

PROGRAMA DE MAESTRIA CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE ENTRE AISLAMIENTOS DE ALTA
Y BAJA PREVALENCIA DE *Mycobacterium
tuberculosis*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A:
Q.F.B. FERNANDO VARGAS ROMERO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO CASTAÑÓN ARREOLA.

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2009

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

Dr. Mauricio Castañón Arreola.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dr. Rogelio Hernández Pando.
(Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán)

Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Mavil López Casamichan.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

M en C. Máximo Martínez Benítez.
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS:

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas gracias al apoyo académico y económico que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, a la cual agradezco, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca CONACyT para Maestría)

La presente tesis estuvo bajo la dirección del Dr. Mauricio Castañón Arreola, al cual agradezco la oportunidad brindada de participar en el proyecto.

Agradezco al Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el apoyo académico y las facilidades otorgadas para la realización de la presente tesis.

Agradezco al Dr. Guillermo Mendoza de la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo en la Espectrometría de Masas y a la Dra. Nora Gutiérrez N; del INMEGEN por el apoyo en la realización de DIGE.

DEDICATORIAS:

A mis *padres*; por su cariño y por brindarme la confianza para poder realizar mis estudios de Maestría, a *Josefina* por su apoyo y consejos en todo momento; a *Juan Manuel* por ser un ejemplo de vida sana y recta que son un ejemplo a seguir.

A *Manuel, Mariano y Aurora* por su confianza y apoyo incondicional a lo largo de nuestras vidas.

A *Alicia* por su grata compañía y cariño muchas gracias por todo. ILY.

A mis *abuelos, tíos, primos*, por sus muestras de confianza y cariño a lo largo de mi vida.

A mis *amigos* de siempre por su grata compañía (Alonso, Alicia, Carlos, Tania, Emmanuel, Ángel)

A todas y todos mis compañeros del Posgrado en Ciencias Genómicas, por todos los momentos vividos juntos, en especial gracias a los tuberculosos.

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
1.-INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	1
ESTADO DEL ARTE	8
ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	21
IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA	23
2.-OBJETIVOS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3.-MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.-RESULTADOS	34
5.-DISCUSIÓN	56
6.-CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	63
ANEXOS	67

INDICE:

1. Introducción	1
Generalidades	1
Epidemiología	3
Tuberculosis farmacorresistente	6
VIH y tuberculosis	7
Epidemiología molecular	8
Tipificación molecular	9
Distribución genotipo Beijing en el mundo	11
Transmisión de <i>M. Tb</i>	12
Patogénesis	13
Respuesta inmune	14
El estado de latencia.	16
Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.	17
Proteínas involucradas en la virulencia de <i>M. Tb</i>	19
Estudios de expresión diferencial entre cepas de <i>M. Tb</i>	21
Aislamientos Sud31 y Sud23	22
2. Justificación	25
3. Hipótesis	26
4. Objetivo	27
Objetivos particulares	27
5. Metodología	28

Cepas de <i>M. Tb</i>	28
Cultivo bacteriano y cosecha	28
Obtención de las PFC	28
Cuantificación de proteínas.	29
SDS-PAGE.	29
Preparación de secretomas.	29
Análisis 2D de los secretomas.	30
DIGE.	30
Espectrometría de Masas.	31
Ensayos de Infección.	32
6. Resultados.	34
7. Discusión.	56
8. Conclusiones.	62
9.- Bibliografía	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN= ácido desoxirribonucleico

AgNO₃= nitrato de plata

BAAR= bacilos ácido-alcohol-resistentes

BCG= bacilo de Calmette-Guèrin

BSA= albúmina sérica bovina (bovine serum albumin)

CHAPS= 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CH₃COOH= ácido acético

cm= centímetros

CO₂= dióxido de carbono

DGE= Dirección General de Epidemiología

DTT= ditioneitol

g= gramos

h= horas

H₂O_d= agua destilada

HCl= ácido clorhídrico

IAA= iodoacetamida

IFN-γ= interferón gamma

IgG= inmunoglobulina G

IL= interleucina

IPG= gradiente inmobilizado de pH (del ingles 'immobilized pH gradient')

kDa= kilodaltones

L= litros

M. bovis= *Mycobacterium bovis*

MDR-TB= tuberculosis multifármacorresistente (multidrug-resistant tuberculosis en inglés)

mg= miligramos

min= minutos

mM= milimolar

mL= mililitros

M. tuberculosis= *Mycobacterium tuberculosis*.

M. tb= *Mycobacterium tuberculosis*.

NaOH= hidróxido de sodio

Na₂S₂O₃·5H₂O= tiosulfato de sodio pentahidratado

OADC= ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa (oleic acid-albumin-dextrose-catalase en inglés)

OMS= Organización mundial de la Salud (WHO= World Health Organization en inglés)

OPS= Organización Panamericana de la Salud

PFC= proteínas de filtrado de cultivo (CFP= culture filtrate proteins en inglés)

pH= potencial de hidrógeno

PSA= persulfato de amonio

rpm= revoluciones por minuto

s= segundos

SDS= Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate en inglés)

SIDA= síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SINAIS= Sistema Nacional de Información en Salud

TB= tuberculosis

TA= Temperatura ambiente.

µm= micrómetros

µg= microgramos

µL= microlitros

VIH= Virus de la Inmunodeficiencia Humana

TB= Tuberculosis.

TEMED= N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina

Th1= subpoblación de linfocitos T cooperadores tipo 1

TNF-α= factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha en inglés)

UFC= unidades formadoras de colonia

Vh= Volts hora

v/v= volumen / volumen

XDR-TB= tuberculosis con fármacorresistencia extendida (extensively drug-resistant tuberculosis en inglés)

w/v= peso / volumen (weight / volume en inglés)

%= por ciento o Porcentual.

°C= grados Celsius

~

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.-** Micrografía electrónica del bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Figura 2.-** Incidencia de tuberculosis en México.
- Figura 3.-** Incidencia mundial de TB en relación a VIH en el 2000
- Figura 4.-** Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG.
- Figura 5.-** Mapa de distribución del genotipo Beijing en el mundo
- Figura 6.-** Infección entre individuos con *M.tb*.
- Figura 7.-** Mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune.
- Figura 8.-** Comparación del porcentaje de supervivencia entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.
- Figura 9.-** Comparación de la virulencia entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.
- Figura 10.-** Comparación en la producción de citocinas TNF, IL-10, INF γ y de IL-4 entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.
- Figura 11.-** PFC del aislamiento Sud31.
- Figura 12.-** Perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31, teñido con plata.
- Figura 13.-** Gel maestro del aislamiento Sud31 de la tinción de plata con 160 spots.
- Figura 14.-** Obtención de PM y PI teórico de spots del aislamiento Sud31.
- Figura 15.-** Perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud23, teñido con plata.
- Figura 16.-** Gel maestro del aislamiento Sud23 de la tinción de plata con 142 spots
- Figura 17.-** Obtención de PM y PI teórico de los puntos del aislamiento Sud23.
- Figura 18.-** Comparación entre geles maestros de Sud31 y Sud23
- Figura 19.-** Perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31, teñido con azul coomassie G250.
- Figura 20.-** Gel maestro del perfil de de secreción proteica de la cepa *Sud23* teñidos con coomassie G-250.

Figura 21.- Perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31, teñido con azul G250

Figura 22.- Gel maestro del perfil de de secreción proteica de la cepa *Sud31* teñidos con comassie G-250.

Figura 23.- Comparación entre geles maestros de Sud31 y Sud23

Figura 24.- DIGE de los aislamientos Sud31 y Sud23.

Figura 25.- Campana de Gauss en la que se observan las proteínas que se incrementas de color azul y las proteínas que decremantan de color rojo

Figura 26.- Incremento de proteína CPF10 de 11 veces en al aislado Sud31 respecto a Sud23.

Figura 27.- Selección de spots en la cepa Sud31.

Lista de Tablas

- Tabla 1.-** Incidencia, prevalencia y mortalidad por TB.
- Tabla 2.-** Métodos de tipificación molecular.
- Tabla 3.-** Ejemplo de algunas proteínas involucradas en la evasión de la respuesta Inmune por *M. tuberculosis*.
- Tabla 4.-** Marcaje de las PFC con los fluoroforos para el desarrollo de DIGE.
- Tabla 5.-** Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud31
- Tabla 6.-** Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud23
- Tabla 7.-** Comparación entre aislamientos Sud31 y Sud23 teñidos con plata
- Tabla 8.-** Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud23
- Tabla 9.-** Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud31
- Tabla 10.-** Comparación entre los aislamientos Sud31 y Sud23
- Tabla 11.-** Diferencias entre la cepa Sud31 y Sud23 de acuerdo a la tinción coomassie G-250 y con tinción de plata.
- Tabla 12.-** Condiciones de marcaje de las proteínas para DIGE
- Tabla 13.-** Análisis de spots detectados con DIGE.
- Tabla 14.-** Proteínas identificadas y características generales.
- Tabla 15.-** Porcentajes de infección de Macrófagos, empleando una MOI de 1:10
- Tabla 16.-** Porcentajes de infección de Macrófagos a las 4, 24, 48 y 72 horas, empleando una MOI de 1:10

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las tres principales enfermedades infecciosas a nivel mundial, junto con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y la malaria. La TB afecta aproximadamente a una tercera parte de la población mundial y recientemente se ha presentado un incremento en la incidencia de la infección, principalmente en regiones endémicas y en países en donde se pensaba que la TB había sido controlada.

Actualmente no están bien definidos los factores que afectan en la etiopatogenia, pero se piensa que la capacidad de invasión y adaptación de *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) a su célula huésped, son factores que definen la epidemiología actual de la infección. La existencia de genotipos muy prevalentes como el Beijing, es posiblemente una consecuencia del uso masivo de la vacuna BCG.

Para identificar algunos de los antígenos que pudieran involucrados en la persistencia de la micobacteria, en éste trabajo se analizó la expresión diferencial de proteínas entre un aislamiento muy prevalente y otro poco prevalente, encontrándose 60 proteínas expresadas diferencialmente en el aislamiento Sud31, de las cuales se identificaron 5 proteínas que correspondieron a CPF10, Ag85B, TRX, TF y una chaperona hipotética. La sobreexpresión de CPF10 en sud31 posiblemente esté involucrada en la alta virulencia de este aislamiento, además de que es dos veces más resistente a la degradación en los lisosomas que el aislamiento Sud23.

1.-INTRODUCCIÓN.

GENERALIDADES.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica que afecta principalmente a los pulmones, también puede afectar a los riñones, huesos, ganglios linfáticos y cerebro. Los principales síntomas de la enfermedad son: tos, pérdida de peso y apetito, fiebre, fatiga y dificultad para respirar.^[1]

La TB es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*, el cual pertenece al orden de los actinomicetales (bacterias con forma de hongos) y son consideradas formas de transición entre las eubacterias (bacterias verdaderas) y los hongos.^[1] El género *Mycobacterium spp.* es responsable de dos de las enfermedades más temidas en la historia de la humanidad: la tuberculosis y la lepra. La TB es reconocida clínicamente mucho de antes que Robert Koch anunciara el descubrimiento del agente etiológico a la sociedad de fisiología de Berlín, el 24 de marzo de 1882. Koch logró aislar y cultivar al germen causante de la tuberculosis, y describió la técnica de tinción que conocemos actualmente como tinción de Zeel-Neelsen y que es, en esencia, el método original de Ehrlich en el cual las bacterianas que son teñidas reciben el nombre de bacilos ácido alcohol-resistentes.^[2]

Las micobacterias son bacilos delgados, rectos o ligeramente curvos con extremos redondos, que miden de 1 a 4 μm de largo por 0.2 a 0.5 μm de ancho (Figura 1). En ocasiones se tiñen irregularmente y se observan espacios claros o gránulos fuertemente teñidos. Algunas cepas en medio líquido crecen formando verdaderos cordones, son ácidos alcohol-resistentes, inmóviles, no esporulados y no poseen cápsula. Tienen una pared celular que contiene un peptidoglicano y mesodiaminopimelico, arabinosa y galactosa.^[1-4]

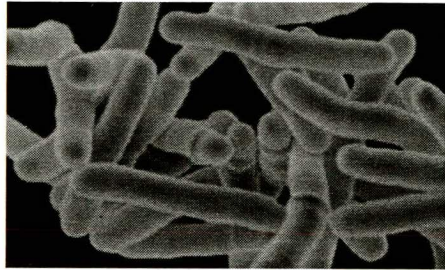
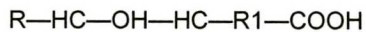


Figura1.-Micrografía electrónica del bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Un aspecto importante de las micobacterias es su alto contenido de lípidos, que llega a representar hasta el 60% del peso húmedo del bacilo, lo que le da la característica hidrofóbica a la célula. Entre los lípidos de la pared celular están la cera D y los glicolípidos (micosidos), teniendo como componente principal a los ácidos micólicos cuya fórmula general es:



R—alrededor de 60 átomos de carbono y 1 átomo de oxígeno R1-C₂₄H₄₉ para cepas que causan enfermedad en humanos y bovinos.^[2]

Existen 5 especies de micobacterias muy relacionadas, que se clasifican dentro del denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*:

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium africanum

Mycobacterium microti

Mycobacterium canetti

Mycobacterium bovis.

M. tuberculosis se transmite principalmente por vía aérea y a la fecha no se conocen reservorios animales. Otra especie causante de TB en humanos es *M. bovis* que puede penetrar la mucosa gastrointestinal o invadir el tejido linfático de la orofaringe, cuando se ingiere leche que contiene gran cantidad de estos microorganismos; aunque también se puede transmitir por vía aérea y causar una enfermedad indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*.^[1-4]

M. tuberculosis ha evolucionado para ser un patógeno intracelular en el cual se han desarrollado diversos mecanismos para evadir a la respuesta inmune y sobrevivir en las células del hospedero; entre otras algunas de las mas importantes son:

- 1) prevenir la apoptosis de los macrófagos alveolares para poder persistir dentro de su nicho
- 2) inducir la apoptosis de linfocitos T $\gamma\delta$
- 3) inhibir la fusión y maduración del fago-lisosoma
- 4) captar hierro intracelular para favorecer que el fagosoma permanezca en la vía de reciclaje endosomal
- 5) inducir una disminución de las moléculas MHC II para prevenir la presentación de antígenos y activación de células del sistema inmune.^{[2,}

5, 6]

EPIDEMIOLOGIA:

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró en 1993 a la TB como una enfermedad en estado de re-emergencia, debido a su asociación con el SIDA y el incremento en el número de casos de multifarmacoresistencia (MFR), además de que se estima que un tercio de la humanidad está infectada pero no enferma por *M. tuberculosis* (Tuberculosis latente).

La TB es una de las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo. La OMS estima que cada año ocurren más de 8 millones de nuevos casos y, aproximadamente, 3 millones de muertes por esta enfermedad. El 99% de los

casos ocurre en países en vías de desarrollo, principalmente en las regiones del sureste de Asia y la región del sub-Sahara en África, en las que se llegan a reportar hasta 700 casos por cada 100,000 habitantes. La mayor tasa de mortalidad se registra en la región sur de África, debido al sinergismo de la TB con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).^[4]

Según estimaciones de la OMS, la región de Asia Sudoriental presentó el mayor número de nuevos casos de TB, correspondiéndole el 34% de la incidencia mundial en 2005. Sin embargo, la tasa de incidencia estimada en el África subsahariana es casi el doble que en la región de Asia Sudoriental, con cerca de 350 casos por cada 100,000 habitantes.^[4]

En México, de acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAPE), se ha presentado una disminución en la incidencia de la enfermedad, aunque la tuberculosis continúa presentándose con más de 17 mil casos nuevos y cerca de 2 mil defunciones cada año, afectando principalmente a la población económicamente activa lo que representa un impacto para los países en vías de desarrollo como México, donde la edad promedio de muerte por este padecimiento es de 54 años.^[7]

Para el año 2007, la información preliminar de la Plataforma única de Tuberculosis señaló que se registró una tasa de 16.3 por cada 100 mil habitantes de TB en todas sus formas (17,143 casos nuevos), lo que refleja una disminución del 11% respecto a la tasa registrada en el año 2000, cuando se identificaron 18,434 casos con una tasa de 18.3 por cada 100 mil habitantes. Del total de casos notificados en el 2007, la forma más frecuente fue la TB pulmonar, al registrarse una tasa de 13.5 (14,422 casos nuevos), presentando una disminución del 8% respecto a los 15,649 casos del 2000.^[7]

Al cierre del 2006 y con base a los casos publicados por el boletín de Epidemiología de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, los estados con mayor incidencia de TB son Veracruz, Baja California y Guerrero (Fig. 2).



FUENTE Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/ DGE/SSA.

* Incluye tuberculosis del aparato respiratorio, tuberculosis meníngea y tuberculosis otras formas.

* Tasa por 100 000 habitantes.

Figura 2.-Incidencia de tuberculosis en México.^[7]

Mundialmente la tuberculosis es una de las principales enfermedades infecciosas por su alto impacto en la salud, lo que ocasiona pérdidas millonarias al afectar a los sujetos en la etapa más productiva de la vida. El riesgo de infección de un individuo susceptible es alto si se encuentra en contacto prolongado, en un ambiente cerrado, y con una persona con tuberculosis pulmonar cuya baciloscopia de esputo es positiva; el riesgo disminuye en los casos con baciloscopia negativa y es aún menor en los casos de tuberculosis extra pulmonar. Si tenemos en cuenta que por cada paciente bacilífero se infectan entre 10-20 personas por año, y de esas personas un 10% puede enfermar, es apremiante la toma de decisiones

de carácter preventivo para disminuir la morbi-mortalidad por esta enfermedad (tabla 1).^[4]

Región de la OMS	incidencia	prevalencia
	número (miles) (% del total mundial)	Número (miles)
África	2,529 (29)	3,773
Las Américas	352 (4)	448
Mediterráneo Oriental	565 (5)	881
Europa	445 (5)	525
Asia Sudoriental	2,993 (34)	4,809
Pacífico Occidental	1,927 (22)	3,616
Mundo	8,811 (100)	14,052

Tabla 1.-Incidencia y prevalencia por TB cada 100,000 habitantes, 2005 (Incidencia - número de nuevos casos registrados en un periodo determinado; prevalencia - número de casos en una población en un momento determinado)

Tuberculosis farmacorresistente

Actualmente, se ha documentado la existencia de cepas resistentes a algún fármaco, y lo que es más importante, ya se conocen cepas resistentes a todos los fármacos antituberculosos de primera línea. La TB farmacorresistente se desarrolla como consecuencia de un tratamiento parcial o anómalo, cuando el paciente incumple el tratamiento al mejorar su sintomatología, las pautas terapéuticas dictadas por el personal sanitario son erróneas o el suministro del fármaco no está garantizado. ^[4, 8, 9]

VIH y tuberculosis

La infección por el VIH y tuberculosis constituyen una combinación letal, ya que se potencian mutuamente. La infección por el VIH debilita el sistema inmunológico y ante una infección con *M. tuberculosis*, una persona VIH-positiva tiene muchas más probabilidades de enfermar de TB que alguien VIH-negativo (aproximadamente 50% más). La TB es una importante causa de mortalidad en la población VIH-positiva. En África, la infección por el VIH es el factor aislado que más ha contribuido al aumento de la incidencia de tuberculosis desde 1990 (Figura3).^[10]

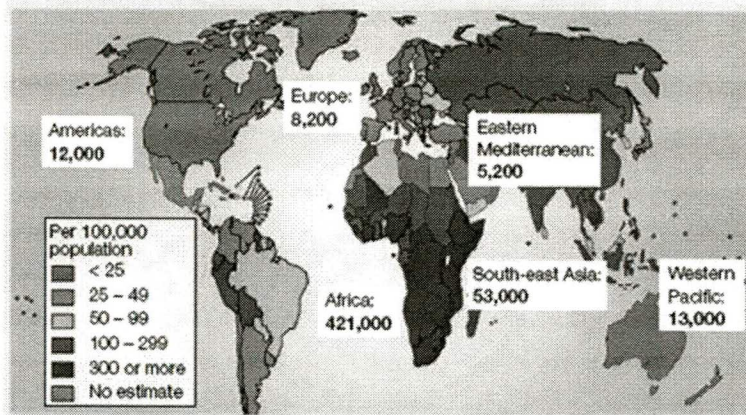


Figura 3.- incidencia mundial de TB en relación a VIH en el 2000^[10]

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

El estudio molecular y la secuenciación del genoma de la cepa H37Rv, han permitido identificar marcadores genéticos de utilidad para el análisis epidemiológico de aislados de *M. tuberculosis*. Entre éstos, la secuencia de inserción IS6110 es una de las más utilizadas, por encontrarse en un número variable (0-26) de copias entre las cepas del complejo *M. tuberculosis*.^[11, 12] Sin embargo, la ausencia de este elemento en algunos aislados clínicos, sumado a la necesidad de cultivo y las complicaciones técnicas de este procedimiento, cuestionan su utilidad como marcador para estudios genéticos moleculares.^[13, 14] La secuencia de inserción IS6110, es miembro de la familia de secuencias de inserción IS3 originalmente descritas en *E. coli* y *Shigella spp.*, el elemento IS6110 fue aislado inicialmente del cromosoma de *M. tuberculosis* (Therry et al, 1990) y dependiendo de la especie donde se encuentra se le denomina IS6110 (*M. tuberculosis*), IS986 (*M. smegmatis*) o IS987 (*M. bovis*), diferenciándose solo en unos pocos pares de bases (pb).^[5, 9, 15]

La secuencia de inserción IS6110 es un segmento de aproximadamente 1360 pb y se han encontrado cepas cuyo contenido de copias va de 0 a 5, donde los estudios moleculares, como el análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP), han sido insuficientes para distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esto ha llevado a la utilización de otros marcadores genéticos alternativos como lo son DR, PGRS y GTG (Tabla 2).

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de *M. tuberculosis*, utiliza como sonda el elemento repetitivo IS6110 y es el más empleado para la caracterización del bacilo de la tuberculosis, con él se obtienen patrones de banda de los fragmentos de ADN de tamaños específicos que constituyen la huella única que varía de una cepa a otra.^[11, 14]

MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR

PGRS	Detección de secuencias polimórfica repetitiva rica en guanina-citoquina
GTG	Genera un número de elementos informativos altamente polimórficos
MIRU-VNTR	Está basado en la amplificación por PCR de múltiples loci contenidos en el genoma de la micobacteria.
ESPOLIGOTIPO	Amplifica una región polimórfica Directa Repetida (DR) presente en un locus cromosomal particular del genoma del bacilo
RFLP-IS6110	Detección del elemento de inserción IS6110, encontrado en número variable de copias en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i>

Tabla 2.- Métodos de tipificación molecular^[16, 17]

Espoligotipificación

La técnica de *spoligotyping* (del inglés: *spacer oligonucleotide typing*), está basada en la presencia o ausencia de alguna de las 43 secuencias espaciadoras localizadas en la región “Directa Repetida” (DR) de *M. tb*, es muy útil como herramienta en investigaciones epidemiológicas y para el desarrollo de programas de prevención. Este procedimiento es ventajoso porque permite rastrear y comparar rápidamente el genotipo con los existentes en la base de datos internacional SpolDB4.^[16, 17]

En este método se aprovecha el alto grado de polimorfismo del locus DR de *M. tuberculosis*. Dicho locus contiene repeticiones directas de 36 pares de bases, separadas por secuencias no repetitivas de 34-41 pares de bases, y las cepas varían tanto en el número de repeticiones directas como en la presencia o ausencia de algunos de los espaciadores. En el método de espoligotipificación las secuencias conservadas de las regiones DR se emplean como diana para la amplificación por PCR, y se aprovecha la alta variabilidad en las regiones

espaciadoras para obtener diferentes patrones de hibridación de dicho producto amplificado contra oligonucleótidos espaciadores sintéticos que se fijan covalentemente a una membrana de nitrocelulosa. [13, 18]

La región DR de *M. bovis* BCG contiene 49 copias de regiones DR de 36 pb, que están separadas por secuencias heterogéneas de 35 a 41 pb (Figura 4). En el centro de dicha región, se integra la IS6110, encontrándose en una localización única dentro del cromosoma, la cual fue descubierta al obtener la secuencia que flanquea a IS6110.^[19]

El locus DR es considerado un punto caliente o “hot spot”, para la inserción de la IS6110, dado que siempre contiene dicha secuencia, incluso en aquellas cepas con escaso número de éstas. La amplificación del espaciador 31 por esta técnica, permite la diferenciación de las familias Harlem y Beijing de *M. tuberculosis*, ambas de gran importancia epidemiológica.

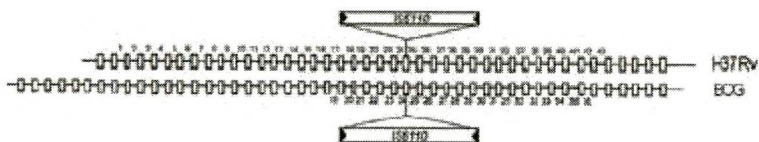


Figura 4.-Estructura del locus DR en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG P3. Los rectángulos representan las secuencias de 36 pb en la región directa repetida (DR).

Genotipo Beijing

En los inicios de 1990 se identificó una cepa resistente a múltiples fármacos en Nueva York, esta cepa se designó como "W", la cual se ha asociado con brotes de TB y con muchas muertes en varias partes del mundo.^[20, 21]

En 1995, un estudio epidemiológico permitió identificar patrones de mutación similares en una larga proporción de cepas de *M. tb* en la provincia de Beijing, China; por lo que este patrón fue designado como genotipo Beijing, el cual se ha reportado en muchas poblaciones en el mundo (Figura 5), generalmente asociado a brotes epidémicos o casos de MDR.^[20, 21]

El genotipo Beijing, incluye variantes del asilamiento W y una de sus características es el tener una secuencia de inserción IS6110 en el locus dnaA-dnaN. Todas las cepas de la familia W comparten espoligotipo con la familia Beijing.^[9, 22-24] Esta cepa está ampliamente distribuida, sobre todo en Asia, donde es predominante, pero también en Europa, Estados Unidos, Sudamérica, países del Caribe y África^[25]. Se ha comprobado por *spoligotyping* que la cepa W, detectada en la década de 1990 en EE.UU. y que causó brotes con multiresistencia, es una rama evolucionada de las cepas de genotipo Beijing, por lo que se ha establecido la existencia de la familia Beijing/W^[12].

El predominio de las cepas Beijing en muchas regiones puede indicar que tienen una ventaja selectiva sobre otras cepas. Estas cepas de *M. tuberculosis* muestran una mayor capacidad para replicarse en los macrófagos humanos y éste podría ser el mecanismo para su mayor propagación. Sin embargo, este tipo de hallazgos puede deberse no sólo a una mayor virulencia, sino también a la distinta inmunogenicidad, a distinta transmisibilidad, a un crecimiento diferente o a características de la población expuesta[26].

Aunque no de forma constante, la cepa Beijing se ha asociado en varios estudios a resistencia a fármacos. Varias cepas de la familia Beijing se han asociado con

producidos al hablar, toser o expectorar. Los bacilos, una vez inhalados, pueden alcanzar los alvéolos pulmonares, donde son fagocitados y la infección en la mayoría de los casos es eliminada o en su defecto, contenida (90%). [2, 5, 28]

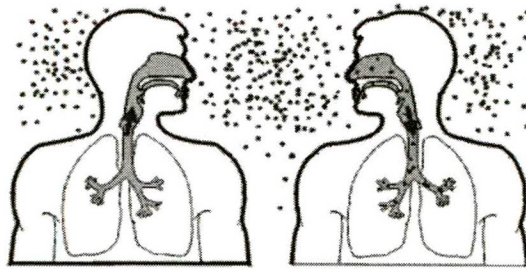


Figura 6.- Infección entre individuos con *M.tb*.

Entrada de *M. tuberculosis* al macrófago.

M. tuberculosis llega a los alvéolos donde entra en contacto con los macrófagos alveolares (MA) que constituyen la primera línea de defensa en el pulmón. Este contacto inicial es crucial y definirá el control de la infección, o bien, el desarrollo de la enfermedad.^[19]

Se ha descrito que los bacilos de la tuberculosis pueden entrar a macrófagos uniéndose a una variedad de receptores del huésped incluyendo a los receptores Fcγ (FcγR), los receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4 (con o sin opsonización), los receptores de manosa; los receptores de proteínas surfactantes, y los receptores tipo “scavenger”.^[29]

Además, los miembros de la familia de los “Toll-like receptors” (TLR) o receptores tipo “Toll”, han sido implicados en la activación de macrófagos por productos bacterianos tales como lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Se ha demostrado, *in*

vitro, que la lipoarabinomanana (LAM) induce señalización intracelular vía TLR2 y TLR4. Se sabe que algunos de los productos de secreción de *M. tuberculosis* sirven como ligandos que son capaces de activar NF- κ B a través de TLR2 y TLR4, mientras que los bacilos muertos por calor sólo lo hacen vía TLR4.^[30]

Un macrófago activado que ha fagocitado un bacilo de *M. tuberculosis* puede activar eficientemente sus mecanismos bactericidas para eliminar al bacilo dentro de los fagolisosomas. Los constituyentes tóxicos encontrados dentro de estas vesículas ácidas incluyen hidrolasas lisosomales; radicales libres del oxígeno (ROI) tales como H₂O₂ y O₂⁻, radicales libres del nitrógeno (RNI) como óxido nítrico (ON) y nitritos (NO₂⁻).^[31, 32] La producción de los RNI en macrófagos murinos es un importante mecanismo efector contra una gran variedad de patógenos. El ON es liberado enzimáticamente a partir de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). A altas concentraciones el ON es citotóxico y contribuye significativamente a la muerte intracelular y extracelular de microorganismos. Las citocinas como el TNF α y el INF γ actúan como poderosos moduladores de la síntesis de los RNI por macrófagos al activar a iNOS, pero IL-4, IL-10 y TGF β son supresores de ésta.^[31]

Si las células del sistema inmune logran destruir a los bacilos de manera eficiente y rápida, no se presenta ninguna sintomatología y la infección es controlada, en cambio, si los bacilos logran multiplicarse, la TB primaria se desarrollará de manera franca y rápida. Se habla de una TB secundaria o de latencia (TBL) cuando las bacterias tienen un crecimiento lento o inactivo que no produce sintomatología. El 15 al 20% de los casos de TB activa se presentan cuando hay una reactivación de estas bacterias debido a un estado de estrés o inmunosupresión.^[22, 33]

Respuesta inmune.

Algunos componentes de la micobacteria como LAM, la lipoproteína de 19 kDa y glicoproteínas, al unirse al TLR2 de los macrófagos inducen la producción de moléculas como IL-1, FNT- α y ON que activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune. Posterior a la fagocitosis de *M. tuberculosis* se inicia la formación del fago lisosoma que es un proceso dinámico encaminado a destruir al bacilo por los mecanismos bactericidas y proteolíticos, con la consecuente generación de péptidos que son acoplados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados por los macrófagos a linfocitos TCD8+, o bien, acoplados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4+.

Por su parte los antígenos de naturaleza glicolípida (fosfatidil manósidos, lipoarabinomananas, ácidos micólicos y hexosil-1- fosfoisoprenoides) son acoplados con moléculas CD1 y presentados a los linfocitos CD8+ y dobles negativos (CD4-CD8-).^[34] El proceso de presentación de antígenos constituye un paso importante en la transición de la respuesta inmune innata a la respuesta inmune adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimocinas.^[28, 33, 34]

Las principales características de la respuesta inmune innata incluyen el reconocimiento de diversas estructuras moleculares, ampliamente distribuidas entre patógenos, por receptores como los TLR, los cuales inducen moléculas como el FNT- α y el ON que, directa o indirectamente, contribuyen a la muerte de los microorganismos, además de inducir la activación y orientación de la respuesta adaptativa a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de lesión, por secreción de quimiocinas.^[28]

En el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa involucran diferentes tipos celulares como macrófagos alveolares (MA), células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, neumocitos tipo I y tipo II y factores solubles como

mucina, lisozima, lactoferrina, proteínas surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entren por el tracto respiratorio.^[6, 35]

Se han descrito distintos mecanismos para evitar la activación de los macrófagos, como la ausencia del estímulo, la muerte de los propios macrófagos por apoptosis o por la acción de citocinas inhibitorias. En este sentido se sabe que IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13, junto al Factor de Crecimiento Transformante 1 (TGF- β 1), funcionan inhibiendo los macrófagos y estimulando los linfocitos B y por tanto la producción de anticuerpos.^[36]

Estas citocinas son características de la respuesta Th-2 y se asocian con exacerbación y formación rápida de lesiones en varios modelos de infección crónica.^[37] Sin embargo, la presencia o ausencia de un tipo concreto de respuesta no condiciona totalmente un aumento de la resistencia, sino que depende de un equilibrio entre ellas y de la virulencia de la cepa en cuestión. El inhibidor más potente para los macrófagos es la IL-10, que inhibe la producción de TFN- α , ON y H₂O₂, además de suprimir la expresión de moléculas MCH-II. Un efecto muy similar lo produce el TGF- β 1.^[13, 29, 33, 34]

El estado de latencia.

M. tuberculosis es un patógeno polifacético, capaz de causar tanto una enfermedad progresiva como una infección asintomática latente. En este último caso, los bacilos pueden sobrevivir durante décadas, antes de reactivarse. En la especie humana se sabe que sólo el 10% de los sujetos expuestos se infectan, mientras que el 90% controla la infección. Además sólo el 40% desarrolla una infección primaria, mientras que en el 60% se mantiene una infección latente. Por tanto, si se censa el número de personas con tuberculosis activa en 8 millones de

nuevos casos al año, existen nada menos que 1,7 millones de personas que son portadoras de una infección latente. [6, 28, 38]

Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

La función normal de los macrófagos es la de destruir a los microorganismos, no obstante *M. tb* posee mecanismos específicos para evitar esta destrucción. Los fagosomas que contienen bacilos vivos, no se fusionan con los lisosomas, evitándose la formación del fagolisosoma y por consecuencia la activación de las hidrolasas ácidas contenidas en el lisosoma. Los mecanismos moleculares por los cuales se inhibe la fusión del fagosoma con las vesículas lisosomales aun no están bien elucidados. Varios estudios han demostrado que los fagosomas que contienen al bacilo vivo retienen marcadores endosomales tempranos como la GTPasa Rab5, pero no adquieren o pierden otros marcadores que son específicos en estadios tardíos de la vía endocítica como Rab7 [5, 39]. Estudios con *M. avium* y *M. tuberculosis*, demuestran que las vacuolas que contienen al bacilo adquieren las proteínas de la membrana lisosomal LAMP1 y LAMP2, y catepsina D, pero carecen de la ATPasa vacuolar, que es responsable de la acidificación del fagosoma. Estos datos sugieren que puede haber una inhibición directa de la ATPasa o una rápida remoción de esta en los fagosomas que contienen a la micobacteria [32]

Ferrari y colaboradores describieron que la “tryptophan aspartate-containing coat protein” (TACO), que normalmente es disociada en el curso de la maduración del fagosoma para la subsecuente fusión lisosomal, es retenida por los fagosomas que contienen al bacilo tuberculoso vivo, pero no en aquellos que contienen bacilos muertos por calor. Estos datos sugieren que *M. tb* retiene a la proteína TACO en el fagosoma como un medio para prevenir la fusión fagosoma-lisosoma y evitar su destrucción (Figura 7). [40]

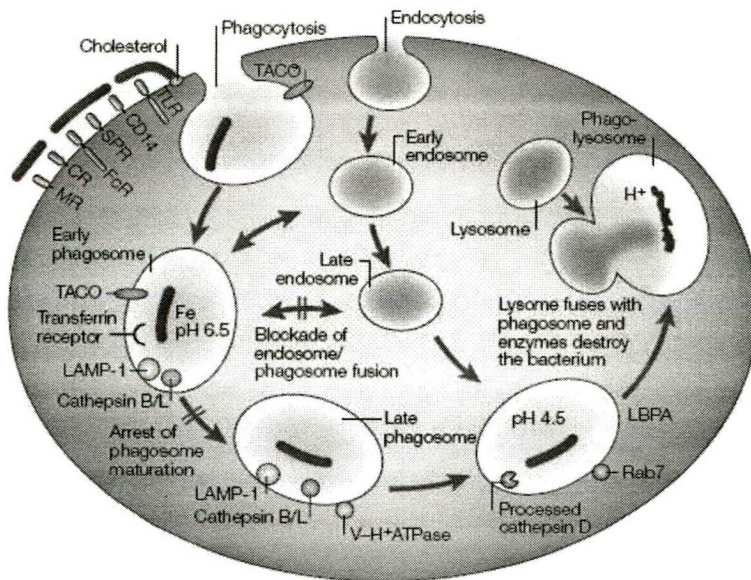


Figura 7.- Mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune.^[3]

Otro mecanismo utilizado por el bacilo tuberculoso es a través de la generación de un nicho intracelular favorable, en parte secretando SapM (una fosfatasa ácida que desfosforila PI3P), el análogo glicosilado de fosfatidil inositol y LAM (que inhibe la producción de Vps34). La acción combinada de esos dos efectores disminuye el contenido vacuolar de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) modulando la adquisición de PI3P en la vacuola, contribuyendo al arresto de la maduración fagosomal en una etapa temprana que favorece la sobrevivencia intracelular de la micobacteria ^[41]. Adicionalmente, *M. tb* evita la fusión del fagosoma, excluyendo las H⁺-ATPasas vacuolares evitando así la acidificación intrafagosomal ^[42-44]. La capacidad de *M. tb* de interferir con las moléculas involucradas en la maquinaria de tráfico y fusión de vacuolas es muy relevante en la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma ^[45]. Algunas de ellas son las proteínas SNARE (del inglés soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor) que son específicas del compartimento

y constituyen un componente mediador de la fusión de las membranas entre el transportador y las vesículas blanco al fagosoma (Tabla 3).^[46]

Entre los mecanismos utilizados por *M. tb*, para reducir la acción antimicrobiana de los macrófagos está la inhibición en la producción de IFN- γ y la disminución en la expresión del receptor 1 para IFN- γ . En pacientes con TB pulmonar se ha observado que, después del tratamiento con fármacos antituberculosos, la expresión del INF γ -R1 recupera sus niveles normales.^[5, 28, 33]

Proteína	Acción	Efecto
SapM	Fosfatasa ácida que desfosforila PI3P	arresto de la maduración fagosomal
Lipoarabinomanana	Inhibe la producción de Vps34	arresto de la maduración fagosomal
SNARE	linvolucradas en la maquinaria de trafico y fusión de vacuolas	inhibición de la fusión fago-lisosoma
Proteína cinasa G	Inhibición en el ensamblaje de actina	evitar la fusión fagosoma-lisosoma

Tabla 3.- Proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune por *M. tuberculosis*.^[1, 5, 11]

Proteínas involucradas en la virulencia de MTB.

A partir de los años 70s comenzó el interés por investigar las proteínas que *M. tuberculosis* como *M. bovis* BCG secretan a el medio de cultivo; debido a que sólo los bacilos vivos son capaces de evadir la respuesta inmune. Esto sugiere que las

proteínas secretadas por el microorganismo están implicadas en estos mecanismos, además de que la respuesta inmune que se monta contra estas proteínas es mayor a la observada contra extractos proteínicos de bacterias muertas por calor. [47, 48]

Dworsky propuso en 1973 que *M. bovis* BCG necesitaba encontrarse en fase de multiplicación para que la vacuna indujera inmunidad protectora, ya que previamente se había demostrado que la administración de fármacos, suprimía completamente la inmunidad subsecuente [49, 50]. Varios grupos de investigación apoyaron la idea de que la resistencia específica a la infección por *M. tb* (mediada por células T) sólo se generaba eficazmente contra el microorganismo vivo, por lo que se propuso que los antígenos responsables de dicha resistencia eran producidos por micobacterias vivas, pero no por bacilos muertos. [50] A finales de la década de 1980, Orme evaluó la capacidad de generar inmunidad celular de diferentes preparados micobacterianos en ratones; sus resultados proporcionaron la primera evidencia de que sólo las micobacterias viables -metabólicamente activas- podían inducir una respuesta protectora contra cepas virulentas de TB [50]

La vacuna BCG es una cepa viva atenuada de *M. bovis*, capaz de producir antígenos importantes para la inducción de una respuesta inmune protectora; tales antígenos deben ser secretados en la cercanía del tejido infectado cuando las micobacterias están en fase de replicación activa. Sin embargo estos antígenos podrían ser menos eficaces cuando provienen de micobacterias muertas o metabólicamente inactivas, debido a que aunque poseen los mismos antígenos, inducen, predominantemente, una respuesta humoral por la excesiva liberación de polisacáridos de la pared celular a medida que las micobacterias son digeridas por los macrófagos. [50]

Diferentes estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, demuestran que las proteínas de secreción, también conocidas como proteínas filtradas de cultivo (PFC), son reconocidas por las células T responsables de la sensibilidad a la tuberculina. A la

par, se confirmó que los antígenos “protectores” son secretados por las micobacterias cuando se cultivan en medios sintéticos. A principios de los 90’s. Andersen y cols. apoyaron esta teoría tras observar que existe una fuerte correlación entre la replicación bacteriana en el hospedero y la respuesta de células T vs las PFC. [18, 36] Por otro lado, se ha planteado que las PFC pueden participar en el desarrollo de inmunidad protectora mediante la activación de macrófagos, células dendríticas y células cebadas, induciendo la secreción de mediadores proinflamatorios, FNT- α e histamina, y al inducir la diferenciación y maduración de células dendríticas que inducen el desarrollo de células T CD4+ secretoras de IFN- γ (específicas para PFC) . [18, 36]

Estudios de expresión diferencial entre cepas de *M. tuberculosis*.

La familia de la cepa Beijing es a menudo asociada con TB y a brotes mundiales a resistencia a fármacos. [10] observaron que la expresión proteica de una cepa tipo Beijing era diferente a la de otro aislamiento clínico y a la de *M. tb* H37Rv. Además se vio que la cepa Beijing mostró notablemente mayor expresión de alfa-cristalina y menor expresión de Hsp65, PstS1 y la proteína de 47 kDa, comparada con el otro aislamiento clínico y la cepa tipo H37Rv. [23, 49]

Un estudio realizado por Bermúdez y cols. [20-22] para entender la serie de eventos que permiten a la micobacteria sobrevivir en el macrófago, monitoreó la expresión de cerca de 3500 genes a las 4, 12 y 24 horas post-infección usando un microarreglo comercial, y observó múltiples diferencias en los patrones de expresión de citocinas, linfocinas, quimiocinas, proteínas de adhesión, vías de apoptosis y en señales de traducción, entre otros. [15, 46]

Aislamientos Sud31 y Sud23

En este estudio se evaluó la expresión diferencial de proteínas entre dos aislamientos clínicos pertenecientes a la familia Beijing, que fueron seleccionados

de acuerdo a su prevalencia en Ciudad del Cabo, Sudáfrica. Las cepas fueron seleccionadas de un estudio epidemiológico conducido por el Dr. Robin Warren, y por su virulencia en el modelo murino de TB pulmonar progresiva del Dr. Rogelio Hernández Pando. Los aislamientos se caracterizaron por ser representativos del genotipo Beijing, siendo el aislamiento Sud31 muy prevalente al reportarse en 12.3 de cada 100,000 casos de TB al año y ser parte de un clúster que agrupa 148 cepas; en comparación al aislamiento Sud23 que es poco prevalente y en el modelo murino antes mencionado presenta un comportamiento opuesto al del aislamiento Sud31. Interesantemente el primer aislado induce el 100% de mortalidad a las 5 semanas post-infección y la respuesta inmune se caracteriza por presentar una alta producción de IL-10 y FNT- α , el aislamiento Sud23 se muestra poco virulento, incluso con respecto a la cepa tipo *M. tb* H37Rv (Figura 8, 9 y 10).^[51]

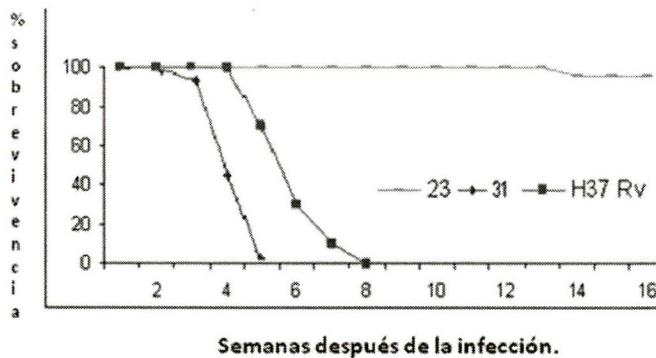


Figura 8.- Comparación del porcentaje de supervivencia entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.

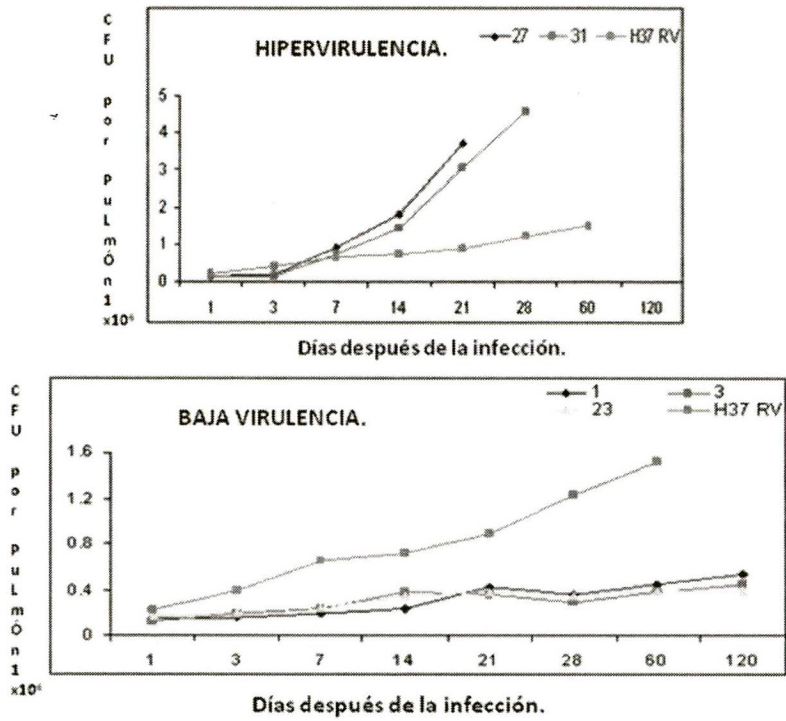


Figura 9.- Comparación de la virulencia entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.^[51]

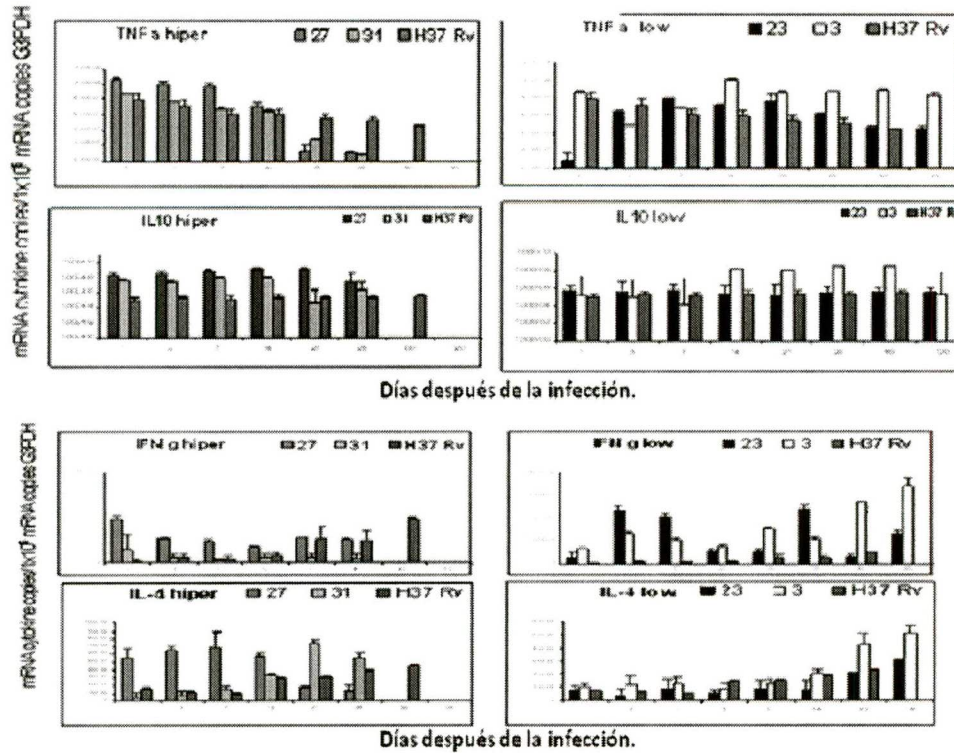


Figura 10.- Comparación en la producción de citocinas TNF, IL-10, INF-γ y de IL-4 entre los aislamientos Sud31 vs Sud23.^[51]

2.-JUSTIFICACIÓN:

La TB es una enfermedad infecciosa que afecta aproximadamente a una tercera parte de la población mundial. Recientemente, se ha visto un incremento en la incidencia de la infección en regiones en donde se pensaba había sido controlada, pero durante la década pasada aparecieron 90 millones de nuevos casos, con una mortalidad del 30%.

El bacilo tuberculoso puede regular la expresión de genes que son utilizados para su supervivencia y crecimiento. Sin embargo, se desconoce las proteínas que son expresadas por las cepas más prevalentes, las cuales pueden participar en la evasión de la respuesta inmune y favorecer su persistencia de la respuesta inmune generada por vacunación con BCG.

3.-HIPOTESIS:

La evasión de la respuesta inmunológica y de la prevalencia de los aislamientos de Sud31 y Sud23 pueden estar relacionados con la expresión diferencial de proteínas de secreción proteica de estos aislados por lo que se identificaran proteínas de secreción expresadas diferencialmente entre el aislamiento de alta prevalencia Sud31 y el de baja prevalencia Sud23.

4.-OBJETIVO

Identificar proteínas de secreción expresadas diferencialmente en el aislamiento Sud31 de *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con el aislamiento Sud23.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Analizar la expresión diferencial entre los perfiles de secreción proteica de los aislamientos Sud31 y Sud23.
2. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en los aislamientos clínicos Sud31.
3. Determinar la capacidad de supervivencia de las cepas Sud31 y Sud23 en macrófagos.

5.-METODOLOGIA.

Aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se utilizaron los aislamientos clínicos Sud31 y Sud23 de *M. tuberculosis*, ambos provenientes de ciudad del Cabo en el Sur de África. Las cepas son pertenecientes al genotipo Beijing, el cual fue determinado por espiligotipificación.

Cultivo bacteriano y cosecha

Las cepas se cultivaron en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementado con 10% de OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa) durante 21 días a 37°C en atmósfera con 85% de HR y 5% de CO₂. Posteriormente se tomó una colonia y se resembró en caldo de cultivo Sauton. Los cultivos se incubaron a 37°C en condiciones estáticas durante 21 días, luego de lo cual se cosecharon por centrifugación a 12,000 rpm durante 15min a 4°C, se les adicionó fluoruro de metilfenilsulfonio (PMSF) 1mM como inhibidor de proteasa y se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0.45µm y 0.22µm (Amicon, Millipore, USA). Posteriormente, se congelaron a -70°C hasta su uso, y el paquete bacteriano se inactivó con radiación gamma en el ININ.

Obtención de proteínas de filtrado de cultivo (PFC)

El sobrenadante de cultivo se descongeló gradualmente a 4°C, se le añadió PMSF 1mM y NaN₃ al 0.05%. A continuación se concentró (50X) por ultrafiltración, utilizando celdas con agitación constante AMICON y unidades de filtración por centrifugación Centricon (Amicon, Millipore, USA). Para la concentración de las proteínas se utilizaron membranas de celulosa regenerada (PLBC, Millipore, USA) de punto de corte de 3 y 5 kDa. La cuantificación de las proteínas se realizó por la técnica de Bradford. Una vez concentradas, las PFC se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de las proteínas obtenidas.

La cuantificación de las proteínas se realizó por la técnica de Micro-Bradford. Se preparó una curva patrón por duplicado con un estándar de BSA 1mg/mL de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 μg de proteína. Se agregó H_2O cbp 50 μL y 200 μL de reactivo de Bradford. Se incubó 5min en oscuridad y se tomó lectura a $A_{\lambda 595\text{nm}}$ y $A_{\lambda 450\text{nm}}$. El complejo colorante-proteína es estable hasta por 60min. Se realizaron las lecturas a los 15 minutos. Se cargaron 1,3 y 5 μl de muestra para después determinar la cantidad de proteína contenida en la muestra por interpolación a partir de una gráfica. La concentración de la proteína se calculó tomando en cuenta el factor de dilución y la lectura de las muestras.

Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE)

A partir de los concentrados obtenidos de PFC, se realizaron geles en una dimensión para confirmar la integridad de las proteínas antes de realizar la electroforesis en dos dimensiones. Se preparó una mezcla de las PFC con solución amortiguadora de carga 2X y se realizó una SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12.5%. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie.

Preparación de secretomas (proteomas de PFC)

Se utilizaron 100 μg de proteína en solución amortiguadora de rehidratación que contiene Urea 7M, CHAPS 4% w/v y DTT 70 mM; las proteínas se focalizaron en tiras de gradiente de pH inmóvil (IPG) de 4 a 7 de 11cm de longitud (ReadyStripTM IPG Strips, Bio-Rad, USA), el isoelectroenfoco (Bio-Rad Protean IEF Cell) se realizó en 5 pasos a 15°C. Los pasos fueron los siguientes:

Paso 1: 500V durante 30 minutos.

Paso 2: 1000V durante 30 minutos.

Paso 3: 1500V durante 30 minutos.

Paso 4: 2000V durante 30 minutos.

Paso 5: 2500V hasta completar 5000 V/hora.

Al término del isoelectroenfoque, las tiras IPG fueron equilibradas en el amortiguador de equilibrio en dos pasos, el primero con DTT (15 mg/mL) y posteriormente con iodoacetamida (37.5mg/mL). Para la electroforesis de la segunda dimensión, las tiras IPG equilibradas se colocaron sobre geles de poliacrilamida, se selló con solución de agarosa y se corrieron a 50 V durante 23 h en una cámara de electroforesis (Bio-Rad). Las proteínas fueron visualizadas por tinción de plata.

Análisis de los geles 2-D

La imagen de los secretomas fue capturada en formato digital TIFF y posteriormente se realizó el análisis comparativo de los geles utilizando el software PDQuest (Bio-Rad, USA). Para la detección de puntos se realizaron los ajustes correspondientes de manera que todos los puntos visibles fueran detectados por el programa. Los dos secretomas obtenidos para cada cepa se combinaron para crear un gel maestro, de manera que el análisis comparativo se realizó con los geles maestros de cada cepa.

DIGE.

Para hacer un análisis diferencial más preciso, se realizó un DIGE (Electroforesis en Gel Diferencial), utilizando una concentración de CyDye de 400 pmol/U, para marcar las proteínas de interés. De cada una de las muestras se utilizó 50 ug de proteína, el aislamiento Sud31 se marcó con Cy5 y el aislamiento Sud23 con Cy3, mientras que el control interno se marcó con Cy2 (Tabla 4)

Proteínas	ug/ml	CyDye	[CyDye pmol/ul]
Sud31	50	Cy5	400
Sud23	50	Cy3	400
Ctrl(31 y 23)	25 + 25	Cy2	400

Tabla 4.- Marcaje de las PFC con los fluoroforos para el desarrollo de DIGE.

El marcaje de las proteínas con los fluoróforos se realizó durante 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad y la reacción se detuvo adicionando lisina 1 µl (10mM) e incubando a TA durante 5 minutos. Una vez marcadas las proteínas se realizó el procedimiento descrito previamente pero en condiciones de oscuridad. La imagen del gel se obtuvo en el equipo Ettan DIGE Imager (GE Healthcare). El análisis del gel se realizó utilizando el programa DeCyder v6.5

Espectrometría de masas.

Se prepararon las muestras en un ambiente libre de queratinas y polvo. La tinción con azul de Coomassie es en todo caso susceptible de análisis por MALDI, proporcionándonos la seguridad de que la alta cantidad de proteína presente en el gel es suficiente para la identificación de la proteína.

Digestión automática de bandas.

Una vez que se seleccionamos las bandas o 'puntos' de interés se recortaron del gel en el menor volumen posible, ajustando al máximo la extensión de la proteína. Esta se introdujo en un tubo limpio y se cubrió con agua milli-Q. La digestión en gel de la banda se llevó a cabo de forma automática con la estación de digestión.

Las proteínas se lavaron con bicarbonato amónico 25 mM y agua, antes de su reducción con DDT 10 mM y alquilación con iodoacetamida 100 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Las porciones de gel se aclararon con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo y secadas bajo un chorro de nitrógeno. A la muestra se le añadió tripsina porcina modificada (sequencing grade; Promega, Madison WI), a una concentración final de 16 ng/µl en bicarbonato amónico 25 mM, y la digestión se realizó durante 6 horas a 37 °C. Finalmente, los péptidos resultantes de la digestión proteica se eluyeron del gel con ácido trifluoroacético 0.1% y bicarbonato amónico 25 mM.

Obtención de huella peptídica.

Una alícuota de la solución de matriz (2,5-ácido dihidroxibenzoico) se depositó manualmente sobre un portamuestras AnchorChip™ MALDI de 400 µm y se dejó secar a temperatura ambiente. Entonces se añadió un volumen igual de la mezcla de péptidos eluidos de cada alícuota y se dejó secar de nuevo a temperatura ambiente.

La adquisición de la huella peptídica se realizó en un espectrómetro de masas (Q TRAP® LC/MS/MS System). La huella peptídica se analizó el programa informáticos MASCOT el cual es un software específico que se concretan varios parámetros a la hora de la identificación de cada proteína.

Ensayos de infección.

Para determinar si hay diferencia en la capacidad de las cepas de ser fagocitadas por los macrófagos, se realizaron ensayos de fagocitosis utilizando la línea celular de macrófagos U937. Los cultivos se hicieron en medio RPMI 1640, enriquecido con glutamina (concentración final: 2 mM) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, BIOSER Argentina, inactivado a 56°C durante 30 minutos), a 37°C en estufa con atmósfera controlada de CO₂ 5% y humedad en saturación. Las células se crecieron hasta obtener un cultivo confluyente, el cual se cosechó y colocó en placas de cultivo de 8 pozos a una densidad de 500,000 células por pozo. La viabilidad del cultivo se determinó por tinción con azul de tripano. Una vez ajustada la densidad celular, los cultivos se diferenciaron a macrófagos mediante la adición de PMA (12-miristato, 13-acetato de forbol). La diferenciación se evaluó morfológicamente por observación en microscopio invertido. Los monocitos se infectaron con cada una de las cepas usando una MOI de 1:10. Posteriormente se analizó el porcentaje de infección a tiempos: basal, 24h, 72h y 5 días; en cada uno de los

tiempos se hizo la cuantificación de las unidades formadoras de colonia (UFC) de MTB.

RESULTADOS:

Cultivo bacteriano y cosecha

El aislamiento de alta prevalencia *Sud31* y el de baja prevalencia el *Sud23* se cultivó en medio sintético para obtener el patrón de proteínas de secreción. De cada cultivo se concentraron las PFC a 50X, obteniendo un rendimiento de 1.5 mg/mL para el lote 1, 1.3 mg/mL para el lote 2 y 1.0 mg/mL para el lote 3. En todos los casos se observó que no hubo degradación de las muestras durante su manipulación y la integridad de las proteínas era la adecuada para su análisis en dos dimensiones (Figura 11).

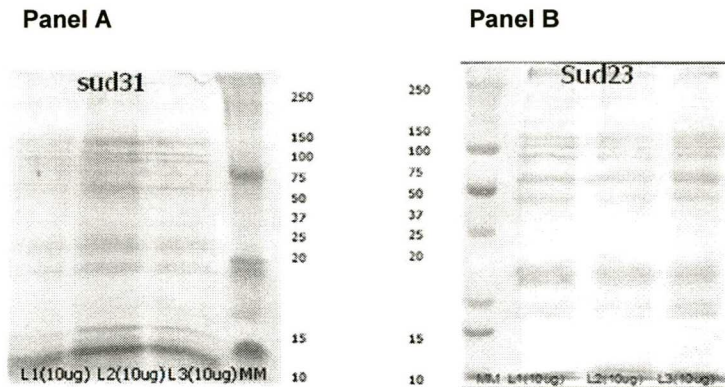


Figura 11.- Separación de las PFC en gel de poliacrilamida a el 12.5 % del aislamiento *Sud31*; se cargaron 10 ug de cada lote de la cepa y se empleo como marcador molecular (MM) el Dual Color, en el panel A está la *Sud31* y en el panel B está la *Sud23*.

Perfiles de secreción proteica de la cepa Sud31.

Una vez que se tuvieron cuantificadas las proteínas y que se comprobó la integridad de las mismas, se procedió a realizar las electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante en dos dimensiones. Para este propósito se utilizaron 100 µg de PFC de cada una de las cepas para realizar los geles analíticos y crear las plantillas a comparar. En los geles obtenidos se detectó un promedio de 130 +/- 8.5 'puntos' (Figura 12).

Posteriormente, se procedió a crear la plantilla maestra del secretoma del asilamiento, utilizando el programa PD-Quest. Después de analizar individualmente cada gel y hacer la detección de puntos fijando como parámetros la intensidad de pixeles del 'punto' más tenue, el más intenso y el más grande, se obtuvieron 124 'punto' para el lote 1, 127 para el lote 2 y 140 para el lote 3. Al superponer las imágenes de las tres repeticiones para obtener los puntos de coincidencia (Tabla 5) y poder crear la plantilla maestra de esta cepa se obtuvo un total de 160 'puntos' (Figura 13)

CEPA 31	'puntos'	MATCHED	UNMATCHED	SIMILITUD
Lote1	124	103	21	74%
Lote2	127	116	11	83%
Lote 3	140	140	0	100%

Tabla 5.- Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud31

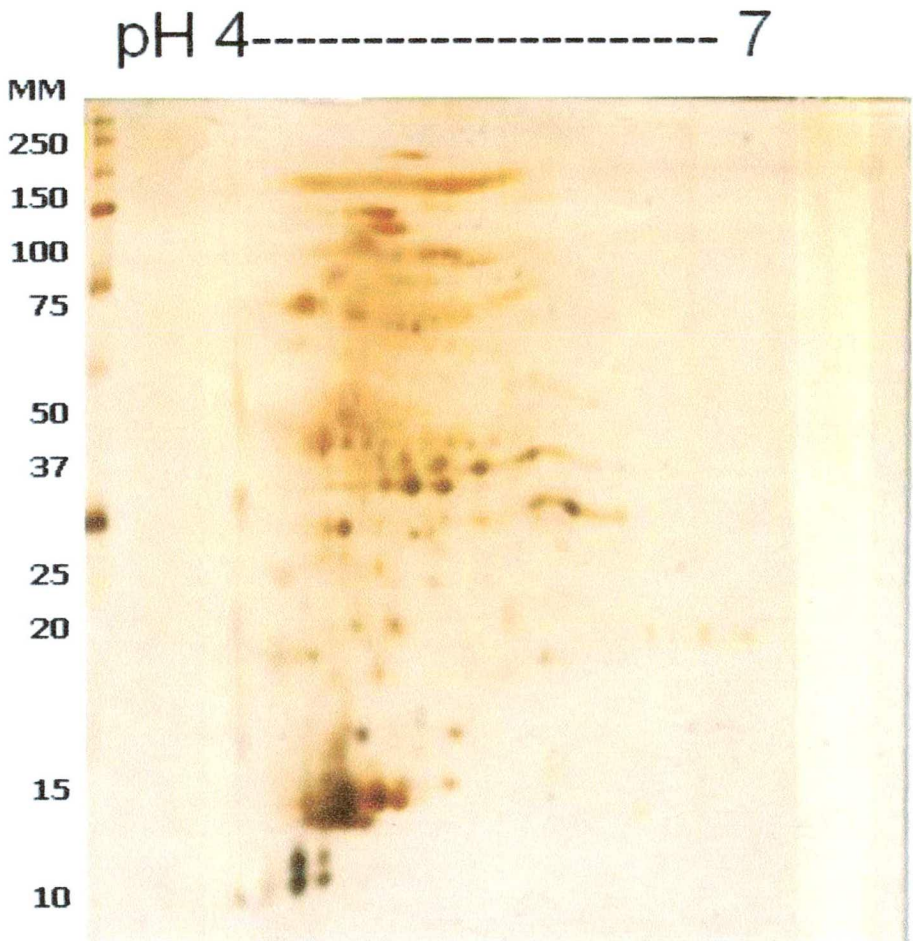


Figura 12.- Gel de poliacrilamida del perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31, teñido con plata.

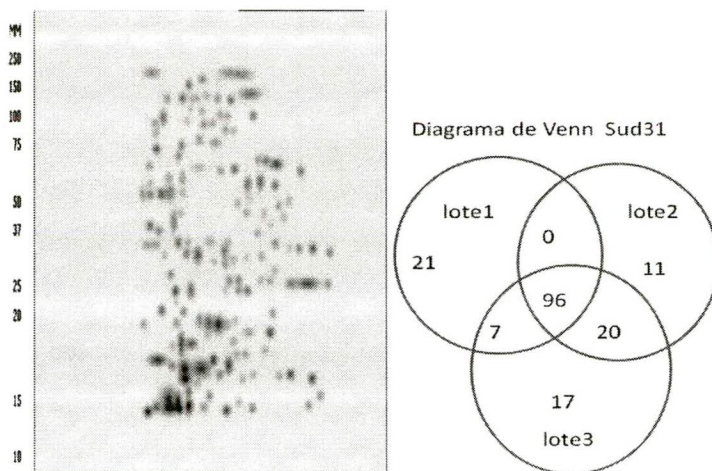


Figura 13.- Gel maestro de la tinción con plata del aislamiento Sud31 con 160 'puntos'.

A partir de la plantilla maestra del secretoma del aislamiento Sud31 se comparó este patrón con los secretomas de *M. tuberculosis* ya publicados en las bases de datos, con la finalidad de seleccionar los 'puntos' de referencia para asignar un punto isoeléctrico y peso molecular a los 'puntos' restantes. Como referencia se seleccionaron las proteínas Ag85A (pI de 6.8, PM de 32 kDa) y alfa cristalina (pI de 4.9, PM de 10.4 kDa). Con los datos obtenidos se determinó la distribución que presentaban las proteínas en el secretoma del aislado Sud31 (Figura 14).

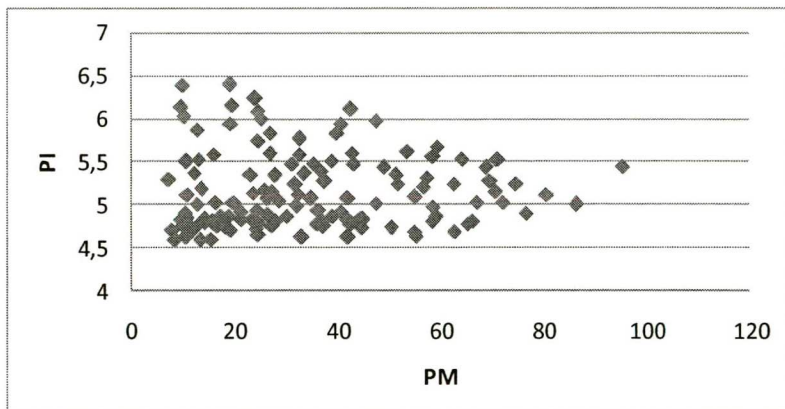


Figura 14.- Obtención de PM y PI teórico de ‘puntos’ del aislamiento Sud31 más abundantes, las proteínas de bajo punto isoeléctrico y las proteínas de bajo peso molecular como se muestra en la gráfica.

Sud23

Se realizó la electroforesis en 2D para el aislamiento Sud23, analizando el perfil de secreción proteica por triplicado, donde se visualizaron 85 +/- 20 ‘puntos’ (Figura 15) en el perfil de secreción proteica; para posteriormente crear la plantilla maestra del secretoma del aislamiento, utilizando el programa PD-Quest. Después de analizar individualmente cada gel, se obtuvieron 89 ‘puntos’ para el lote 1, 118 para el lote 2 y 78 para el lote tres. Al superponer las imágenes de las tres repeticiones para obtener los puntos de coincidencia (Tabla 6) y poder crear la plantilla maestra de esta cepa se obtuvieron un total de 142 ‘puntos’ (Figura 16). Una vez hecha la comparación entre los lotes, el programa generó un gel maestro del aislamiento Sud31 en donde obtuvimos un total de 142 ‘puntos’.

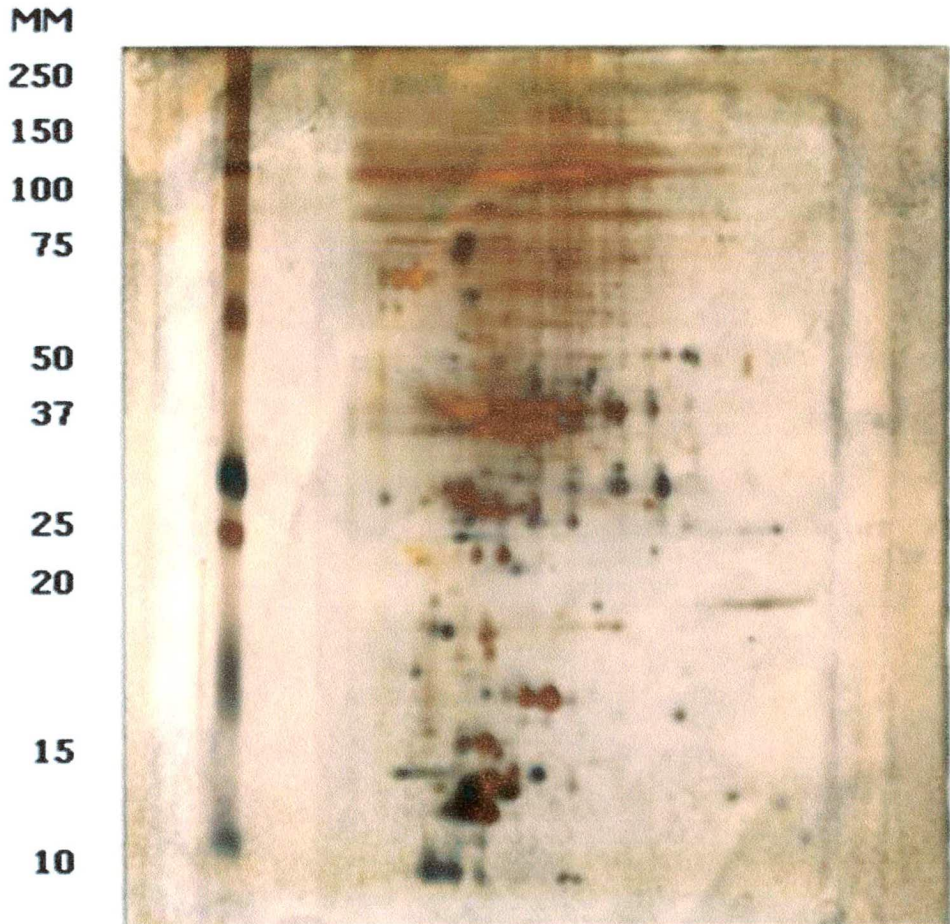


Figura 15.- Gel de poliacrilamida teñido con plata que muestra el perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud23.

CEPA 23	'puntos'	MATCHED	SIMILITUD
Lote1	89	71	60%
Lote 2	118	118	100%
Lote 3	78	70	59%

Tabla 6.- Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud23

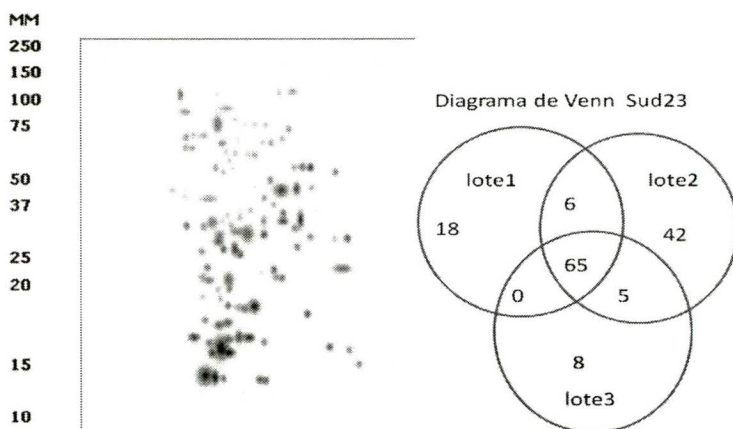


Figura 16.- Gel maestro del aislamiento Sud23 de la tinción de plata con 142 'puntos'

El perfil de secreción proteica de la cepa Sud23, al igual que en la cepa Sud31, se comparó con los ya reportados, con la finalidad de seleccionar los 'puntos' de referencia para calcular los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares teóricos de cada punto visualizado con el programa. Las proteínas seleccionadas fueron Ag85A (pI 6.8, PM 32 kDa) y la proteína alfa cristalina (pI 4.9, PM 10.4 kDa).

Se obtuvo un gel con las coordenadas de cada punto y observamos que las proteínas más abundantes eran las de bajo punto isoeléctrico y las proteínas de bajo peso molecular, además de que se veían más acentuadas estas proteínas en la imagen del secretoma (figura 17).

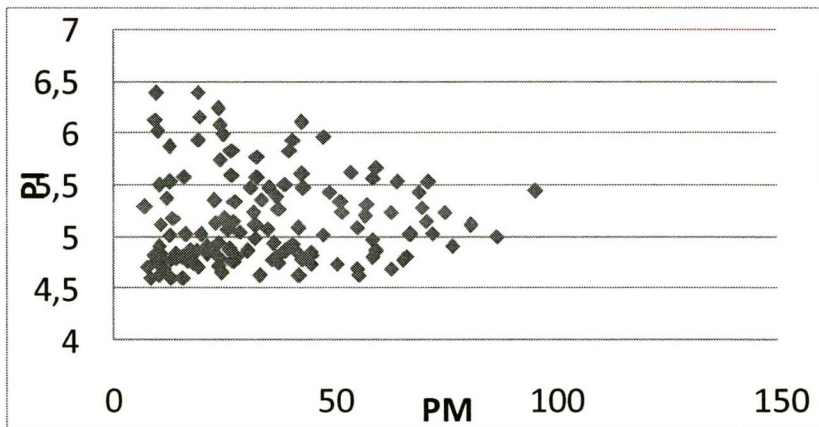


Figura 17.- Obtención de PM y PI teórico de los puntos del aislamiento Sud23 que eran más abundantes más las proteínas de bajo punto isoeléctrico y las proteínas de bajo peso molecular.

Análisis diferencial de los aislamientos Sud31 y Sud23

Las plantillas maestras para cada uno de los aislamientos se sobrepusieron para determinar las diferencias y similitudes mediante el programa PD-Quest, obteniendo un 77% de similitud entre los secretomas de ambos (Figura 18).

En total se encontraron 92 puntos de interés que coincidieron, 60 puntos que sólo se observaron en el aislamiento Sud31 y 26 puntos se observaron solo en el aislamiento Sud23. (Tabla 7).

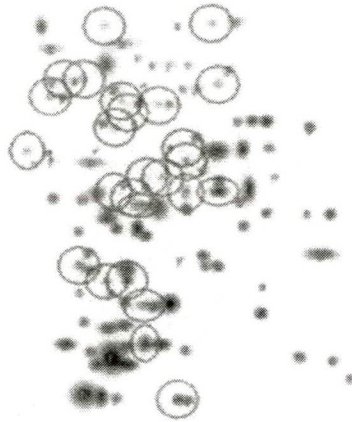


Figura 18.- Comparación entre geles maestros de Sud31 y Sud23

Aislamientos	puntos	Coincidencia	% similitud
23	118	118	100%
31	152	92	77%



Tabla 7.- Comparación entre aislamientos Sud31 y Sud23 de la tinción con plata

Sud23 teñidos con azul brillante de Coomassie G-250

Se realizó la electroforesis en 2D para el aislamiento Sud23 y se analizó el perfil de secreción proteica por triplicado, donde se obtuvieron 46 +/- 7 puntos (Figura 19); posteriormente se creó la plantilla maestra del secretoma del

asilamiento, utilizando el programa PD-Quest. Después de analizar individualmente cada gel y hacer la detección de puntos fijando como parámetros la intensidad de pixeles del punto más tenue, el más intenso y el más grande, se obtuvieron 43 puntos para el lote 1, 51 para el lote 2 y 44 para el lote tres (tabla 8). Al superponer las imágenes de las tres repeticiones para obtener los puntos de coincidencia y poder crear la plantilla maestra de esta cepa se obtuvo un total de 51 puntos de interés (Figura 20).

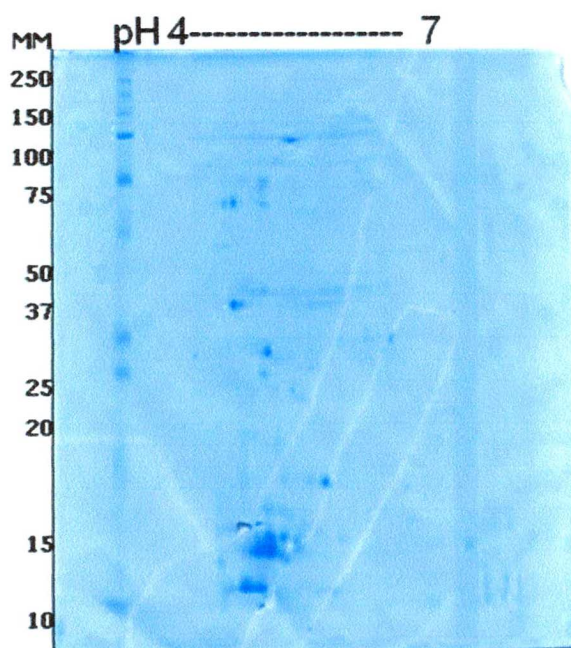


Figura 19.- Gel teñido azul Coomassie G250 del perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31.

CEPA 23	'puntos'	Matched	SIMILITUD
Lote 1	43	34	79%
Lote 2	51	51	100%
Lote 3	44	36	81%

Tabla 8.- Comparación entre los tres lotes del aislamiento Sud23

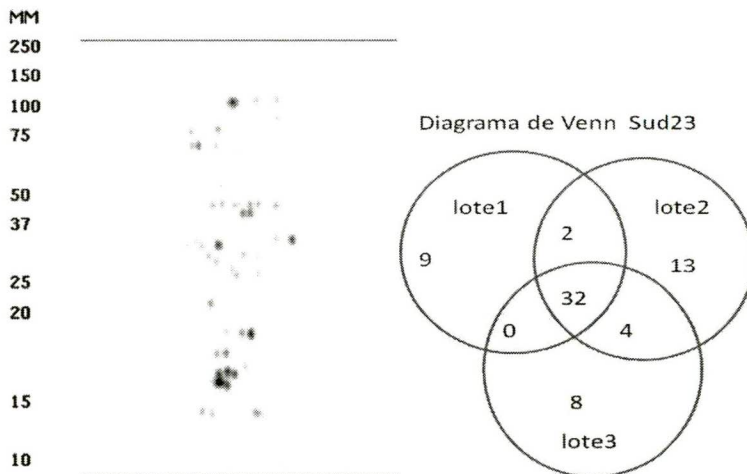


Figura 20.- Gel maestro del perfil de de secreción proteica de la cepa *Sud23* con Coomassie G-250.

Perfiles de secreción proteica de la cepa *Sud31* teñidos con Coomassie G-250.

Se realizó la electroforesis en 2D para el aislamiento Sud23 obtuvimos el perfil de secreción proteica por triplicado, donde se visualizaron 77 +/- 5 puntos (Figura 21) en el perfil de secreción proteica; para posteriormente crear la plantilla maestra del secretoma del aislamiento, utilizando el programa PD-Quest.

Después de analizar individualmente cada gel y hacer la detección de puntos fijando como parámetros la intensidad de pixeles del 'punto' más tenue, el más intenso y el más grande, se obtuvieron 76 'puntos' para el lote 1, 81 para el lote 2 y 75 para el lote tres (Tabla 9). Después de la superposición de las imágenes se pudo crear la plantilla maestra de esta cepa en donde se obtuvo un total de 94 'puntos' (figura 22)

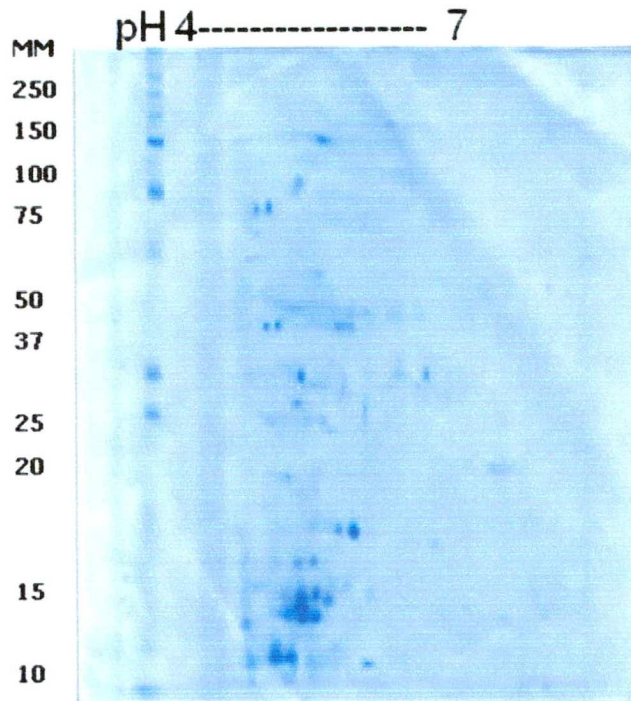


Figura 21.- Gel de poliacrilamida de el perfil de secreción proteica para el aislamiento Sud31, con azul G250

CEPA 31	'puntos'	Matched	SIMILITUD
Lote 1	76	71	88%
Lote 2	81	81	100%
Lote 3	75	67	83%

Tabla 9.- Comparación entre tres lotes del aislamiento Sud31

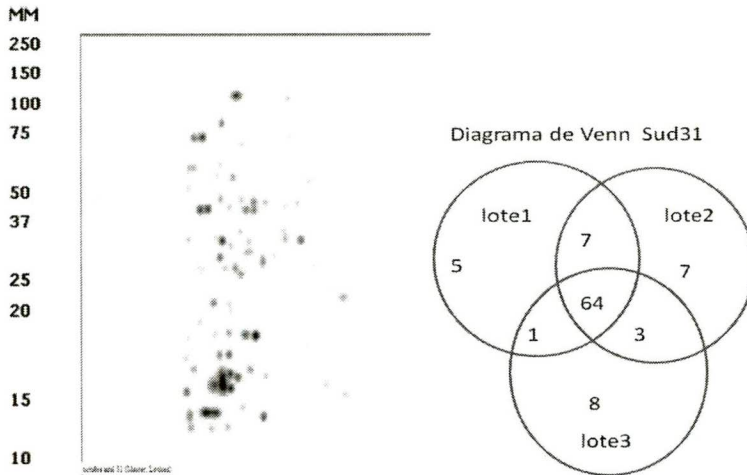


Figura 22.- Gel maestro del perfil de de secreción proteica de la cepa *Sud31* con Coomassie G-250.

Comparación de los geles de los aislamientos Sud31 vs Sud23 teñidos con azul de Coomassie G250.

Una vez obtenidos los perfiles de secreción proteica de los dos aislamientos y los geles maestros de cada aislamiento, se analizaron entonces las diferencias y similitudes entre los dos aislamientos mediante el programa PD-Quest, para obtener un gel maestro. (Figura 23) (Tabla 10)

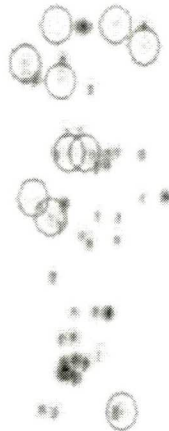


Figura 23.- Comparación entre geles maestros de Sud31 y Sud23

De los dos aislamientos en donde se visualizaron diferencias y similitudes entre los geles, para el aislamiento Sud 31 se encontraron 41 puntos exclusivos en él mientras que en Sud23 se encontraron 11 puntos sólo en él y además se observó que compartían 40 puntos entre ellos. (Tabla 10)

CEPA	'PUNTOS'	MATCHED	SIMILITUD
23	51	51	100%
31	81	41	80%

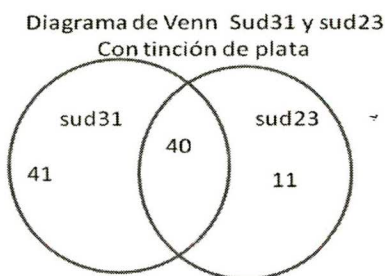


Tabla 10.- Comparación entre los aislamientos Sud31 y Sud23

Identificar las proteínas expresadas diferencialmente en los aislamientos clínicos Sud31.

Se emplearon proteínas que estuviesen presentes en la cepa Sud31 y ausentes en la Sud23; además de que estas proteínas se debían de teñir con azul de Coomassie G-250.

Para alcanzar este objetivo teníamos 40 posibles candidatos según la comparación entre Coomassie G-250 presentes en Sud31 y ausentes en Sud23.

Con la tinción de plata pudimos observar 60 posibles candidatos según la comparación entre la tinción con plata presentes en Sud31 y ausentes en Sud23 (Tabla 11).

TINCIÓN	CEPA	'PUNTOS'	MATCHED
Plata	23	118	118
	31	152	92
Azul Coomassie	23	51	51
	31	81	41

Tabla 11.- Diferencias entre la cepa Sud31 y Sud23 de acuerdo a la tinción Coomassie G-250 y con tinción de plata.

Perfiles de secreción proteica de las cepas Sud31 y Sud23 por Electroforesis Diferencial en Gel (DIGE):

Para hacer más preciso el análisis comparativo entre estas dos cepas, se realizó de forma complementaria, una electroforesis diferencial utilizando la técnica DIGE, en la cual las muestras son corridas bajo las mismas condiciones, de manera que se reducen las variaciones durante el procesamiento de la muestra.

Las proteínas se marcaron con los fluoróforos Cy3 (aislado 23), Cy5 (aislado Sud31) y Cy2 (control de carga utilizado para la normalización de la imagen aislado Sud23 y Sud31). (Tabla 12)

Proteínas	ug/ml	CyDye	[CyDye pmol/ul]
Sud31	50	Cy5	400
Sud23	50	Cy3	400
Ctrl(31 y 23)	25 + 25	Cy2	400

Tabla 12.- Condiciones de marcaje de las proteínas para DIGE

Con el uso de esta técnica se lograron resolver 301 'puntos' en el gel maestro; (Figura 24). En el secretoma de la cepa Sud31 se detectaron 270 'puntos' y 241 'puntos' para el aislamiento Sud23. Además 210 'puntos' se encontraron en ambos aislamientos, 60 sólo se observaron en el aislamiento Sud31 y 31 en el aislamiento Sud23 (Tabla 13).

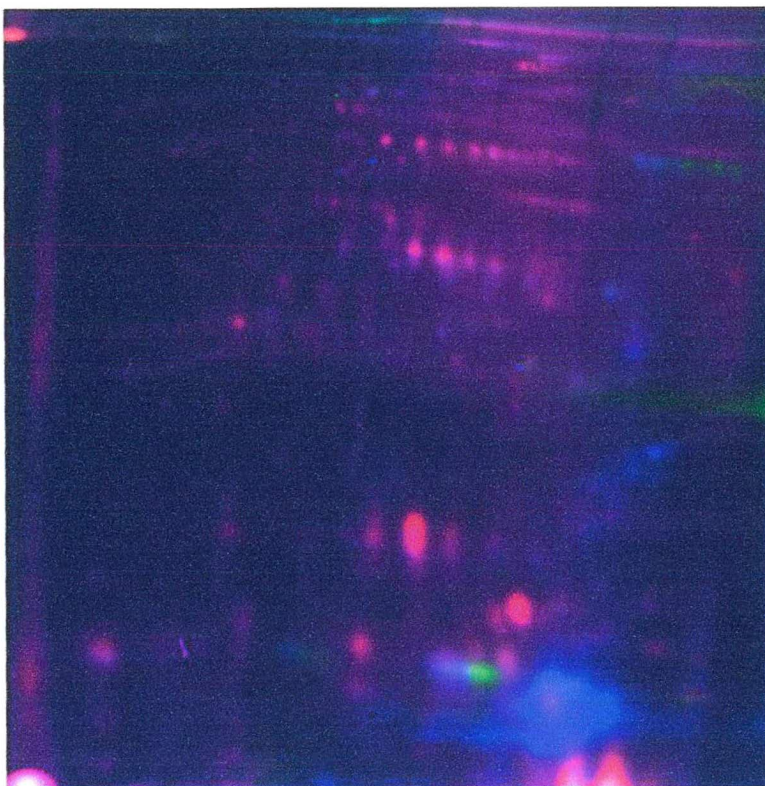


Figura 24.- DIGE de los aislamientos Sud31 y Sud23.

DIGE	número	porcentaje
'puntos' totales	301	100,00%
Decrementos	31	10.3 %
Similares	210	69.8 %
Incrementan	60	19.9 %

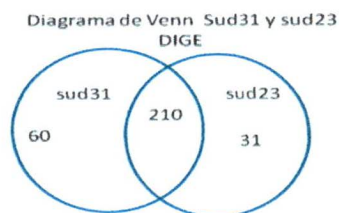


Tabla 13.- Análisis de 'puntos' detectados con DIGE.

Al comparar la relación de intensidad de los 'puntos' encontramos entre las imágenes con Cy3/Cy5 que 252 se presentaban en cantidad similar en los dos aislamientos, mientras que 11 mostraron una menor expresión (9 del aislamiento Sud31 y 2 del aislamiento Sud23). En el aislamiento Sud31 se detectó una mayor expresión en 38 'puntos'. (Figura 25)

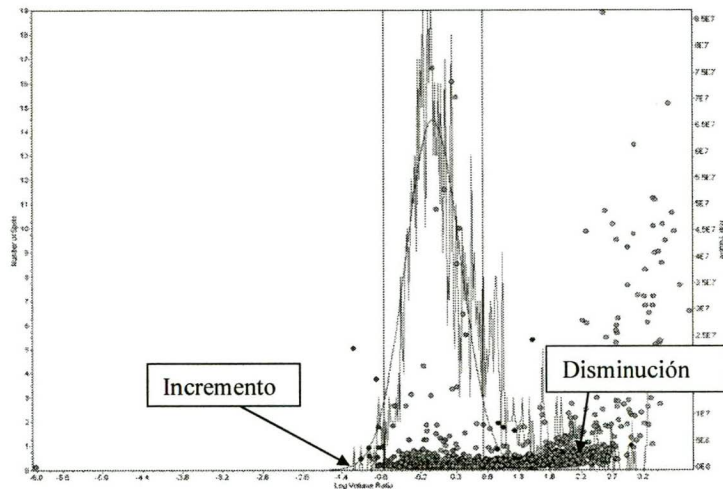


Figura 25.- Campana de Gauss en la que se observan las proteínas que se incrementan de color azul y las proteínas que disminuyen de color rojo

De los 'puntos' que se vieron incrementados en el aislamiento Sud31, hubo uno que sobresale de los demás al incrementarse en 11 veces respecto a Sud23 (Figura 26), cabe mencionar que en el aislamiento Sud23 también se observó esta proteína pero en menor cantidad.

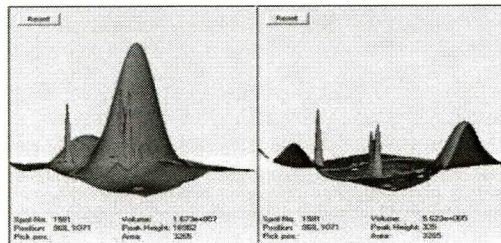


Figura 26.- Incremento de proteína CPF10 de 11 veces en Sud31 respecto a Sud23.

Selección de 'puntos' a secuenciar.

Para identificar a las proteínas que pudieran estar involucradas en la virulencia del aislamiento Sud31, de las 40 proteínas encontradas sólo en este aislamiento, se seleccionaron 5 proteínas para su identificación por espectrometría de masas (Figura 30). Las proteínas se seleccionaron bajo los siguientes criterios:

- a) que sólo estén presentes en el aislamiento Sud31
- b) que se encontraran en los tres geles
- c) que pudieran detectarse con azul brillante de Coomassie G-250

Adicionalmente se decidió secuenciar el 'punto' que se encontró 11 veces más expresado en el aislamiento Sud31. (Figura 27)

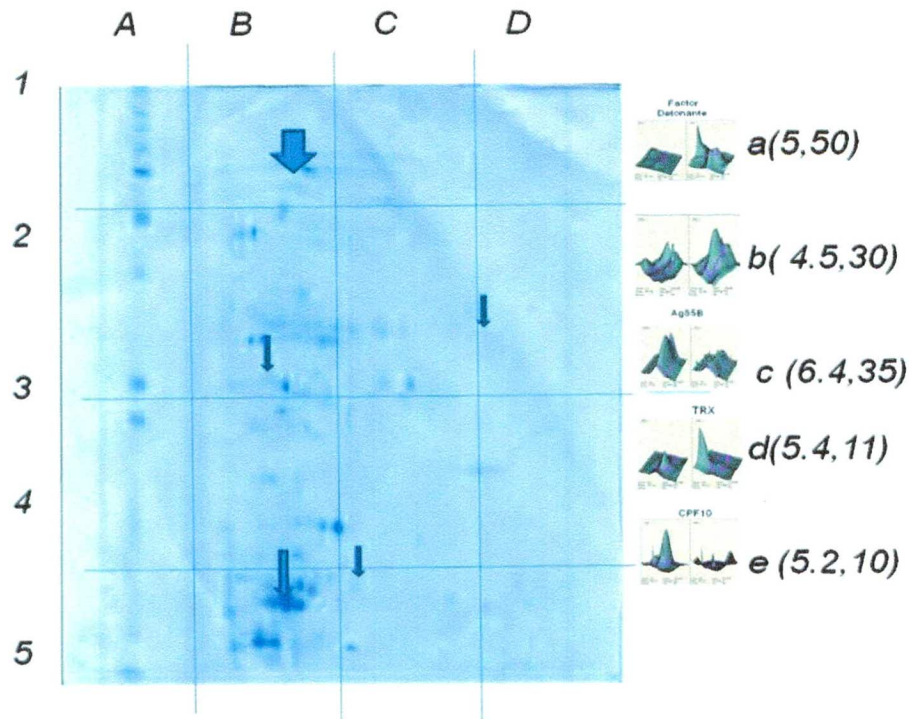


Figura 27.- Selección de 'puntos' en la cepa Sud31 (Izquierda), el incremento de cantidad de proteína de los 'puntos' en Sud31 de acuerdo a DIGE con punto isoeléctrico y peso molecular teórico a la (derecha)

Identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Los 5 'puntos' pudieron ser identificados exitosamente, obteniéndose coberturas de identificación que fueron del 12 al 86% (Tabla 14). Las proteínas identificadas correspondieron a los grupos funcionales de pared celular y procesos celulares (Ag85B), Virulencia (CPF10) esta proteína fue la que se encontró sobre expresada 11 veces respecto a Sud23, Detoxificación (TRX) y adaptación (Factor detonante).

Proteína identificada	Abreviatura	Masa(Da)	Score	PI	Cobertura (%)
Antígeno filtrado del medio de 10kDa	CPF10	10787	633	4.6	86
Thioredoxina	TRX	12651	70	5.1	20
Chaperona	TEORICA	30632	57	7.1	14
Antígeno de secreción de 85kDa	Ag85B	34728	127	6.8	13
Factor Detonante	Trigger Factor	50586	77	4.4	12

Tabla 14.- Proteínas identificadas y sus características generales.

Ensayos de Fagocitosis

Para determinar si había diferencias en la capacidad de los macrófagos para fagocitar estos aislamientos y saber si estas diferencias están relacionadas a la prevalencia del aislamiento, se hicieron ensayos de fagocitosis utilizando monocitos U937 diferenciados a macrófagos, que fueron infectados con la cepa Sud31 y la cepa Sud23 (inactivada por irradiación gamma) a una MOI de 1:10 (Tabla 15).

Aislamiento	Macrófagos infectados (200)	Porcentaje de infección
Sud31	81,3+/-10,2	57,9%
Sud23	112+/-1,4	56%

Tabla 15.- Porcentajes de infección de Macrófagos, empleando una MOI de 1:10

También se hicieron ensayos de fagocitosis a las 4, 24, 48 y 72 horas, utilizando monocitos U937 diferenciados a macrófagos, que fueron infectados con la cepa Sud31 y la cepa Sud23 (inactivada por irradiación gamma) a una MOI de 1:10 para evaluar la capacidad de sobrevivir de los aislamientos en los macrófagos. (Tabla 16)

<i>Sud31</i>		<i>Sud23</i>	
Tiempo de infección(hrs)	Porcentaje de infección (Infección +/- Dv/ %)	Tiempo de infección(hrs)	Porcentaje de infección (Infección +/- Dv/ %)
Basal	115.6 +/-5.13 (100%)	Basal	112 +/-1.4 (100%)
24	82.6 +/-9.7 (71.4%)	24	78.6 +/-8.7 (69.9%)
48	66.63 +/-6.6 (57.6%)	48	42.6 +/-4.5 (38%)
72	43+/-7 (57%)*	72	27 +/-6.3 (24%)*

Tabla 16.-Porcentajes de infección de Macrófagos a las 4, 24, 48 y 72 horas, empleando una MOI de 1:10; * p<0.05.

DISCUSION

La tuberculosis es una de las principales enfermedades infecciosas a nivel mundial que afecta aproximadamente a una tercera parte de la población mundial; recientemente, se ha visto un incremento en la incidencia de la infección en regiones en donde la tuberculosis se pensaba había sido controlada, pero durante la década pasada aparecieron 90 millones de nuevos casos de la infección, con una mortalidad del 30%.^[4, 5] Aún no están bien definidos todos los factores que afectan la etiopatogenia, pero se piensa que están relacionados a la capacidad de invasión y adaptación de *Mycobacterium tuberculosis* a su célula huésped, ya que es un patógeno intracelular que puede residir en el interior de los macrófagos del huésped.^[52]

Se ha sugerido que *M. tuberculosis* puede regular la expresión de genes que son utilizados para su supervivencia y crecimiento. Sin embargo, los mecanismos de interacción de micobacteria-macrófago están poco entendidos tanto a nivel molecular como celular, por lo que nosotros estudiamos las diferencias de expresión proteica en dos aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (Sud31 y Sud 23)^[51] que pertenecen a la familia Beijing, el cual es un genotipo de gran relevancia mundial debido a que se le genotipo más prevalente en la región asiática y se le ha relacionado con brotes epidemiológicos a lo largo del mundo.

Los aislamientos fueron seleccionados con base a su prevalencia en Ciudad del Cabo, Sudáfrica y por su virulencia en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva^[51]; siendo el aislamiento Sud31 muy prevalente (12.3 de cada 100000 casos al año) y ser parte de un cluster que agrupa 148 aislamientos, en comparación con el aislamiento Sud23 que es poco prevalente y de mucho menor virulencia en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva; mientras que el primero induce el 100% de mortalidad a las 5 semanas post-infección y la respuesta inmune se caracteriza por presentar una alta producción de IL-10 y FNT- α , el aislamiento Sud23 se muestra poco virulento, incluso con respecto a la

cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv. (Hernandez-Pando; datos sin publicar o comunicación personal ^[51]), Este comportamiento indica que la cepa Sud31 tiene alguna característica que la hace ser más virulenta que el aislamiento Sud23, por lo que el presente estudio estuvo enfocado en analizar la expresión diferencial de proteínas de secreción para posteriormente determinar si estas pueden estar involucradas en la virulencia de la micobacteria, ya sea modulando o evadiendo la respuesta inmune, ya que durante la primera y segunda semana después de la infección el aislamiento Sud31 induce una baja y estable producción de IFN- γ y una producción similar de FNT- α a la observada en ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. Sin embargo esta respuesta es inhibida por la producción de IL-10 y de IL-4, que se ve reflejada en una alta carga bacilar después de los 21 y 28 días post-infección; en contraste con la cepa Sud23 que induce una baja producción de IL-4 y una alta expresión de IFN- γ .

Estas diferencias en el comportamiento inmunológico durante la infección con estos aislamientos pueden ser el resultado de la expresión diferencial de proteínas, las cuales le han dado ventajas adaptativas al aislamiento Sud31 y a las cepas relacionadas a esta.

Una vez que obtuvimos las PFC, se analizaron en geles de dos dimensiones para obtener los perfiles de secreción proteica de los dos aislamientos. La separación de las proteínas en base a su masa molecular y a su punto isoeléctrico permitió obtener una mejor resolución de proteínas e identificar la presencia de isoformas y proteínas solo presentes en uno de los aislamientos.

Para visualizar el secretoma de cada uno de los aislamientos se utilizó la tinción de plata, obteniéndose para el aislamiento Sud31 un total de 160 'puntos' y 142 'puntos' para el aislamiento Sud23, teniendo así una mayor cantidad de proteínas en el aislado Sud31. La comparación entre los secretomas de ambos aislamientos con tinción de plata nos permitió determinar que el 77% es decir 92 de los 'puntos' se encontraban en ambas cepas y 26 'puntos' se encontraron en el aislamiento

Sud23 y 60 el aislamiento Sud31, mientras que con la tinción de azul de Coomassie G-250, encontramos un 80% de similitud y 11 'puntos' se encontraron en el aislamiento sud 23 y 41 'puntos' en el aislamiento Sud31. La diferencia entre el número de 'puntos' encontrados en cada aislamiento es atribuible a la sensibilidad de las tinciones utilizadas en plata 160 para el aislamiento sud 31 y 118 en el aislamiento Sud23 y para Coomassie coloidal para el aislamiento Sud23 se encontraron 51 'puntos' mientras que para el Sud31 se encontraron 77 'puntos'.

Los 'puntos' expresados diferencialmente que sólo se observaron en el aislamiento Sud31 (60 'puntos' con plata y 40 'puntos' con Coomassie) pero no en el aislamiento Sud23 nos podría estar indicando que esas proteínas pueden estar relacionadas a la prevalencia y virulencia del aislamiento Sud31.

Para la selección de 'puntos' nos basamos en que estuvieran en mayor cantidad y que estuvieran presentes en Sud31 pero que no estuvieran presentes en Sud23, de los 60 'puntos' de Sud31 encontrados diferentes a Sud23 por tinción de plata se realizó un análisis comparativo con la tinción de azul de Coomassie para ver si estos 'puntos' se teñían con Coomassie encontrando la presencia de 40 'puntos' presentes en Sud31.

Después se seleccionaron 5 'puntos' del aislamiento Sud31 para identificarlos por espectrometría de masas, esta selección fue en base a que los 'puntos' estuvieran en el aislamiento Sud31, que estuvieran presentes en los tres geles, que pudieran detectarse con azul brillante de Coomassie G-250, para esta selección también se hizo una inspección visual de los geles.

Para confirmar que estas proteínas se expresaban de forma diferencial en el aislamiento Sud31, y a la vez incrementar la sensibilidad y precisión del estudio, se realizó un gel DIGE (Electroforesis en Gel Diferencial); además de ver de forma cuantitativa las proteínas presentes en ambos aislamientos. Con este análisis se pudieron detectar 301 'puntos' expresados en ambas cepas, de los cuales el

83.7% se encontró expresado de forma similar, mientras 49 'puntos' se expresaron diferencialmente (11 'puntos' disminuyeron, mientras que se incrementaron 38 'puntos').

Una de las proteínas identificadas, que incrementó su expresión de forma significativa en el aislamiento Sud31, fue la proteína CFP10 (11 veces respecto al aislamiento Sud23); además de que la proteína era muy abundante en las tinciones y siempre era la primera en aparecer al momento de realizar las tinciones; cabe mencionar que esta proteína también se veía en Sud23 pero en menor cantidad. De igual manera se seleccionaron otros 4 'puntos' expresados únicamente en Sud31 y que fueron visualizados con la tinción de Coomassie; entre ellas la proteína Ag85B la cual se observó que tenía coordenadas en posición distinta a la observada normalmente con respecto a H37Rv; ya que posiblemente esta proteína esté sufriendo alguna modificación post-traducciona l o esté sufriendo cambios en su secuencia que hacen que incrementé un poco su peso molecular y su punto isoeléctrico; con respecto a las otras tres Tio redoxina, Chaperona teórica y el Factor detonante, se observó que estas proteínas estaban presente solo en el aislamiento Sud31.

La proteína CPF10 pertenece a la familia de las chaperoninas GroES; las cuales se requieren para el plegamiento correcto y montaje subsecuente de algunas proteínas bacterianas dentro de la célula; son inducidas por estrés y actúan estabilizando o protegiendo de una posible desestabilización cuando se encuentra en condiciones de calor (choque térmico).^[1, 52]

CPF10 presenta una gran capacidad de inducir respuestas inmunitarias mediadas por células T y en la modificación de la actividad formadora de hueso, inhibe el crecimiento de osteoblastos y recluta osteoclastos, dando por resultado la reabsorción de las vértebras en el caso de la tuberculosis espinal. Esto libera nutrientes y macrófagos que pueden servir como nuevas células hospederas para la bacteria[53].

Como se sabe el aislamiento Sud31 tiene una alta producción de IL-10 y TNF- α y se ha demostrado que el antígeno CPF-10 del *M. tuberculosis* puede unirse a la superficie de los macrófagos y estimular la secreción de citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α . El antígeno a diferencia de otros secretados por el *M. tuberculosis* tiende a establecer sinergia con el IFN- γ , provocando la producción de agentes microbicidas por parte del fagocito mononuclear, como lo es el NO. Sin embargo, si el individuo ha sido expuesto con anterioridad al antígeno, éste va a reducir la cantidad de NO producida por los macrófagos, aunque exista una gran cantidad de IFN- γ en el medio celular, pero seguirá induciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias como el FNT- α e interleucinas de tipo Th2 como IL-10.^[52]

Otra proteína identificada es el antígeno de 85 kDa, que es uno de los mayores constituyentes del sobrenadante de los cultivos del *M. tuberculosis* el cual pertenece a un conjunto de tres enzimas, transferasas de ácido micólico expresadas y secretadas por *M. tuberculosis*, que poseen un peso molecular entre 30 y 32 kDa.^[1, 52] Estas enzimas también se conocen en conjunto como el complejo antigénico 85 de *M. tuberculosis* y se expresan, en gran cantidad, en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Su expresión dentro de los fagosomas y sobre la pared celular de la bacteria permite el mantenimiento de la integridad de la misma y el crecimiento de la bacteria, después de ser ingeridas por los macrófagos por activación del proceso de fagocitosis.^[11] Algunas investigaciones sugieren que sin la presencia de este complejo antigénico la bacteria no sería capaz de sobrevivir y reproducirse dentro del fagosoma.^[5] Las proteínas del complejo 30/32 kDa son de los principales candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas contra la TB, ayudan a mantener la alta hidrofobicidad e integridad de la pared celular de *M. tuberculosis*, es decir, actúa sobre una de las estructuras que se encarga de la supervivencia de la bacteria en el organismo del huésped. Este proceso es mediado a través de la transferencia de ácidos micólicos hacia la pared celular para que interaccionen con las moléculas de arabinogalactano presente en ella, y la síntesis de factor cordón.^[5]

La Tiorredoxina (TRX) pertenece a la superfamilia de tiorredoxinas, que incluye enzimas que catalizan la reducción, formación e isomerización de puentes bisulfuro y ejercen su actividad a través de la activación redox disulfuro en motivos Cys-Xaa(1)-Xaa(2)-Cys motif. ^[52] La TRX es una enzima antioxidante la cual reduce proteínas citoplasmáticas por medio de reacciones redox y que permite el mantenimiento de la homeostasis redox, la importancia de la proteína es que ayuda a evitar la lisis de la bacteria por óxido nítrico. ^[52]

La dos últimas son la proteína Factor Detonante y una Chaperona teórica. No se tiene mucho conocimiento de éstas pero se cree que el factor detonante puede estar involucrado en la promoción de la expresión de algunas citocinas que pudieran estar involucradas en la respuesta inmune; mientras que de la chaperona teórica sólo se conoce que este tipo de proteínas se expresa ante estímulos estresantes, como la disminución de nutrientes y el incremento de temperatura. ^[52]

Para evaluar si los aislamientos estudiados eran fagocitados de forma diferente y saber si esta era una característica asociada a la persistencia del aislamiento Sud31, se realizaron ensayos de fagocitosis y se encontró que este aislamiento se fagocitaba en la misma proporción que el aislamiento Sud23; por lo que la persistencia, en este caso, no está relacionada a la frecuencia con la que es fagocitada la bacteria, sin embargo una característica del aislamiento Sud31 es que este mostró ser más resistente a la degradación por los macrófagos, pudiéndose observar bacilos en el 43% de los macrófagos (infectados inicialmente) a las 72 hrs de infección, mientras que en el caso del aislamiento Sud23 solo se encontraron bacilos en el 24% de los macrófagos infectados.

Estas diferencias podrían reflejarse en la persistencia de la bacteria, ya que el tiempo de exposición a las proteínas filtradas del cultivo puede jugar un papel importante en la modulación de la repuesta inmune.

CONCLUSIONES:

Se encontró que el aislamiento Sud31 expresa diferencialmente 60 proteínas en comparación con el aislamiento Sud23.

Se identificaron 5 proteínas que aunque están descritas en el genoma de *M. tuberculosis*, presentan puntos isoeléctricos diferentes a los reportados, posiblemente por cambios en la secuencia o modificaciones postraduccionales que pudieran variar la presentación antigénica descrita previamente para estas proteínas.

La sobreexpresión de la proteína CPF10 (11 veces más respecto a Sud23) posiblemente la proteína pudiera verse involucrada en la virulencia del aislado Sud31.

Ambos aislamientos son fagocitados en la misma proporción, sin embargo el aislamiento Sud31 presenta una mayor resistencia a la degradación en el lisosoma.

6. BIBLIOGRAFIA.

1. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*. Clin. Microbiol. Rev., 2003. 16(3): p. 463-496.
2. Bailey W. Scott e., *Diagnóstico Microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos...* . Ed. med.Panamericana. Bs.As, 1986. 4ta. ed.
3. P Onyebujoh, G.R., P Desjeux, L Savioli, M, *Disease watch Focus: Tuberculosis*. Nature review, 2004. 2: p. 930-932.
4. Aziz, M.A. and A. Wright, *The World Health Organization/International Union against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: A Model for Other Infectious Diseases*. Clinical Infectious Diseases, 2005. 41(s4): p. S258-S262.
5. Manjula, S. and V. Sritharan, *Microbial pathogenesis: An insight into Mycobacterium tuberculosis*. Vol. 20. 2002. 61-68.
6. van Crevel, R., T.H.M. Ottenhoff, and J.W.M. van der Meer, *Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Microbiol. Rev., 2002. 15(2): p. 294-309.
7. salud, S.d., *Boletín epidemiológico*. Secretaria de Salud, 2007. 01: p. 2-8 de enero.
8. Pablos-Mendez, A., et al., *Global Surveillance for Antituberculosis-Drug Resistance, 1994-1997*. N Engl J Med, 1998. 338(23): p. 1641-1649.
9. Rengarajan, J., B.R. Bloom, and E.J. Rubin, *Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(23): p. 8327-8332.
10. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-Genome Comparison of Mycobacterium tuberculosis Clinical and Laboratory Strains*. J. Bacteriol., 2002. 184(19): p. 5479-5490.
11. Barnes, P.F. and M.D. Cave, *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. N Engl J Med, 2003. 349(12): p. 1149-1156.
12. Soolingen, D.V., *Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements*. Journal of Internal Medicine, 2001. 249(1): p. 1-26.
13. Trinchieri, G., *Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity*. Annual Review of Immunology, 1995. 13(1): p. 251-276.
14. Supply, P., et al., *Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*. J. Clin. Microbiol., 2001. 39(10): p. 3563-3571.
15. Sung Weon Ryoo¹, Young Kil Park¹, Sue-Nie Park³, Young Soo Shim⁴, Hyunjeong Liew⁵, Seongman Kang², and Gill-Han Bai^{1*}, *Comparative Proteomic Analysis of Virulent Korean Mycobacterium tuberculosis K-strain with Other Mycobacteria Strain Following Infection of U-937 Macrophage*. The Journal of Microbiology, 2007. 45(3): p. 268-271.

16. Tanaka, M.M. and A.R. Francis, *Detecting emerging strains of tuberculosis by using spoligotypes*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. 103(41): p. 15266-15271.
17. Dale JW, B.D., Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, DriscollJJ, et al., *Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the Mycobacterium tuberculosis complex: recommendations for standardized nomenclature*. Int J Lung Dis. , 2001. 5: p. 216-9.
18. Andersen, P. *Effective vaccination of mice against Mycobacterium tuberculosis infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins*. Infect. Immun., 1994. 62(6): p. 2536-2544.
19. Iseman, M.D., *Tuberculosis therapy: past, present and future*. Eur Respir J, 2002. 20(36_suppl): p. 87S-94.
20. Glynn JR, W.J., Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. , *Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review*. . Emerg Infect Dis [serial online] 2002 Aug. 8.
21. Judith R. Glynn, J.W., Pablo J. Bifani, Kristin Kremer, and Dick van Soolingen; , *Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of Mycobacterium tuberculosis: A Systematic Review*; . Emerging Infectious Diseases, 2002. • Vol. 8, No. 8.
22. Shapiro SD, C.E., Senior RM, Welgus HG. , *Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes*. . J Rheumatol Suppl. , 1991, 27:: p. 95-98.
23. Glynn JR, C.A., Traore H, Yates MD, Mwaungulu FD, Ngwira BM, et al. , *Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype, northern Malawi*. Emerg Infect Dis [serial on the Internet]. , 2005 Jan.
24. Skeiky, Y.A.W. and J.C. Sadoff, *Advances in tuberculosis vaccine strategies*. Nat Rev Micro, 2006. 4(6): p. 469-476.
25. Nguyen LN, G.G., Marks GB. , *Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis*. Respiriology., 2004;. 9:313-9.
26. Murray M, N.E., *Molecular epidemiology of tuberculosis. Achievements and challenges to current knowledge*. Bull World Health Organ. , 2002. 80: p. 477-82.
27. Zhang M, G.J., Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. , *Enhanced capacity of a widespread strain of Mycobacterium tuberculosis to grow in human macrophages*. . J Infect Dis., 1999. 179: p. 1213-7.
28. Helen L. Collins, S.H.E.K., *The many faces of host responses to tuberculosis*. Immunology, 2001. 103(1): p. 1-9.
29. Ernst, W.A., et al., *Granulysin, a T Cell Product, Kills Bacteria by Altering Membrane Permeability*. J Immunol, 2000. 165(12): p. 7102-7108.
30. Means, T.K., et al., *Human Toll-Like Receptors Mediate Cellular Activation by Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 1999. 163(7): p. 3920-3927.
31. Hernandez-Pando R, S.T., Orozco EH, Serafin J, Estrada-García I., *Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis*. Exp Toxicol Pathol, 2001. 53(4): p.:257-65.

32. Xu, S., et al., *Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages*. J Immunol, 1994. 153(6): p. 2568-2578.
33. Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen, *Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes*. Infect. Immun., 1996. 64(3): p. 683-690.
34. J. Serafin-López. *The Effect of Iron on the Expression of Cytokines in Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis*. Scandinavian Journal of Immunology, 2004. 60(4): p. 329-337.
35. Vasselon, T. and P.A. Detmers, *Toll Receptors: a Central Element in Innate Immune Responses*. Infect. Immun., 2002. 70(3): p. 1033-1041.
36. Andersen, P., et al., *T-cell proliferative response to antigens secreted by Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun., 1991. 59(4): p. 1558-1563.
37. Hernandez-Pando R, O.E., Samperi, Pavon, *correlation between the kinetics of th1/th2 and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. immunol, 1996. 89: p. 26-33.
38. Barrios-Payan Jorge A, C.-A.M., Flores-Valdez Mario A, Hernandez-Pando R, *Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente*. Salud Publica de México, 2009.
39. Kabouridis PS, J.J., Magee AL, Ley SC., *Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes*. Eur J Immuno, 2000. 30(3): p. 954-63.
40. Ferrari G, V.M., *A Coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of Mycobacteria*. Cell, 1996. 97: p. 435-437.
41. Steinberg, B.E. and S. Grinstein, *Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants*. The Journal of Clinical Investigation, 2008. 118(6): p. 10.
42. Deretic, V. and R.A. Fratti, *Mycobacterium tuberculosis phagosome*. Mol Microbiol, 1999. 31(6): p. 1603-9.
43. Fratti, R.A., et al., *Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block*. Electrophoresis, 2000. 21(16): p. 3378-85.
44. Russell, D.G., H.C. Mwandumba, and E.E. Rhoades, *Mycobacterium and the coat of many lipids*. J Cell Biol, 2002. 158(3): p. 421-6.
45. Via, L.E., et al., *Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7*. J Biol Chem, 1997. 272(20): p. 13326-31.
46. J. A. Mcgarvey, D.W.L.E.B., *Differential gene expression in mononuclear phagocytes infected with pathogenic and non-pathogenic mycobacteria*. Clinical & Experimental Immunology, 2004. 136(3): p. 490-500.
47. Nagai, S., J. Matsumoto, and T. Nagasuga, *Specific skin-reactive protein from culture filtrate of Mycobacterium bovis BCG*. Infect. Immun., 1981. 31(3): p. 1152-1160.
48. Ravn, P., et al., *Human T Cell Responses to the ESAT-6 Antigen from Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases, 1999. 179(3): p. 637-645.

49. Pfeiffer, C., et al., *Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Microbiology, 2005. 151(4): p. 1139-1150.
50. Turcotte, R.a.Y.D.O., *Influence of the age of mycobacterial cultures on the protein and carbohydrate composition of tuberculin*. . Can J Microbiol., 1972. 18(5): : p. p. 637-45.
51. Hernandez-Pando R, W.R., *Datos sin publicar, estudio epidemiológico de cepas de MTB*. Datos sin publicar, estudio epidemiológico de cepas de MTB., 2008.
52. Zaida Araujo¹, M.A., Hemir Escobar², Ricardo Baños², Carlos Fernández de Larrea³ y Bruno Rivas-Santiago⁴., *Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de Mycobacterium tuberculosis en la protección, patología y diagnóstico*. Revisión. Invest Clin 2008. 49(3): p. 411 - 441.
53. Trajkovic V, S.G., Singh B, Singh S, Sharma P. , *Effect of Mycobacterium tuberculosis-specific 10-kilodalton antigen on macrophage release of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide*. . Infect Immun 2002. 70(12): p. 6558-6566.
54. Zor, T. and Z. Selinger, *Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1996. 236: p. 302-308.
55. *Ready Strip. IPG Strip Instruction Manual*., ed. L.I. Bio-Rad.
56. Görg, A., *Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis*. 2003.
57. Berkelman, T. and T. Stenstedt, *2-D Electroforesis. Principles and methods*. 3rd ed, ed. G. Healthcare. 1998, U. K. 168.

ANEXOS:**A. Medio Sauton**

L-asparagina	$C_4H_8N_2O_3$	4g
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	2g
Fosfato de potasio	K_3PO_4	0.5g
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
Citrato férrico de amonio	$C_6H_8O_7 \cdot Fe \cdot H_3N$	0.05g
Glicerol	$C_3H_8O_3$	15mL
Piruvato de sodio	$C_3H_3NaO_3$	0.5% w/v

Disolver en 900mL de H_2O , ajustar el pH a 6.9-7.0 con NaOH 1M y llevar a volumen de 1L. Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 μ m.

Para el cultivo de la subcepa rBCG38 se adicionó sulfato de kanamicina 0.03mg/mL cada tercer día.

B. Método de Bradford (microensayo) ^[54]

En una microplaca y a partir de un estándar de BSA 1mg/mL, preparar una curva con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 μ g de proteína. Agregar H_2O cbp 50 μ L y añadir 200 μ L de reactivo de Bradford. Incubar 5min en oscuridad y leer a $A_{\lambda 595nm}$ y $A_{\lambda 450nm}$. El complejo colorante-proteína es estable hasta por 60min. La cantidad de proteína contenida en la muestra por interpolación a partir de una gráfica.

C. Solución amortiguadora de carga 2X

Tris-HCl pH 6.8 (0.125mM), glicerol 20% v/v, SDS 4% w/v, β -mercaptoetanol 20 μ L/mL, azul de bromofenol 0.01% w/v.

Disolver en H_2O y almacenar protegido de la luz a 4°C. Para preparar la muestra, se mezcla con en relación 1:1 y se calienta en baño maría por 5min.

D. Tris-HCl pH 6.8 (0.5M)

Para 100mL: disolver 6g de Tris base en 60mL de H₂O_d, ajustar a pH 6.8 con HCl 6N y llevar a volumen. Filtrar con membrana de 0.45µm y almacenar a 4°C.

E. Solución Amortiguadora de Rehidratación ^[55-57]

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

Rehidratar el CHAPS, la urea y el azul de bromofenol con la muestra de proteína, agregar el DTT y H₂O_d cbp el volumen final deseado de la mezcla. Para tiras gradiente inmobilizado de pH (IPG) de 11cm, mezclar 180µL de la solución amortiguadora de rehidratación con las anfolinas. Las tiras IPG se rehidratan de 10 a 16h a temperatura ambiente.

F. Solución Amortiguadora de Equilibrio

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

G. Tris pH 8.8 (1.5M) 4X

Tris base al 18.17%, SDS 0.4%.

Disolver en H₂O_d, ajustar a pH 8.8 con HCl 1M y llevar a volumen con H₂O_d. Filtrar con membrana de 0.45µm y almacenar a 4°C.

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

Para 100mL disolver 29.1g de acrilamida y 0.9g de bis-acrilamida y llevar a volumen con H₂O_d. Desgasificar, filtrar con membrana de 0.45µm y almacenar protegido de la luz a 4°C.

I. Solución de Persulfato de Amonio (PSA) 10%

Para 6mL: disolver 1.2122g de PSA en H₂O_d, desgasificar y almacenar en alícuotas de 150μL a -70°C.

J. Solución de agarosa para sellar

Agarosa 0.5%w/v, Buffer de corrida 5X 10mL, Azul de bromofenol 0.002%w/v, H₂O_d 40mL. Fundir la agarosa en el H₂O_d y almacenar en alícuotas de 5mL en tubos de vidrio con tapón de rosca.

K. Buffer de corrida 5X

Glicina 192mM, Tris base 25mM, SDS (Sigma) 0.1%.

Disolver, llevar a volumen con H₂O_d y filtrar con papel Whatman #1. Almacenar a 4°C.

L. DGGE 10-17%

Los geles de poliacrilamida en gradiente de 10 al 17% se prepararon como se indica a continuación:

Reactivo	Solución al 10% de archilamida	Solución al 17% de acrilamida
Sucrosa	—	8.25g
H ₂ O _d	22.660mL	4.840mL
Tris pH 8.8 (1.5M) 4X	13.750mL	13.75mL
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (T30% C3%)	18.330mL	31.167mL
PSA 10%	250μL	80μL
TEMED*	13μL	13μL

Volumen final	55mL	55mL
---------------	------	------

* N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina

Para preparar más de un gel simultáneamente, se utiliza un sistema formador de gradiente. Una vez inyectado el volumen total de la mezcla, se coloca una capa de isopropanol sobre los geles para que la superficie de los mismos quede plana. Se dejan polimerizar al menos durante 1h.

M. Tinción con plata

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

Las soluciones de pre-tratamiento, impregnación y revelado deben prepararse al instante. No es recomendable rehusar más de tres veces las soluciones de fijación y paro. Los geles pueden almacenarse en la solución de paro a 4°C hasta por una semana. Antes de secar los geles entre dos hojas de papel celofán, se recomienda hacer un lavado con solución de glicerol al 10% durante 10min.

PERSPECTIVAS:

Se estudiaran mas afondo los aislamientos Sud31 y Sud23, además de ver el comportamiento de las cepas in vivo.

Se estudiara la expresión de las proteínas identificadas en la infección de macrófagos y en ratones.

Se determinara el efecto de CPF10 en estudios de virulencia.

JURADO ASIGNADO:

El Jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 11 de Febrero del 2009, en la Ciudad de México D.F; para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Q.F.B. Fernando Vargas Romero.

Presidente:

Dr. Mauricio Castañón Arreola _____

Vocal:

Dr. Rogelio Hernández Pando _____

Secretaria:

Dra. Mavil López Casamichan _____

Sustentante:

Q.F.B. Fernando Vargas Romero _____

Pedro Ahumada



TESIS URGENTES

REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.