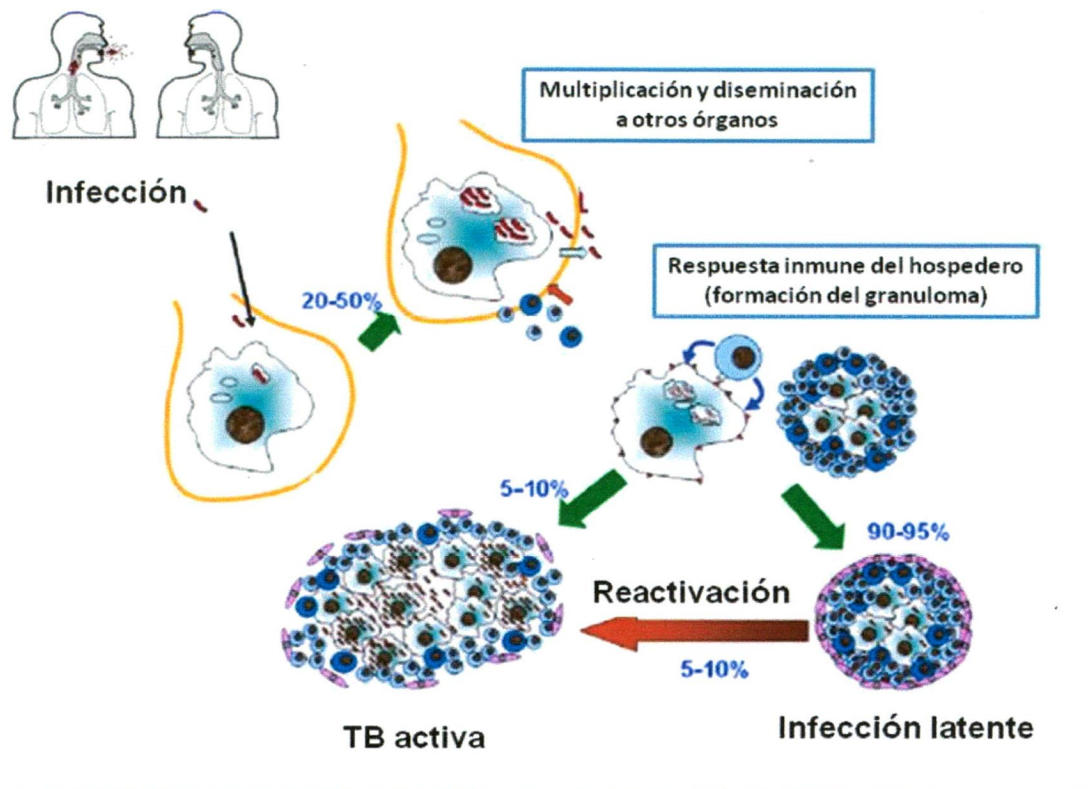


Figura 5. Etapas de la infección con *M. tuberculosis*. La figura muestra las etapas de la infección con *M. tuberculosis*, en el número 2 se muestra la entrada del bacilo a los alveolos pulmonares, en donde puede llegarse a contener la infección, o en el 20-50% de los casos el bacilo puede multiplicarse y diseminarse a otros órganos (3). El sistema inmune del hospedero propiciara la infiltración de numerosas células como son los basófilos, neutrófilios, etc; a fin contener al bacilo en una estructura conocida como granuloma. Llevando al 90-95% de los casos a una infección en estado latente y se estima que sólo en el 5-10% de los casos progresará a una enfermedad activa, (Dheda *et al.*, 2010).

Inmunidad innata frente a *M. tuberculosis*

La primera línea de defensa contra *M. tuberculosis* es montada por la respuesta inmune innata a través de células fagocíticas profesionales como los macrófagos y las células dendríticas que fagocitan al patógeno después de reconocerlo a través de los receptores anteriormente señalados. Después de que *M. tuberculosis* ha sido fagocitado por las células presentadoras de antígenos profesionales (APC), inicia la producción de citocinas proinflamatorias (Figura 6) tales como: el factor de necrosis tumoral (TNF- α) que con el interferón gamma (IFN- γ) activan los mecanismos bactericidas dependientes de la producción de especies reactivas de O₂ y de nitrógeno; la IL-12 que tiene un papel importante en la defensa contra *M. tuberculosis* al ser necesaria para la inducción del IFN- γ (25) que al interactuar con los macrófagos da como resultado la sobreexpresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MCH-II) (3, 20, 26).

En la fase temprana de la infección la producción de citocinas y quimiocinas como la IL-8 que induce la acumulación de una gran variedad de células del sistema inmune en el lugar de la infección como neutrófilos (23), macrófagos, células NK y linfocitos T, dando lugar a la formación de un granuloma que contendrá la infección (19, 27). Si la infección es contenida en esta etapa el granuloma desaparecerá eventualmente, de no ser así, continuará el reclutamiento de células al sitio de la infección y se establecerá una infección latente (20, 21).

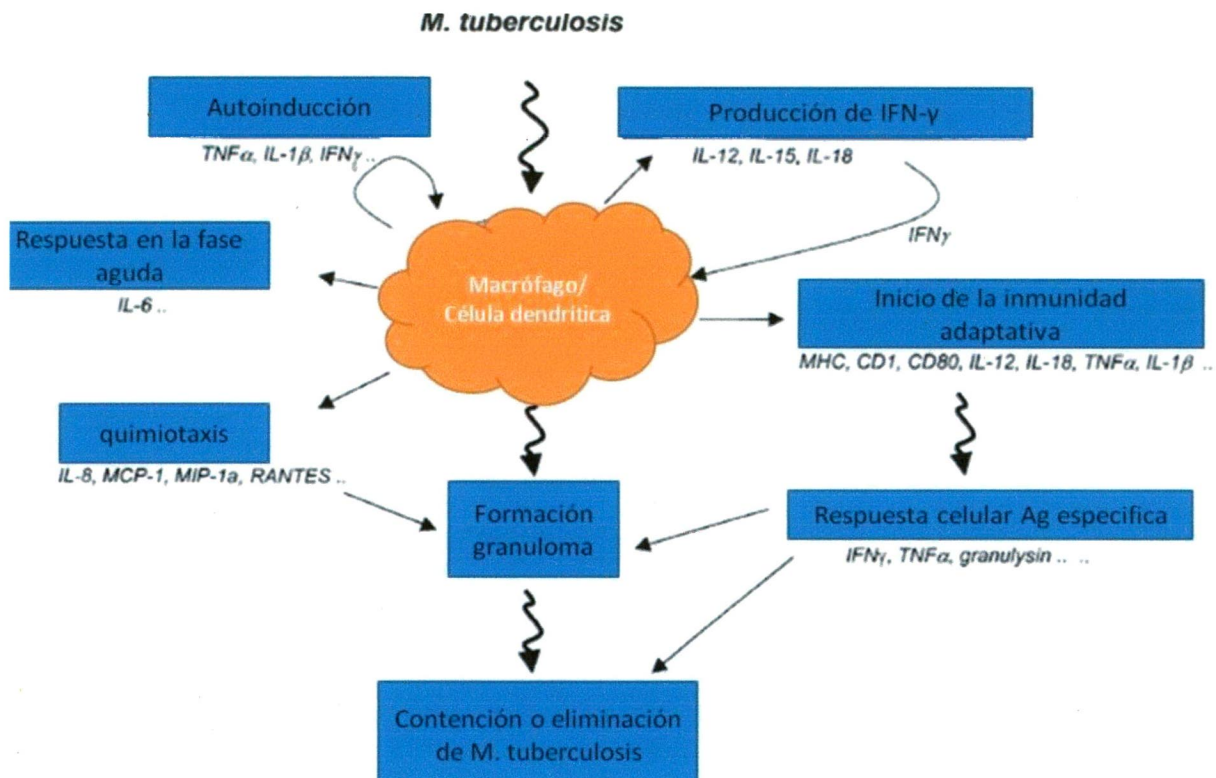


Figura 6. Respuesta inmune montada ante el estímulo con *M. tuberculosis*. Una vez que *M. tuberculosis* entra al macrófago se induce la producción de citocinas, las cuales van a promover diversos mecanismos efectores contra el bacilo. Un ejemplo de ello son IL-12, IL-15 e IL-18, capaces de inducir la producción de otras citocinas proinflamatorias y a su vez inducir la producción de IFN- γ y las citocinas IL-8, MCP-1 y RANTES que mediarán el proceso de quimiotaxis para reclutar a los basófilos y neutrófilos al lugar de la infección, dando lugar a la formación del granuloma la contención de la infección (van Crevel 2002).

Inmunidad adaptativa frente a *M. tuberculosis*

El inicio de la respuesta inmune adaptativa se manifestará una vez que se lleva a cabo la presentación antigénica y la coestimulación. En la fase progresiva de la infección la producción de citocinas proinflamatorias ocurre a la par con la producción de citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10 y el TGF- β , que bloquea la producción de IFN- γ en las células T, antagonizando la presentación de antígenos y dirigiendo la respuesta inmune hacia la respuesta humoral o del tipo Th2 (25).

M. tuberculosis se vale de diferentes mecanismos para evadir al sistema inmune: a) bloqueando la formación del fagolisosoma con la producción de derivados sulfátidos y derivados multiacetilados de trealosa 2-sulfato y amonio (24, 25); b) regulando la presentación antigénica para evitar su eliminación por las células T; c) secretando proteínas como la superóxido dismutasa y la catalasa que son antagonistas de los intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), bloqueando así la activación de los macrófagos, polarizando la respuesta inmune a Th2 y generando un microambiente adecuado para su replicación y persistencia (19).

Diagnóstico de la Tuberculosis

En la práctica clínica sólo el 44% de los casos de TB se logran detectar rápida y oportunamente, debido a que en países en vías de desarrollo como es el caso de México, sólo se cuenta con métodos diagnósticos tales como la prueba de la tuberculina, la cual consiste en administrar intradérmicamente una mezcla de proteínas

de filtrado de cultivo (PFC) de *M. tuberculosis* normalmente conocida como PPD (derivado proteico purificado) y, posteriormente medir la induración a las 24 y 74 hrs después de la aplicación. El principal inconveniente del PPD radica en que las proteínas utilizadas no son específicas de *M. tuberculosis*, por lo que la vacunación previa con BCG y la exposición a micobacterias ambientales disminuye la especificidad de la prueba (20).

Otro método de diagnóstico convencional es la baciloscopía, la cual consiste en la observación de bacilos ácido alcohol resistentes en muestras de esputo u otros fluidos corporales mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, con la desventaja de que este método diagnóstico requiere que el paciente tenga una gran carga bacilar (5,000 y 10,000 bacilos por mL de muestra) la cual sólo se presenta en aquellos individuos con tuberculosis crónica. Aunque esta técnica puede tener hasta un 80 % de sensibilidad para detectar los casos de TB activa, no permite diferenciar una infección por *M. tuberculosis* de una causada por otro tipo de micobacteria (5, 28).

Además de las pruebas moleculares que buscan la presencia de ADN micobacteriano, recientemente, se han desarrollado pruebas de diagnóstico "in vitro" que han sido denominados IGRA's (*interferon- γ release assays*) debido a que detectan la liberación de IFN- γ en respuesta a antígenos micobacterianos que sólo se encuentran en las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Entre estos otros métodos diagnósticos están: a) el quantiFERON-TB Gold, el cual consiste en incubar 1mL de sangre periférica con los antígenos ESAT-6 (Early Secretory Antigen Target) y CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) codificados en la región RD1 del genoma de *M. tuberculosis* y posteriormente medir la concentración de IFN- γ secretada mediante

ensayos de ELISA. El uso de estos antígenos incrementa significativamente su especificidad, ya que esta región se encuentra deletada en la vacuna *M. bovis* BCG y en la mayoría de las MNT's, por lo que esta prueba de diagnóstico posee una sensibilidad del 83 % y una especificidad del 59%; b) El otro tipo de IGRA es el T-PUNTO.TB, el cual se basa en el mismo principio que el quantiFERON-TB Gold, sin embargo, a diferencia de este no se utilizan células mononucleares de sangre periférica que son purificadas y, posteriormente, estimuladas para cuantificar la producción de IFN- γ por ELISPOT. Este método diagnóstico posee una sensibilidad del 91% y una especificidad del 59%. Sin embargo, estas pruebas sólo son indicativas de infección latente por micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, ya que los antígenos ESAT-6 y CPF-10 se encuentran en las micobacterias del complejo (con excepción de *M. microti* que carece de la región RD1) y en muy pocas micobacterias ambientales como es el caso de *M. Kansasii* y *M. szulgai* que si presentan un gen homólogo a ESAT-6 (20, 29). Otro inconveniente que presentan estos métodos diagnósticos es el costo, ya que el costo de una prueba de QFT-G es más de 100 veces mayor al de la prueba del PPD, y al igual que esta no es indicativa de riesgo de progresión de la enfermedad. Por tal motivo se ha buscado desarrollar pruebas serológicas con el fin de hacer más sencilla y económica la detección de la TB activa y latente (20).

Actualmente existen los siguientes métodos comerciales: "In Bios TB Detected IgG ELISA" (In Bios International Seattle w. A), el cual detecta IgG's que reconocen a las proteínas de 18, 36 y 40 kDa; "Anda Biologicals, TB ELISA" (anda Biologiccals Strasbourg France) que utiliza a los antígenos MTB-81, MTB-8, MTB-48, DPEP (MPT32). Y algunos otros métodos serológicos en los que se emplea al antígeno MPB-

64, el cual se ha postulado permite distinguir la TB activa de la TB latente, teniendo una sensibilidad del 88-98 % y una especificidad del 100%, debido a la poca conservación que existe en las micobacterias de este antígeno. Sin embargo, el estándar de oro en el diagnóstico de la TB sigue siendo el cultivo de *M. tuberculosis* (30).

Tabla 2.

Presencia de los antígenos ESAT-6 y CPF-10 en las micobacterias.

Complejo Micobacterium tuberculosis	ESAT-6	CPF-10	MNT	ESAT-6	CPF-10
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	<i>M. abcesus</i>	-	-
<i>M. africanum</i>	+	+	<i>M. avium</i>	-	-
<i>M. pinnipedii</i>	-	-	<i>M. brandem</i>	-	-
<i>M. microti</i>	-	-	<i>M. celatum</i>	-	-
<i>M. canetti</i>	+	+	<i>M. chelonae</i>	-	-
<i>M. bovis</i>	+	+	<i>M. foruitum</i>	-	-
			<i>M.gordonii</i>	-	-
<i>M. bovis</i> BCG			<i>M. intracellulare</i>	-	-
<i>Gothenburg</i>	-	-	<i>M. kansasii</i>	+	+
<i>Monreau</i>	-	-	<i>M. malmoense</i>	-	-
<i>Tice</i>	-	-	<i>M. oenavence</i>	-	-
<i>Tokyo</i>	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	-	-
<i>Danish</i>	-	-	<i>M. smegmatis</i>	-	-
<i>Glaxo</i>	-	-	<i>M. szulgi</i>	+	+
<i>Montreal</i>	-	-	<i>M. terrae</i>	-	-
<i>Pasteur</i>	-	-	<i>M. xenopi</i>	-	-
			<i>M.marinum</i>	+	+
			<i>M. ulcerans</i>	-	-
			<i>M. smegmatis</i>	-	-
			<i>M. gilvum</i>	-	-

En la tabla se muestra la presencia o ausencia de los antígenos ESAT-6 y CPF-10 en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, las cepas "hijas" de la vacuna *M. bovis* BCG y algunas especies de MNT's (Cascante *et al.*, 2007).

***M. bovis* BCG**

El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es la única vacuna aprobada por la OMS para el control y prevención de la TB en el mundo. Actualmente, es la vacuna más utilizada en la historia de la humanidad y aproximadamente se le ha administrado a más de 4 mil millones de personas.

En 1908, Albert Calmette y Camile Guérin observaron la atenuación de una cepa virulenta de *M. bovis* aislada de un caso de mastitis bovina. A fin de preservar la cepa, esta se subcultivó durante 13 años en rebanadas de papa cocida suplementadas con glicerol, y después de 230 subcultivos, en 1921 fue administrada por primera vez como vacuna a un paciente pediátrico hijo de una madre con tuberculosis. Al observarse la eficacia de la vacuna para reducir el riesgo de muerte por tuberculosis, en 1928 la Liga de Naciones (hoy conocida como OMS) recomendó el uso de la vacuna para su aplicación mundial (10), razón por la cual la cepa original siguió subcultivándose en diferentes laboratorios del mundo, dando origen a subcepas que conocemos como cepas hijas de la vacuna original. Hoy en día la aplicación de la vacuna BCG está indicada sólo en aquellas regiones en donde la TB es endémica. Actualmente, la vacuna BCG brinda protección a los menores de 5 años contra las formas más severas de TB como lo es la TB miliar y la meningitis tuberculosa y reduce casi en un 90% la mortalidad por TB en infantes, sin embargo, esta no ha logrado reducir la incidencia de TB en adultos jóvenes (4). Se especula que en las regiones endémicas la inmunidad conferida por la vacuna disminuye en la edad adulta, lo cual se asocia a varios factores como por ejemplo:

El tipo de subcepa con el que fue vacunado el individuo. Antes de la adopción de los lotes semilla, a fin de distribuir y preservar la vacuna BCG en todo el mundo, ésta tuvo que subcultivarse en diferentes laboratorios y dio origen a nuevas “cepas hijas” que poseen diferencias genóticas y fenotípicas que permiten clasificarlas como “cepas tempranas” (BCG Rusia, Japón y Monreau) y “cepas tardías” (BCG Pasteur, Danesa y Glaxo). Esta diferencia antigénica podrían estar implicadas en la sobreatenuación de la vacuna durante su diversificación (31).

El fondo genético del individuo, que puede conferir mayor susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*. Existen diversos estudios en los cuales se ha observado que la presencia de polimorfismos en genes tales como los que codifican para el INF- γ R, el receptor de vitamina D y el antígeno de leucocitos humanos clase II (HLA) DR2 provocando una susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis* y otras micobacterias. En el año de 1995 Levin y cols. describieron un caso en el que tres niños poseían severas infecciones a causa de micobacterias atípicas (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. avium-intracellulare*), estos niños poseían una baja producción de INF- γ en respuesta a antígenos micobacterianos, debido a que los tres niños eran homocigotos para una transversión (A/C) en el cromosoma 6q en la posición 395 donde se encuentra el gen INF γ -R1, provocando un codón de paro prematuro y propiciando así la ausencia de INF γ -R1 en los leucocitos de estos niños y así evitando su función efectora (22, 32, 33).

La latitud geográfica. Desde hace varias décadas se han realizado estudios en los cuales se observa que la eficacia de la vacuna BCG varía en diferentes partes del mundo y su protección disminuye significativamente en las regiones tropicales como

África, Asia y centro América, en donde la tuberculosis humana tiene una alta prevalencia (31).

Exposición a micobacterias ambientales, comunes en las regiones tropicales. Por lo que han surgido dos hipótesis que tratan de explicar las variaciones de la eficacia protectora de la vacuna BCG en torno la exposición previa a micobacterias ambientales.

Hipótesis del bloqueo

Propone que una exposición previa a micobacterias ambientales puede reducir la eficacia protectora de la vacuna BCG cuando se administra posteriormente. Este efecto se debe a que la exposición previa a MNT's despierta una respuesta inmune en el individuo menor, a la que le conferiría la vacuna *M. bovis* BCG, pero capaz de contener la infección provocada por la vacuna BCG, no permitiendo que esta pueda desarrollar algún tipo de inmunidad protectora (31) (Figura 7). El desarrollo de una vacuna en este marco no debería verse afectada por la exposición previa a MNT's. Debido a que las vacunas desarrolladas mediante la atenuación de *M. bovis* o la recombinación de la vacuna existente, probablemente sufrirían el mismo efecto de bloqueo. Por ello se ha propuesto que las vacunas basadas en subunidades de péptidos específicos, o con adyuvantes virales serían la mejor opción (34).

Hipótesis del enmascaramiento

Postula que una exposición previa a MNT's da al individuo un cierto nivel de protección similar al conferido por la vacunación con BCG, de modo que con la subsecuente vacunación con *M. bovis* BCG no proporciona una mayor protección a la ya conferida

por la exposición previa a micobacterias ambientales, por lo que no se observa un cambio en el efecto protector de la vacuna BCG al estar enmascarado con el efecto protector conferido por las MNT's. Una vacuna desarrollada en este escenario debería conferir una mayor protección que la obtenida por la exposición a micobacterias ambientales (Figura 7) (31, 34).

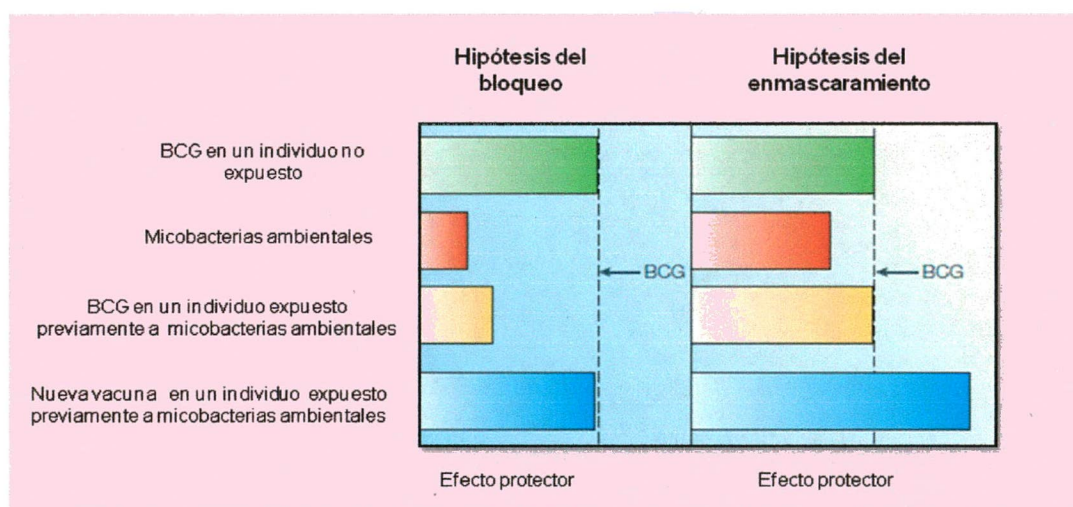


Figura 7. Representación gráfica de las hipótesis de bloqueo y enmascaramiento. En la figura se esquematiza el efecto protector conferido por la vacuna *M. bovis* BCG. Dentro de la hipótesis del bloqueo el efecto protector dado por las MNT's es poco, sin embargo, es suficiente para disminuir el efecto protector de la vacuna BCG debido a que interfiere con su replicación en el hospedero. En contraste, la hipótesis del enmascaramiento propone que la exposición a MNT's confieren un efecto protector similar al que brinda *M. bovis* BCG (Andersen cols., 2005).

JUSTIFICACIÓN

Los antígenos que son reconocidos por reactividad cruzada en la vacuna *M. bovis* BCG son de gran importancia, debido a que por un lado interfieren con el diagnóstico de la TB y por el otro podrían estar involucrados en el enmascaramiento o bloqueo de la respuesta inducida por vacunación con BCG. Por ello la identificación de estos antígenos permitirá diseñar herramientas para discernir entre la infección por *M. tuberculosis* y la sensibilización con MNT's, así como evaluar el papel que juegan estos antígenos en el desarrollo o inhibición de la respuesta inmune protectora contra la TB.

OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas de *M. bovis* BCG que son reconocidas por anticuerpos presentes en el suero de sujetos sanos del Distrito Federal.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener sueros de sujetos sanos del Distrito Federal.
- 2) Obtener el secretoma y proteoma de extractos totales de *M. bovis* BCG.
- 3) Determinar el perfil de reconocimiento de proteínas de *M. bovis* BCG por el suero de sujetos sanos.
- 4) Identificar los péptidos de *M. bovis* BCG reconocidos por los sueros de los sujetos sanos.
- 5) Determinar la homología de los antígenos identificados y los utilizados en el serodiagnóstico de la TB con los encontrados en las MNT's.

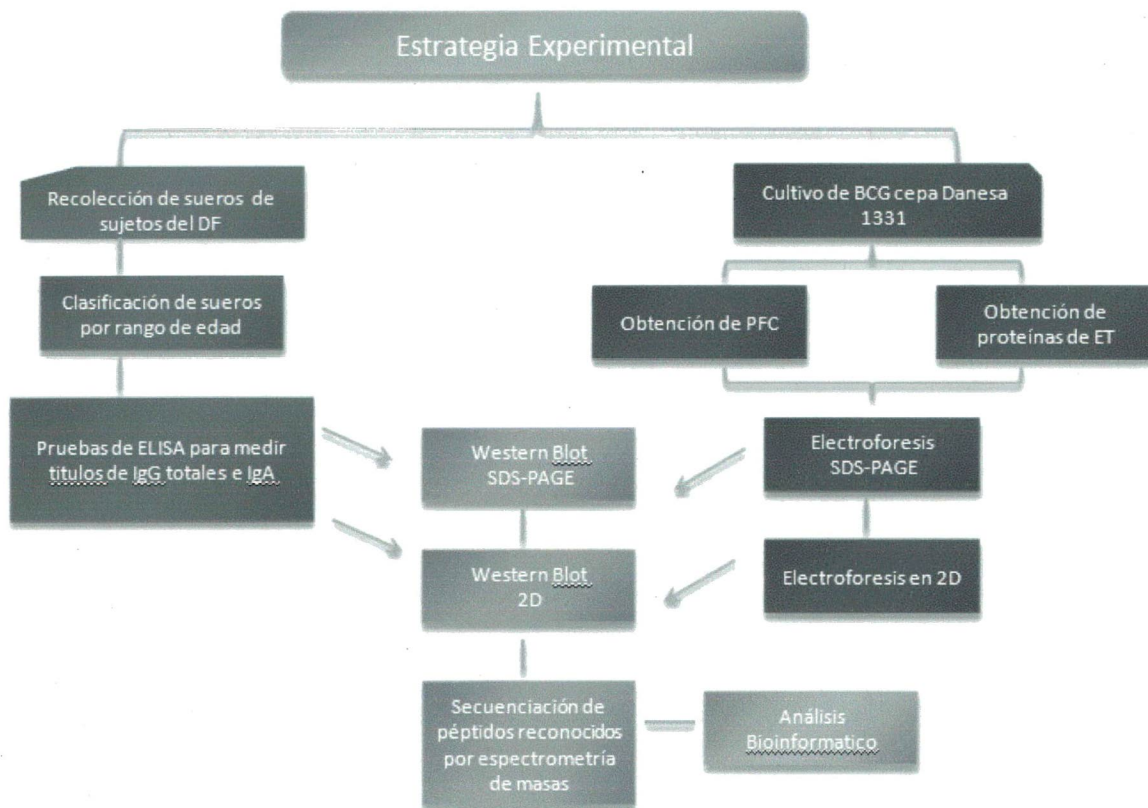


Figura 8 Estrategia experimental. En el esquema se muestra la estrategia experimental propuesta para la realización de este proyecto, el cual se divide en tres fases importantes: 1) la realización de pruebas de ELISA con los sueros recolectados para seleccionar muestras candidatas, 2) el cultivo de *M. bovis* BCG cepa Danesa 1331 y la realización de los perfiles proteómicos. La etapa número 3 es la intersección entre las dos primeras fases, realizando ensayos de Western-Blot con las PFC y PEC de *M. bovis* BCG y utilizando como anticuerpos primarios los sueros seleccionados en la fase 1.

METODOLOGÍA

Recolección de muestras

Se recolectaron 828 sueros de sujetos sanos que acudieron a los laboratorios Olarte y Akle Bacteriólogos S.A de C.V. en sus distintas sucursales (Central-Roma, Pedregal, Coapa, Lomas de Chapultepec, Satélite e Interlomas) para realizarse estudios de química sanguínea. Los sueros fueron seleccionados aleatoriamente hasta cubrir un número equiparable de muestras, tanto de hombres como de mujeres correspondientes a los rangos de edad: 0-10 años, 11-20 años, 21-30 años, 31-40 años, 41-50 años, 51-60 años y de 61 años en adelante.

Cultivo de *M. bovis* BCG (Danesa 1331)

El cultivo de *M. bovis* BCG cepa Danesa 1331 se realizó en medio Middlebrook 7H10 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) durante 15 días a 37 °C. Transcurrido este tiempo se resembró la cepa en el medio sintético Sauton y se incubó durante 15 días a 37 °C con una atmosfera de 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5 000 rpm durante 5 min y se lavaron tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar los componentes del medio

de cultivo. Al sobrenadante se le adicionó el inhibidor de serin proteasas PMSF [1mM] y las bacterias fueron resuspendidas en medio Sauton adicionado con glicerol al 10 % para su criopreservación a -80°C hasta su uso.

Extracción de proteínas

Los sobrenadantes (SN) se esterilizaron por filtración con membranas Millipore de 0.45 µm y 0.22 µm, inmediatamente se les adicionó nuevamente PMSF 1 mM y azida de sodio al 0.01 %, previo a la concentración por ultrafiltración en la unidad Amicon *stirred ultrafiltration cells 8200* (Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se utilizó una membrana con punto de corte de 3 kDa (Millipore), activada previamente con tres lavados de 20 min en dH₂O estéril. Las proteínas fueron concentradas 50X.

Por otro lado, las bacterias fueron sonicadas aplicando 15 pulsos de 1 min con una frecuencia de 0-80 %, intercalados con un minuto de descanso entre cada pulso. Posteriormente, el lisado se le adicionó PMSF 1mM y se centrifugó a 12,000 rpm para separar la fracción soluble a la cual se le denominó extracto total (ET).

Cuantificación de proteínas

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método de microBradford utilizando placas de 96 pozos y teniendo una curva estándar de albumina de suero bovino (BSA) con las siguientes concentraciones: 1.25, 2.5, 5 y 10 µg/mL.

En cada pozo se añadió 1 µL de muestra, 159 µL de ddH_2O y 40 µL de reactivo Bradford (Bio-Rad). Las muestras se leyeron en un lector de ELISA modelo ELx800 (Bio-Tec) a 495 nm.

SDS-PAGE

Para verificar la integridad de las proteínas recuperadas tanto de los sobrenadantes como de los ET, éstas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12 % en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando como amortiguador Tris-Glicina (25 mM Tris-Base, 250 mM Glicina, 0.1 % SDS). Se cargaron 15 µg de proteínas y en uno de los carriles se cargó el marcador de peso molecular "dual color" (Bio-Rad) con un rango de 10 a 250 kDa y la electroforesis se realizó a 120 V. Las proteínas fueron visualizadas por tinción de los geles con azul de Coomassie R-250 (0.025 % azul de coomassie R-250, 40 % metanol, 7 % ácido acético) y posteriormente, se lavaron los geles para retirar los excesos de colorante con una solución de lavado (20 % Metanol, 10 % ácido acético) hasta que se observaron claramente las bandas.

Ensayos de ELISA

Con la finalidad de identificar los sueros que presentaban anticuerpos específicos contra antígenos de *M. bovis* BCG, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp) usando 2 µg/mL de PFC de *M. bovis* BCG disuelta en amortiguador de carbonatos estéril pH 9.6 (0.15 M Na_2CO_3 , 0.35 M NaHCO_3 , 0.03

M NaN_3). A cada pozo se le adicionaron 100 μL de la mezcla anterior y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se decantó la placa y se bloqueó con albúmina al 1 % disuelta en PBS (3.8 mM NaH_2PO_4 , 16.2 mM Na_2HPO_4 , 75 mM NaCl, azida 0.02%) durante 1.5 h a 37 °C, transcurrido este tiempo se decantó nuevamente la placa y se realizaron 3 lavados de 1 min cada uno con PBS-Tween 20 (3.8 mM NaH_2PO_4 , 16.2 mM Na_2HPO_4 , 75 mM NaCl, azida 0.02%, Tween 20 0.05%), se adicionó el anticuerpo primario disuelto en PBS 1:50 (suero de sujetos) en cada uno de los pozos y se incubó durante 1.5 h a 37 °C. Nuevamente se decantó el contenido de la placa y se lavo con amortiguador de lavado 5 veces más durante un 1 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-IgG totales ó anti-IgA) acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) diluido 1:5000 y se incubó 1.5 h a 37 °C. Se decantó y se lavo la placa 5 veces por 1 minuto, seguido a esto se adicionó 100 μL del sustrato *Sigma Fast OPD* (Sigma-Aldrich) y se dejó incubar durante 30 min en oscuridad; transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA modelo ELx800 (Bio-Tec) y finalmente se detuvo la reacción con H_2SO_4 1N y nuevamente se midió la absorbancia a 490 nm.

Electroforesis en doble dimensión (2D)

Para la electroforesis en doble dimensión se utilizaron 250 μg de cada una de las muestras proteicas (PFC y ET), a las cuales se les adicionó CHAPS al 4 %, y posteriormente se les agregó urea 7 M hasta disolverse completamente; a este volumen se añadieron 35 μL de una solución de DTT 70 mM y 0.5 μL de azul de

bromofenol al 1%; finalmente la mezcla se llevó a 500 µL. Se tomaron 200 µL en un tubo nuevo y se adicionaron 2 µL de anfolinas con un rango de pH de 4 a 7 (Bio-Rad). Con la solución final se rehidrataron pasivamente tiras IPG ReadyStrip de 7 y de 11 cm con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7 (Bio-Rad), la rehidratación se llevo a cabo durante 18 hrs a temperatura ambiente.

Trascurrido el período de rehidratación se procedió a montar el isoelectroenfoco, el cual se realizó en la unidad PROTEAN® IEF (Bio-Rad) utilizando las siguientes condiciones: 1) 500 Volts por 30 min, 2) 1000 Volts por 30 min, 3) 1 500 Volts por 30 min, 4) 2 000 Volts por 30 min, 5) 2 500 Volts hasta alcanzar 50 000 V/hr.

La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 12 % de 18 x16 cm en solución amortiguadora de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1 %), colocando la tira IPG, previamente equilibrada con DTT disuelto en 5 mL de buffer de equilibrio (urea 6M, glicerol 30% v/v, tris pH 8.8 50 mM, SDS 2 % W/V, 0.002 % v/v azul de bromofenol) durante 15 min y posteriormente con IAA disuelta en 5 mL de buffer de equilibrio durante 15 min. Las tiras fueron colocadas en el gel y se añadió agarosa al 0.5 % para sellar los geles. La electroforesis se llevo a cabo a 100 voltios durante 8 horas a 4 °C.

Tinción de los geles de 2D

Para observar los patrones proteicos obtenidos en la electroforesis en doble dimensión, se realizaron diferentes tinciones:

Tinción con Plata: Los geles se dejaron en solución de fijación (40 % metanol, 10 % ácido acético) durante toda la noche, transcurrido el tiempo de fijación se realizaron dos lavados con metanol al 20 % de 20 min cada uno, posteriormente, se realizaron 2 lavados adicionales con dH₂O por 5 min cada uno, se adicionó la solución de pre-tratamiento (0.02 % p/v tiosulfato de sodio pentahidratado) y se incubó durante 2 min, al término de la incubación se decantó la solución de pre-tratamiento y se realizaron 2 lavados con dH₂O por 20 segundos cada uno, y se incubó con la solución de plata diluida 1:15 (Pierce) durante 25 min; posteriormente se realizaron una vez más 2 lavados con dH₂O de dos min cada uno. Finalmente se reveló con una solución de carbonato de sodio anhídrido 3 % y paraformaldehído 0.05, una vez que se observaron claramente los puntos, se detuvo la reacción con una solución de ácido acético al 10 % y se escaneó inmediatamente.

Tinción Fluorescente: Para esta tinción se utilizó una solución que permite observar la emisión de fluorescencia cuando esta se adhiere a las proteínas desnaturalizadas. La tinción se llevo a cabo fijando los geles durante 2 hrs con una solución de etanol al 40% y ácido acético 10%; Posteriormente, se desechó la solución de fijación y se adicionó "Flamingo Fluor" (Bio-Rad) y se dejó en tinción durante 3 hrs como mínimo. Las imágenes de los geles fueron obtenidas en un lector FUJIFILM FLA-5100 utilizando el laser de 532 nm y el filtro LPG.

Análisis de los patrones de 2D

El análisis de los geles en doble dimensión se llevó a cabo con ayuda del programa PDQuest (Bio-Rad), para lo cual fue necesario obtener las imágenes digitales de los geles en escala de grises, en formato TIFF y con una resolución de 300 dpi según los requerimientos del paquete. El análisis se realizó con la ayuda de los parámetros establecidos por el programa en los cuales se selecciono el punto más tenue, el más pequeño y el más grande, y en base a estos parámetros el programa realizó la búsqueda y determinación de puntos en cada uno de los geles. Para cada uno de los geles se realizó una edición manual de la imagen con la finalidad de adicionar los puntos que no se detectaron, y para eliminar las manchas que fueron detectadas erróneamente como puntos.

Western Blot

Transferencia de proteínas

Después de separar las proteínas por SDS-PAGE o en 2D según la metodología anterior, estas fueron transferidas a una membrana de PVDF^{Psq} (polyvinylidene difluoride) utilizando una cámara de transferencia húmeda (Bio-Rad para la transferencia en 1D y Hoefer para la transferencia en 2D). Se colocó papel filtro previamente humedecido con una solución de transferencia (192 mM glicina, 25 mM Tris-Base, 0.037 % SDS y 20 % metanol); sobre éste se colocó la membrana activada con metanol al 100% durante 5 minutos, el gel, y otra capa de papel filtro, todos ellos humedecidos previamente en la solución de transferencia por al

menos 15 min. La cámara se llenó con bufer de transferencia (Tris-Glicina) y se colocó sobre hielo, se conectó a una fuente y se llevo a cabo la transferencia a 100 voltios durante 1 hr.

Visualización de la transferencia

Una vez transferidas las proteínas resueltas en electroforesis de una y doble dimensión, para visualizar las proteínas transferidas las membranas fueron teñidas con Rojo de Ponceau y con el colorante FAST BLOT stain (Millipore), respectivamente.

Protocolo de Western Blot

Las membranas se bloquearon durante 1.5 h a temperatura ambiente con albúmina al 1% disuelta en TBS-T (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% de Tritón X-100). Posteriormente, se incubaron 4 h a 37 °C con los sueros de sujetos sanos seleccionados en una dilución 1:10. Transcurrido el tiempo de incubación la membrana se lavó tres veces por 10 min con TBS-T. Después de ello se incubó 1.5 hrs con los anticuerpos secundarios anti-IgG totales anti-humano acoplados a HRP en una dilución 1:1000. Una vez más se realizaron 4 lavados de 15 min cada uno con TBS-T. Finalmente, las proteínas reconocidas se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el sustrato HRP (Millipore) y obteniendo la imagen en placas Kodak X-Omat con un tiempo de exposición de 40 segundos para el WB en 1D y 1 hr para el WB en 2D.

Tinción con Coomassie coloidal G-250

Esta tinción se utilizó para teñir aquellos geles de los cuales se escindieron los puntos candidatos para el análisis por espectrometría de masas, para lo cual se fijó el gel de 6 a 16 h en una solución 50 % v/v metanol y 2 % v/v ácido fosfórico, transcurrido el tiempo de fijación se realizaron 3 lavados de 30 min cada uno con dH₂O; posteriormente se adicionó la solución de tinte (34 % v/v metanol, 2 % v/v ácido fosfórico, 17% p/v sulfato de amonio y 0.066 % Coomassie G-250). Una vez tenido el gel se dejó destiñendo en dH₂O durante 3 a 6 h.

Análisis de espectrometría de masas

Una vez identificados los péptidos reconocidos por reactividad cruzada, éstos fueron llevados a la Facultad de Medicina de la UNAM en donde fueron escindidos del gel, cortados en pequeñas piezas de 1-2 mm³, y fueron desteñidos y lavados en una solución ácido acético 5% metanol 50% durante toda la noche. Posteriormente, las piezas desteñidas se deshidrataron con acetonitrilo al 100% y se secaron en una centrifuga con vacío. Para la reducción de las muestras se les adicionó 30 µL de DTT 10 mM en NH₂HCO₃ 50 mM y se dejó incubar durante 30 min, transcurrido el tiempo de incubación la solución se retiró y se añadieron 30µL de iodacetamida 100 mM para alquilar las proteínas, esta reacción se realizó en la obscuridad durante 30 min. Terminada la reacción, la solución fue removida y los fragmentos de gel se deshidrataron con acetonitrilo al 100% y se lavaron durante 10 min con NH₂HCO₃ 100 mM. El procedimiento anterior se repitió nuevamente

antes de realizar la digestión con tripsina. Para dicha digestión las muestras se rehidrataron nuevamente agregando una solución fría de tripsina modificada (Promega, Madison, WI) en NH_2HCO_3 50 mM y resuspendiéndolas ocasionalmente con vortex, seguido a ello se realizó una incubación de las mismas a 37 °C.

Los péptidos fueron extraídos del gel con NH_2HCO_3 50 mM y, posteriormente, lavados con una solución de acetonitrilo 50% / ácido fórmico 5% durante 10 min, al término de lo cual se secaron por evaporación en una centrifuga con vacío a temperatura ambiente. Finalmente, se les adicionaron 20 μL de ácido fórmico al 1 % y se retiraron las sales con las unidades Zip Tip $\mu\text{C}18$ (Millipore, Bedford, MA) antes de ser analizadas por cromatografía líquida con un nanoAQUITY UltraPerformance LC (UPLC, Waters, Milford, Mass) acoplado a un espectrómetro de masas LC/ESI-MS/MS Q-TRAP 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada).

Análisis Bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias de los péptidos por espectrometría de masas se realizó un análisis BLAST para determinar con qué otras proteínas de micobacterias y otros microorganismos podrían tener homología las proteínas identificadas.

También, se realizó una búsqueda en la literatura de aquellos antígenos que han sido utilizados ocupado para realizar pruebas serológicas que detecten la TB, a fin

de determinar con qué frecuencia y homología se encuentran estos antígenos en las micobacterias ambientales. Para ello, primeramente, se realizó la búsqueda de la secuencia de aminoácidos para cada uno de los antígenos reportadas en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

Las edades de la población muestreada fueron desde un día hasta 93 años, se establecieron siete grupos, teniendo para cada intervalo de edad entre 96 y 136 muestras, y manteniendo una proporción hombres/mujeres de entre 0.52 a 1.18.

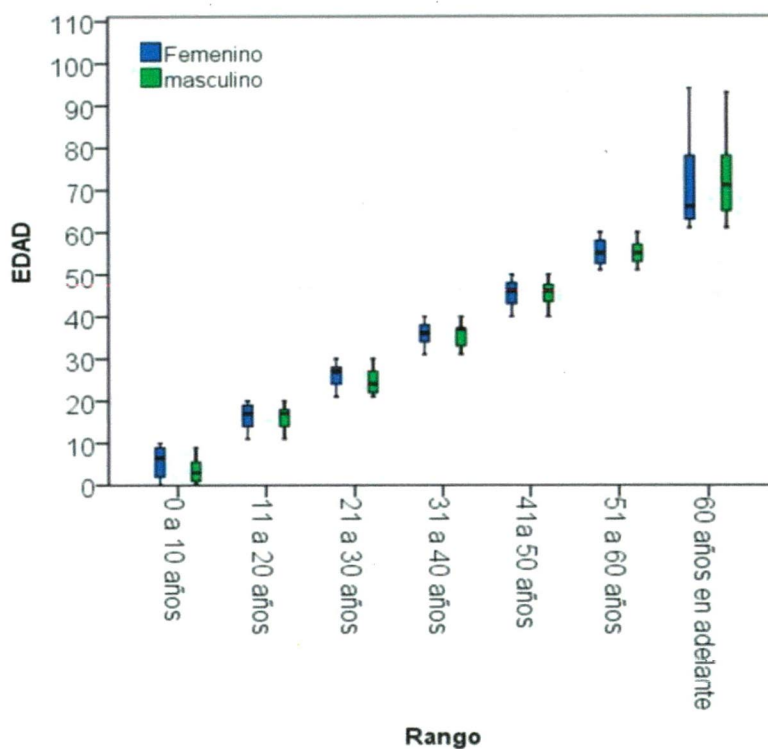


Figura 10 Distribución de sueros según su rango de edad. Se muestran los 7 grupos establecidos de acuerdo a un rango de edad y género. Puede observarse la dispersión de edades en cada uno de los grupos teniendo individuos que van desde 1 día de nacidos hasta personas de 93 años edad.

Ensayos de ELISA

Se realizaron pruebas de ELISA para determinar si los sueros recolectados presentaban IgG's e IgA's que reconocieran proteínas de filtrado de cultivo de *M. bovis* BCG. Las lecturas de absorbancia fueron graficadas en cuartiles para observar el comportamiento de la población y detectar aquellos casos positivos y los que se encontraban fuera de la distribución normal. La mayoría de las muestras que presentaron IgG's totales, que reconocían PFC de *M. bovis* BCG se encontraron en el grupo de 61 años en adelante, teniendo lecturas mucho más altas que aquellas que resultaron positivas en otros rangos de edades (Figura 11).

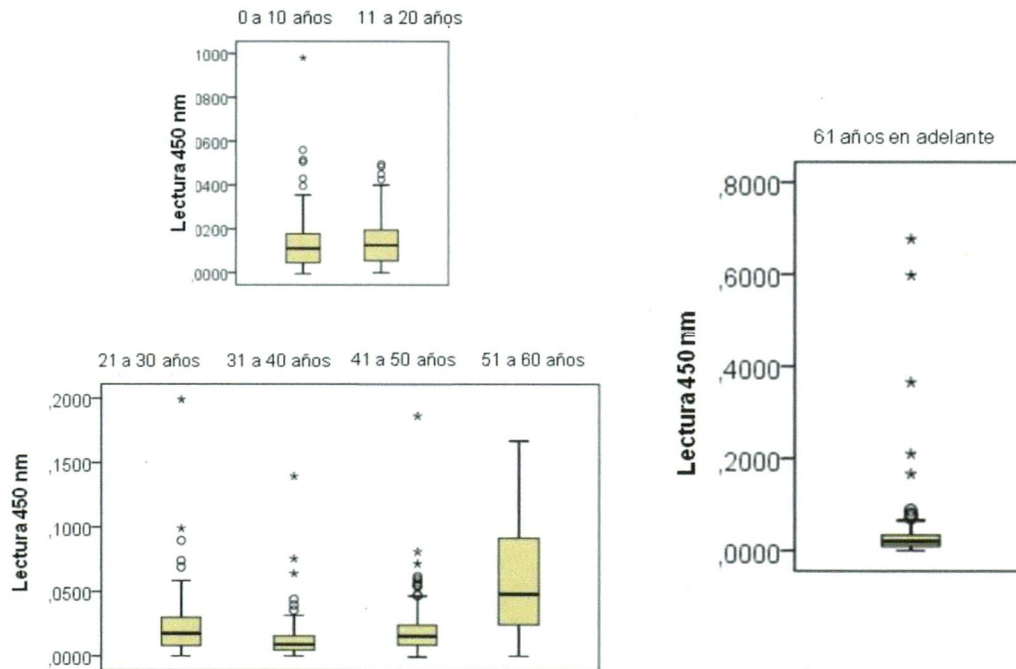


Figura 11. Ensayos de ELISA para IgG's totales. Gráficas de cuartiles en las cuales se representan las lecturas obtenidas de los ensayos de ELISA para cada uno de los grupos antes mencionados.

BIBLIOTECA UACM

En total se seleccionaron 15 muestras que fueron positivas, una en el grupo de 0-10 años; 2 del grupo de 21-30 años; 3 de sujetos de entre 31-40 años; 3 más en el grupo de 41-50 años y 6 en el grupo de mayores de 60 años (Figura 12). Al observar la distribución de las muestras positivas puede observar que sigue un comportamiento parecido al de la incidencia de tuberculosis en el Distrito Federal; también es importante mencionar que se encontró un mayor número de muestras positivas del sexo femenino.

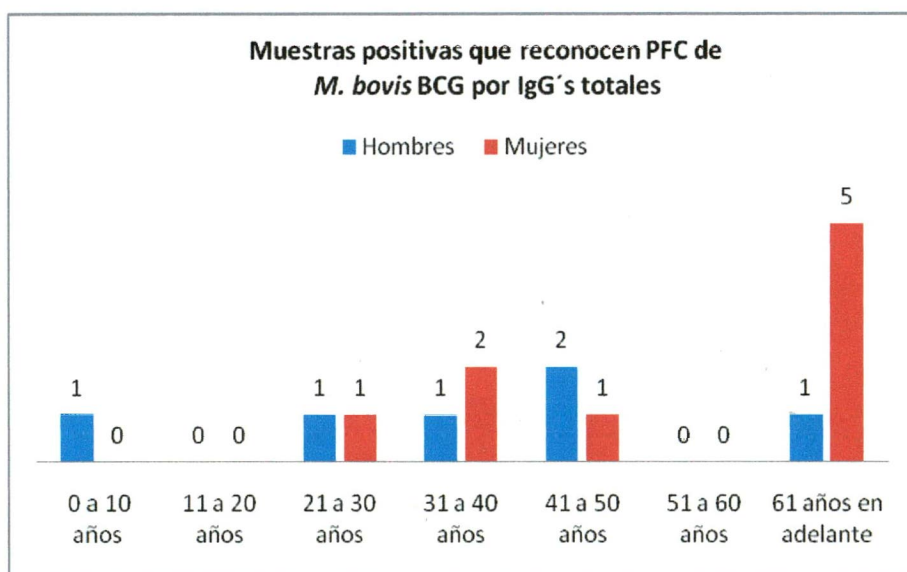


Figura 12. Número de muestras con IgG's totales que reconocen PFC de *M. bovis* BCG. En la gráfica se muestran, el número de muestras de hombres y mujeres seleccionadas para cada uno de los rangos antes mencionados.

Posteriormente, se realizó el ensayo para identificar las muestras que presentaran IgA que reconocen proteínas de filtrado de cultivo de *M. bovis* BCG, esto debido a que la vía más frecuente de exposición a MNT's es la oral y la Inmunoglobulina A es propia de las mucosa gástrica (entre otras). Sin embargo, debido a que la presencia de anticuerpos específicos es muy baja en sujetos sanos, se seleccionaron aquellas muestras cuya lectura se encontraba fuera del rango de distribución del grupo correspondiente, teniendo 3 muestras para el grupo de 11-20 años, 2 muestras en el grupo de 21-30 años, 4 muestras para el grupo de 31-40 años y 2 para el grupo de 41-50 años (Figura 13 y 14). Cabe destacar que sólo una de las muestras presentó IgG's e IgA's que reconocieron PFC de *M. bovis* BCG.

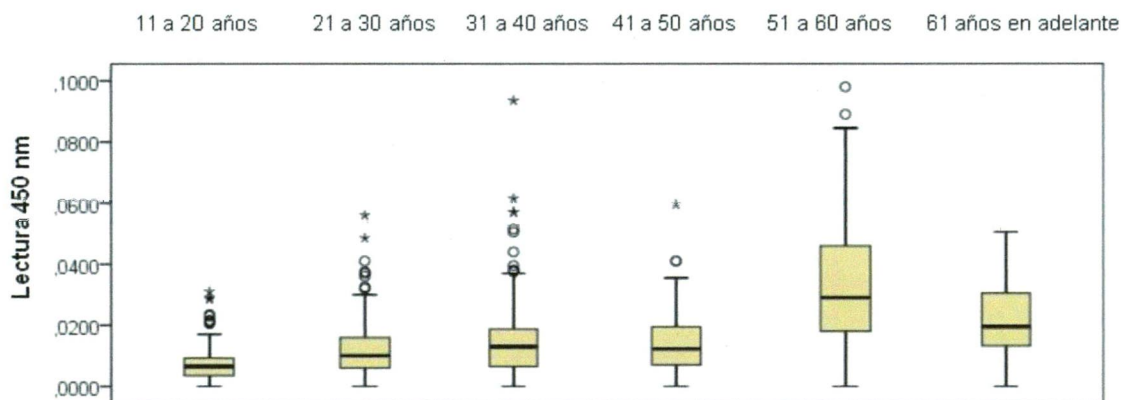


Figura 13 Ensayos de ELISA para IgA Gráfica de cuartiles en la cuales se representan las lecturas obtenidas de los ensayos de ELISA para cada uno de los grupos de estudio.

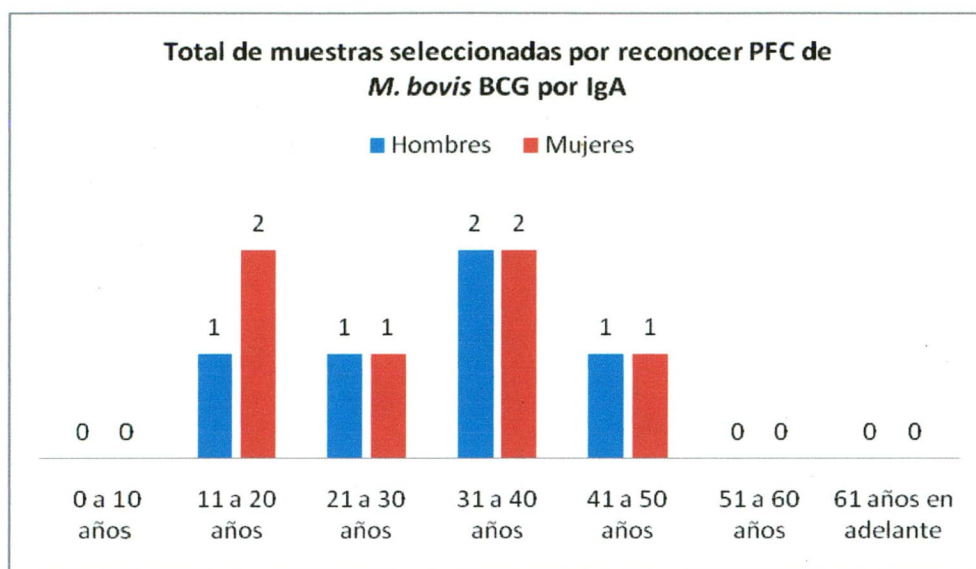


Figura 14. Número de muestras con IgA's que reconocen PFC de *M. bovis* BCG. En la gráfica se muestran el número de muestras seleccionadas por ser casos atípicos, para cada uno de los grupos antes mencionados.

Cultivo y extracción de proteínas de *M. bovis* BCG

Una vez que transcurrieron los 15 días de incubación, se cosecharon los cultivos de *M. bovis* BCG cepa Danesa 1331 de los cuales se recuperaron las PFC y se extrajeron proteínas totales mediante el proceso de sonicación. Cada ensayo se realizó al menos por triplicado.

Las PFC fueron concentradas y fueron cuantificadas por microBradford, obteniendo un rendimiento de 2,090.01 µg para el lote I, 2.563.2 µg para el lote II y de 3, 819.6 µg para el lote III. En el caso de las proteínas de extractos totales se

obtuvieron 4, 235.40 μg para el lote I; 3,952 μg para el lote II y 3,082 μg para el lote III.

Para verificar la integridad de las proteínas recuperadas, tanto de de los sobrenadantes como de los extractos celulares, éstas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 %, cargándose 15 μg de muestra. Y pudo observarse que las proteínas se encontraron integras, además de que los perfiles obtenidos para PFC y proteínas de ET fueron los esperados (Figura 15).

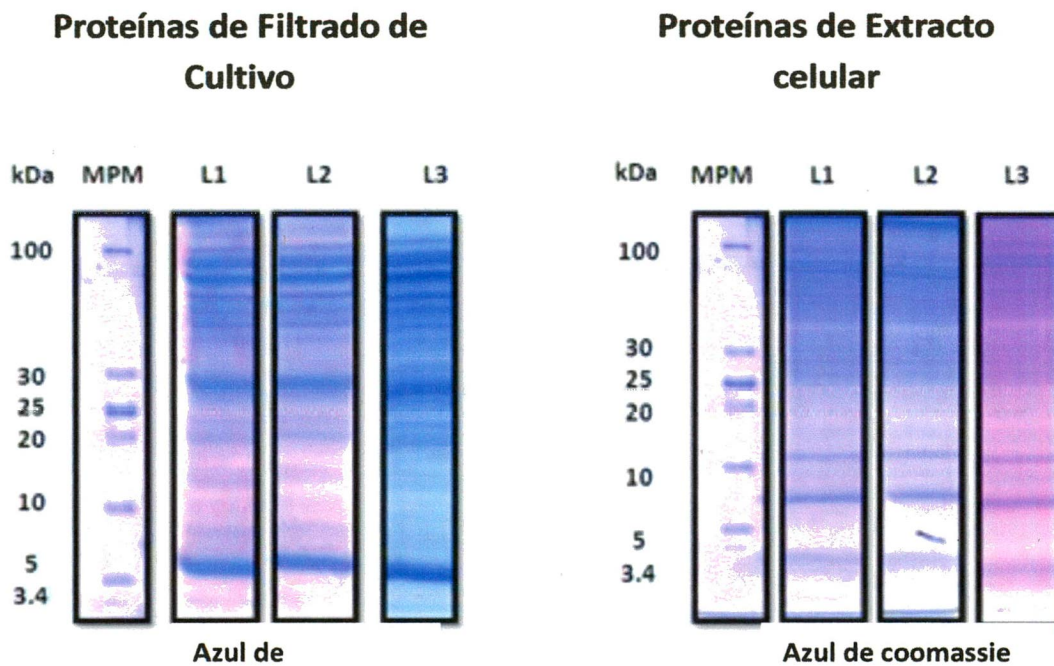


Figura 15. SDS-PAGE de integridad. Se muestra gel de acrilamida al 15 % cargados con 15 μg de proteína de los lotes L1, L2 y L3 de filtrado de cultivo y de extracto celular. (MPM) marcador de peso molecular. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie.

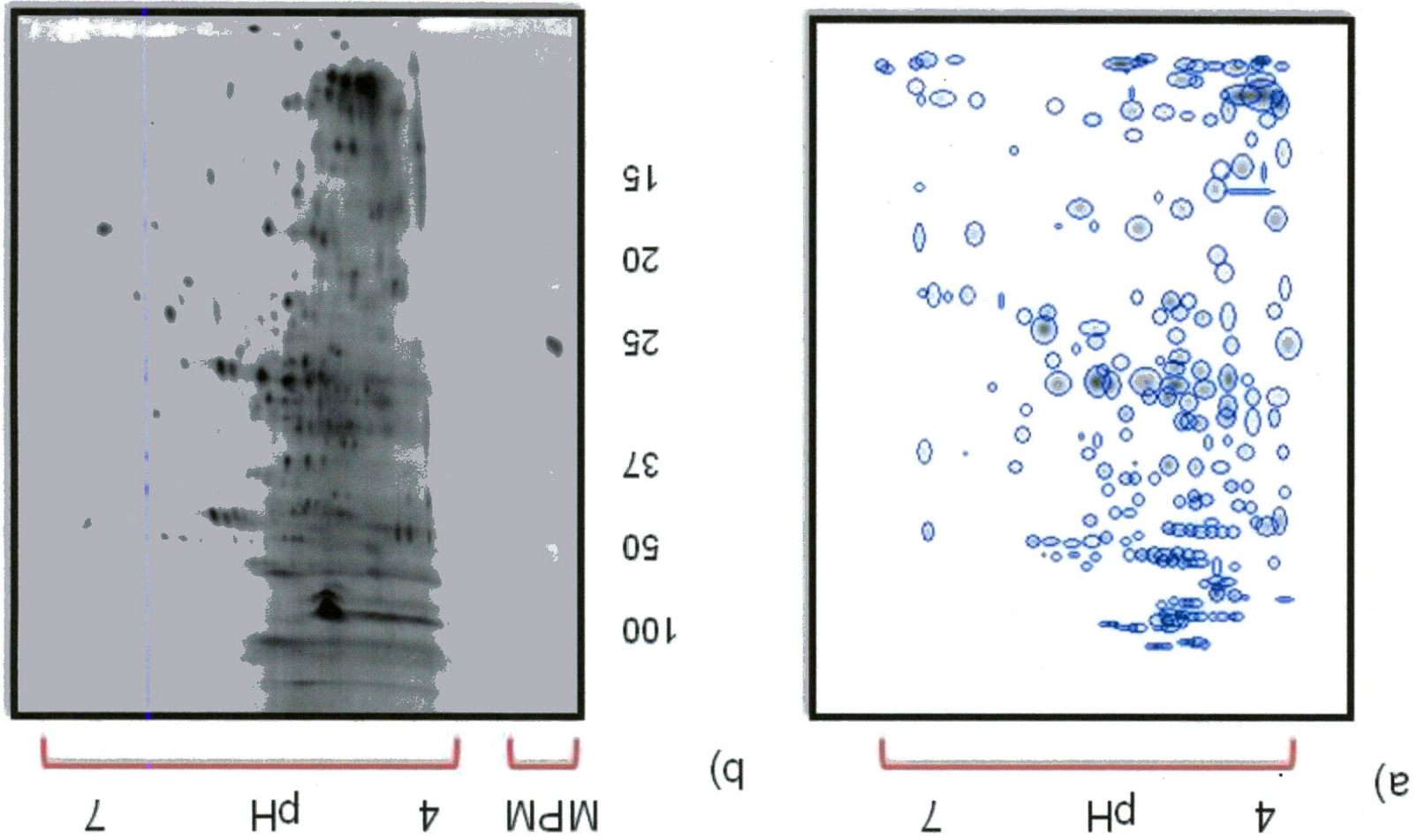
Electroforesis en doble dimensión

Para determinar el patrón de PFC y compararlo con el patrón de proteínas de ET Primero se realizó la electroforesis en doble dimensión, obteniendo para las PFC un promedio total de 347.33 ± 71 puntos (lote I 266, lote II 379, lote III 397); y en la caso de las proteínas de extracto total se obtuvo un promedio total de 349 ± 20.51 puntos (348 puntos para el lote I, 370 puntos para el lote II y 329 puntos para el lote III). Para cada uno de los extractos proteínicos (PFC y EC) se construyó una plantilla maestra en la que se consideraron sólo aquellos puntos que se encontraban en al menos dos de las réplicas usadas para la comparación (Figuras 16 y 17).

Al realizarla comparación del secretoma con el proteoma de las proteínas de ET de *M. bovis* BCG, encontramos 91 proteínas comunes, 175 proteínas presentes sólo en el secretoma y 288 proteínas presentes únicamente en el perfil de ET. Entre las proteínas que comparten, podrían encontrarse proteínas en proceso de secreción, y proteínas liberadas al medio de cultivo por lisis de algunas micobacterias como sería el caso de las proteínas ancladas a la pared celular.

Fluor

Figura 16. Gel maestro para PFC's. En el panel a) se muestra el gel maestro obtenido con ayuda del programa PDQuest (Bio-Rad), el cual contiene 266 puntos y en el panel b) se observa un gel representativo de las PFC teñido con "Flamingo



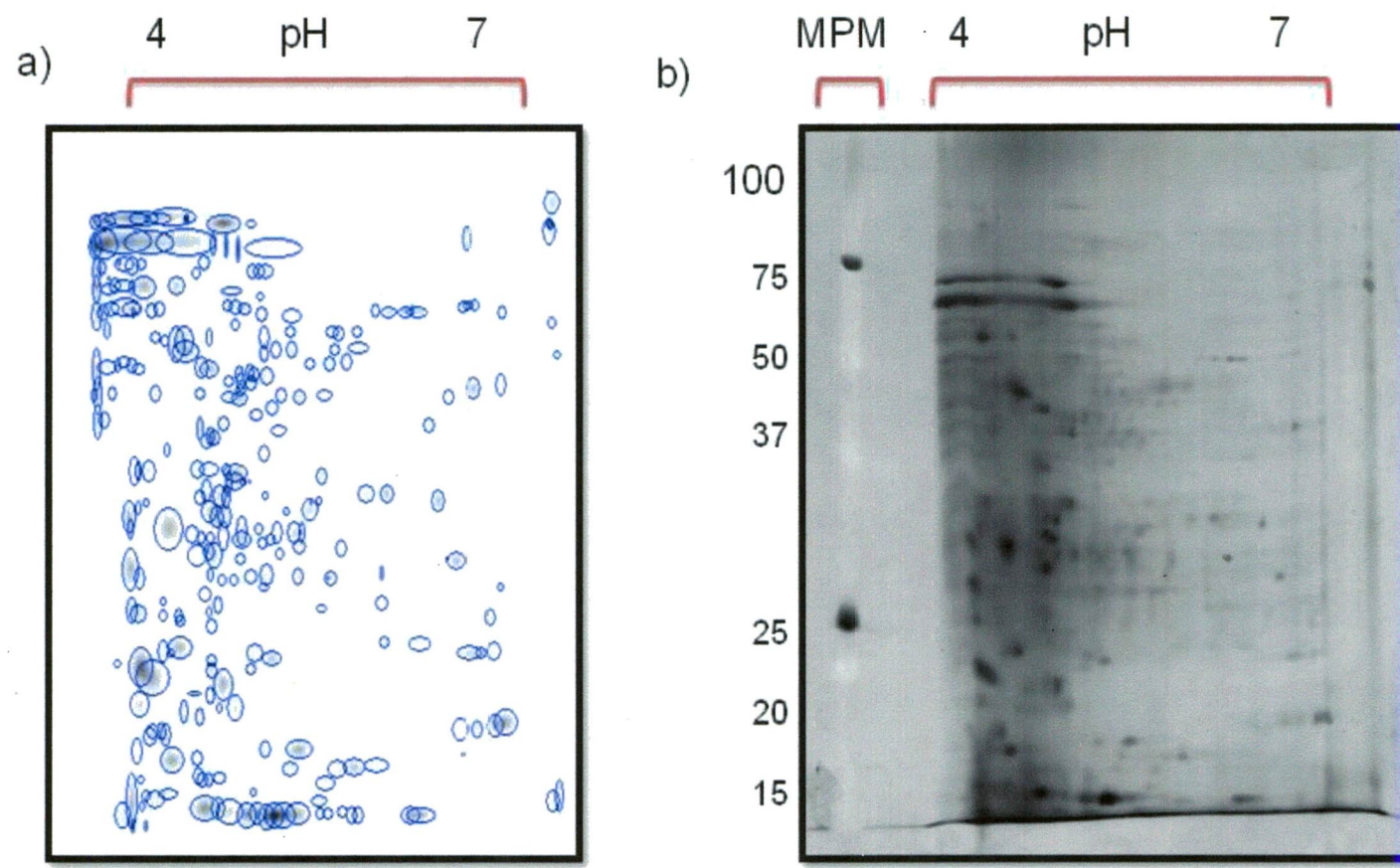


Figura 17. Gel maestro para proteínas de Extractos Totales. En el panel a) se muestra la plantilla maestra de las PEC, en la que se incluyeron 379 puntos. El panel b) muestra un gel de poliacrilamida al 12.5 % representativo de las proteínas de extracto celular teñido con "Flamingo Fluor".

Western Blot

Una vez que se obtuvo el secretoma y el proteoma de las PEC, se realizó el patrón de reconocimiento de proteínas por Western-Blot, tanto en 1D como en 2D. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF^{PSQ}, que posteriormente fueron teñidas con Rojo de Ponceau (Figura 18) y el kit *Fast Blot stain* (Figura 19) respectivamente, a fin de visualizar la transferencia.

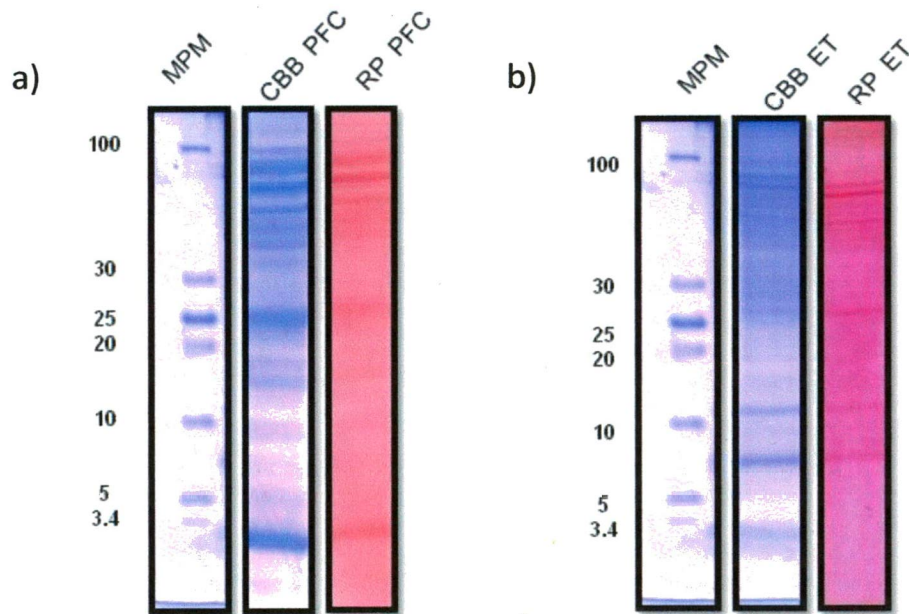


Figura 18. Transferencia de SDS-PAGE. a) SDS-PAGE de PFC teñida con azul de Coomassie (CBB) transferido a una membrana PVDF^{PSQ} teñido con rojo de Ponceau (RP), b) SDS-PAGE de ET teñida con azul de Coomassie (CBB) transferido a una membrana PVDF^{PSQ} y teñido con Rojo de Ponceau (RP).

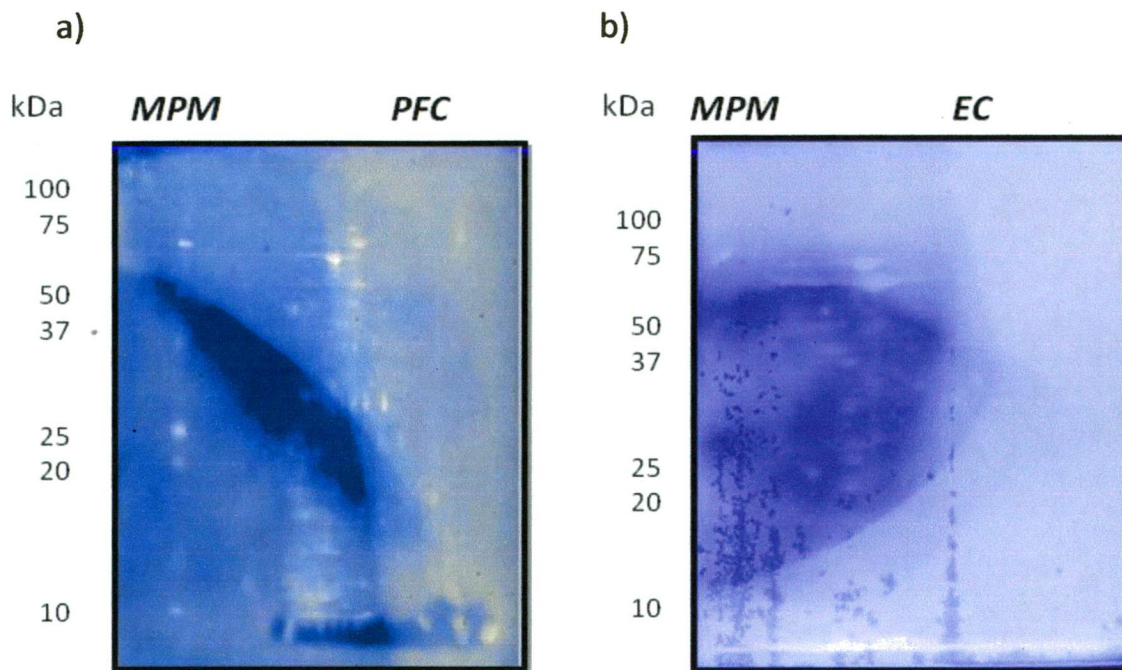


Figura 19 Transferencia de electroforesis en 2D. a) 2D de PFC (a) y proteínas de extracto celular (b) transferido a una membrana PVDF^{PSQ} y teñido con Stain Fast-Blot.

En las muestras analizadas por Western-Blot en 1D se observó el reconocimiento de 10 bandas a las que se les designó A, B, C, D, E, F, G, H, I y J. Cuatro bandas (B, C, D y G) fueron comunes en todos los patrones de PFC (Figura 20). En los ensayos realizados con proteínas de ET se tuvo el reconocimiento de 13 bandas, a las que se denominó A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, de las cuales 3 fueron comunes en todos los patrones (C, D, G). Se observó una mayor heterogeneidad en los patrones de proteínas de ET con respecto al perfil de reconocimiento de PFC. Como control positivo se utilizó un suero de paciente con TB (Figura 21).

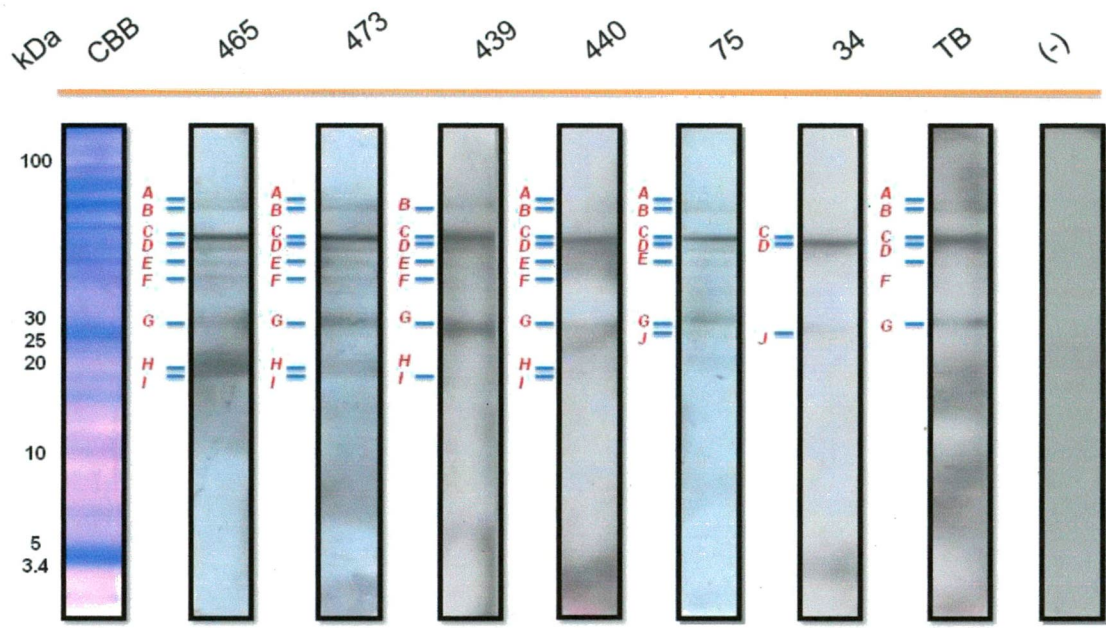


Figura 20. Western Blot en una dimensión, contra PFC de *M. bovis* BCG. Se muestran los Westerns-Blots para 6 de las muestras seleccionadas en los ensayos de ELISA, así como también el de un paciente con TB, además de un control de reacción (-)

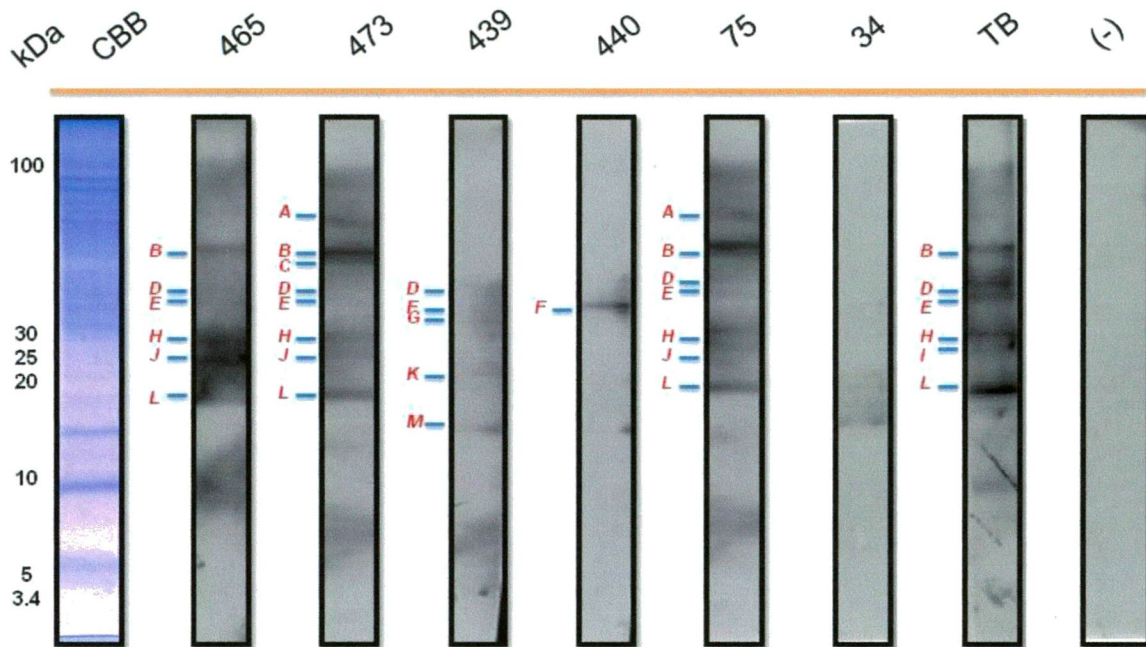


Figura 21. Western Blot en una dimensión, contra proteínas de ET de *M. bovis* BCG. Se muestran los Westerns-blots para 6 de las muestras seleccionadas en los ensayos de ELISA, así como también un western blot de un paciente de TB, además de un control de reacción (-)

Después, se realizó un Western Blot en 1D para observar el perfil de reconocimiento de PFC de *M. bovis* BCG obtenido con una pool de sueros de sujetos sanos del DF (todos los sueros seleccionados por ELISA) y una pool de sueros de pacientes y contactos de TB. Se observarán 10 bandas con la mezcla de sueros de los sujetos sanos, mientras que con la mezcla de sueros de los pacientes se observarán 6 bandas (Figura 22).

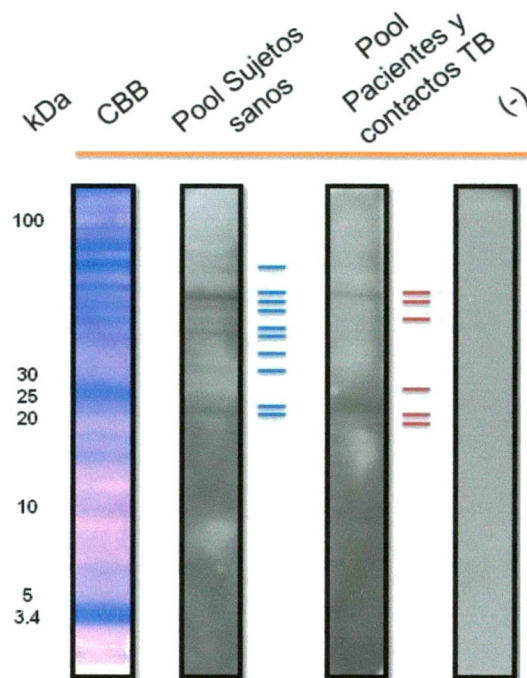


Figura 22. Comparación de los patrones obtenidos con sueros de sujetos sanos, sueros de pacientes con TB y contactos sanos de los pacientes con TB. En la imagen puede apreciarse la diferencia que existe en el reconocimiento de las bandas para cada uno de los ensayos, pudiéndose observar un mayor número de bandas en el ensayo para el pool de sujetos sanos.

Western Blot en 2D

Al mismo tiempo de la búsqueda de antígenos, se realizó el Western Blot en 2D a fin de que las bandas previamente reconocidas se resolvieran mejor y así, poder definir cuales puntos, se enviarían para su identificación por espectrometría de masas (MS/MS). El ensayo fue realizado con el pool de sueros de sujetos sanos (descrito anteriormente) y así ver que péptidos reconocían. En el western Blot de PFC pudo visualizarse el reconocimiento de 3 manchas, las cuales fueron ubicadas en el perfil proteómico en 2D de las PFC. Una vez que se ubicaron los puntos, éstos se enviaron para su secuenciación por espectrometría de masas (Figura 23 a y b).

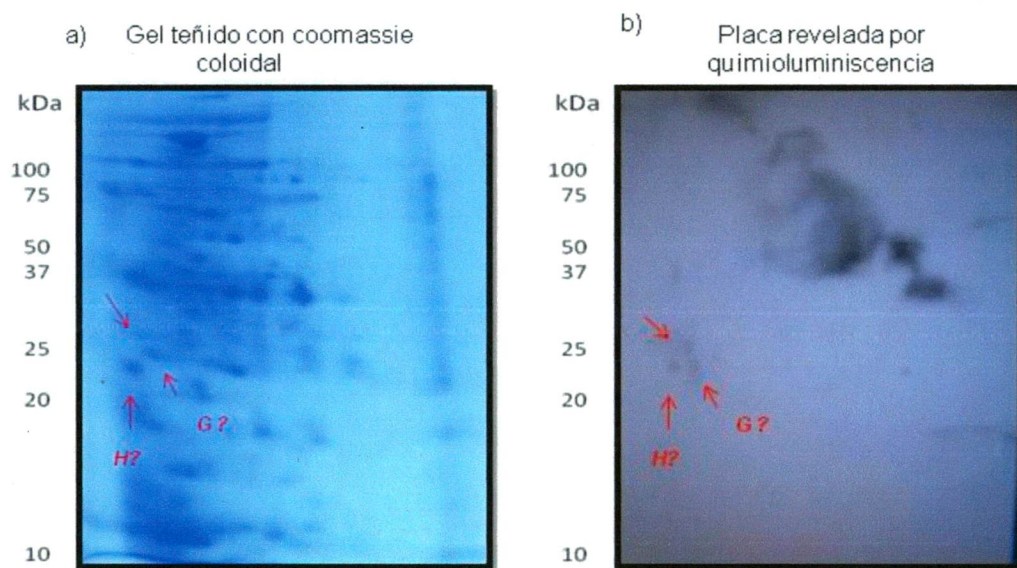


Figura 23. Western Blot en 2D, en la figura se muestra el Gel en 2D de PFC teñido con coomassie coloidal a partir del cual se escindieron los puntos identificados por espectrometría de masas, y el Western-Blot en 2D (b). Probablemente los puntos reconocidos puedan tratarse a las bandas G y H reconocidas en el WB de 1D.

Identificación por espectrometría de masas

En el análisis por espectrometría de masas de los puntos escindidos permitió la identificación de cuatro proteínas (Figura 23). Para el punto número 1, se identificaron péptidos con 77 % de cobertura sobre una proteína hipotética de *M. Bovis* BCG Pasteur, de 162 aminoácidos y con un *pI* calculado de 4.29. Esta proteína también se encuentra en *M. bovis* y en *M. tuberculosis*, con un porcentaje de homología del 100%. Esta proteína posee un dominio predicho FHA (*Forkhead associated domain*), implicado en la unión a fosfotreoninas, fosfoserinas y fosfotirosinas.

Para el punto número 2 se obtuvieron péptidos con un 49 % de cobertura sobre una hiperóxido reductasa (subunidad C) de *M. bovis* BCG (Pasteur), la cual posee 195 aminoácidos y un *pI* calculado de 4.5, esta proteína se encuentra presente también en *M. tuberculosis* y en *M. bovis* con un porcentaje de identidad del 100%. Para este punto, también se encontró que los péptidos identificados tienen un porcentaje de cobertura del 41 % con la cadena A de la proteína Ahpc (hiperóxido reductasa) de *M. bovis* BCG (Pasteur), esta proteína posee 195 aminoácidos y un *pI* calculado de 4.43. Estas proteínas son parte de la familia de las peroxirredoxinas implicadas en la protección celular al reducir el peróxido de hidrogeno producido ante un estrés celular.

El tercer punto identificado tuvo un 64 % de cobertura con la lipoproteína (Lppx) de *M. bovis* BCG (Pasteur), proteína que posee 233 aminoácidos y un punto isoeléctrico calculado de 5.03. Esta proteína se encuentra en *M. tuberculosis*

(H37Rv) y *M. bovis* con un porcentaje de identidad del 100%, sin embargo en las MNT's, como es el caso de *M. abscesus*, *M. parascrofulaceum*, *M. gilvum* y *M. smegmatis*; se encuentra con un porcentaje de identidad de 31, 32, 30 y 29 % respectivamente (Tabla 4).

- a) 1 MTDMNPDIEK DQTSDEVTVE TTSVFRADFL SELDAPAQAG TESAVSGVEG
 51 LPPGSALLVV KRGNAGSRF LLDQAITSAQ RHPDSIDIFLD DVTVSRRHAE
 101 FRLENNEFNV VDVGSLNGTY VNREPVDASV LANGDEVQIG KFRLVFLTGP
 151 KQGEDDGSTG GP
- b) 1 MPLLTIGDQF PAYQLTALIG GDLSKVDKQ PGDYFTTITS DEHPGKWRVV
 51 FFWPKDFTFV CPTAIAAFSK LNDEFEDRDA QILGVSIDSE FAHFQWRAQH
 101 NDLKTLPPFM LSDIKRELSQ AAGVLNADGV ADRVTFIVDP NNEIQFVSAT
 151 AGSVGRNVDE VLRVLDALQS DELCACNWRK GDPTLDAGEL LKASA
- c) 1 XPLLTIGDQF PAYQLTALIG GDLSKVDKQ PGDYFTTITS DEHPGKWRVV
 51 FFWPKDFTFV CPTAIAAFSK LNDEFEDRDA QILGVSIDSE FAHFQWRAQH
 101 NDLKTLPPFX LSDIKRELSQ AAGVLNADGV ADRVTFIVDP NNEIQFVSAT
 151 AGSVGRNVDE VLRVLDALQS DELCASNWRK GDPTLDAGEL LKASA
- d) 1 MNDGKRAVTS AVLVVLGACL ALWLSGCSSP KPDAEEQGVV VSPTASDPAL
 51 LAEIRQSLDA TKGLTSVHVA VRTTGKVDL LGITSADVDV RANPLAARGV
 101 CTYNDEQGVV FRVQGDNISV KLFDDWSNLG SISELSTSRV LDPAAGVTQL
 151 LSGVTNLQAQ GTEVIDGIST TKITGTIPAS SVRMLDPGAK SARPATVWIA
 201 QDGSHELLVRA SIDLGSGSIQ LTQSKWNEPV NVD

Figura 24 Secuencia de aminoácidos de los péptidos encontrados por espectrometría de masas. a) Secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética de *M. bovis* BGC (*Pasteur*), b) y c) secuencia de aminoácidos de la hiperoxido reductasa subunidad C de *M. bovis* BGC (*Pasteur*), y la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la proteína Ahpc de *M. bovis* BGC (*Pasteur*), d) secuencia de aminoácidos de la lipoproteína de *M. bovis* BGC (*Pasteur*); en rojo se muestran los péptidos encontrados por espectrometría de masas.

Análisis Bioinformático

Con la finalidad de determinar si existen proteínas homologas a los antígenos identificados en las MNT's, se realizó un análisis bioinformático en el cual también se incluyó a los antígenos que han sido propuestos o son utilizados en pruebas serológicas para el diagnóstico de la TB (Tabla 3).

Una vez identificados los antígenos utilizados en pruebas de diagnóstico serológicas para TB, se obtuvieron sus secuencias de aminoácidos en el Gen Bank de NCBI (35) y con estas se realizó un análisis de tipo BLAST con las especies de micobacterias ya reportadas (36), y así poder conocer su homología en otras micobacterias con respecto a los antígenos de *M. tuberculosis* H37Rv (Tabla 4). De cada BLAST se recuperó el porcentaje de similitud que había con las cepas: *M. tuberculosis* CD1551, *M. bovis* AF2122/97, *M. bovis* BCG Pasteur y las especies de MNT's *M. avium*, *M. marinum*, *M. intracellulare*, *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, *M. abecesus*, *M. gilvum* y *M. parascrofulaceum* que se incorporó en una tabla comparativa.

Tabla3 Antígenos utilizados para el diagnóstico de TB en pruebas serológicas.

Antígeno	Función	Referencia
DnaK	Chaperona, induce la activación de NFK- β en las células endoteliales humanas	(37)
GroEL	Chaperonina, modula la respuesta inmune ante una infección con <i>M. tuberculosis</i>	(38)
GroES	Proteína de choque térmico	(39)
Proteína de 38 kDa (PstS1)	Proteína implicada en la fosforilación y localizada en la capsula micobacteriana	(40)
Antígeno 85 A (mycolyl transferase)	implicada en la síntesis de la pared celular	(40)
Antígeno 85 B (mycolyl transferase)	fibronectin-binding protein	(40)
MPT48	Proteína hipotética rica en glicinas	(40)
MPT32 (FAP-TB) Antígeno de 45/47 kDa	fibronectin-binding protein	(40)
MPT 70/86	Antígenos de mayor secreción en <i>M. bovis</i>	(41)
MPT64	Proteína altamente antigénica	(42)
ESAT-6	Antígeno de secreción que promueve la respuesta inmune Th1	(43)
CFP-10	Antígeno de secreción que promueve la respuesta inmune Th1	(43)
MPT51 (Ag 85C)	Mycolyl transferasa	(44)
Antígeno de 43 kDa	L-alanina deshidrogenasa, de secreción	(5)

La mayoría de los antígenos aquí enlistados corresponde a proteínas asociadas a la pared celular micobacteriana.

Tabla 4.

Porcentajes de identidad de los antígenos de *M. tuberculosis* H37Rv propuestos y utilizados para el diagnóstico serológico de la TB

ANTIGENO	<i>M. tuberculosis</i> (CD1551)	<i>M. bovis</i> (AF2122/97)	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. avium</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>
RV1827	100%	100%	100%	92%	91%	92%	88%	92%	91%	91%	84%	89%	95%
Oxido reductasa C	100%	100%	100%	91%	92%	90%	87%	93%	92%	81%	84%	(-)	90%
Ahpc Cadena A	99%	99%	99%	90%	92%	89%	87%	92%	92%	81%	83%	(-)	89%
Lipoproteína Lppx	100%	100%	100%	35%	74%	34%	77%	70%	74%	29%	31%	30%	32%
DnaK	99%	100%	100%	96%	96%	95%	95%	97%	96%	93%	92%	93%	95%
GroEL	100%	100%	100%	85%	88%	85%	83%	88%	87%	82%	79%	82%	86%
GroES	100%	100%	100%	97%	99%	99%	90%	100%	99%	99%	98%	97%	99%
38 kDa	100%	99%	99%	(-)	37%	(-)	(-)	37%	38%	(-)	35%	(-)	(-)
Ag 85A	100%	100%	100%	84%	85%	83%	83%	84%	85%	(-)	(-)	(-)	82%
Ag 85B	100%	99%	99%	86%	89%	87%	80%	90%	88%	(-)	(-)	(-)	90%
MPT32	99%	99%	99%	79%	81%	77%	79%	85%	81%	60%	54%	60%	81%
MPT48	100%	99%	99%	(-)	69%	(-)	(-)	72%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MPT70/83	100%	100%	(-)	(-)	73%	(-)	(-)	82%	(-)	(-)	(-)	(-)	77%
MPT864	99%	100%	100%	55%	66%	53%	(-)	75%	67%	44%	44%	44%	47%
ESAT-6	100%	100%	(-)	(-)	90%	(-)	(-)	99%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CFP-10	100%	100%	(-)	(-)	97%	(-)	(-)	95%	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MPT63	100%	100%	100%	47%	86%	(-)	(-)	68%	(-)	55%	48%	45%	69%
MPT51	99%	99%	99%	83%	85%	82%	78%	85%	85%	67%	(-)	70%	85%

Dentro de la tabla puede observarse que existen antígenos como las chaperonas GroEL y GroES que son muy conservadas en las micobacterias teniendo un porcentaje de identidad que va desde el 79 % al 100 %. También se puede apreciar que hay antígenos como MPT32 y MPT64 que se encuentran en las especies de micobacterias anteriormente mencionadas, sin embargo, el porcentaje de similitud es muy bajo entre ellas, ya que va desde el 44 % hasta el 99 %. Por otro lado, antígenos ESAT-6, CPF-10 que sólo se presentan en las micobacterias del complejo tuberculosis y en muy pocas MNT's, son muy conservados entre sí.

En el caso del antígenos MPT64 se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal W, con el fin de conocer que regiones de los antígenos podrían ser utilizadas para diferenciar de la infección por *M. tuberculosis*, de la exposición a MNT's. Pudo apreciarse que hay regiones claras como la amino terminal, en la cual *M. tuberculosis* posee 42 aminoácidos más en su secuencia, y una región adyacente al extremo COO⁻ que sólo se presenta en *M. abscessus*, *M. avium*, y *M. intracellulare*.

DISCUSIÓN

La tuberculosis (TB) es uno de los principales problemas de salud pública, por ello se han diseñado programas a fin de controlar los casos nuevos de TB, implementar tratamientos más cortos y efectivos, además de crear nuevos métodos diagnósticos de bajo costo y fácil acceso en la población (3).

Actualmente, existen métodos diagnósticos como el PPD que es uno de los más utilizados para la detección de TB. Sin embargo, el principal inconveniente de la prueba de PPD recae en que las proteínas contenidas en este derivado proteico no son específicas de *M. tuberculosis*, sino que son compartidas con otras micobacterias patógenas y con micobacterias saprófitas, comúnmente encontradas en suelos y el agua; hecho que puede provocar un falso positivo por reactividad cruzada debida a la inmunización con *M. bovis* BCG o por la exposición a micobacterias ambientales (20). Hoy en día existen métodos diagnósticos basados en la producción de IFN- γ , los cuales consisten en estimular células sanguíneas con antígenos como ESAT-6 y CPF-10 y medir los niveles de IFN- γ producidos (quantiFERON- TB y ELISPOT), teniendo como principal obstáculo el alto costo respecto a la prueba de la tuberculina, además de que las proteínas ESAT-6 y CPF-10 se encuentran presentes en los miembros del complejo *M. tuberculosis*, por lo que estos test diagnósticos sólo son indicativos de una infección por micobacterias del complejo tuberculoso, la cual puede ser resultado de una infección reciente o tratarse de una infección latente.

Por tal motivo, en los últimos años se ha dado una gran importancia a la búsqueda de nuevos reactivos para el diagnóstico de la TB, entre los cuales se incluyen pruebas basadas en serología, las cuales son de bajo costo y pueden ser aplicadas masivamente en regiones endémicas. Actualmente, no se cuenta con una prueba que permita discernir, entre una infección por *M. tuberculosis*, la inmunización con *M. bovis* BCG o la exposición a micobacterias no tuberculosas. Ya que existen reportes en los que se ha visto que las MNT's comparten gran cantidad de antígenos con *M. tuberculosis* y con las especies contenidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, como es el caso de los antígenos ESAT-6 y CPF-10 que también se encuentran en *M. kansasii*, *M. szulgi* y *M. marinum*. Por ello, con el objetivo de identificar proteínas reconocidas por reactividad cruzada, se recolectaron 828 sueros de sujetos sanos del Distrito Federal en los que se buscó la presencia de anticuerpos IgG e IgA que reconocieran PFC de *M. bovis* BCG.

Al graficar por rango de edad las muestras que resultaron positivas se observó un patrón similar al que se observa en la incidencia de casos por TB pulmonar, teniendo un mayor número de casos positivos en el grupo de 60 años en adelante (Figura 12). En el caso de las muestras con IgA's que reconocieron PFC de *M. bovis* BCG se obtuvo un patrón muy diferente (Figura 14), ya que, por el contrario, los casos positivos se encuentran entre los 11-50 años de edad, lo cual podría explicarse por una exposición previa a micobacterias ambientales, ya que éstas entran por vía oral, sin embargo, una afirmación de este tipo sería muy subjetiva, ya que la presencia de IgG's e IgA's sólo nos indica que el sujeto habían estado

expuestas a algún tipo de micobacteria en un momento reciente a la toma de la muestra.

Con la finalidad de identificar los antígenos que son reconocidos por estas inmunoglobulinas, se realizaron ensayos de Western Blot en 1D, para observar el patrón de reconocimiento de PFC y de proteínas de ET de las muestras que resultaron positivas, y se encontraron 10 bandas que fueron reconocidas por IgG's, de las cuales sólo 4 fueron reconocidas por la mayoría de las muestras evaluadas (Figura 21). El reconocimiento diferencial de bandas entre una muestra y otra, puede deberse a características propias de la respuesta inmune de cada individuo, o a que los individuos habían estado expuestos a diferentes tipos de MNT's. Por poner un ejemplo, este efecto puede observarse con el control positivo perteneciente a un paciente de TB, en el cual puede observarse el reconocimiento de un número menor de bandas que el suero número 465; también puede observarse que el control positivo comparte el reconocimiento de 2 bandas con las demás muestras, lo cual podría referir que estas proteínas son comunes en las micobacterias a las cuales estamos expuestos.

También se realizó un ensayo de Western Blot para evaluar que proteínas de ET de *M. bovis* eran reconocidas por estos sueros. Se observaron patrones más heterogéneos que en el caso de las PFC, ya que fueron reconocidas 13 bandas, de las cuales sólo 3 fueron comunes en la mayoría de las muestras. Sin embargo, el patrón de reconocimiento del control positivo (Paciente de TB) fue mucho más parecido con las muestras seleccionadas, que el de PFC (Figura 20).

Al analizar las proteínas que han sido utilizado en métodos diagnóstico serológico para la detección de TB, y se encontró que las banda C y G de las PFC, se encuentran cerca del peso molecular de los antígenos HSP65 y p38 descritos por Rovatti y cols.

Al tratar de obtener el patrón de reconocimiento de las PFC y ET de *M. bovis* BCG por IgA's, no se logró definir ningún patrón, debido a que los niveles de anticuerpos eran demasiado bajos para poder visualizarlos por esta técnica.

Por otra parte se realizó una búsqueda exhaustiva de aquellos antígenos de *M. tuberculosis* que se han utilizado o se han incluido en pruebas serológicas para el diagnóstico de la TB, y se encontraron proteínas como la DnaK, GroEL y GroES, las cuales difieren de otros organismos y han sido utilizadas para hacer evidente la presencia de micobacterias, sin embargo, para el diagnóstico de la TB resultan poco específicas, debido a que presentan un porcentaje de identidad del 95% al 100% entre las micobacterias del complejo y las MNT's (37-39). Los antígenos 85A, 85B, 85C/MPT51 son muy inmunogénicos, se les ha evaluado como pruebas de diagnósticos para la TB y como candidatos a vacuna; estos antígenos están implicados en la síntesis de la pared celular y en su entrada al hospedero, sin embargo, han mostrado poca especificidad en las regiones endémicas debido a que poseen un porcentaje de identidad del 100%-99% entre las micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, y del 90%-82% entre las MNT's (40, 44).

Sin embargo, existen otros antígenos como MPTB64, MPT32 que a pesar de tener homólogos en las MNT's, su porcentaje de identidad es muy bajo entre las micobacterias, cualidad que puede ser explotada para el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en aquellos fragmentos diferenciales entre ellas.

Al realizar ensayos de Western-Blot en 2D se pudieron detectar sólo 3 proteínas del filtrado de cultivo de *M. bovis* BCG, los cuales fueron escindidas del gel y analizadas por espectrometría de masas. Se identificó una proteína hipotética de *M. Bovis* (Pasteur), la cual posee un dominio FHA (*Forkhead associated domain*) implicado en la unión a fosfotreoninas, fosfoserinas y fosfotirosinas; además de que posee una señal de localización nuclear, por lo que esta proteína pudiera estar jugando un papel importante en alguna vía de señalización.

En el segundo punto analizado, los péptidos identificados, tuvieron un score alto para dos proteínas de *M. bovis* BCG (Pasteur). Una de ellas, la subunidad C de la hiperoxidoreductasa, la cual es muy conservada en las micobacterias y participa en la respuesta de *M. tuberculosis* al estrés oxidativo, estrés sufre en las fases tempranas de la infección, al ser atacada por las especies reactivas de oxígeno generadas por los macrófagos a fin de contener la infección, por lo que esta proteína es necesaria para la persistencia de *M. tuberculosis* en su hospedero. Ya que existen estudios, en los cuales deletan el gen q codifica para esta proteína y se observó que *M. tuberculosis* no puede sobrevivir en su hospedero sin ella. (19, 45). La otra proteína descrita para los péptidos identificados en este punto, fue la cadena A de la proteína Ahpc, la cual refiere ser una isoforma de la subunidad C de la hiperoxireductasa.

Finalmente en el tercer punto identificado, se encontraron péptidos, pertenecientes a la lipoproteína (LppX) de *M. bovis* BCG (Pasteur), la cual tiene un porcentaje de identidad entre las micobacterias que va desde un 29 % hasta un 90 %, lo cual resulta interesante ya que este antígeno podría ser utilizado para diferenciar entre una infección por *M. tuberculosis* de una exposición a MNT's. Se ha reportado que esta proteína participa en los procesos de invasión al hospedero y es requerida para la translocación de compuestos como los DIM (phthiocerol dimycocerosates) y diversos lípidos al exterior de la membrana celular, en los procesos de infección (46)(40).

La identidad de las proteínas reconocidas por IgG's totales presentes en los sueros de los sujetos sanos, fue la esperada, debido a que estas están asociadas a la patogenicidad de *M. tuberculosis*, en sus distintas etapas de infección: 1) la colonización de la mucosa; 2) la entrada a las células del huésped; 3) Resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero (40). Sin embargo, no se puede concluir que las muestras positivas o con IgG's totales para estas proteínas se traten de casos de infección con *M. tuberculosis*.

CONCLUSIONES

- ✓ De los 828 sueros evaluados, sólo 15 fueron positivos para IgG's y 11 de ellos para IgA.
- ✓ Se lograron resolver 532 proteínas entre el secretoma y el proteoma del extracto celular de *M. bovis* BCG.
- ✓ En las PFC se lograron detectar 10 bandas, de las cuales sólo 4 fueron comunes a la mayoría de las muestras, y en los ET se visualizaron 13 bandas, de las cuales sólo 3 se encontraron en la mayoría de las muestras.
- ✓ A partir de los 3 puntos identificados por espectrometría de masas, se obtuvieron péptidos que presentaron porcentajes de cobertura importantes para 4 proteínas de *M. bovis* BCG (Pasteur). Las cuales correspondieron a la proteína hipotética Rv1827, la subunidad C de una oxido reductasa, la cadena A de la proteína Ahpc y la lipoproteína Lppx.
- ✓ Se encontró que las proteínas identificadas con excepción de la lipoproteína Lppx poseen un porcentaje de identidad de 100-80% entre las especies reportadas de micobacterias. Mientras que la lipoproteína Lppx, posee un porcentaje de identidad del 100-29 % entre ellas.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas del proyecto se tiene la clonación de los péptidos identificados a fin de obtener proteínas recombinantes a fin de evaluar el papel que juegan estas proteínas en la modulación de la respuesta inmune, así como su posible utilidad en el desarrollo de pruebas de diagnóstico que permitan discernir la sensibilización con MNT's de la infección por *M. tuberculosis*.

REFERENCIAS

1. Wallace Cyril Lutzee TC, Glover Gordon, Cousins Debby, Bell John, Berlie-Surujballi Gloria, Barbeau Yvon, and Randall Geoff Isolation of a *Mycobacterium microti*-like organism from a rock hyrax (*Procavia capensis*) in a Canadian zoo. *Can Vet J.* 2006 October;47(10):1011-3.
2. Roscigno G. RRaZA. Tuberculosis. *Nature.* 2004;2:930-2.
3. García MdL. Limitaciones y necesidades para el desarrollo de estrategias para el control efectivo de la tuberculosis. *I N d S Pública.* 2004;49 (XII congreso de investigación en salud pública): E127- E33.
4. WHO. Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing. World Health Organization. 2009.
5. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology.* 2010;15(2):220-40.
6. WHO. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. World Health Organization. 2010.
7. Stephan J, J. Bender, et al. . The growth rate of *Mycobacterium smegmatis* depends on sufficient porin-mediated influx of nutrients. *Mol Microbiol* 2005;58:714 - 30.

8. Dheda K, SSK, Zhu B., van Zyl-Smit R., Zhang Y. The immunology of tuberculosis: From bench to bedside. *Respirology*. 2010;15:433-50.
9. SSA. Informe de rendición de cuentas en Salud. 2008;80-88.
10. Milstien Julie. E. Tuberculosis. /immunological Basis for Immunization. World Health Organization. 1993.
11. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO, III. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004 January 1, 2004;17(1):98-106.
12. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008 March 1, 2008;72(1):126-56.
13. Tortolli E. Impact of Genotypic Studies in Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003;16(2):319-54.
14. Cosma Christine L. SDR, and Ramakrishnan Lalita The Secret Lives of Pathogenic Mycobacteria *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57:641-76.
15. Sundaramurthy V. PJ. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and infection*. 2007;9:1671-9.
16. Dorronsoro I. TL. "Microbiología de la tuberculosis.". *An Sist Sanit Navar*. 2007;30:67-85.
17. Palomino J. C. CLS, Ritacco V. Tuberculosis. Departamento de Microbiología and U F d S Paulo Brazil. 2007.

18. Murray Patrick R. RKS, Pfaller Michael A. Microbiología medica. 2009;sexta edición(mycobacterium):227-90.
19. Raja A. "Immunology of tuberculosis.". Indian J Med Res. 2004;120:213-32.
20. Cascante J. PI, Eguía V., Hueto J. . *Diagnóstico de la infección tuberculosa.* An sist Sanit Naval 2007;30:49-65.
21. Dietrich JaTMD. "Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development. APMIS. 2009; 117:440-57.
22. Thaiss. K. 2010.
23. Jimenez M. BR, Linares M., Chavez R., Lascurain R.,Zenteno E. . "Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tubeculosis." Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2001;14(1):39-48.
24. Flynn JLaJC. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS. Annual Review of Immunology 2001;19:93-129.
25. van Crevel R, T. H. M. Ottenhoff, et al. . Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*". Clin Microbiol Rev. 2002;15(2):294-309.
26. Ferraz J. MF, Albuquerque M., Montenegro S. and Abath F. "Immune factors and immunoregulation in tuberculosis.". Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2006; 39:1387-97.
27. Zahrt T. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Microbes and infection. 2003;5:159-67.

28. Organización PdIS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. 2008; Parte 1 Baciloscopia.
29. Goletti D. , Carrar S. a, Vincent D. , Saltini C. , Busi Rizzi E., SchininaV. , Ippolito G. ,Amicosante M. and Girardi5 E. . Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study *Clinical Microbiology and Infection*. 2006;12:544-50.
30. Anderson B. L. WRJ, 1 and Litwin1 C. M. . Assessment of Three Commercially Available Serologic Assays for Detection of Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* and Identification of Active Tuberculosis. *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*. 2008, :1644-9.
31. Graham A. W.Rook. KD, et al. . "Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 661-7.
32. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes and inmunity*. 2003;4:4-11.
33. Kaufmann S.H.E. CST, Mizrahi V., Rubin E., Nathan C. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *JEM*. 2005;201(11):1693-7.
34. Andersen P. DM. "The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine.". *Nature*. 2005;3:656-60.
35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

37. Bulut Y, Michelsen KS, Hayrapetian L, Naiki Y, Spallek R, Singh M, et al. Mycobacterium Tuberculosis Heat Shock Proteins Use Diverse Toll-like Receptor Pathways to Activate Pro-inflammatory Signals. Journal of Biological Chemistry. 2005 June 3, 2005;280(22):20961-7.
38. Khan N, Alam K, Mande SC, Valluri VL, Hasnain SE, Mukhopadhyay S. Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60 modulates immune response to PPD by manipulating the surface expression of TLR2 on macrophages. Cellular Microbiology. 2008;10(8):1711-22.
39. Baird PN, Hall LMC, Coates ARM. A major antigen from Mycobacterium tuberculosis which is homologous to the heat shock proteins groES from E.coli and the htpA gene product of Coxiella burneti. Nucleic Acids Research. 1988 September 26, 1988;16(18):9047.
40. Daffé M. EG. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. Tubercle and Lung Disease. 1999;79(3):153-63.
41. Wiker HG. MPB70 and MPB83 – Major Antigens of Mycobacterium bovis. Scandinavian Journal of Immunology. 2009;69(6):492-9.
42. Harth G, Lee B, Horwitz M. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major Mycobacterium tuberculosis extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. Infect Immun. 1997 June 1, 1997;65(6):2321-8.

43. Meher AK, Bal NC, Chary KVR, Arora A. Mycobacterium tuberculosis H37Rv ESAT-6–CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. FEBS Journal. 2006;273(7):1445-62.
44. Wilson Rosalind A. MWN, Kremer Laurent , Besra Gurdyal S. and Fütterer Klaus. The Structure of Mycobacterium tuberculosis MPT51 (FbpC1) Defines a New Family of Non-catalytic α/β Hydrolases Journal of Molecular Biology. 2003;335(2):519-30.
45. Chen L, Xie Q-w, Nathan C. Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C (AhpC) Protects Bacterial and Human Cells against Reactive Nitrogen Intermediates. Molecular cell. 1998;1(6):795-805.
46. Sulzenbacher G, Canaan S, Bordat Y, Neyrolles O, Stadthagen G, Roig-Zamboni V, et al. LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of Mycobacterium tuberculosis. EMBO J. 2006;25(7):1436-44.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 31 de enero del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Ing. Claudia Virginia Dorantes Torres.

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dra. Elizabeth Álvarez Sanchez

Dr. Israel López Reyes

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

