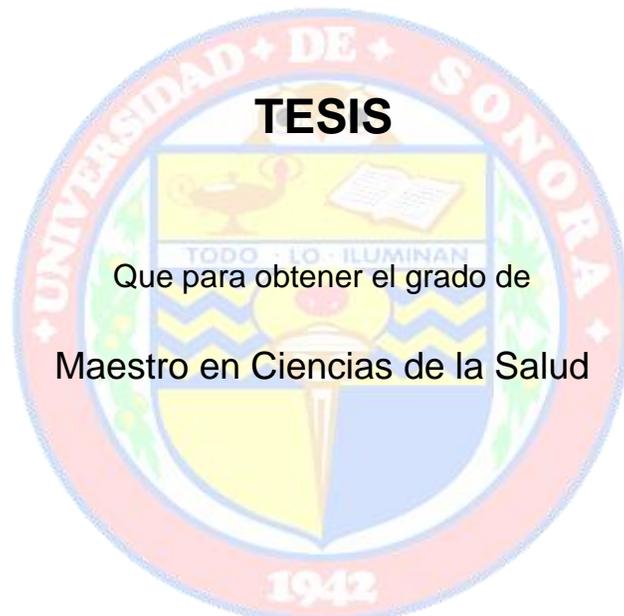


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

"Comparación de los perfiles electroforéticos en doble dimensión, de las proteínas de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* de Hermosillo, Sonora"



TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Aby Cervantes Domínguez

Hermosillo, Sonora

Marzo, 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



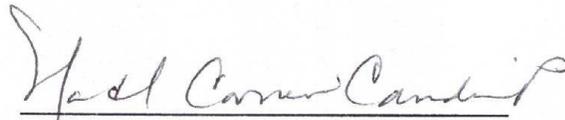
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Aby Cervantes Domínguez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dra. María del Carmen Candia Plata
Director Académico



Dr. Enrique Bolado Martínez
Secretario



Dr. Gerardo Álvarez Hernández
Vocal



Dr. Luis Fernando López Soto
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, al Programa de Maestría en Ciencias de la Salud y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme la oportunidad de cumplir una meta más de mi crecimiento académico.

A la Fundación Mexicana para la Salud, Capítulo Sonora, por los fondos asignados al proyecto: "Identificación de Antígenos Inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv", cuyo responsable fue la Dra. Maria del Carmen Candia Plata.

A mi directora de tesis Dra. Maria del Carmen Candia Plata, gracias por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, por proporcionarme todos los recursos necesarios, tanto intelectuales como en insumos de investigación, por ser mi guía y por todas sus enseñanzas, pero en especial, por creer en mí y darme la oportunidad de empezar a formarme como un investigador en la ciencia y permitirme así, empezar a ver la realización de uno de mis deseos de la infancia.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública, en especial al Departamento de Micobacterias, por permitirnos el uso de sus instalaciones y haber donado el material biológico. Un agradecimiento especial para las Químicas María del Rosario Aguayo Verdugo, Miriam Patricia Lugo Zazueta y Lizbeth Alejandra Burboa Rodríguez por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dr. Enrique Bolado Martínez, Dr. Gerardo Álvarez Hernández y Dr. Luis Fernando López Soto, por sus aportaciones a este trabajo que contribuyeron a su calidad.

A las Maestras Lucía Castellón Campaña y Karla A. Monge Villegas, porque sin formar parte de mi comité, trabajaron a la par conmigo en el desarrollo de los cultivos de las cepas clínicas. Mi más sincero y profundo agradecimiento.

A mis amigos de laboratorio: Q.B. Gabriela Zubiarte, Q.B. Claudia Celeste Molina Domínguez, Dra. Adriana Soto Guzmán, M.C. Edson Norberto Cárcamo Noriega, Dr. José Manuel Galván Moroyoqui, Q.B. Gabriela Zubiarte Cabanillas, Q.B. Fátima Romero Ayala, Q.B. Karen Domínguez y M.C. Miriam Denisse García Villa, por darme ánimos, su apoyo y su amistad, muchísimas gracias.

DEDICATORIA

A Ti, que desde siempre me cuidas, me das la vida y la fuerza para realizar proyectos como este, tan importantes para mí.

A mi Padre, Madre y Hermanos. Con ustedes soy fuerte, viven mis alegrías y me acompañan en los malos ratos. Los amo.

A ti, que no aunque no te conozco, espero que el día que así sea te sientas orgulloso de mí.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
OBJETIVOS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Tuberculosis.....	3
Epidemiología.....	3
Patogenia.....	5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Características Generales.....	6
Genómica y Proteoma de <i>M. tuberculosis</i>	9
Genoma de <i>M. tuberculosis</i>	9
Proteoma de <i>M. tuberculosis</i>	11
Proteínas de filtrado de cultivo.....	12
Electroforesis en dos dimensiones.....	14
Análisis de imágenes de geles de electroforesis en dos dimensiones.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	19
Sesgos Experimentales Previstos.....	19
Muestras Utilizadas.....	19
Operacionalización de Variables.....	21
Plan de Procesamiento y Análisis de Datos.....	21
Cultivo de las Cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Protocolo de cultivo de la cepa de referencia.....	22

Protocolo de cultivo de la cepa clínica.....	23
Obtención del filtrado de cultivo.....	24
Estimación Proteica del Filtrado de Cultivo.....	24
Electroforesis SDS-PAGE.....	25
Electroforesis en Dos Dimensiones.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Cepa de Referencia H37Rv.....	27
Perfil electroforético en una dimensión.....	27
Perfil electroforético en dos dimensiones.....	31
Cepa Clínica de <i>M. tuberculosis</i>	35
Perfil electroforético en una dimensión.....	35
Perfil electroforético en dos dimensiones.....	39
Comparación de los Perfiles en Dos Dimensiones de la Cepa Clínica y de Referencia.....	43
Manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa de referencia	44
Manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa clínica.....	48
Mancha peptídica no detectada en la cepa clínica.....	54
Manchas peptídicas detectadas sólo en la cepa clínica.....	56
Correlación entre los Perfiles Electroforéticos en una Dimensión y los Mapas Proteómicos en Dos Dimensiones de Ambas Cepas.....	57
SÍNTESIS DE OBSERVACIONES Y CONCLUSIÓN.....	59
RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63
APENDICE 1.....	74
APENDICE 2.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Definición conceptual de la muestra, criterios de inclusión y exclusión de las muestras.....	20
II	Lista de las bandas peptídicas (por masa molecular) observadas en las cepas de referencia y clínica	40
III	Manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa de referencia <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	45
IV	Resumen de las manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa clínica <i>M. tuberculosis</i> H8306.....	50
V	Resumen de manchas detectadas sólo en alguna de las cepas...	55

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	8
2	Mapa proteómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv reportado en la bibliografía.....	16
3	Perfil electroforético en una dimensión, de las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, cultivado en medio líquido Sauton	29
4	Densitograma de la electroforesis en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, cultivado en medio Sauton	30
5	Perfil electroforético en dos dimensiones de las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv, cultivado en medio Sauton, cultivado en medio Sauton	32
6	Perfil electroforético en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H8306.....	36
7	Densitograma de las proteínas de filtrado de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> H8306, cultivado en medio Sauton.....	37
8	Comparación de los densitogramas de las proteínas de filtrado de cultivo de las cepas micobacterianas clínica y de referencia, arrojado por el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®).....	38
9	Perfil electroforético en dos dimensiones de las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa clínica <i>M. tuberculosis</i> H8306, cultivado en medio líquido Sauton	42
10	Sección número uno del gel en doble dimensión que muestra los manchas peptídicas que tienen densidad diferente entre las	

	dos cepas	46
11	Sección dos del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas	49
12	Sección número tres del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas	51
13	Sección número cuatro del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas	53

OBJETIVOS

General

Identificar las principales diferencias entre el densitograma de doble dimensión del filtrado proteico de un cultivo clínico de *Mycobacterium tuberculosis* y el obtenido de la cepa de referencia H37Rv.

Específicos

1. Obtener los filtrados proteicos del cultivo, en medio líquido Sauton, de la cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* y de una cepa clínica de la misma especie bacteriana aislada en Hermosillo, Sonora.
2. Obtener y comparar los perfiles electroforéticos en doble dimensión de los filtrados proteicos de *M. tuberculosis* H37Rv y de la cepa clínica.
3. Describir las diferencias electroforéticas relevantes entre la cepa de referencia y la cepa clínica, para identificar manchas proteicas potencialmente importantes para la identificación específica posterior de péptidos inmunodominantes.

RESUMEN

La tuberculosis, aunque conocida desde la antigüedad, es la enfermedad infecciosa que produce más muertes por sí sola a escala mundial. Para su adecuado control epidemiológico será necesario obtener mayor información ontogénica y epigenética de las cepas micobacterianas aisladas de muestras clínicas, ya que sólo así se podrán desarrollar nuevos métodos diagnósticos, así como nuevas vacunas y fármacos antituberculosos más efectivos.

En los últimos años se ha demostrado que la diversidad y heterogeneidad de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, la principal especie micobacteriana causante de tuberculosis humana, es superior a la de su genómica, por lo que se cree que su estudio brindará información para explicar las diferencias patogénicas entre cepas.

Dentro de las técnicas para el estudio del proteoma (totalidad de proteínas expresadas por un organismo), la electroforesis de doble dimensión en gel es una de las técnicas más poderosas porque permite una alta definición del perfil de las proteínas expresadas a nivel celular y subcelular. Por lo anterior, fue esta técnica la utilizada en este trabajo para comparar el perfil proteico del filtrado de cultivo de una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* aislada en Hermosillo, Sonora, con relación a la cepa de referencia H37Rv.

Se encontraron 37 diferencias principales entre los patrones proteicos de la cepa clínica y la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Entre éstas, 16 manchas peptídicas, algunas reportadas comúnmente como péptidos y/o proteínas inmunodominantes, presentaron una menor intensidad en la cepa clínica. No fue posible asociar una de las manchas observada en la electroforesis de la cepa de referencia con alguna proteína de *Mycobacterium tuberculosis* previamente reportada, porque esta mancha no aparece en los

electroforetogramas de reportes previos nacionales ni internacionales. Por lo anterior, es recomendable la caracterización posterior de esta mancha.

En la cepa clínica se observaron 13 manchas de una densidad muy superior a las generadas por las proteínas de la cepa H37Rv; cinco de las estas manchas peptídicas parecen estar relacionadas con proteínas involucradas en la división celular y la síntesis proteica.

Finalmente, se observaron siete manchas que sólo aparecieron en el perfil proteico de la cepa clínica y se observó una mancha en la cepa de referencia que no apareció en la cepa clínica. La masa y punto isoeléctrico de esta última mancha, son similares a los de la proteína KatG, que está relacionada con la resistencia a isoniazida.

Con los datos generados en este análisis, se puede concluir que el proteoma de la cepa clínica de *Mycobacterium tuberculosis* aislada en Hermosillo, Sonora, es significativamente diferente a la cepa de referencia H37Rv, por lo que es recomendable analizar las diferencias proteómicas de ambas cepas a través de la caracterización bioquímica e inmunológica de las manchas electroforéticas distintivas.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la tuberculosis, causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), es la enfermedad de origen infeccioso que produce más muertes por sí sola a escala global (Malen y col., 2008; WHO, 2012; Palma-Nicolas y Bocanegra-García, 2007). En los últimos años, la incidencia de esta enfermedad ha aumentado 67% en Sonora (Steef-López y Tovar-Guzmán, 2008).

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, cuyo control temporal en el siglo XX se debió al avance en el conocimiento de su etiología y al desarrollo de antimicrobianos eficaces (Ryan y Ray, 2004). Sin embargo, la conjunción de factores como el recrudescimiento de la pobreza mundial, la epidemia del SIDA y la diabetes, la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos y el escaso desarrollo de métodos con el valor clínico necesario para la prevención y diagnóstico oportunos de la tuberculosis, ha contribuido al incremento significativo de enfermos con tuberculosis a escala mundial (Jungblut y col., 1999; Samanich y col., 2000). Las diferencias en la distribución mundial de las distintas cepas micobacterianas (Palomino y col., 2007) que podrían influir en la interacción de la bacteria con el organismo huésped (Fleischmann y col., 2002) puede ser otro factor asociado al descontrol epidemiológico de la tuberculosis. Es importante profundizar en el estudio de las diferencias entre cepas para comprender bien la patogénesis y fisiopatología de la tuberculosis (Hirsh y col., 2004). También es posible que la comparación de distintas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* pueda brindar elementos para esclarecer las bases de la heterogeneidad en la expresión clínica de la tuberculosis (Betts y Dodson, 2000).

Algunas proteínas de *M. tuberculosis*, como ESAT6 (6-9.9 kDa), CFP 10 y TB7.7, han sido utilizadas para desarrollar métodos que solamente son útiles

para el diagnóstico de tuberculosis latente. Otras proteínas inmunodominantes recuperadas del ambiente extracelular de los cultivos *in vitro* de *M. tuberculosis* (Sonnenberg y Belisle, 1997; Smith, 2003) que podrían ser de utilidad para el diseño de métodos serodiagnósticos potencialmente útiles son la MPT64 (24-kDa), el complejo Ag85 (30 a 31-kDa) y la MPT43 (45-kDa). Sin embargo, los métodos serodiagnósticos diseñados hasta ahora con estas proteínas no tienen la validez clínica necesaria para su aplicación masiva, lo que supone que aún no se identifican las proteínas de mayor utilidad para fines diagnósticos. Es posible que la combinación de dos o más antígenos mejore el valor clínico de las pruebas diagnósticas (Bahk y col., 2004) y por ello la investigación del proteoma (totalidad de las proteínas) de *M. tuberculosis* no pierde vigencia.

Para estudiar las proteínas micobacterianas pueden usarse actualmente técnicas muy sensibles, como la electroforesis de doble dimensión en gel, una técnica poderosa para el estudio de los perfiles proteicos celulares y subcelulares (Bahk y col., 2004; Bisht y col., 2007). Esta técnica electroforética se ha usado para comparar patrones proteicos de cultivos *in vitro* de *M. tuberculosis* bajo diferentes condiciones: crecimiento extracelular e intracelular, diferentes concentraciones de hierro, etc. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo, fue iniciar una línea de investigación proteómica mediante la comparación del perfil proteico en dos dimensiones de una cepa clínica aislada de un paciente con tuberculosis de Hermosillo, Sonora, con relación al perfil de doble dimensión de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv.

Se encontraron 37 diferencias principales entre los patrones proteicos de la cepa clínica y la cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*, cuya relevancia y potencial utilidad se discuten en este trabajo.

ANTECEDENTES

Tuberculosis

Epidemiología

La tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma más común de tuberculosis y la más importante en términos epidemiológicos (Palma-Nicolas y Bocanegra-Garcia, 2007). Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2012, la tuberculosis (TB) fue la mayor causa de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo; dos años antes se estimaron 9.27 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales 4.1 millones fueron positivos a la tinción Ziehl-Nielsen, incluyendo 1.37 millones de casos en la población VIH positiva y 23% de las muertes ocurridas en este grupo poblacional. Se calcula que en el año 2011 hubo 8.7 millones de nuevos casos de TB (13% coinfectados con el VIH) y que 1.4 millones de personas murieron por esta causa (informe mundial sobre la tuberculosis 2012 por la OMS).

Los continentes con mayor incidencia de TB son Asia y África, con el 55% y 31% de los casos globales respectivamente, siendo India, China, Indonesia, Sudáfrica y Nigeria los cinco países con mayor incidencia. De los 15 países con las tasas de incidencia más altas, 12 están en África. Esto se explica, al menos parcialmente, porque África tiene la mayoría de los casos VIH positivos: 85%. El porcentaje restante se encuentra principalmente en la región sureste de Asia, principalmente en la India (WHO, 2012).

América Latina ocupa el quinto lugar en el número de infectados diagnosticados, con 300,000 diagnósticos anuales y 25,000 decesos; los países con mayor incidencia de tuberculosis son Brasil, Perú y México (Zenteno-Cuevas, 2003). De acuerdo con la OMS, en México se estimaron alrededor de 21,000 casos de tuberculosis en el 2010, con una incidencia de 16 casos por

100,000 habitantes. Aunque datos relativamente recientes señalan que la tendencia en la tasa de incidencia entre el 2000 y el 2005 decreció con relación a los años previos (González-Saldaña, 2007; USAID, 2007), otros reportes destacan que en algunos estados como Sonora los casos han ido en aumento (Tovar-Guzmán, 2008). La tendencia a la disminución en la incidencia de la TB sin tratamiento en países industrializados fue más clara (4-5%), pero podría llegar a ser hasta de 14% con una quimioterapia efectiva y buenos programas de control (Báez-Saldaña y col., 2003).

Las cifras oficiales de la Secretaría de Salud en México indican que la TB ocupa el lugar 17 como causa de muerte en la población, pero igual que en el resto del mundo, *M. tuberculosis* produce el mayor número de defunciones por sí solo que ningún otro microorganismo (Palma-Nicolas y Bocanegra-Garcia, 2007) y en Sonora, la incidencia de dicha infección ha aumentado en un 67% de 2003 a 2008. (Steeff-Lopez y Tovar-Guzmán, 2008). En el año 2010, se reportaron 733 casos tan sólo en este estado, representando el 4.7% de los casos a nivel nacional (SINAVE, 2012). El 95% de las defunciones por TBP ocurre en mayores de 15 años, afectando a la población económicamente activa; además, en los últimos años, se ha observado que cerca de dos terceras partes de los casos de TB corresponden a hombres y las enfermedades que se asocian con mayor frecuencia a la tuberculosis son la diabetes mellitus, la infección por VIH y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Secretaría de Salud de México, 2011).

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (MDR tuberculosis) y extremadamente resistente (XDR tuberculosis) a fármacos, obstaculiza los programas implementados para el control de la tuberculosis. En el 2010, se calcularon alrededor de 290,000 casos de MDR tuberculosis, 86% de estos casos se encontraban en sólo 27 países, de los cuales 15 eran del este de Europa. De los casos de tuberculosis en México, 13% son resistentes a

fármacos, ocupando el primer lugar en América (González-Saldaña, 2007; WHO, 2012).

Patogenia

La infección por *M. tuberculosis* se transmite de persona a persona a través de la inhalación de gotitas eliminadas por un enfermo con tuberculosis pulmonar activa. El desarrollo de la enfermedad depende del establecimiento y de la proliferación de los bacilos y de la propia respuesta del hospedero. Así tenemos que: 1) la bacteria puede ser eliminada efectivamente por una respuesta inmune adecuada por parte del hospedero; 2) el microorganismo puede replicarse inmediatamente después de la infección, produciendo una infección primaria; ó 3) que el bacilo puede establecerse en el pulmón sin causar enfermedad originando una infección latente (que luego puede reactivarse) (Ryan y Ray, 2004; Herrera y col., 2005; Rosas-Taraco y Arce-Mendoza, 2007).

Max B. Lurie propuso cuatro estadios para describir el desarrollo de la TBP. El primer estadio se refiere a la inhalación del bacilo y su implantación en las zonas apicales del pulmón, en donde entra en contacto con los macrófagos alveolares. Estas células ingieren el bacilo y frecuentemente lo destruyen gracias a su capacidad microbicida intrínseca. Las micobacterias que escapan a la destrucción intracelular inicial se multiplican masivamente y conducen al rompimiento del macrófago. Cuando esto ocurre los monocitos sanguíneos y otras células inflamatorias son atraídas al pulmón. Estos monocitos se diferencian en macrófagos para ingerir pero no para destruir a las micobacterias. En este estado simbiótico las micobacterias crecen logarítmicamente y los macrófagos se acumulan, pero ocurre poco daño en el tejido infectado. Dos a tres semanas después de la infección, se desarrolla la inmunidad celular a expensas de la proliferación de los linfocitos T específicos

para antígenos micobacterianos; si esta respuesta es eficiente los linfocitos T proliferan dentro de las lesiones (tubérculos) y después activan macrófagos para degradar micobacterias intracelulares y detener el crecimiento logarítmico bacilar (tercer estadio). La necrosis sólida central en estas lesiones primarias inhibe el crecimiento extracelular de la bacteria. Como resultado, la infección queda en fase estacionaria o latente. Sin embargo, bajo condiciones de inmunodeficiencia, la enfermedad puede progresar (en meses o años) gracias a la diseminación hematógica de las bacterias contenidas en las lesiones primarias (tuberculosis postprimaria). Los focos caseosos líquidos proveen condiciones excelentes para el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis*. La formación de cavidades puede llevar a la ruptura del bronquio más cercano, permitiendo que el bacilo se disemine a otras partes del pulmón y hacia el ambiente exterior. En resumen, después de la entrada al pulmón humano, el bacilo tuberculoso tiene una serie de encuentros con diferentes mecanismos de defensa del patógeno, por lo que el resultado final de la infección depende del balance entre el crecimiento y la eliminación de la bacteria, así como del grado de necrosis, fibrosis y regeneración tisular (van Crevel y col., 2002).

Mycobacterium tuberculosis

Características Generales

M. tuberculosis es una bacteria que pertenece al género *Mycobacterium*, del filum Actinobacteria. Todas las bacterias de este género, son bacilos no móviles, encapsulados y no esporulados con alto contenido de guanina y citosina en su ADN genómico. El bacilo de la tuberculosis mide de 2 a 10 µm de largo y posee una envoltura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es la capa externa de la envoltura que sirve de protección contra factores externos, por lo que interacciona de inmediato con los elementos de la respuesta inmune. La pared micobacteriana se localiza por

debajo de la cápsula, separada por un espacio periplásmico al tiempo que rodea a la bicapa lipídica. Además, la pared celular aporta las propiedades fisicoquímicas que le permiten a la micobacteria sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos. Tales propiedades están ligadas a su composición (Figura 1), que consta de un peptidoglicano con ácido N-glucolilmurámico en vez del ácido N-acetilmurámico de las bacterias Gram positivas. Existen proteínas asociadas al peptidoglicano, localizadas incluso entre éste y la membrana plasmática, algunas de las cuales se cree que son muy inmunogénicas. En la parte externa, el peptidoglicano está unido por medio de enlaces fosfodiéster a arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. Unidos a la porción distal del arabinogalactano se encuentran los ácidos micólicos (Fenton y Vermeulen, 1996; Ryan y Ray, 2004). Estos ácidos grasos son distintivos de cada especie, tienen una cadena larga ramificada de 60 a 90 carbonos y constituyen más del 60% de la masa de la pared celular.

La trehalosa, un disacárido de α -D-glucosa, forma parte de antígenos como el factor de acordonamiento y los sulfolípidos de trehalosa de la pared celular de las micobacterias (Fenton y Vermeulen, 1996; Gorocica y col., 2005). El factor de acordonamiento está formado por trehalosa y ácidos micólicos; es altamente inmunogénico y participa en diferentes funciones biológicas incluyendo la inducción de la consunción (Hunter y col., 2006). Los sulfolípidos de trehalosa son factores de virulencia que inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma en la infección tuberculosa y están constituidos por ácidos micólicos sulfatados ligados al disacárido.

Otro componente de la pared celular es el lipoarabinomanano, que está anclado a la membrana celular micobacteriana y se extiende hasta la superficie de la pared celular. Está compuesto por una mezcla de arabinosa y manosa con lipopolisacáridos fosforilados de alto peso molecular. Los lípidos de la pared

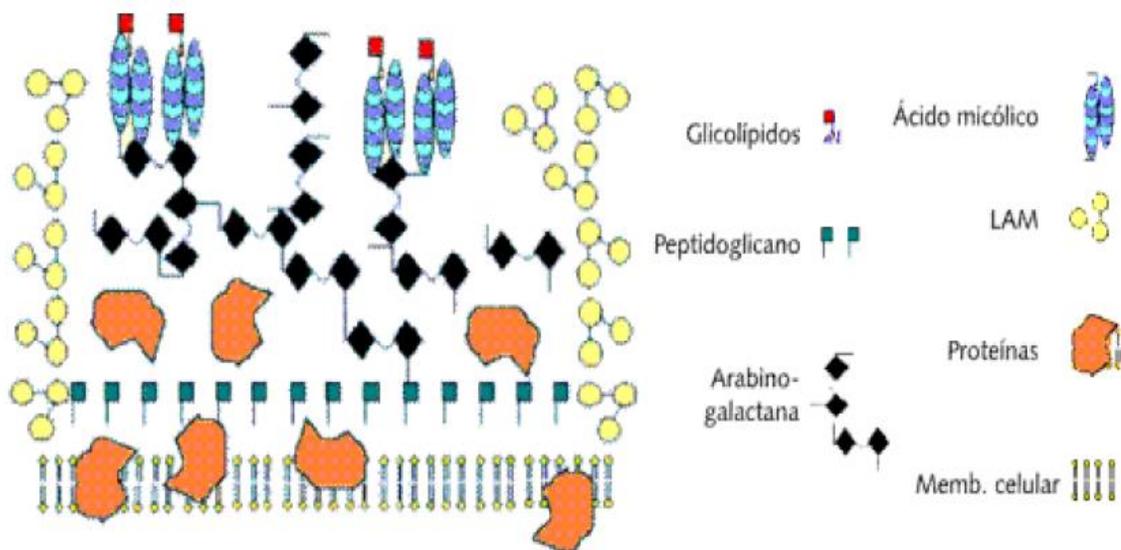


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.

Fuente: Gorocica y col., 2005.

celular la vuelven muy hidrófoba, lo que hace a las micobacterias ácido-alcohol resistentes (Ryan y Ray, 2004).

La apariencia microscópica no permite la diferenciación entre los agentes patógenos responsables de la tuberculosis. En el frotis bacteriano, estos microorganismos parecen bacilos rectos o ligeramente curvados. De acuerdo a las condiciones de cultivo, los bacilos pueden variar en forma y tamaño, desde cocobacilos pequeños a largos rodillos. Cuando la bacteria se está multiplicando activamente, muestra una evidente tendencia a formar agregados hidrofóbicos. En los tejidos, los bacilos son muy numerosos dentro de las células fagocíticas (Palomino y col., 2007).

Genoma y Proteoma de *M. tuberculosis*

Genoma de *M. tuberculosis*. El genoma es el ordenamiento de los nucleótidos y el conjunto de genes que constituyen la carga heredable de un organismo. El estudio del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y otras cepas como la CDC1551 (Cole, 2002) ha permitido conocer mejor a la bacteria, descubrir antígenos y definir nuevos objetivos farmacológicos.

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv tiene 4.4×10^6 pares de bases con aproximadamente 4,000 genes, de los cuales 200 (casi el 6% del genoma) codifican enzimas del metabolismo de ácidos grasos. Aproximadamente 100 de éstos, están relacionados con la β -oxidación de los ácidos grasos (Smith, 2003), mientras que otros parecen codificar enzimas relacionadas con la habilidad de *M. tuberculosis* para crecer en los tejidos del huésped infectado.

La micobacteria también tiene un contenido de guanina y citosina uniforme a lo largo del genoma (G-C=65.5%), lo que concuerda con su variación alélica restringida y apoya la hipótesis de que la transferencia horizontal de genes ha

estado virtualmente ausente en *M. tuberculosis*. Esto también sugiere que al ocurrir cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos, puede haber consecuencias funcionales como la resistencia a antibióticos (Sreevatsan y col., 1997).

Un grupo de genes con alto contenido de G-C de las micobacterias son los que codifican a la familia de proteínas PE y PPE (Smith, 2003; Palomino y col., 2007). Estas proteínas son ricas en glicina y de carácter ácido; sus secuencias N-terminal son Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE). De los 172 genes de este tipo, 104 son de la clase PE y 68 de la variedad PPE. En el bacilo de la tuberculosis, las proteínas codificadas por los genes PE puede subdividirse en tres clases: 29 proteínas con la región PE sola, 8 proteínas con la región PE seguida de una secuencia C-terminal y 67 proteínas que forman la subfamilia de las PE-PGRS (secuencias polimórficas repetitivas ricas en G-C), que consisten en un dominio PE seguido de una secuencia C-terminal y múltiples repeticiones en tándem de Glicina-Glicina-Alanina ó Glicina-Glicina-Asparagina. La función de estas grandes familias proteicas es desconocida, pero se ha observado que son de tamaño variable y que muchas se encuentran presentes en la pared celular y en la membrana celular. Con esta información y sabiendo de la antigenicidad de estas proteínas, se ha sugerido que al menos algunas de ellas están involucradas en las variaciones antigénicas del bacilo durante la infección (Banu y col., 2002). Por otro lado, se ha dicho que el contenido de la mayoría de los grupos de genes y sus productos son similares a los encontrados en otros microorganismos (Smith, 2003).

La secuenciación del genoma de la cepa H37Rv significó un gran avance en la biología de esta especie, pero no ha permitido explicar la complejidad de su expresión proteica. Varios estudios han demostrado que existen proteínas no predichas por los análisis genómicos, y se ha propuesto que éstas pueden ser

detectadas eficazmente por medio de análisis proteómico (Jungblut y col., 2001; Fleischmann y col., 2002).

Proteoma de *M. tuberculosis*. El proteoma refleja el estado funcional de una célula en respuesta al estímulo ambiental, y es un complemento invaluable de la genómica porque representa la expresión proteica global de un organismo (Jungblut y col., 2001). Representa no sólo el inventario de los productos génicos, sino el rango de traducción y de eventos postranscripcionales que ocurren en un organismo bajo condiciones medioambientales específicas (Betts y Dodson, 2000). Por esto, el análisis global de las proteínas compartimentalizadas puede arrojar luz sobre las interacciones hospedero patógeno, rutas metabólicas y comunicación celular.

La proteómica intenta correlacionar la diversidad funcional y estructural de las proteínas que produce un organismo con los procesos biológicos asociados, incluyendo los procesos patológicos, por lo que representa una oportunidad para identificar e investigar proteínas claves que son expresadas diferencialmente en la salud y la enfermedad. Las ramas de la proteómica incluyen la separación de proteínas, su identificación y cuantificación, análisis secuencial proteico, interacción proteómica y modificación proteica. En su sentido más amplio, involucra el estudio de la actividad de las proteínas, sus modificaciones, interacciones y localización en un organismo ó célula (Kavallaris y Marshall, 2005).

En el 2004, sólo se habían identificado cerca de 400 proteínas del proteoma de *M. tuberculosis*, quizá debido a las limitaciones de los métodos de separación utilizados. Sin embargo, el uso de nuevas técnicas para el análisis proteómico, como la electroforesis bidimensional y la cromatografía de alta resolución, acopladas a la espectrometría de masas, dieron un perfil proteico

más amplio y mejor definido (Palomino y col., 2007). En un trabajo realizado en el 2005, en el cual se fraccionaron las proteínas de acuerdo a su ubicación celular, se identificaron 705 proteínas de membrana, 306 de la pared celular, 356 en la fracción citosólica y 47 presentes en todas las fracciones analizadas (Mawuenyega y col., 2005).

Un aspecto importante del bacilo de la tuberculosis, es la diferencia que existe en la expresión proteica entre cepas, que contrasta con su escasa variación genómica. Un estudio reveló un número importante de diferencias en la composición proteica celular y los filtrados de cultivo, entre la cepa Beijing, la cepa H37Rv y dos aislamientos clínicos, que podrían ser importantes para explicar las diferencias en la virulencia de las cepas (Fleischmann y col., 2002; Pheiffer y col., 2005).

Proteínas de filtrado de cultivo. El cultivo *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* contiene un complejo grupo de proteínas en el ambiente extracelular, colectivamente llamado proteínas de filtrado de cultivo (Sonnenberg y Belisle, 1997). Este filtrado proteico contiene tanto proteínas de secreción como citosólicas y de pared celular (Castillón, 2008), que han sido relacionadas con la virulencia micobacteriana. Por este motivo, el filtrado de cultivo del bacilo de la tuberculosis parece ser una fuente para la identificación de factores de virulencia.

El estudio del filtrado de cultivo también parece ser importante porque muchas de sus proteínas generan una respuesta inmune protectora y son considerados antígenos para las células T, con un alto potencial para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico de la tuberculosis (Weldingh y col., 1998; Smith, 2003). Los intentos por identificar los componentes inmunológicamente activos dentro de esta fracción han llevado a la purificación y caracterización de proteínas como la ESAT-6 (de 6-9.9-kDa), MPT64 (24-

kDa), complejo Ag85 (30 a 31-kDa) y MPT43 (45-kDa), entre otras. Las proteínas más abundantes dentro de esta fracción del proteoma de la micobacteria son el mismo complejo antigénico 85, las proteínas inmunogénicas MPT63 y MPT64, la proteína de secreción rica en prolina-alanina MPT32, la proteína de secreción rica en prolina MPT28 y algunas de las proteínas de la familia ESAT-6. Otras dos proteínas relativamente abundantes son una posible oxidoreductasa y una probable proteína de membrana conservada (productos de los genes Rv0063 y Rv3587c, respectivamente), que aun no han sido identificadas completamente (Malen y col., 2007).

Otras proteínas de los filtrados de cultivo son las enzimas KatG (una catalasa-peroxidasa) y SodA (superóxido dismutasa), que degradan intermediarios reactivos del oxígeno y son importantes para la sobrevivencia de la micobacteria durante la infección. Se ha especulado que la localización extracelular de estas enzimas permite una detoxificación más eficiente de moléculas dañinas para la micobacteria, que son producidas en los fagosomas de las células del hospedero. También es común encontrar proteínas en los filtrados de cultivo que no tienen los péptidos señales involucrados en la secreción proteica, pero el hecho de que sean liberadas en etapas tempranas del crecimiento sugiere que su excreción es fisiológica y no dependiente de la lisis celular (Smith, 2003).

Una proteína con gran importancia inmunológica es la proteína de filtrado de cultivo 10 (CFP10), que al igual que la ESAT-6, se encuentra codificada en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pero no en el de *M. bovis* BCG. Estos antígenos estimulan intensamente a las células T de los individuos infectados, por lo que son un componente primario de los nuevos métodos de diagnóstico de la tuberculosis con los que se espera que sea detectada la infección tuberculosa latente (Hasan y col., 2009). En un estudio relativamente reciente, se menciona que las respuestas inmunes relacionadas con la ESAT-6 están

más asociadas con la infección activa que con la infección latente, por lo que para lograr distinguirla de esta última habría que determinar primero el valor clínico de otros antígenos relacionados con el estado de latencia (como la HspX ó la α -cristalina). Otros antígenos que provocan reacciones cruzadas, como el complejo 85A, no son de utilidad para realizar el diagnóstico diferencial entre tuberculosis activa y latente (Demissie y col., 2006).

Se ha demostrado que el perfil proteico de los filtrados de cultivo (conjunto de proteínas expresadas de los filtrados de cultivo) es altamente dependiente del medio de cultivo usado así como de factores tales como el tiempo, la temperatura y la agitación del cultivo. Por esta razón no ha sido posible completar el estudio de la composición proteica de esta fracción y se dispone sólo de datos parciales en la literatura actual (Sonnenberg y Belisle, 1997).

Dado que favorece el crecimiento de cultivos eugónicos de los bacilos tuberculosos, el medio líquido Sauton ha sido comúnmente utilizado para el cultivo de micobacterias, incluyendo el cultivo de la cepa BCG para la producción de la vacuna del mismo nombre (Van Deinse, 1950). Este medio tiene la característica de no estar enriquecido con proteínas y tener bajos niveles de carbohidratos (Anexo 2), lo que permite obtener proteínas de filtrado de cultivo sin gran cantidad de ácidos micólicos ni moléculas glicadas y facilita el estudio de las proteínas de esta fracción, por lo que es ampliamente usado en la investigación del proteoma de la micobacteria tuberculosa (Rosenkrands y col., 2000; Pheiffer y col., 2005; Malen y col., 2007).

Electroforesis de dos dimensiones. A pesar del progreso hecho en el desarrollo de técnicas alternativas para la separación de proteínas, la electroforesis en dos dimensiones (o de doble dimensión en gel) es la técnica más poderosa en el estudio de los patrones proteicos, porque permite una alta

definición del perfil de las proteínas expresadas a nivel celular y subcelular. Se basa en la separación de proteínas por dos parámetros, el punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión y el peso molecular en la segunda dimensión (Bahk y col., 2004; Bisht y col., 2007). Cada mancha en el gel de doble dimensión, corresponde potencialmente a una proteína de la muestra. De ahí que cientos de proteínas diferentes puedan ser separadas y se pueda obtener información como el pI, el peso molecular aparente y la cantidad de cada proteína (Berkelman y col., 1998; Görg y col., 2007).

La electroforesis de doble dimensión se ha aplicado exitosamente al estudio de las proteínas del bacilo de la tuberculosis en varios estudios, con los que se han generado mapas proteómicos como el que se muestra en la figura 2. También se han comparado los perfiles proteicos expresados por la bacteria en condiciones aeróbicas y anaeróbicas; en estos estudios, se ha observado que se altera significativamente la expresión proteica de la bacteria bajo estrés anaerobio y se degradan proteínas inmunodominantes como la Gro-EL2 (Starck y col., 2004). Con la electroforesis en doble dimensión, también se ha demostrado que la concentración de hierro influye en la expresión proteica y se han logrado identificar proteínas como la Fur y el homólogo de la aconitasa, conocidas en otras bacterias por su papel en la regulación del hierro, que en el caso de las micobacterias podrían ser reguladores transcripcionales de la expresión diferencial de otras proteínas bajo diferentes concentraciones de hierro en el medio de cultivo (Wong y col., 1999).

Hasta ahora los intentos por esclarecer las diferencias proteicas entre las cepas de referencia y las clínicas han demostrado que el problema no pierde vigencia debido a que hay muchos aspectos no resueltos. Betts y Dodson, en el año 2000, publicaron los resultados de ensayos dirigidos a comprobar que la cepa de referencia H37Rv de *M. tuberculosis* no ha perdido su virulencia. El perfil proteico en doble dimensión de la cepa H37Rv se comparó con la cepa

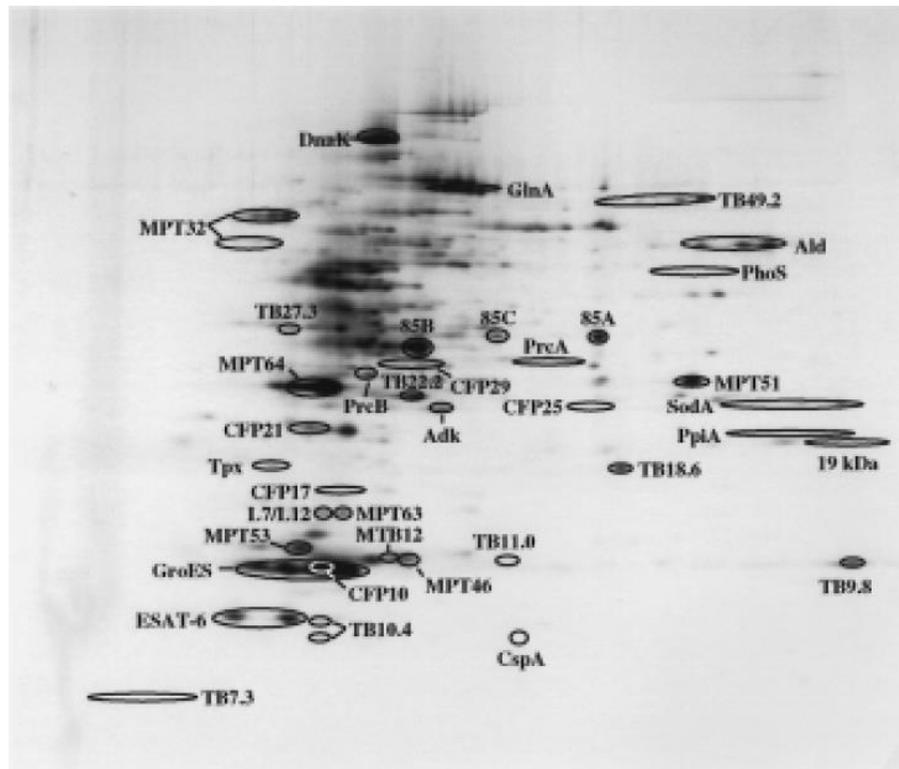


Figura 2. Mapa proteómico en dos dimensiones de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv.

Fuente: Rosenkrands y col., 2000^a.

CDC 1551 altamente inmunogénica. Se identificaron algunas proteínas con punto isoeléctrico diferente, pero se llegó a la conclusión de que la cepa CDC 1551 no es más virulenta que la H37Rv, pero que induce una respuesta inmune más vigorosa por parte del hospedero (Betts y Dodson, 2000).

En 2007 se publicó un estudio en el que se realizó un análisis de los filtrados de cultivo de *M. tuberculosis* con la presencia mínima de proteínas citosólicas.

En él se identificaron 257 proteínas, 159 de las cuales tenían péptidos señales en el extremo N-terminal específicos para su secreción a través de la membrana citoplasmática. Además, 92 de las proteínas identificadas no habían sido registradas previamente y 51 no presentaron semejanza con proteínas caracterizadas anteriormente, demostrando que existen muchas proteínas con funciones desconocidas en el subproteoma de secreción de la micobacteria (Malen y col., 2007).

Análisis de imágenes de geles de electroforesis de dos dimensiones. El análisis de las imágenes basado en programas computacionales, es un paso crucial en la interpretación biológica de los experimentos electroforéticos de dos dimensiones, ya que permiten el análisis de ensayos grandes, que abarca desde la adquisición de las imágenes de los geles, la cuantificación de las manchas, la creación de perfiles de expresión seguido del análisis estadístico de dichos perfiles, hasta la presentación de los resultados (Berth y col., 2007).

Entre los avances logrados en los programas para análisis de datos, se encuentra la creación de un algoritmo que combina la información de varios geles en uno solo, llamado 'gel de fusión', que hace posible generar un mapa proteómico que es representativo del experimento completo (Luhn y col., 2003). En un mapa proteómico se pueden detectar todas las manchas proteicas de un

experimento en una sola imagen y pueden servir como un patrón consenso válido para todo el conjunto de geles del experimento. Esto permite obtener perfiles de expresión completos para un análisis estadístico confiable. (Berth y col., 2007). El PDQuest (BioRad) es un programa que permite este tipo de análisis.

Para el procesamiento de las imágenes, el PDQuest utiliza densitómetros con detectores de luz o radiación que convierten las señales de muestras biológicas en datos digitales, para después desplegar los datos en un monitor en forma de imágenes a color o en escala de grises. Cada dato que se muestra en la pantalla está compuesto de píxeles y tiene una coordenada en el eje Y y X y un valor de Z. En la imagen, las coordenadas X y Y corresponden a las variables pH y punto isoeléctrico, respectivamente, y Z es la intensidad de la señal del pixel.

Para la detección de las manchas proteicas en el PDQuest, la imagen original es filtrada y suavizada para clarificar las manchas, y finalmente crear manchas Gaussianas en tres dimensiones. Las manchas borrosas o sobrepuestas pueden ser difíciles de distinguir o cuantificar. Dado que el perfil de la imagen de una mancha ideal forma una curva de Gauss, el PDQuest utiliza el modelaje Gaussiano para identificar y cuantificar las manchas con precisión.

El PDQuest permite además crear y editar 'geles de fusión' y así mismo, provee una variedad de herramientas analíticas para determinar cuáles manchas son estadística y científicamente significativas (BioRad, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sesgos Experimentales Previstos

En este trabajo, se obtuvieron filtrados proteicos del cultivo líquido de la cepa de referencia H37Rv y de una cepa clínica aislada de un paciente de Hermosillo, Sonora, evitando los siguientes sesgos experimentales para descartar del estudio las cepas no idóneas:

- Contaminación de los cultivos por otras bacterias y por hongos.
- Desnaturalización proteica de los filtrados de cultivo.
- Falta total o parcial de información confirmatoria (oficial) de la identidad de las cepas (de referencia y clínica) de *M. tuberculosis*.
- Cambios en las condiciones óptimas de los ensayos electroforéticos, como temperatura, tiempos de incubación, tiempos de corrida y tinción.

Muestras Utilizadas

Se ensayaron únicamente dos muestras, una con la cepa de referencia H37Rv y otra con una cepa clínica (Ver Tabla I). Se hicieron 4 repeticiones del experimento para cada cepa, lo que permitió alcanzar un poder de 0.8, con una razón de cambio de 2 veces, lo que garantiza que el estudio fue capaz de detectar un incremento del doble de la intensidad de la señal de una mancha proteica de la cepa clínica, con respecto a la de referencia, según lo recomendado por la bibliografía (Karp y Lilley, 2007; Karp y col., 2007).

Tabla I. Definición conceptual de la muestra, criterios de inclusión y exclusión de las muestras.

Muestras	Definición	Inclusión	Exclusión
1. Cepa de Referencia	Linaje de una cepa bacteriana que ha sido ampliamente tipificada y caracterizada, que se ha convertido en modelo de estudios microbiológicos (Bifani y col., 2000)	Cepa: <ul style="list-style-type: none"> • BAAR (+) • Proporcionada como H37Rv por el INDRE 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación de la cepa
2. Cepa Clínica	Cepa bacteriana que ha sido aislada a partir de una muestra clínica, que no ha sido ampliamente caracterizada (Bifani y col., 2000)	Cepa: <ul style="list-style-type: none"> • BAAR (+) • Confirmada por PCR como <i>M. tuberculosis</i> • Procedente de Hermosillo (LESP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminación de la cepa

Operacionalización de Variables

Las variables fueron definidas de acuerdo a la tabla presentada en el Apéndice 1.

Plan de Procesamiento y Análisis de Datos

El análisis de la variable cuantitativa (intensidad de la señal densitométrica) se llevó a cabo por medio de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para probar la siguiente hipótesis nula: La mediana de la intensidad de la señal (también llamada volumen de la mancha; ver apéndice I) de cada mancha proteica de la cepa clínica es diferente a la de la mancha proteica correspondiente detectada en la cepa de referencia. Para lograr lo anterior, se hicieron cuatro repeticiones de la electroforesis en doble dimensión de los filtrados de cultivo de ambas cepas y se determinó la densidad de cada una de las manchas detectadas en los geles usando un comando automatizado del programa PD Quest™ Advanced v8.0.1 (BioRad®). Posteriormente, se verificó que las manchas que resultaron ser estadísticamente diferentes entre los geles estuvieran presentes en al menos tres de las cuatro repeticiones de cada gel, como es recomendado (BioRad, 2005) y solo éstas se tomaron como manchas verdaderamente diferentes para estimar la mediana de la densidad de cada una de las manchas detectadas en los geles.

Se concluyó que una mancha proteica (variable cualitativa) estaba ausente en alguna de las cepas cuando se observó:

1. Que el valor de p fue \leq a 0.05, al comparar la mancha específica entre los geles por medio de la prueba U de Mann Whitney.
2. Que la masa molecular, punto isoeléctrico y la intensidad de la mancha, fueran iguales en todas las repeticiones en las que se observó la mancha.

3. Que la intensidad de la mancha fuera igual a cero en todas las repeticiones de la cepa donde no se detectó, y que no existiera otra mancha cercana con la que pudiera confundirse.

Cualquier diferencia detectada tanto en la presencia de proteínas (una sola proteína diferente) así como en la cantidad proteica (dos veces más o menos de una proteína en la cepa clínica respecto a la de referencia), confirman que el patrón proteico de filtrado de cultivo de una cepa clínica es diferente a la cepa de referencia.

Cultivo de las Cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Las proteínas de filtrado de cultivo se obtuvieron a partir de una cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y de una cepa clínica aislada de una persona con tuberculosis de Hermosillo, Sonora.

La cepa de referencia fue tipificada en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). La cepa clínica fue seleccionada al azar de una lista de cepas que habían sido utilizadas en estudios anteriores (Bolado-Martínez y col., 2012), y que fueron aisladas e identificadas como *M. tuberculosis* por el Departamento de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP). Ambas cepas, fueron generosamente donadas por la misma institución para la realización de este trabajo.

Protocolo de Cultivo de la Cepa de Referencia

La manipulación de las cepas se llevó a cabo en el Departamento de Micobacterias del LESP y durante la realización de los procedimientos se trabajó en una campana de bioseguridad tipo III. Se partió de un cultivo en tubo, con el medio Löwenstein-Jensen, de 4 semanas de desarrollo de la

micobacteria, que fue proporcionado por el personal del LESP. Las colonias bacterianas se disolvieron en solución salina fisiológica estéril, y todo el inóculo generado se utilizó para inocular tres matraces Erlenmeyer de vidrio de 1 litro conteniendo aproximadamente 650 mL del medio líquido Sauton. Las suspensiones celulares fueron incubadas a 37°C durante cuatro semanas sin agitación. Se inocularon placas de agar sangre con una muestra del contenido de cada matraz antes de iniciar la incubación, que fueron observadas al tercer día de haber sido inoculadas. Cuando fue detectada la aparición de cualquier colonia en el agar (indicativa de contaminación por microorganismos no micobacterianos) se desechó e inactivó el contenido del cultivo micobacteriano del matraz correspondiente (Castillón, 2008; Monge-Villegas, 2011).

Protocolo de Cultivo de la Cepa Clínica

Dado que investigaciones anteriores evidenciaron que la velocidad de crecimiento de las cepas clínicas tiende a ser menor que las de referencia (von Groll y col., 2010), se estandarizó un protocolo que asegurara la obtención de la cantidad necesaria de proteína para realizar los estudios. Primeramente, la cepa que se encontraba almacenada en leche descremada a -70°C fue descongelada a temperatura ambiente, para llevar a cabo su reactivación inoculando 2 tubos con medio de Löwenstein-Jensen en plano inclinado, que fueron incubados a 37°C durante cuatro semanas. Al término de esta primera incubación, se tomaron las colonias de los tubos y se disgregaron con perlas de vidrio en una solución salina fisiológica estéril. Posteriormente, la suspensión de micobacterias fue resembrada en 4 tubos de medio Löwenstein-Jensen, que fueron incubados bajo las mismas condiciones que el cultivo anterior. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano, las colonias fueron resuspendidas en solución salina como se describió anteriormente, para finalmente inocular tres matraces Erlenmeyer de vidrio de 1 L, conteniendo aproximadamente 650 mL

del medio líquido Sauton. Los matraces fueron incubados a 37°C durante cuatro semanas sin agitación. Antes de inocular los matraces y para descartar la contaminación de la suspensión celular con otras bacterias, se aplicó una alícuota de la suspensión a una placa de agar sangre. Este procedimiento se realizó también con el contenido de cada uno de los matraces Erlenmeyer antes de inocularlos con la suspensión micobacteriana. Los cultivos de agar sangre se observaron al tercer día, y la aparición de cualquier colonia fue motivo suficiente para la inactivación y el desecho de los cultivos micobacterianos.

Obtención del Filtrado de Cultivo

Para obtener las proteínas acumuladas en el medio de cultivo, el contenido de los matraces se filtró por un sistema de filtración acoplado a una bomba de vacío, utilizando una membrana de nylon con punto de corte de 0.2 µm (Millipore, USA) y se inocularon placas de agar sangre con el filtrado para comprobar que no estuviera contaminado. Los filtrados se sometieron a un proceso de concentración por un sistema de filtración con membrana de nitrocelulosa con punto de corte de 10,000 Da en una centrífuga refrigerada a 4°C (Sigma Chemical Co, St Louis Mo, USA). Después se dializaron en pequeñas fracciones contra agua tridestilada en agitación y a 4°C. Por último, las fracciones proteicas se liofilizaron (Labconco Corporation, Kansas City, Mo, USA) y almacenaron en refrigeración a 4°C hasta la realización de las electroforesis.

Estimación Proteica del Filtrado de Cultivo

La estimación de la concentración proteica de filtrado de cultivo se realizó por el método de Bradford (Bradford, 1976) en microplaca, utilizando albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) como proteína estándar para la

curva de calibración. El rango de concentración de la curva fue de 3.125 µg/mL a 100 µg/mL. La lectura de las absorbancias se realizó en un lector de microplacas Benchmark Microplate Reader (BioRad®) a una longitud de onda de 570 nm.

Electroforesis SDS-PAGE

La masa de los componentes proteicos de los filtrados proteicos de *Mycobacterium tuberculosis*, se estimó por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970) en geles de poliacrilamida (15%) en una cámara vertical MiniProtean®3 (BioRad®) a 100 volts constantes. Se cargaron 5, 7.5 y 10 µg de proteína por pozo de los filtrados de ambas cepas micobacterianas (H37Rv y la cepa clínica) en el mismo gel de poliacrilamida. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie (Altschul y Evans, 1967). La masa de las diferentes bandas se estimó empleando proteínas estándares para electroforesis (BioRad®). Los geles se analizaron usando el programa ImageLab™ v 3.0 acoplado a un fotodocumentador Gel Doc™ XR (ambos de BioRad®).

Electroforesis en Dos Dimensiones

Para obtener los perfiles electroforéticos en doble dimensión de la cepa clínica y la de referencia, se utilizó el método descrito por primera vez por P. H. O'Farrell (O'Farrell, 1975), con las modificaciones propuestas por A. Görg (Görg y col., 1988). Se cargaron 216 µg de proteína por tira, con un gradiente inmóvil de pH 4-7, disueltos en la solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M -Sigma-Aldrich Inc, St Louis Mo, USA-, 3-[(3-coladomidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato al 4% -CHAPS, BioRad®, ditiotreititol al 2% -DTT, Sigma-Aldrich Inc, St Louis Mo, USA- y anfolitos al 2%) en incubación con la muestra

durante toda una noche.

El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en una cámara Protean[®] IEF Cell (BioRad[®]). Para ello, la tira se equilibró previamente, durante 20 minutos, en una solución de DTT al 2% y otros 20 minutos en una solución de iodoacetamida al 2.5% (Sigma-Aldrich Inc, St Louis Mo, USA). La electroforesis SDS-PAGE se realizó como se describió previamente, utilizando una solución comercial de agarosa al 0.5% (BioRad[®]) como sellador de la tira. Para visualizar los perfiles electroforéticos, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Altschul y Evans, 1967) y se escanearon con un densitómetro de alta resolución (Molecular Imager GS-800[™] de BioRad[®]). Las imágenes resultantes se analizaron con el programa Quantity One v4.6.9 (BioRad[®]), con el que se calcularon los pesos moleculares y puntos isoeléctricos. Las comparaciones entre los geles se realizaron con el PD-Quest Advanced v8.0.1 (BioRad[®]), utilizando la prueba estadística para datos no paramétricos U-Mann-Whitney y regresiones lineales para probar la relación entre las réplicas de las cepas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepa de Referencia H37Rv

El rendimiento proteico del cultivo de la cepa de referencia R37Rv, por litro de cultivo, fue estimado utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina en un rango de 3.125 a 100 µg/mL ($r^2 = 0.995$; Bradford, 1976). Se obtuvo un rendimiento promedio de 1,830 µg de proteína por litro del medio de cultivo Sauton, una cantidad de proteína suficiente para realizar los ensayos electroforéticos en una y dos dimensiones.

Perfil Electroforético en una Dimensión

La posibilidad de detectar ciertas bandas proteicas en electroforesis de una dimensión, depende en gran medida de los métodos usados para la documentación y análisis de los perfiles electroforéticos. Naturalmente, los fotodocumentadores de última generación son los que permiten la adquisición de imágenes de alta resolución que facilitan la visualización y el reconocimiento de las bandas, incluso las de baja densidad. Igualmente, la influencia de las variaciones de los protocolos utilizados para la obtención de las proteínas de filtrado de cultivo, que se reflejan en el perfil electroforético, pueden ser detectadas con estos métodos novedosos.

En este trabajo, los resultados de la electroforesis SDS-PAGE en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa H37Rv, se analizaron con el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®). En la literatura, se han reportado hasta 33 bandas proteicas, siendo las de masa molecular de 20 a 24 y de 100 a 105 kDa las más abundantes (Andersen y col., 1991). En contraste con tales resultados, en el presente trabajo se observaron 40 bandas, con pesos moleculares en el rango de 9 a 116 kDa; las de mayor abundancia

relativa se observaron entre los pesos moleculares de 9 a 12 kDa, de 30 a 38 y de 71 a 76 kDa, con el 26.4%, 10.5% y 7% del total de las bandas, aproximadamente (Figuras 3 y 4). En estos rangos de masa molecular, las proteínas que se reportan en la literatura son la ESAT 6 (early secreted antigen target, de 6-9.9 kDa), CFP (de 10 kDa), complejo antigénico 85 (de 30 a 32 kDa), homólogo del PstS de 38 kDa, HSP F84.1 de 76 kDa y la HSP70 de 70 kDa, entre otras proteínas con importancia inmunogénica (Uniprot.org; Smith, 2003; De Souza y col., 2011). No se observaron tres bandas de la región entre 21 y 25 kDa que han sido reportadas en la literatura (Andersen y col., 1991; Malen, 2007), pero en cambio se detectaron bandas de 11-15, 90-95 y 105 -114 kDa.

Las bandas entre los 107 y 116 kDa que se muestran en la figura 3 de este trabajo, no se observaron en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio (Monge-Villegas, 2011) con condiciones de cultivo similares, en el que en cambio se presentaron varias bandas entre los 132 y 138 kDa, probablemente porque el tiempo de corrida fue mayor (alrededor de dos horas y media) con relación a los del presente trabajo.

En los estudios clásicos realizados por Andersen y colaboradores (1991), se analizaron proteínas de filtrado de cultivo con 14 días de incubación del bacilo. En esta fase de crecimiento bacteriano (logarítmico), se observa un perfil de proteínas muy diferente al de los cultivos de 4 semanas de incubación (como el del presente trabajo) en los que, a diferencia de los cultivos jóvenes, se advierte la abundancia de proteínas de estrés térmico y la disminución de otras por el envejecimiento del cultivo (Castillón, 2008).

Muchas veces la presencia de proteínas que se expresan en forma abundante enmascara las bandas que se expresan solamente bajo las condiciones de cultivo seleccionadas, especialmente cuando éstas se encuentran en baja concentración. Por ejemplo, en este trabajo no se detectó

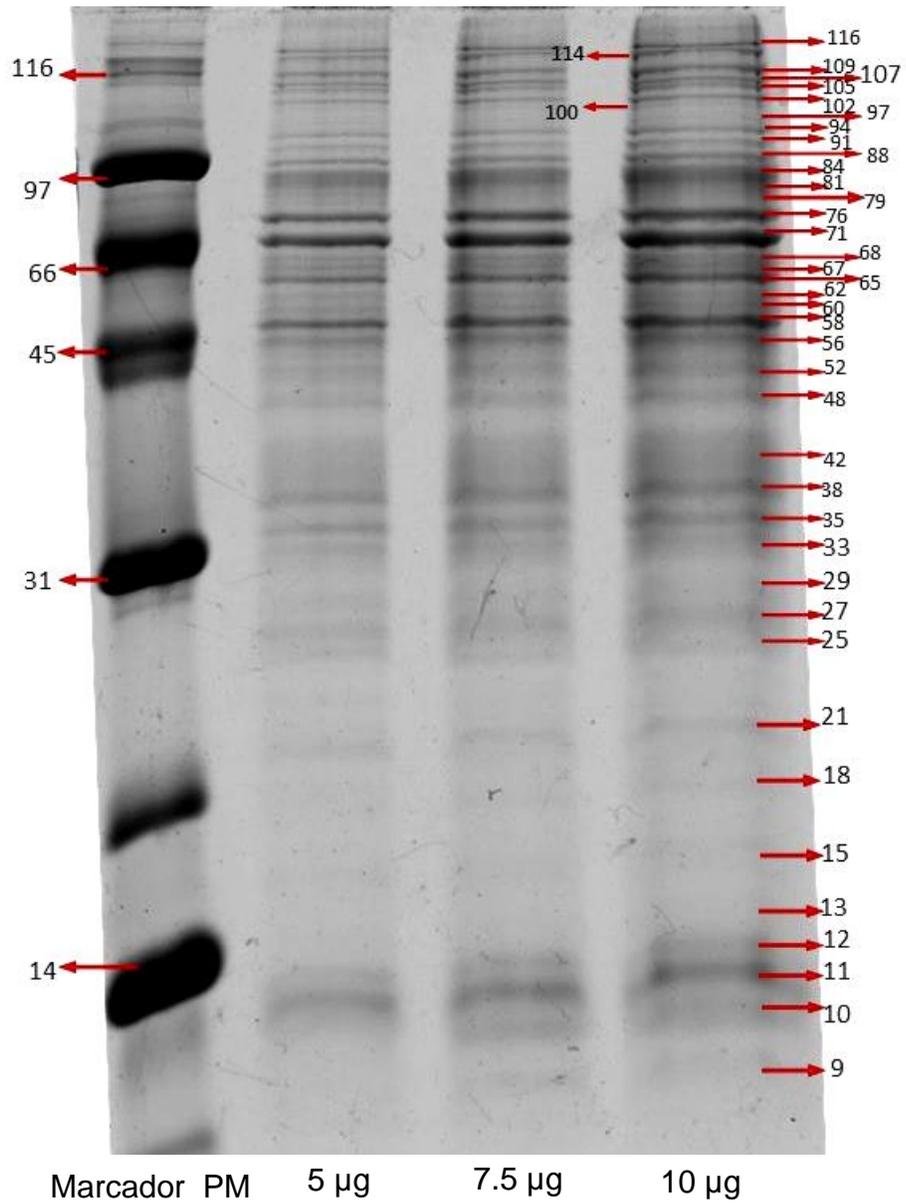


Figura 3. Perfil electroforético en una dimensión, de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivado en medio líquido Sauton.

PM: Peso molecular BioRad, USA.

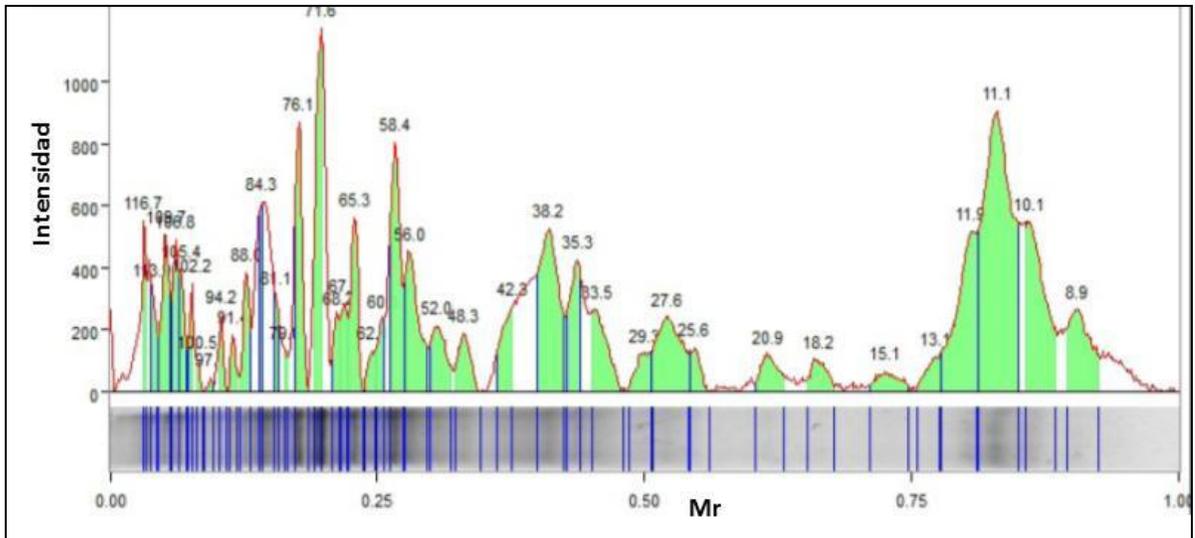


Figura 4. Densitograma de la electroforesis en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivado en medio Sauton. Gráfico de resultados arrojado por el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®).

Intensidad: Densidad óptica por pixel.

Mr: Migración relativa.

Las bandas más abundantes se encontraron entre los pesos moleculares de 9 a 12 (26.4%), de 30 a 38 (10.5%) y de 71 a 76 kDa (7%).

(Figura 4) una banda de 23 kDa que ha sido observada en otros trabajos, como el de Monge-Villegas, 2011 y el de Deshpande de 1993.

Sin embargo, cabe la posibilidad de que esta banda no haya sido observada por la abundancia de bandas de masa cercana, como las de 30 a 32 kDa (complejo Antígeno 85) que al igual que en otros estudios (Landowski y col., 2001) mostraron una densidad (Figura 4) lo suficientemente elevada como para enmascarar también otras bandas de la región entre 20 y 30 kDa.

Otras fracciones observadas en la electroforesis en una dimensión de la cepa H37Rv, que también fueron muy abundantes en el filtrado de cultivo obtenido en otros estudios, fueron las bandas de 10 a 15, 30 a 35 y 50 a 75 kDa (Malen y col., 2007; Malen y col., 2008).

Perfil Electroforético en Dos Dimensiones

Se realizaron cuatro repeticiones de la electroforesis en dos dimensiones de las proteínas de la cepa H37Rv, que posteriormente se analizaron mediante el programa PDQuest Advanced v8.0.1 (BioRad®). Las manchas peptídicas fueron detectadas automáticamente por el programa, y subsecuentemente se hizo un análisis manual para descartar estrías y artefactos. Se detectó un promedio de 364 manchas peptídicas por gel, de las cuales, alrededor de 96.2% estuvieron presentes en todos los geles (las cuatro repeticiones). La masa molecular de las manchas peptídicas se encontró entre 6.6 y 82.9 kDa. La mancha con menor punto isoeléctrico fue de 4.2 y el de mayor punto isoeléctrico de 6.5 (Figura 5). El coeficiente de correlación entre las repeticiones fue de 0.8245, por lo que fueron aceptados los resultados (Garrels, 1989), y es similar a los reportados por otros estudios de análisis proteómico (Zhang y col., 2003; Vydra y col., 2008).

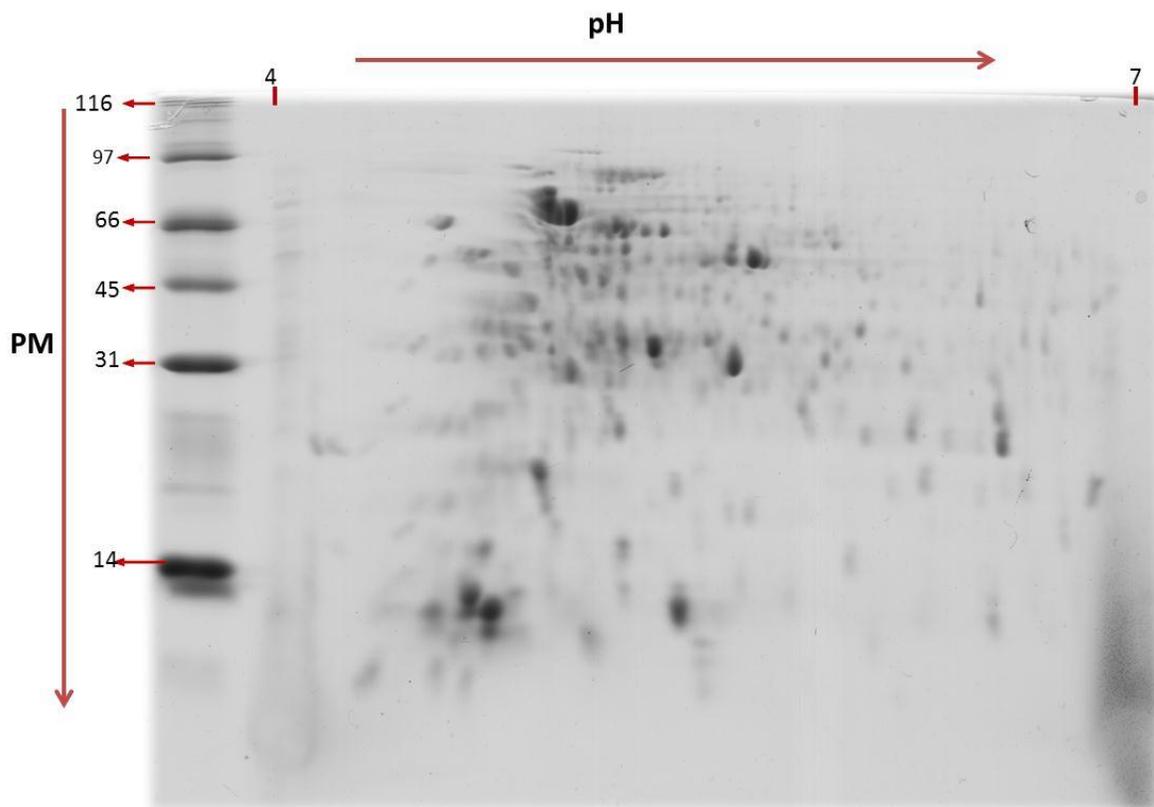


Figura 5. Perfil electroforético en dos dimensiones de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivado en medio Sauton.

PM: Peso molecular.

El mapa proteómico en dos dimensiones generado en este estudio, es muy similar a los publicados en reportes previos (Figura 2) y se encontraron manchas peptídicas que pudieron ser asociadas con proteínas micobacterianas específicas, con base en parámetros como la masa molecular, punto isoeléctrico y densidad.

Como se muestra en la figura 5, se localizaron las manchas comúnmente asociadas con la chaperonina de 60 kDa, el antígeno MPT 32, tres proteínas del complejo antígeno 85, la superóxido dismutasa A, la CFP de 10 kDa, y la ESAT de masa reportada entre 6 y 9.9 kDa, entre otras (Sonnenberg y Belisle, 1997; Weldingh y col., 2000; Malen y col., 2008).

En la bibliografía se han reportado proteínas de filtrado de cultivo de incluso hasta de 200 kDa, pero sólo en los perfiles electroforéticos en una dimensión (Andersen, 1991; Malen 2007). Sin embargo, en los mapas proteicos generados por las electroforesis en dos dimensiones, los pesos moleculares máximos encontrados están alrededor de 86 kDa, debido a las complicaciones intrínsecas a la técnica (Rosenkrands, 2000a; Malen, 2008; *Proteome 2D-PAGE Database*, 2012). Es probable que por esta misma razón, en el presente trabajo se hayan perdido las manchas peptídicas de 90 a 116 kDa que se observaron en el perfil de una dimensión.

Cabe destacar, que a pesar de que en este trabajo se utilizaron minigeles para la electroforesis en doble dimensión, el número de manchas peptídicas identificadas densitométricamente fue mayor al obtenido por Malen y colaboradores (2007), quienes observaron 257 manchas en esta misma fracción proteica usando un gel de tamaño mediano. En otros estudios, usando geles de dimensiones mayores, se ha conseguido la identificación de más de 500 manchas proteicas con el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. El mapa proteómico en dos dimensiones generado en este estudio, es muy similar a los publicados en reportes previos (Figura 2) y se encontraron manchas peptídicas

que pudieron ser asociadas con proteínas micobacterianas específicas, con base en parámetros como la masa molecular, punto isoelectrico y densidad.

Como se muestra en la figura 5, se localizaron las manchas comúnmente asociadas con la chaperonina de 60 kDa, el antígeno MPT 32, tres proteínas del complejo antígeno 85, la superóxido dismutasa A, la CFP de 10 kDa, y la ESAT de masa reportada entre 6 y 9.9 kDa, entre otras (Sonnenberg y Belisle, 1997; Weldingh y col., 2000; Malen y col., 2008).

En la bibliografía se han reportado proteínas de filtrado de cultivo de incluso hasta de 200 kDa, pero sólo en los perfiles electroforéticos en una dimensión (Andersen, 1991; Malen 2007). Sin embargo, en los mapas proteicos generados por las electroforesis en dos dimensiones, los pesos moleculares máximos encontrados están alrededor de 86 kDa, debido a las complicaciones intrínsecas a la técnica (Rosenkrands, 2000a; Malen, 2008; *Proteome 2D-PAGE Database*, 2012). Es probable que por esta misma razón, en el presente trabajo se hayan perdido las manchas peptídicas de 90 a 116 kDa que se observaron en el perfil de una dimensión.

Cabe destacar, que a pesar de que en este trabajo se utilizaron minigeles para la electroforesis en doble dimensión, el número de manchas peptídicas identificadas densitométricamente fue mayor al obtenido por Malen y colaboradores (2007), quienes observaron 257 manchas en esta misma fracción proteica usando un gel de tamaño mediano. En otros estudios, usando geles de dimensiones mayores, se ha conseguido la identificación de más de 500 manchas proteicas con el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Mawuenyega y col., 2005). Este número se ha multiplicado (>2,000) en los estudios más recientes (De Souza y col., 2011), gracias a la mejor separación de las manchas originadas por el uso de geles de mayor tamaño.

Cepa Clínica de *M. tuberculosis*

La cepa clínica seleccionada fue la H8306, nombrada de esta forma con un sistema arbitrario de nomenclatura en el que la H se refiere a que fue aislada de un humano; los siguientes dos números muestran que fue la cepa número 83 aislada durante el año 2006 (indicado por los dos últimos números) en el LESP. Esta cepa provino inicialmente de una muestra de expectoración de un paciente masculino de 42 años, que habitaba en Hermosillo, Sonora con recaídas de tuberculosis constantes entre los años 2002 y 2007, hasta su fallecimiento en este último año. Fue clasificada como resistente a isoniazida por el InDRE, según consta en las actas del Departamento de Micobacterias del LESP.

Se han reportado estudios en los que se demuestra que el crecimiento *in vitro* de la mayoría de las cepas clínicas es menor que las de referencia (von Groll y col., 2010). Por esta razón, se utilizó 4 veces más cantidad de inóculo que el utilizado en los cultivos de la cepa H37Rv; así, se obtuvo un rendimiento proteico de 2,197 µg por litro de cultivo, similar al de la cepa de referencia.

Perfil Electroforético en Una Dimensión

El perfil electroforético en una dimensión de la cepa clínica H8306, fue analizado con el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®). Se distinguieron 42 bandas (dos más que en la cepa de referencia) con masas moleculares entre 8 y 117 kDa (Figura 6), un rango similar al de la cepa H37Rv. Las bandas más abundantes estuvieron en los rangos de 9-13 kDa, 30-38 y 71-76 kDa, con el 22.9, 12.8% y 7.4%, respectivamente (Figura 7).

La homología gráfica de los densitogramas de la cepa clínica y la cepa de referencia es evidente (Figura 8), sin embargo la densidad de la región de baja

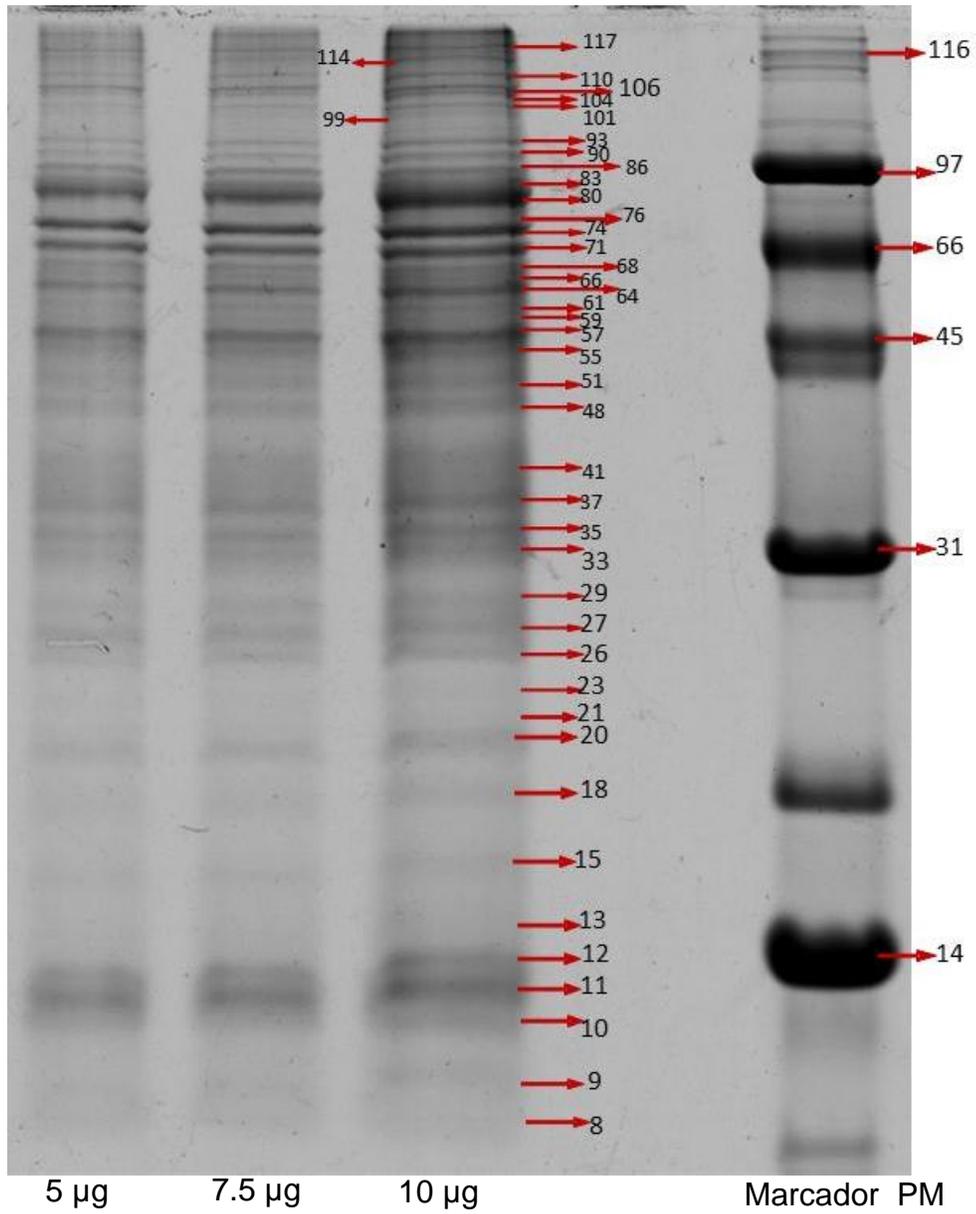


Figura 6. Perfil electroforético en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv.

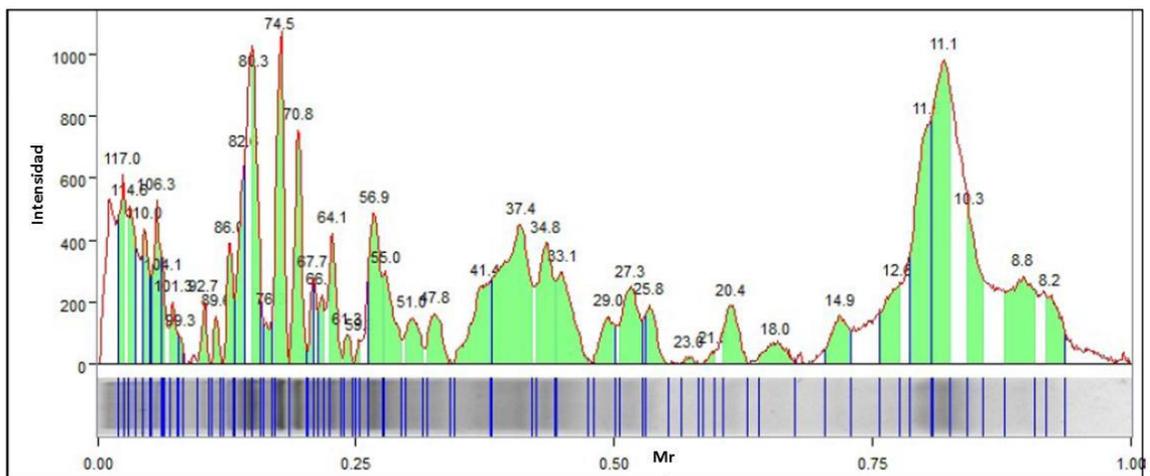
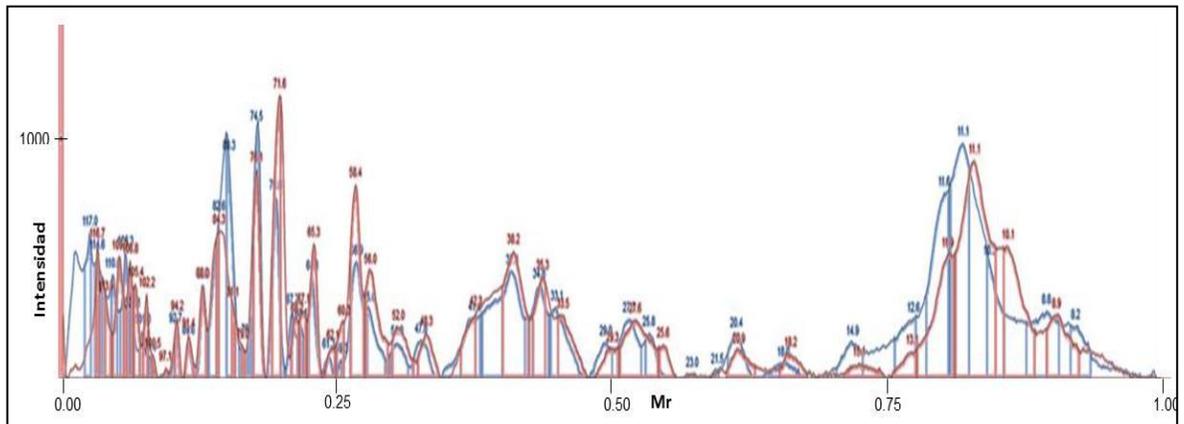


Figura 7. Densitograma de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H3706, cultivado en medio Sauton. Gráfico de resultados arrojado por el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®)

Intensidad: Densidad óptica por pixel.

Mr: Migración relativa.

Las bandas más abundantes están en los rangos de 9-13 kDa, 30-38 y 71-76 kDa, con el 22.9, 12.8% y 7.4%, respectivamente



— Cepa Clínica *M. tuberculosis* H8306
 — Cepa de Referencia *M. tuberculosis* H37Rv

Figura 8. Comparación de los densitogramas de las proteínas de filtrado de cultivo de las cepas micobacterianas clínica y de referencia, arrojado por el programa Image Lab™ v3.0 (BioRad®).

Intensidad: Densidad óptica por pixel

Mr: Migración relativa

masa molecular (principalmente en la región de 9-13 kDa) fue mayor en el densitograma de la cepa clínica. Este aumento en la densidad coincide con la observación de que una mancha de masa molecular de 8.2 kDa se presentó solamente en el densitograma de la cepa clínica. Otras tres manchas, con masas moleculares de 21.5, 23 y 74.5 kDa (Tabla II) también se observaron únicamente en la cepa clínica.

En cambio, la densidad en la región de 30 a 38 kDa de la cepa de referencia fue superior a la de la cepa clínica. Además, la cepa H37Rv mostró dos bandas de 94 y 97 kDa que no fueron detectadas en el perfil electroforético de la cepa clínica.

Las bandas con pesos moleculares entre los 71 y 76 kDa tienen una densidad muy parecida en ambas cepas, pero interesantemente, la intensidad de la banda de 71 kDa fue mayor en la cepa de referencia que en la cepa clínica.

Todas estas diferencias entre los perfiles proteicos podrían estar relacionadas con diferencias en la expresión génica entre la cepa de referencia y la clínica, pero también con la presencia de manchas proteicas que enmascaran la presencia de las bandas no observadas.

Perfil Electroforético en Dos Dimensiones

Al igual que con la cepa referencia, se hicieron 4 réplicas de las electroforesis en dos dimensiones de la cepa clínica. Las manchas peptídicas se identificaron automáticamente con el programa PDQuest™ Advanced v8.0.1 (BioRad®) y se hizo el análisis manual para descartar estrías y artefactos. Las regresiones lineales realizadas entre las réplicas de este grupo, mostraron coeficientes de correlación lineal de 0.8466. Al igual que en la cepa de referencia, se detectó un

Tabla II. Lista de las bandas peptídicas (por masa molecular) observadas en las cepas de referencia y clínica. Enmarcadas en recuadros se enlistan las bandas que se presentan sólo en los perfiles unidimensionales de alguna de las dos cepas.

No. Banda	Referencia	Clínica	No. Banda	Referencia	Clínica	No. Banda	Referencia	Clínica
1	116.7	117	16		74.5	31	29.3	29
2	113.9	114.6	17	71.6	70.8	32	27.6	27.3
3	109.7	110	18	68.2	67.7	33	25.6	25.8
4	106.8	106.3	19	67.1	66.1	34		23
5	105.4	104.1	20	65.3	64.1	35		21.5
6	102.2	101.3	21	62.1	61.3	36	20.9	20.4
7	100.5	99.3	22	60.3	59.3	37	18.2	18
8	97.1		23	58.4	56.9	38	15.1	14.9
9	94.2		24	56	55	39	13.1	12.6
10	91.4	92.7	25	52	51	40	11.9	11.6
11	88	89.6	26	48.3	47.8	41	11.1	11.1
12	84.3	86	27	42.3	41.4	42	10.1	10.3
13	81.1	82.6	28	38.2	37.4	43	8.9	8.8
14	79	80.3	29	35.3	34.8	44		8.2
15	76.1	76.3	30	33.5	33.1			

promedio de 364 manchas peptídicas por gel, de las cuales, alrededor de 94% estuvieron presentes en todos los geles. También, los rangos de masa molecular y punto isoeléctrico de las manchas peptídicas fueron similares a los de la cepa de referencia: el rango de masa molecular se encontró entre 6.5 a 82.8 kDa, mientras que el de punto isoeléctrico estuvo entre 4.2 y 6.5 (Figura 9).

En la literatura se ha mencionado que una característica de las cepas clínicas es la sobreexpresión de las isoformas del antígeno de 16 kDa HspX (Betts y Dodson, 2000; Pheiffer y col., 2005), motivo por el que se realizó el análisis electroforético dirigido a la identificación de las manchas peptídicas de masa molecular cercana a 16 kDa. El patrón electroforético de la cepa clínica H8306 fue consistente con esta información, encontrándose manchas proteicas de gran intensidad con pesos moleculares y puntos isoeléctricos que probablemente corresponden a los de las isoformas de dicha proteína (Figura 9). Otras manchas peptídicas que podrían estar traslapadas en esa región, podrían corresponder a proteínas altamente inmunogénicas, como la ESAT 6 con peso molecular reportado de 6 a 9.9 kDa y punto isoeléctrico de 4.5, y la GroES de 10.8 kDa y punto isoeléctrico de 4.6 (Rosenkrands y col., 2000a).

Otras características de la composición de las proteínas de filtrado de cultivo de esta cepa clínica, se discuten en la siguiente sección.

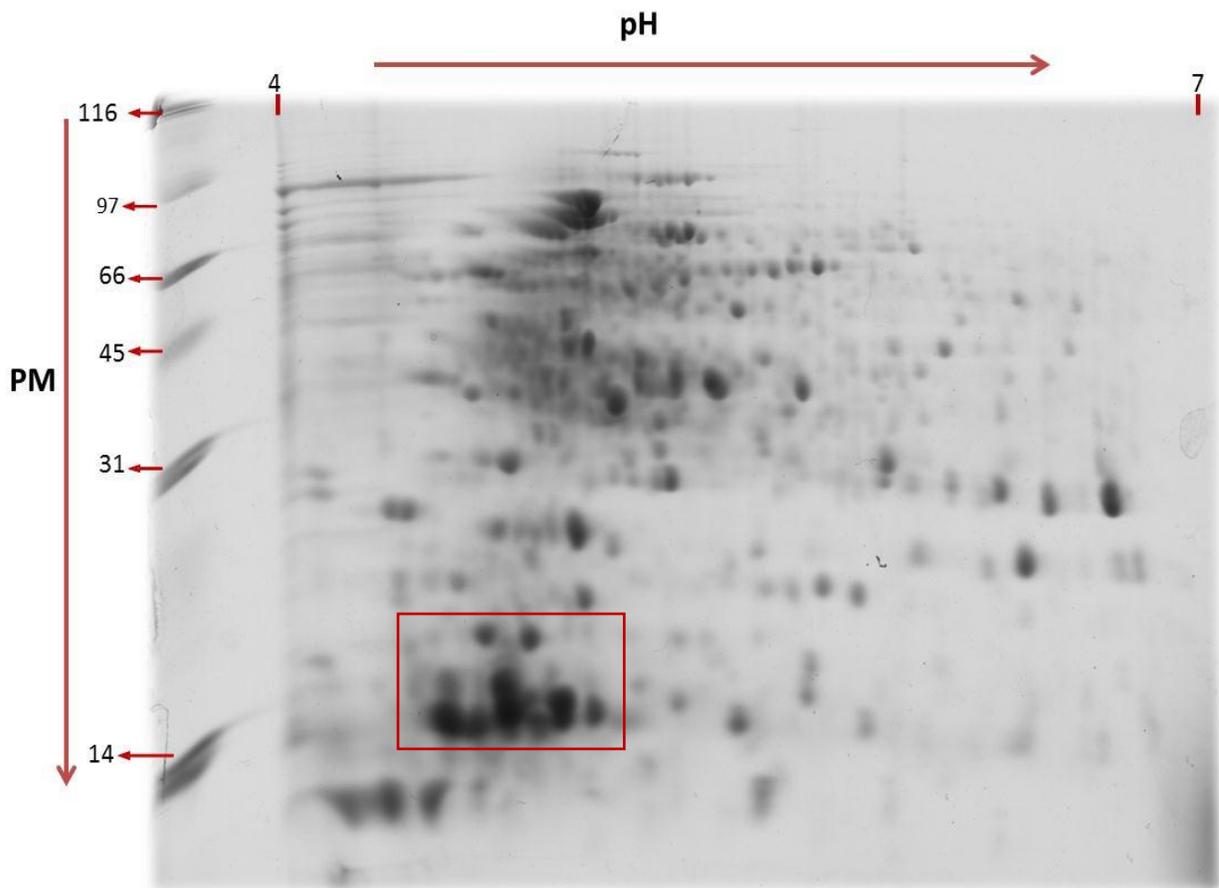


Figura 9. Perfil electroforético en dos dimensiones de las proteínas de filtrado de cultivo de la cepa clínica *M. tuberculosis* H8306, cultivado en medio líquido Sauton. En el recuadro se señalan las probables isoformas de la proteína HspX, GroES y ESAT 6.

PM: Peso molecular

Comparación de los Perfiles en Dos Dimensiones de la Cepa Clínica y de Referencia

Como se mencionó anteriormente, las diferencias en la intensidad de la señal densitométrica originada por las manchas peptídicas de los mapas proteómicos de la cepa de referencia y la clínica, se determinaron utilizando una prueba estadística para datos no paramétricos: U de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$) (Karp y col., 2007a; Karp y col., 2007b). Se descartaron del análisis todas las manchas peptídicas que no cumplieran con los criterios establecidos en el plan de análisis y las manchas sólo se consideraron significativamente diferentes cuando mostraron un doble cambio en la intensidad de la señal densitométrica, con un valor de $p \leq 0.05$.

Se hallaron 37 diferencias significativas entre los mapas proteómicos de la cepa de referencia y la clínica. Dieciséis de las manchas peptídicas de la cepa de referencia tuvieron una densidad significativamente mayor que las correspondientes de la cepa clínica. En contraparte, la densidad de 13 manchas peptídicas de la cepa clínica fue significativamente mayor que las del perfil de la cepa de referencia. Siete de las manchas peptídicas detectadas sólo fueron observadas en la cepa clínica y una fue detectada solamente en la cepa de referencia.

Se realizó la comparación de las manchas peptídicas observadas en los mapas proteómicos de la cepa de referencia y la clínica, con relación a las reportadas en la literatura (Rosenkrands y col., 2000b; Base de datos en línea: <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/>). Para este análisis se tomó en cuenta que las variaciones en el proceso de desnaturalización utilizado en la electroforesis bidimensional pueden afectar ligeramente la masa de los péptidos (Rosenkrands y col., 2000b). Por esta razón, la identidad proteica de cada una de las manchas de interés, fue determinada en función de su posición relativa con relación a las manchas vecinas reportadas en otros perfiles en doble

dimensión. Sin embargo, es importante destacar que la identificación preliminar de las diferencias peptídicas, entre la cepa de referencia y la clínica, observadas en este trabajo, debe ser posteriormente confirmada con métodos como la espectrometría de masas o bien la inmunodetección con anticuerpos monoclonales (Elliot y col., 2009).

Manchas Peptídicas de Mayor Densidad en el Mapa de la Cepa de Referencia

En este grupo de manchas peptídicas, se encontraron 6 cuya intensidad es más de 10 veces mayor en la cepa de referencia. La mayoría de ellas, son proteínas con alto peso molecular (Tabla III), entre las que destaca la mancha número 9 (Figura 10), que podría corresponder a la glucosa 6 fosfato isomerasa que está involucrada en la glucólisis y gluconeogénesis de la bacteria. Esta enzima ha sido ampliamente estudiada y reconocida no sólo en los filtrados de cultivo micobacterianos, sino en las fracciones celulares y de membrana (Gu y col., 2003; Griffin y col., 2011). Así mismo, se encontró una alta densidad en la mancha 4 del mapa de la cepa H37Rv (Figura 10), que podría corresponder al antígeno de 38 kDa, también llamado PhoS, y que está relacionado con el transporte de fosfato. En estudios anteriores, se ha demostrado que ésta es una de las proteínas más inmunodominantes de los filtrados de cultivo micobacterianos (Covert y col., 2001). La densidad de la mancha 4 en el mapa de la cepa clínica fue significativamente inferior a la que presentó en la cepa de referencia. Esto concuerda con los resultados de otras investigaciones, en las que se ha encontrado que una cepa de alta prevalente en China, la cepa Beijing, muestra una mínima expresión del antígeno PhoS, junto con la proteína GroEL de 65 kDa y el antígeno de 47 kDa (Pheiffer y col., 2005).

Tabla III. Manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv.

No. Id.	P.M.	P. I.	Cambio en intensidad*	Proteínas con PM y pl similares	Rv	Referencia
1	12.9	5.3	5.82	Difosfatasa cinasa nucleosidasa (11.8, 5.3).	Rv2445c	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
2	32.5	5.5	2	Tb11.0 (12, 5.0) Ag85A (31.4, 5.3)	Rv3592 Rv3804c	Rosenkrands y col., 2000. Sonnenberg y Belisle, 1997.
3	32.9	5.8	>10	Observado, no identificado (28.5, 5.6)		Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/ Número de mancha: 3_509
4	36.3	5.7	>10	PhoS (39, 5.5)	RV0934	Rosenkrands y col., 2000a.
5	55.0	5.6	>10	Subunidad del antígeno de 56 kDa (58.8, 5.5)	NI	Sonnenberg y Belisle, 1997.
6	55.6	5.5	2.5	Subunidad del antígeno de 56 kDa (58.8, 5.5)	NI	Sonnenberg y Belisle, 1997.
7	55.9	5.6	4.9	Subunidad del antígeno de 56 kDa (58.8, 5.5)	NI	Sonnenberg y Belisle, 1997.
8	58.7	5.1	2.6	Glutamina sintetasa (55.59, 5.14)	Rv2220	Sonnenberg y Belisle, 1997.
9	59.5	5.5	>10	Glucosa 6 fosfato isomerasa (60, 5.4)	Rv0946c	Gu y col., 2003; De Souza y col., 2011
10	64.8	5.2	2			No se encontró en reportes previos
11	64.9	5.3	7.5			No se encontró en reportes previos
12	65.5	5.8	>10	Subunidad α de la carboxilasa CoA (64, 5.6)	Rv 3285	Rosenkrand y col., 2000b.
13	66.5	4.6	5.3			No se encontró en reportes previos
14	70.8	4.9	9.1	DnaK (69.9, 5.1)	Rv0350	Sonnenberg y Belisle, 1997.
15	78.2	5.2	> 10	Endopeptidada de unión a ATP (76.5, 5.2)	RvO384c	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
16	78.3	5.1	5.9	Endopeptidada de unión a ATP (76.5, 5.1)	Rv03384c	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/

No. Id.: Número de identificación. P.M.: Peso molecular. P.I.: Punto isoeléctrico. Rv: Nombre del gen según Cole col., 1998.

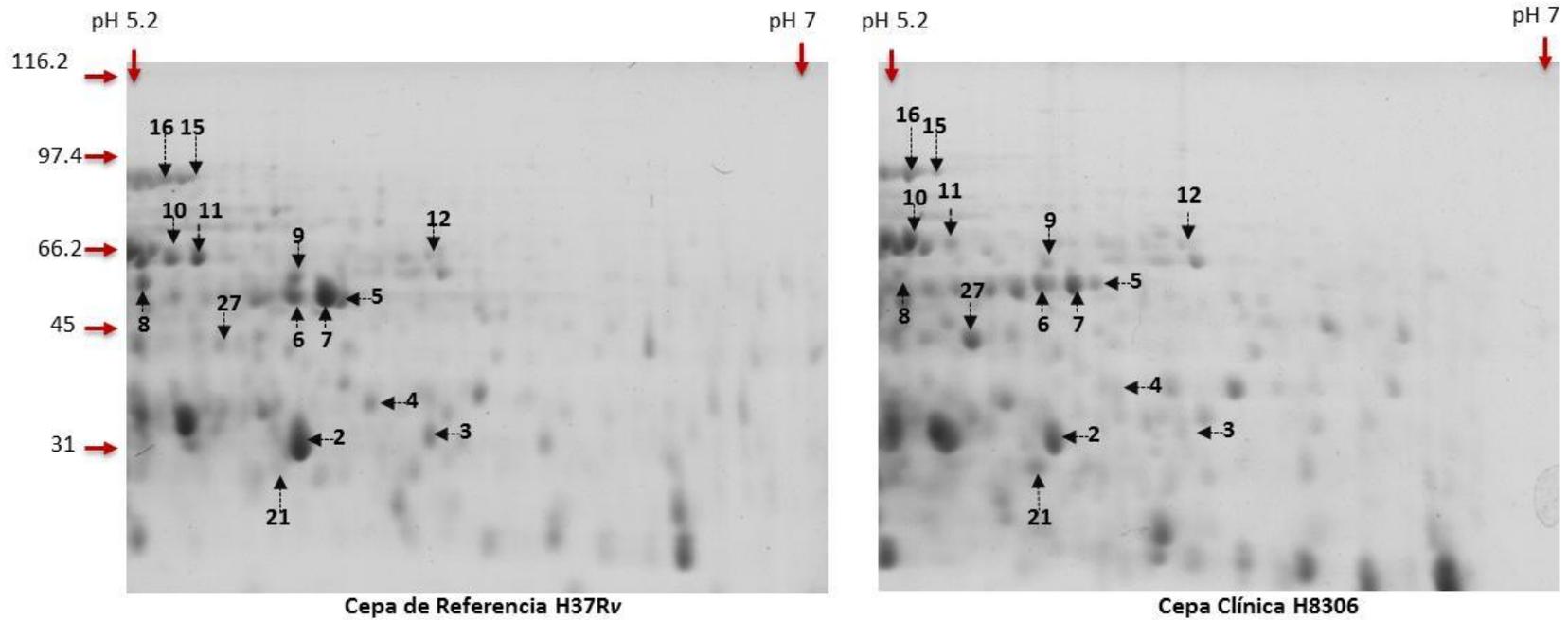


Figura 10. Sección número uno del gel en doble dimensión que muestra los manchas peptídicas que tienen densidad diferente entre las dos cepas. En el primer carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular y en la parte superior del gel, el gradiente de pH.

Otra de las proteínas de la cepa H37Rv que mostró mayor densidad, con relación a la proteína correspondiente de la cepa clínica, es la que aparece a los 32.5 kDa (mancha 2, Figura 10).

Esta mancha parece corresponder al antígeno 85A, perteneciente a las proteínas del complejo de 30-32 kDa. Este complejo proteico está involucrado en el mantenimiento de la pared celular micobacteriana y es responsable de la afinidad de la bacteria a la fibronectina (Espitia y col., 1999). Estas proteínas son secretadas por la micobacteria, forman parte del filtrado de cultivo y al parecer favorecen la invasión de los macrófagos alveolares (Roning y col., 2004). Al igual que en este estudio, en otros reportes se ha descrito la disminución en la cantidad de antígeno 85A en el filtrado de cultivo de cepas clínicas aisladas en China, en comparación con la cepa de referencia, y se ha sugerido que la disminución en la cantidad de antígeno 85A puede ser un mecanismo que facilita la sobrevivencia de las cepas endémicas de esa región (Pheiffer y col., 2005).

En 1988, Ljungqvist y sus colaboradores, demostraron la importancia inmunogénica de una banda de 56 kDa en la electroforesis en una dimensión de las proteínas de filtrado de cultivo. En un estudio posterior, dicho antígeno se encontró como una serie de manchas ubicadas entre los 55 y 56 kDa (Sonnenberg y Belisle, 1997). En el presente estudio, la mancha 5 tiene masa molecular de 55 kDa y parece coincidir con la migración bidimensional del antígeno de 56 kDa reportada en la literatura; esta mancha tiene una densidad 10 veces mayor en la cepa de referencia que en la clínica (Figura 10).

Las manchas 10 y 11 en este estudio (Figura 10), también mostraron mayor densidad en la electroforesis bidimensional de la cepa de referencia. Estas manchas no pudieron relacionarse con proteínas específicas, porque sus puntos isoelectrónicos y pesos moleculares no coinciden con los de las manchas

de los mapas bidimensionales previamente reportados. Se necesitan estudios posteriores para su identificación.

Los mapas proteómicos de la cepa de referencia y de la cepa clínica, mostraron una mancha con peso molecular de 66 kDa y punto isoeléctrico de 4.6 (mancha 13; Figura 11). Esta mancha mostró mayor densidad en el mapa de la cepa de referencia, pero no se hallaron reportes de proteínas con características similares en la bibliografía ni se observaron manchas peptídicas previamente reportadas que estuvieran cercanas a esa posición y pudieran ser utilizadas como manchas de referencia para proponer una proteína como candidato. Es posible, sin embargo, que por el tiempo de cultivo usado en este estudio (cuatro semanas) se trate de una proteína de estrés térmico (Castillón, 2008) que no se presentaría en los cultivos jóvenes de dos a tres semanas usados en la mayoría de los estudios reportados hasta ahora (Sonnenberg y Belisle, 1997; Sinha y col., 2005, De Souza y col., 2011).

Manchas Peptídicas de Mayor Densidad en el Mapa de la Cepa Clínica

De las 13 manchas que están en este grupo, ocho mostraron una densidad hasta 10 veces mayor que las manchas correspondientes de la cepa de referencia (Tabla IV). Entre éstas, las manchas número 26 (Figura 11) y 18 (Figura 12) y están relacionadas con las proteínas MPT32 y MPT64, respectivamente. Ambas proteínas son antígenos inmunodominantes de la fracción proteica de los filtrados de cultivo consideradas fuertes candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas y métodos diagnósticos (Kumar y col., 2003; Wang y col., 2007). Esto es porque aunque la función del antígeno MPT64 es desconocida, se sabe que induce una respuesta de hipersensibilidad tardía en modelos animales y que es expresada por la bacteria sólo cuando se está dividiendo (Yamaguchi y col., 1989; Zvi y col., 2008). Por otro lado, la MPT32 es

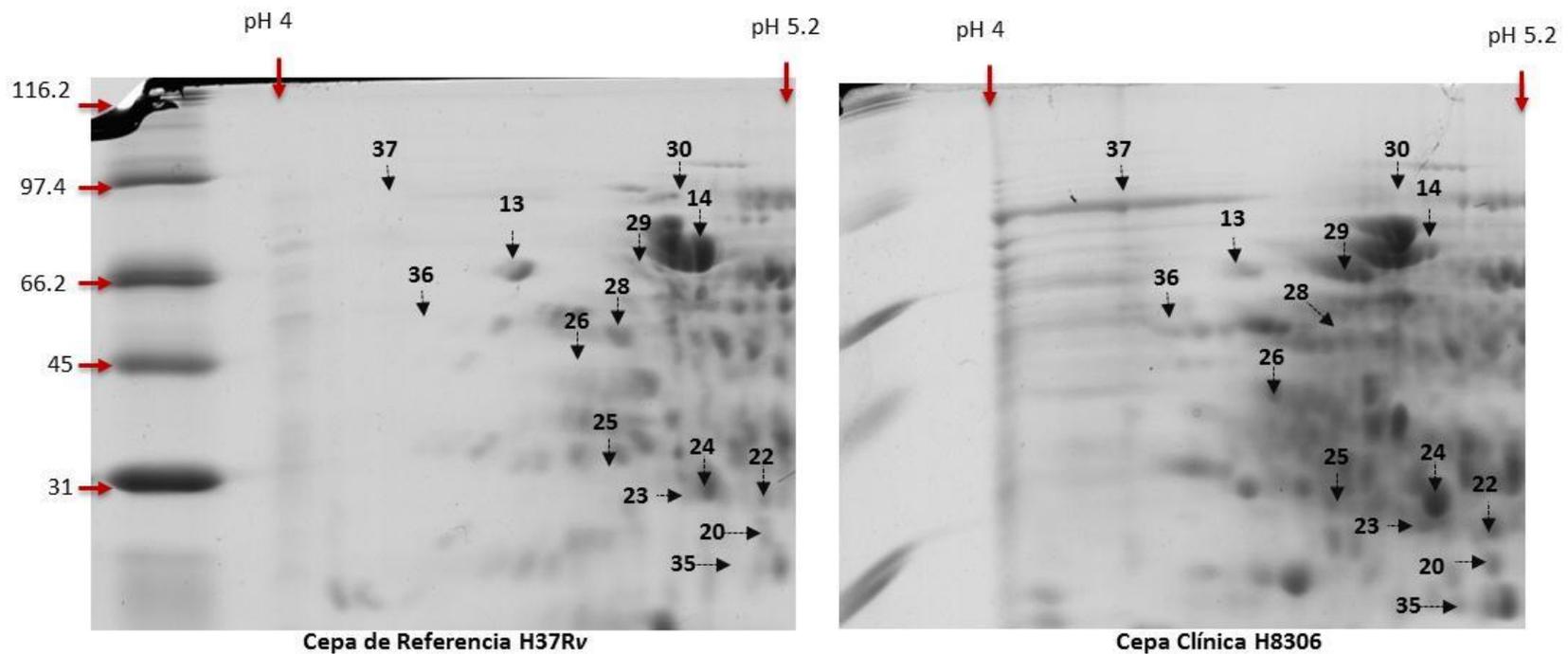


Figura 11. Sección dos del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas. En el extremo izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular y en la parte superior, el gradiente de pH.

Tabla IV. Resumen de las manchas peptídicas de mayor densidad en el mapa de la cepa clínica *M. tuberculosis* H8306.

No. Id.	P.M.	P. I.	Cambio en intensidad	Proteínas con PM y PI similares	Número de Rv	Referencia
17	14.4	5.6	4.6	Proteína TB15.3 (14.4, 5.6)	Rv1636	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/ ; Rosenkrands y col., 2000a
18	20.6	4.8	>10	Isoforma de MPT64 (22.4, 4.6)	Rv1980c	Rosenkrands y col., 2000a
19	24.8	5.9	5.4	Isoforma de SodA (25, 5.8)	Rv3846	Rosenkrands y col., 2000a
				MPT51 (25, 5.5)	Rv3803c	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/ ; Weldingh y col., 1998
20	26.4	5.1	6.1	Proteína designada como B (25.56, 5.1)		Sonneberg y Belisle, 1997
				Adk (26, 4.9)	Rv0733	Rosenkrands y col., 2000a
21	28.7	5.5	>10	Proteína PrcA (29, 5.2)	Rv2109c	Rosenkrands y col., 2000a
22	29.1	5.1	>10	Antígeno de 27 kDa (26.15, 5.1)		Sonnenberg y Belisle, 1997
				Proteína de filtrado de cultivo de 29 kDa (29, 4.8)	Rv0798c	Rosenkrands y col., 2000a
23	29.1	5.0	>10	Proteína de filtrado de cultivo de 29 kDa (29, 4.8)	Rv0798c	Rosenkrands y col., 2000a; Rosenkrands y col., 2000b.
24	30.0	5.0	3	Antígeno 85B (29.85, 5.1.)	Rv1886c	Sonneberg y Belisle, 1997
25	31.7	4.8	>10	Subunidad alfa de una flavoproteína transportadora de electrones (31.6, 4.7)	Rv3028c	Jiang y col., 2006
26	43.5	4.7	>10	MPT32 (42.1, 4.5)	Rv1860	Sonneberg y Belisle, 1997; Rosenkrands y col., 2000a
27	46.0	5.4	>10	Factor de elongación Tu (46 y 5.2)	Rv0685	Rosenkrands y col., 2000a
28	52.0	4.8	4.4	Observado, pero no identificado (51.9, 4.7)		Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/ Número de mancha: 1_526
29	69.4	4.8	>10	Isoforma de la proteína DnaK (69.9, 5.1)	Rv0211	Sonneberg y Belisle, 1997; Rosenkrands y col., 2000a;
				Isoforma de la proteína GroEL (62, 4.8)	Rv0440	Sonneberg y Belisle, 1997; Rosenkrands y col., 2000b.

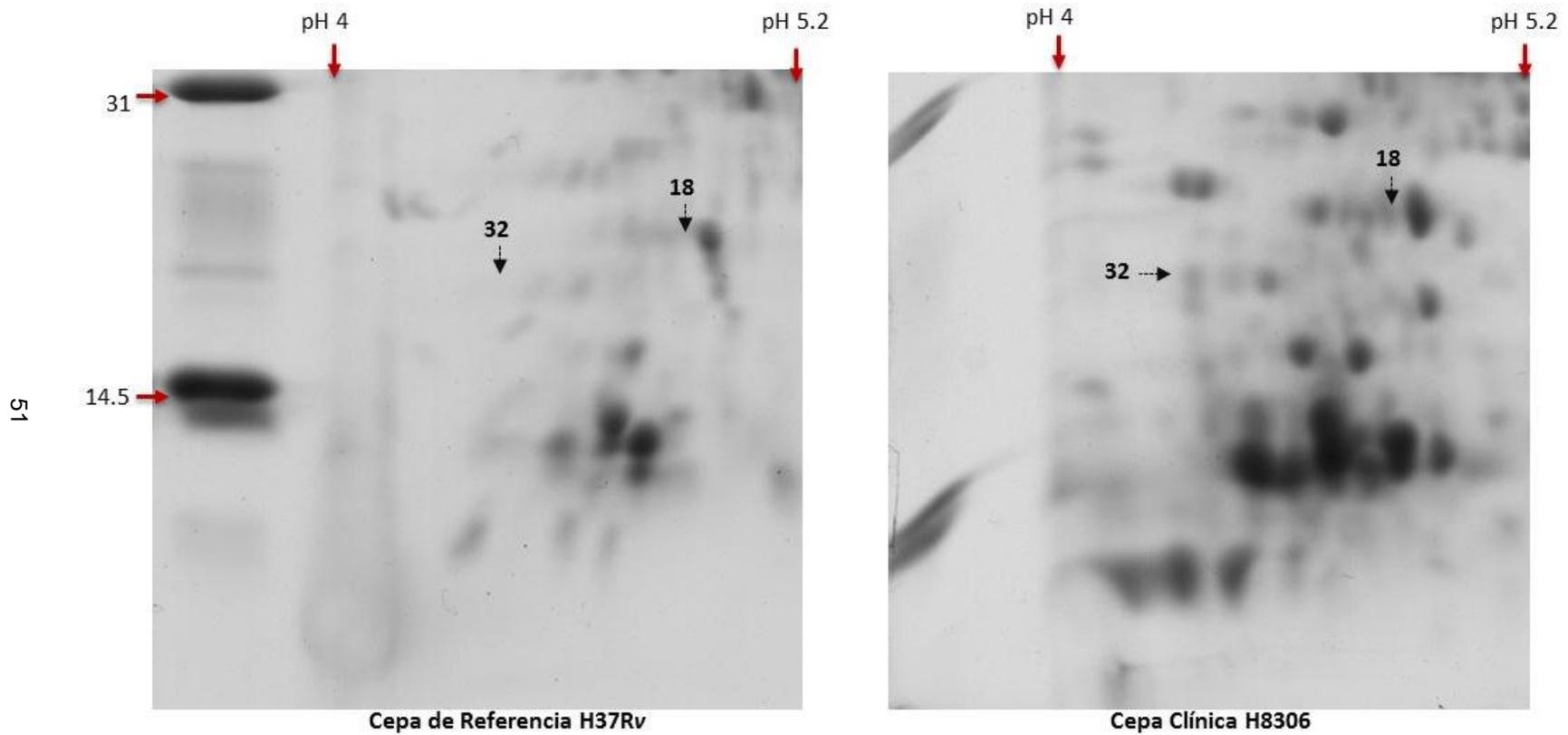


Figura 12. Sección número tres del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas. En el extremo izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular y en la parte superior, el gradiente de pH.

una proteína con afinidad a fibronectina, que induce una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T y que tiene capacidad de inmunización en cerdos de Guinea (Kumar y col., 2003; Malen y col., 2008). Se ha reportado que los antígenos con mayor expresión en las cepas clínicas despiertan una fuerte respuesta inmune, por lo que es probable que los pacientes infectados con esta cepa, presenten una gran reactividad contra estas proteínas (Pheiffer y col., 2005). En ese sentido, la detección en la cepa clínica de las manchas de alta densidad asociadas a la MPT64 y MPT32 sugeriría que se trata de una cepa altamente inmunogénica de la localidad, que podría utilizarse como herramienta en la evaluación de la respuesta inmune de pacientes de la región noroeste de México.

La mancha número 17 (Figura 13) también mostró una elevada densidad. Esta mancha es similar a la que se ha visto que produce la proteína TB15.3 en los geles de dos dimensiones de otros estudios (Rosenkrands y col., 2000a). Se sabe que esta proteína está involucrada en la regulación del hierro por la bacteria, pero más interesantemente, se ha reportado un aumento en su concentración en los perfiles proteicos de cepas clínicas hipervirulentas (Bahk y col., 2004; Mehaffy y col., 2010). Esto sugiere la posibilidad de que la cepa clínica H8306 sea una cepa regional de alta virulencia, lo que de ser así tendría implicaciones regionales, epidemiológicas y clínicas, considerables.

Otra de las manchas de mayor densidad en la cepa clínica, con relación a la cepa de referencia, fue la identificada con el número 24 (Figura 11), cuyo peso molecular y punto isoeléctrico coinciden con los reportados para el antígeno 85B por otros investigadores. Esta es una de las proteínas pertenecientes al complejo inmunogénico de 30 a 32 kDa (Sonnenberg y Belisle, 1997) y tiene función de micolil transferasa, en la síntesis del factor cordón que forma parte de la pared celular micobacteriana. Junto con las otras proteínas del complejo de 30 a 32 kDa, despierta una fuerte respuesta inmune por parte del hospedero

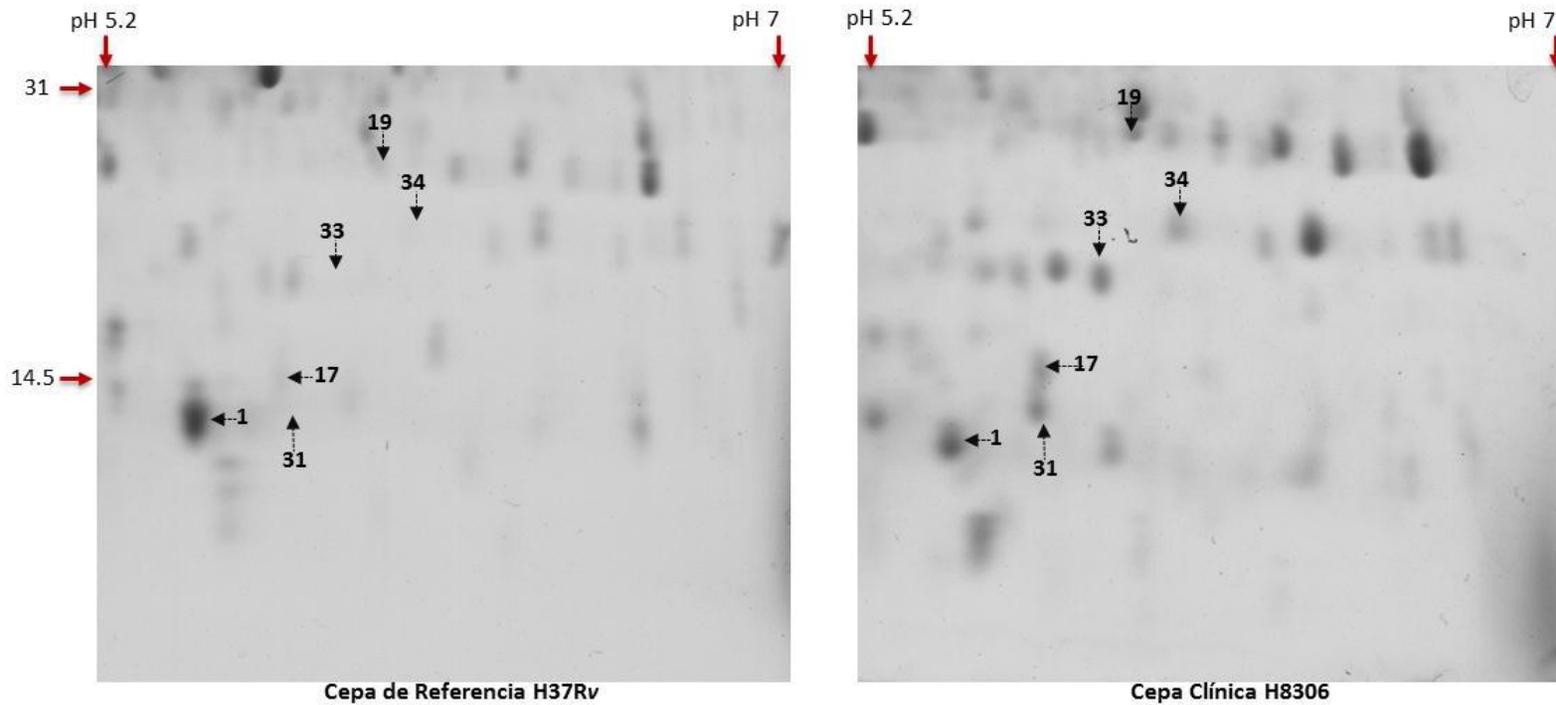


Figura 13. Sección número cuatro del gel en doble dimensión que muestra las manchas peptídicas que resultaron diferentes entre las dos cepas. En el extremo izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular y en la parte superior, el gradiente de pH.

(Malen y col., 2008). Esto sugiere que la cepa H8306 podría mostrar eventualmente una elevada inmunogenicidad a expensas del antígeno 85B. Por otro lado, es importante destacar que la cepa Beijing (la de mayor prevalencia en China), a diferencia de otras cepas de la misma región geográfica, muestra una disminución de la concentración de este antígeno en su perfil proteico (Pheiffer y col., 2005).

En el año 2006, Jiang y colaboradores, reportaron la sobreexpresión de 6 proteínas en cepas resistentes a isoniazida, dentro de las cuales se encontró a la subunidad alfa de una flavoproteína transportadora de electrones. La mancha 25 (Figura 11) de la cepa clínica H8306, parece coincidir con las características de masa y pI de esta flavoproteína. En dicho estudio, se describe además la mutación del gen que codifica a la flavoproteína, pero no se pudo explicar la razón de la sobreexpresión de la proteína ni su relación con la resistencia a isoniazida. De comprobarse la identidad de la mancha 25, sería interesante buscar si otras cepas resistentes a isoniazida procedentes de Sonora, expresan de la misma manera esta proteína.

Mancha Peptídica no Detectada en la Cepa Clínica

La única mancha que se encontró en los perfiles de doble dimensión de la cepa de referencia, que no fue detectada en la cepa clínica es la número 30 (Tabla V, Figura 11). Este hallazgo puede interpretarse de dos formas, primera, que en realidad la cepa clínica no esté expresando la proteína correspondiente, y segunda, que la cepa clínica sí la exprese pero en concentraciones tan pequeñas, que la técnica usada no logre su detección. En la revisión bibliográfica, la proteína con peso molecular y punto isoeléctrico más cercano es la enzima catalasa peroxidasa KatG. Esta enzima está relacionada con la

Tabla V. Resumen de las manchas peptídicas detectadas sólo en alguna de las cepas.

No. ID.	P.M.	P. I.	Proteínas con PM y pl similares	Número de Rv	Referencia
Mancha peptídica no detectada en la cepa clínica <i>M. tuberculosis</i> H8306					
30	78.5	4.9	Catalasa- Peroxidasas KatG (80.6, 4.9)	Rv1908c	Rosenkrands y col., 2000b.
Manchas peptídicas detectadas únicamente en la cepa clínica <i>M. tuberculosis</i> H8306					
31	12.5	5.6	Proteína ribosomal 30s (11.9, 5.6)	Rv0700	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
32	17.1	4.4	Proteína hipotética conservada (17.2, 4.6)	Rv2204c	Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
			Proteína de filtrado de cultivo de 20 kDa (16.897, 4.92)	Rv1932	Weldingh y col., 1998.
33	18.4	5.8	Proteína TB18.6 (20, 5.3)	Rv2140c	Rosenkrands y col., 2000a. Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
34	19.8	6.0	Factor reciclante de ribosomas (20.8, 5.8).	Rv2882c	Betts y col., 2000. Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
35	23.6	5.0	Proteína conservada	Rv2716	Rosenkrands y col., 2000b
36	55.2	4.4	Proteína TF (56.2, 4.4)	Rv2462c	Rosenkrands, 2000b; Base de datos en línea: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/
37	77.3	4.5	Proteína de Choque Térmico HSP90 (73, 4.6)	Rv2299c	Rosenkrand y col., 2000b

No. Id.: Número de identificación. P.M.: Peso molecular. P.I.: Punto isoeléctrico. Rv: Nombre del gen según Cole y col., 1998.

resistencia a isoniazida, ya que su función es la de convertir al precursor de la isoniazida a su forma bioactiva (Pym y col., 2002).

La escasa producción o el mal funcionamiento de la enzima catalasa peroxidasa KatG, son factores de resistencia a este antibiótico. En el caso de la cepa clínica H8306, la baja expresión de KatG podría explicar su resistencia al antifímico. Sin embargo, en un estudio realizado en Sonora, en el que se analizó esta cepa clínica, el gen fue secuenciado y se reportó sin mutaciones (Bolado y col., 2012).

En otros trabajos con cepas clínicas resistentes a isoniazida, se ha reportado la delección parcial o completa del gen que codifica la proteína KatG (Tsolaki y col., 2003), pero la evidencia molecular previa con la cepa H8306, sugiere que en esta cepa la resistencia al antifímico no obedece a la mutación del gen KatG. Esto significa que la proteína sintetizada por la bacteria podría quedarse principalmente a nivel intracelular, sin ser secretada al filtrado de cultivo, tal como lo han observado Pfeiffer y colaboradores en el 2005, al detectar una baja concentración de proteína KatG en los perfiles proteicos de los filtrados de cultivo de las cepas clínicas en comparación con los perfiles proteicos de los extractos celulares de las mismas cepas clínicas.

Las posibles causas de la resistencia a isoniazida de la cepa H8306, que deben ser analizadas a la brevedad, podrían ser: la existencia de mutaciones en el gen *furA* (Rv1909c), que también alteran los niveles de la proteína KatG (Pym y col., 2001) o bien una mutación en el promotor de KatG.

Manchas Peptídicas Detectadas sólo en la Cepa Clínica

Siete manchas peptídicas solamente estuvieron presentes en los perfiles proteicos en doble dimensión de los filtrados de cultivo de la cepa clínica. Sobresalieron las manchas 34 (Figura 13) y 36 (Figura 11), que tienen pesos moleculares y puntos isoeléctricos similares al factor reciclador de ribosomas y a la proteína TF respectivamente (Tabla V). Ambas proteínas, están involucradas en la síntesis

proteica. El factor reciclador de ribosomas libera a los ribosomas del ARN mensajero una vez que ha terminado la síntesis proteica y por lo tanto, se ha propuesto que puede incrementar la eficiencia de la traducción proteica (Base de datos en línea: www.uniprot.org). Por otro lado, la proteína TF pertenece a una familia de chaperonas involucrada en los procesos de estabilización proteica durante la síntesis de nuevas proteínas (Griffin y col., 2011).

Otra mancha localizada solamente en el mapa de la cepa clínica, fue identificada con el número 37 (Figura 11). Esta podría corresponder a una proteína chaperona htpG, perteneciente a la familia HSP90. En la bibliografía, no se han reportado muchos estudios acerca de ella, pero se sabe que está involucrada en el doblamiento proteico y que tiene actividad ATPasa (Base de datos en línea: www.uniprot.org).

De comprobarse la identidad de estas tres proteínas con elevada densidad en el mapa proteico de la cepa clínica H8306, podría ser un hallazgo indicativo de una alta tasa de síntesis proteica por parte de la cepa clínica, que podría favorecer la virulencia de la misma.

Correlación de los Perfiles Electroforéticos en una Dimensión con los Mapas Proteómicos en Dos Dimensiones de Ambas Cepas

Al comparar los perfiles electroforéticos en una dimensión entre ambas cepas resaltó la presencia de las bandas con masa de 21.5 y 23 kDa (Figura 8) en la cepa clínica. Aunque el análisis completo del mapa proteómico de la cepa de referencia, muestra manchas peptídicas en estos rangos, la intensidad de las manchas es mucho menor. Igualmente, se puede explicar la diferencia densitométrica de la banda de 21.5 kDa si se considera que la intensidad de la señal de la mancha 18 (Figura 12) de la cepa clínica, podría estar traslapada con la de la proteína de 23 kDa MPT64 (Rosenkrands y col., 2000a). Además, la mayor intensidad de señal de la banda de 23 kDa de la cepa clínica coincide con la alta densidad de la mancha 35 (Tabla IV, Figura 11).

Sería interesante confirmar la identidad de la mancha 35, ya que se ha encontrado que los sueros de pacientes infantiles del estado de Sonora, reconocen fuertemente la banda de 23 kDa (Monge, 2011).

Además se observó, que la cepa de referencia expresa mayor intensidad en las bandas de 58, 65 y 71 kDa. Al revisar los perfiles en dos dimensiones, se encontró la mancha 8 (Figura 10), de 58.7 kDa, tuvo una densidad más de dos veces mayor que en la cepa clínica. Una serie de 4 manchas (10, 11, 12, 13 en Figura 10 y 11) entre los 64 y 66 kDa también mostraron una densidad mayor en la cepa de referencia, lo que explica el aumento en la intensidad de la banda de 65.3 kDa en el perfil proteico de una dimensión. Finalmente, la densidad de la banda de 71 kDa en la cepa de referencia (mancha número 14 de la Figura 11) fue nueve veces mayor que la observada en la cepa clínica.

Dentro de la zona de los 8 a los 13 kDa, se encuentran proteínas inmunogénicas que se sabe son mayormente expresadas por las cepas clínicas y que en parte les confieren virulencia (Betts y Dodson, 2000; Pfeiffer y col., 2005), por lo que no es de sorprenderse, que en este estudio, se haya observado una intensidad en la señal densitométrica mucho mayor en la cepa clínica que en la de referencia.

SÍNTESIS DE OBSERVACIONES Y CONCLUSIÓN

1. Los perfiles electroforéticos en una y dos dimensiones de la cepa de referencia, obtenidos en este estudio, fueron similares a los publicados en otros reportes.
2. Las diferencias de los perfiles electroforéticos en una dimensión entre la cepa clínica y la de referencia, pueden ser fácilmente explicados al observar las diferencias en los mapas de doble dimensión.
3. En ambas cepas, se observó una mancha (13) para la que no se encontraron referencias bibliográficas y que podría representar alguna proteína o isoforma proteica no reportada.
4. En el perfil proteico de dos dimensiones de la cepa clínica, se observaron 16 manchas de menor densidad que las correspondientes en la cepa de referencia, de las cuales, las manchas 2, 4, 5, 6 y 7 parecen representar a proteínas inmunogénicas importantes como el antígeno 85A, PhoS y las isoformas del antígeno de 56 kDa.
5. En el perfil de doble dimensión de la cepa clínica, se presentaron 13 manchas altamente densas. Entre éstas, parecen estar proteínas inmunodominantes como la MPT64, el antígeno 85B, la MPT32 (manchas 18, 24 y 26, respectivamente) y la TB15.3 observada con anterioridad en cepas hipervirulentas.
6. La mancha 25 también se observó principalmente en el perfil proteico de la cepa clínica y se relacionó con la subunidad alfa de una flavoproteína transportadora de electrones. Esta proteína se ha encontrado en cantidades elevadas en cepas resistentes a isoniazida aisladas en China.
7. En el perfil de la cepa clínica no se detectó la mancha 30, que podría corresponder a la proteína KatG relacionada con la resistencia a isoniazida. En un estudio previo en el que se analizó la cepa H8306, no se observaron mutaciones en el gen que codifica la KatG, pero el gen no fue escaneado por

completo. Esto sugiere la importancia de hacerlo. Alternativamente, se puede sospechar de mutaciones en otro gen o en el promotor del KatG.

8. En el perfil de doble dimensión de la cepa clínica, se encontró una elevada densidad de las manchas 16, 24, 34, 37 y 38, que podrían corresponder a las proteínas MPT64, antígeno 85B, factor reciclador de ribosomas, factor de elongación TF y chaperona htpG, respectivamente. La confirmación de las identidades de estas proteínas podría ser un indicativo de las elevadas tasas de síntesis proteica y división celular en la cepa clínica.

En conclusión, el patrón electroforético en doble dimensión de la cepa clínica *M. tuberculosis* H8306, aislada en Hermosillo, Sonora, México, es diferente al de la cepa de referencia H37Rv; las diferencias entre las dos cepas podrían utilizarse como base para la caracterización de otras cepas clínicas aisladas en la región noroeste de México, así como para la identificación de blancos moleculares inmunodominantes con potencial utilidad inmunoestimulante y serodiagnóstica.

RECOMENDACIONES

Metodológicas

- a) De continuar con la investigación proteómica del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, es recomendable que para la reactivación de cepas clínicas almacenadas en ultracongelación, se realicen dos subcultivos en el medio Löwenstein-Jensen, y se disgreguen las colonias micobacterianas con perlas de vidrio en solución salina estéril, antes de la inoculación del medio líquido. Esto para asegurar la obtención de una cantidad significativa de proteínas de filtrado de cultivo de la micobacteria.
- b) Se observó una mejor separación de las proteínas de filtrado de cultivo de la micobacteria tuberculosa en la electroforesis de doble dimensión, cuando se realizó un ciclo de agitación vigorosa de la proteína en la solución de rehidratación por cinco minutos, seguido de un periodo de reposo por veinte minutos a temperatura ambiente y finalmente otros cinco minutos de agitación vigorosa antes de cargar la solución de rehidratación en la tira IPG. Además, el aumento a 20 minutos del tiempo de incubación de la tira IPG con cada una de las soluciones de equilibrio provocó la mejora notable de los resultados de la electroforesis en doble dimensión.

Investigación

- a) Se recomienda la identificación de la mancha 13 mediante un análisis de espectrometría de masas y su introducción a una base de datos de proteínas de *M. tuberculosis* en caso de representar algún péptido proteico no reportado anteriormente.
- b) Se recomienda la identificación de las manchas 17, 18, 24 y 26. De confirmarse su identidad como alguno de los antígenos inmunodominantes bien conocidos, el análisis de su expresión en otras cepas clínicas aisladas

en el estado de Sonora sería relevante para estimar la virulencia de las cepas micobacterianas en esta región geográfica.

- c) Se recomienda la identificación de la mancha 30 por espectrometría de masas. En caso de corroborarse como la especie proteica KatG, sería recomendable el escaneo completo del gen que la codifica, para investigar otras posibles mutaciones que causen su baja expresión además de las que previamente se habían buscado.
- d) Se recomienda el análisis de un mayor número de cepas clínicas, para buscar paralelismos proteicos y establecer asociaciones epidemiológicas.

Políticas

- a) El presente trabajo muestra evidencias de la existencia de una cepa clínica resistente a la isoniazida, con características de hipervirulencia en el estado de Sonora. El análisis más detallado de la cepa podría contribuir a la identificación de mutaciones no descritas de uno de los genes que más comúnmente proporciona resistencia a este antifímico, así como de la caracterización proteica de la cepa. Además, podría brindar detalles sobre la virulencia de la cepa y ayudar a explicar las manifestaciones clínicas de la enfermedad en esta región geográfica. Un beneficio adicional del estudio de los antígenos inmunodominantes de las cepas clínicas de *M. tuberculosis* en esta región, podría ser la identificación de potenciales blancos para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y de prevención más eficaces. Por todo esto, sería altamente recomendable que las autoridades de salud del estado dirigieran recursos, económicos y humanos, para fortalecer la infraestructura para el desarrollo de investigaciones científicas relacionadas con el estudio del proteoma de las micobacterias prevalentes en el estado de Sonora.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul, A. M., Evans, W. J. 1967. Zone electrophoresis with polyacrylamide gel. *Methods in Enzymology* 11: 179–86.
- Andersen, P., Askgaard, D., Ljungqvist, L., Bennedsen, J., Heron, I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun.* 59(6):1905-10.
- Báez-Saldaña, R., Pérez-Padilla, R., Salazar-Lezema, M. A. 2003. Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaria de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre la tuberculosis en México, 1981 - 1998. *Salud Pública Méx* 45(2): 78 - 83.
- Bahk, Y. Y., Kim, S. A., Kim, J. S., Euh, H. J., Bai, G. H., Cho, S. N. y col. 2004. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4(11): 3299-307.
- Banu, S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M. C., Cole, S. T. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol* 44(1): 9-19.
- Berkelman, T., Stenstedt, T., Bjellqvist, B., Laird, N., McDowell, M., Olsson, I. y col. 1998. 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods. Handbooks from American Biosciences. Biosciences, A. 80-6429-60.
- Berth, M., Moser, F. M., Kolbe, M., Bernhardt, J. 2007. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* 76(6): 1223-43.
- Betts, J. C., Dodson, P. 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology* 146(12): 3205-16.

- Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsin, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A., Kreiswirth, B. N. 2000. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: Distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *J Clin Microbiol* 38(9): 3200-04.
- BioRad, Ed. 2005. PDQuest User Guide. The Discovery Series. Hercules, California, BioRad Laboratories.
- Bisht, D., Singhal, N., Sharma, P., Venkatesan, K. 2007. An improved sample preparation method for analyzing mycobacterial proteins in two-dimensional gels. *Biochemistry (Moscow)* 72(6): 672-74.
- Bloom, B. R., Murray, C. J. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257(5073): 1055-64.
- Blum, H., Beier, H., Gross, J. H. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8(2): 93-99.
- Bolado-Martínez E., Pérez-Mendoza A., Alegría-Morquecho F.M., Candia-Plata M. C., Aguayo-Verdugo M. R., Álvarez-Hernández G. 2012. Mutaciones asociadas con resistencia a rifampicina o isoniazida en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* de Sonora, México. *Salud Publica Mex* 54:167-70.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Cardoso-Leão, S., Portaels, F. 2007. Historia. Ch. 1 in "Tuberculosis 2007: from basic science to patient care". www.TuberculosisTextbook.com (Ed), p. 25-48. Brazil.
- Castillón-Campaña. L. G. 2008. Estandarización del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio líquido M7H9 y asilamiento de proteínas hidrofóbicas del filtrado de cultivo. Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora

- Cole, S. T. 2002. Comparative mycobacterial genomics as a tool for drug target and antigen discovery. *Eur Respir J* 20: 78S-86S.
- Covert, B. A., Spencer, J. S., Orme I. M., Belisle, J. T. 2001. The application of proteomics in defining the T cell antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 1: 574-86.
- Daniel, T. M. 2005. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 9(11): 1181-82.
- Daniel, T. M. 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med* 100(11): 1862-1870.
- De Souza, G. A., Leversen, N. A., Malen, H., Wiker, H. G. 2011. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *J Prot* 75: 502-10.
- Demissie, A., Leyten, E. M., Abebe, M., Wassie, L., Aseffa, A., Abate, G. et al. 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 13(2): 179-86.
- Deshpande, R.G., Khan, M.B., Bhat, D.A., Navalkar, R.G. 1993. Superoxide dismutase activity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculosis patients and the immunoreactivity of superoxide dismutase from *M. tuberculosis* H37Rv. *Tubercle Lung Dis*. 74(6): 388-94.
- Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V., Raviglione, M. C. 1999. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282(7): 677-86.
- Elliot, H. M., Smith, S. D., Parker, E. C., Borchers, C. 2009. Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass. Spectrom.* 44: 1637-60.
- Espitia, C., Laclette, J. P., Mondragon-Palomino, M., Amador, A., Campuzano, J., Martens, A. 1999. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium*

- tuberculosis: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiology* 145: 3487-95.
- Fenton, M. J., Vermeulen, M. W. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 64(3): 683-90.
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., et al. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184: 5479-90.
- Garrels, I. J. 1989. The Quest system for quantitative analysis of two dimensional gels. *J Biol Chem* 264(9): 5269-82.
- González-Saldaña, N. 2007. Estado actual de la tuberculosis en México y en el ámbito mundial. *Vacunación hoy* 15(86): 50-5.
- Görg, A., Luck, C., Weiland, F., Weiss, W. 2007. Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: a laboratory manual. Proteomik. Munich, T. U. O.
- Görg, A., Postel, W., Gunther, S. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9(9): 531-46.
- Gorocica, P., Jimenez-Martinez, M. d. C., Garfias, Y., Sada, I., Lascurain, R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*: 142-53.
- Griffin, J. E., Gawronski, J. D., Dejesus, M. A., Ioerger, T. R., Akerley, B. J., Sassetti, C. M. 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog* 7(9):1002-25.
- Gu, S., Chen, J., Dobos, K. M., Bradbury, E. M., Belisle J. T., Chen, X. Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol Cell Proteomics* 2(12):1284-96

- Hasan, Z., Jamil, B., Ashraf, M., Islam, M., Dojki, M., Irfan, M. y col. 2009. Differential live *Mycobacterium tuberculosis*-, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 16(7): 991-8.
- Herrera, B. M. T., Torres, R. M., Juárez, C. E., Sada, D. E. 2005. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18(4): 327-36.
- Herzog, H. 1998. History of tuberculosis. *Respiration* 65(1): 5-15.
- Hirsh, A. E., Tsolaki, A. G., DeRiemer, K., Feldman, M. W., Small, P. M. 2004. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4871 -76.
- Hochberg, Y., Benjamini, Y. 1995. Controlling the False discovery Rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* 57 (1): 289-300.
- Hugues, V., Bannantine, J. P., Denham S., Smith, S., Garcia-Sanchez, A., Sales, J., Paustian, M. L., Mclean, K., Stevenson, K. 2008. Immunogenicity of proteome-determined *Mycobacterium avium* susp. paratuberculosis-specific proteins in sheep with paratuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 15(12): 1824-33.
- Hunter, R. L., Olsen, M. R., Jagannath, C., Actor, J. K. 2006. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann Clin Lab Sci* 36(4): 371-86.
- Jiang, X., Zhang, W., Gao, F., Huang, Y., Lv C., Wang, H. 2006. Comparison of the proteome of isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resis* 12(4):231-38
- Jungblut, P. R., Muller, E. C., Mattow, J., Kaufmann, S. H. 2001. Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *Infect Immun* 69(9): 5905-7.

- Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J. col. 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards a functional genomics of microbial pathogens. Mol Microbiol. Berlin, Germany, Blackwell Publishing Ltd. 33: 1103-17.
- Karp, N. A., Lilley, K. S. 2007a. Design and analysis issues in quantitative proteomics studies. *Proteomics* 7 Suppl 1: 42-50.
- Karp, N. A., McCormick, P. S., Russell, M. R., Lilley, K. S. 2007b. Experimental and statistical considerations to avoid false conclusions in proteomics studies using differential in-gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 6(8): 1354-64.
- Kaufmann, S. H. E. 2005. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med* 353(23): 2423-26.
- Kavallaris, M., Marshall, G. M. 2005. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *Med J Aust* 182(11): 575-9.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Landowski, C. P., Godfrey, H. P., Bentley-Hibbert, S. I., Liu, X., Huang, Z., Sepulveda, R., Huygen, K., Gennaro M. L., Moy, F.H., Lesley, S. A., Haak-Frendscho, M., 2001. Combinatorial use of antibodies to secreted mycobacterial proteins in a host immune system-independent test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 39(7):2418-24.
- Levine S., O., Schuchat, A., Schwartz, B., Wenger D., J., Elliott, J. 1996. Generic protocol for population-based surveillance of *Haemophilus influenzae* type B. Global Programme for Vaccines and Immunization. Prevention, C. f. D. C. a. Geneva, World Health Organization.
- Luhn, S., Berth, M., Hecker, M., Bernhardt, J. 2003. Using standard positions and image fusion to create proteome maps from collections of two-dimensional gel electrophoresis images. *Proteomics* 3(7): 1117-27.

- Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., Wiker, H. G. 2007. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics* 7(10): 1702-18.
- Malen, H., T., S., H.G., W. 2008. "Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins". *Scand J Immunol.* Bergen, Norway, Blackwell Publishing Ltd. 67: 245-52.
- Mawuenyega, K. G., Forst, C. V., Dobos, K. M., Belisle, J. T., Chen, J., Bradbury, E. M. y col. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell* 16(1): 396-04.
- Mehaffy, C., Hess, A., Prenni, J. E., Mathema, B., Kreiswirth, B., Dobos, K. M. 2010. Descriptive proteomic analysis shows protein variability between closely related clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 10: 1966–84.
- Monge-Villegas, K. A. 2011. Identificación de antígenos inmunodominantes en el filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cultivado en medio líquido Sauton, utilizando sueros de pacientes con tuberculosis del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora
- Murray, J. F. 2004. A century of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169(11): 1181-86.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *JBC* 250(10): 4007-21.
- Palma-Nicolas, J. P., Bocanegra-Garcia, V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. *Arch Bronconeumol* 43(4): 225-32.
- Palomino, J. C., Cardoso-Leao, S., Ritacco, V. 2007. "Tuberculosis 2007: from basic science to patient care".1. BourcillierKamps.com. Argentina.

- Pheiffer, C., Betts, J. C., Flynn, H. R., Lukey, P. T., Van Helden, P. 2005. Protein expression by a Beijing strain differs from that of another clinical isolate and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 151:1139-50.
- Pym, A. S., Domenech, P., Honore, N., Song, J., Deretic, V., Cole, S. T. 2001. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 40(4):879-89.
- Pym, A. S., Saint-Joanis, B., Cole, S. T. 2002. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun* 70(9):4955-60.
- Ronning, D. R., Vissa, V., Besra, G. S., Belisle, J. T., Sacchettini, J. C. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85A and 85C structures confirm binding orientation and conserved substrate specificity. *J Biol Chem* 279(35):36771-7.
- Rosas-Taraco, A. G., Arce-Mendoza, A. Y. 2007. Tuberculosis: Mecanismos de defensa, inmunopatogénesis y biomarcadores. *RESPYN* 8(4).
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Veggerby-Hansen, C., Florio, W., Gianetri, I., Andersen, P. 2000a. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* 21(5):935-48.
- Rosenkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M., Moertz, E., Andersen, P. 2000b. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis* 21:3741-56.
- Rusen, I. D., Enarson, D. A. 2006. FIDELIS--innovative approaches to increasing global case detection of tuberculosis. *Am J Public Health* 96(1):14-6.
- Ryan, K., Ray, G. C. 2004. Micobacterias. Ch. 28 in Sherris-Microbiologia médica: una introducción a las enfermedades infecciosas. Editorial McGraw-Hill Interamericana (Ed), p. 477-95. Mexico.

- Samanich, K. M., Keen, M. A., Vissa, V. D., Harder, J. D., Spencer, J. S., Belisle, J. T. y col. 2000. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(4): 662-8.
- Scheindlin, S. 2006. The fight against tuberculosis. *Mol Interv* 6(3): 124-130.
- Sinha, S., Kosalai, K., Arora, A., Namane, A., Sharma, P., Gaikwad, A. A., Brodin, P., Cole, S. T. 2005. Immunogenic membrane associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. *Microbiology* 151: 2411-19.
- Secretaría de Salud de México. 2011. "Tuberculosis. Panorama Epidemiológico 2000-2010". *Epidemiología en Breve* 1(10).
- SINAVE. 2012. SINAVE/DGE/SALUD/Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16(3): 463-96.
- Sonnenberg, G. M., Belisle, T. J. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Proteins by two-dimensional polyacrimide gel electrophoresis, N-Terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 65(11):4515-24.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S. y col. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18):9869-74.
- Starck, J., Kallenius, G., Marklund, B. I., Andersson, D. I., Akerlund, T. 2004. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology-Sgm* 150:3821-29.
- Steef-Lopez, W., Tovar-Guzman, V. 2008. Factores de riesgo asociados a recaídas en pacientes con tuberculosis pulmonar en Hermosillo. *RESPYN* 9(Ed. especial No. 6):19-25.

- Stewart, G. R., Snewin, V. A., Walzl, G., Hussell, T., Tormay, P., O'Gaora, P., Goyal, M., Betts, J., Brown, I. N., Young, D. B. 2001. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 7(6):732-37.
- Tsolaki, A. G., Hirsh, A. E., DeRiemer, K., Enciso, J. A., Wong, M. Z., Hannan, M. , Goguet de la Salmoniere, Y. O., Aman, K. , Kato-Maeda, M., Small, P. M. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. *Proc Natl Acad Sci* 101(14):4865-70.
- USAID. 2007. USAID Health: Infectious Diseases, Tuberculosis, Countries, Mexico. from http://www.usaid.gov/our_work/global_health/id/tuberculosis/countries/lac/mexico_profile.html.
- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H., van der Meer, J. W. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 15(2):294-309.
- Van Deinse, F. 1950. BCG on Sauton's medium: Effect of a long series of subcultures on the morphological and biological properties of BCG cultures. *WHO Bulletin* 2:347-54.
- Vydra, J., Selicharová, I., Smutná, K., Sanda, M., Matouskova, E. 2008. Two dimensional electrophoretic comparison of metastatic and non-metastatic human breast tumors using in vitro cultures epithelial cells derived from the cancer tissues. *BMC Cancer* 8: 107
- von Groll, A., Martin, A., Portaels, F., Almeida da Silva, P. E., Palomino, J. C. 2010. Growth kinetics of *Mycobacterium tuberculosis* measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Braz J Microbiol* 41(2):300-3.
- Wang, Z., Potter, B. M., Gray, A. M., Sacksteder, K. A., Geisbrecht, B. V., Laity, J. H. 2007. The solution structure of antigen MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*

defines a new family of beta-grasp proteins.
J Mol Biol 366(2):375-81.

Weldingh, K., Rosenkrands, I., Jacobsen, S., Rasmussen, P. B., Elhay, M. J., Andersen, P. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun* 66(8):3492-500.

WHO. 2012. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing. WHO report 2012. Geneva, World Health Organization.

Wong, D. K., Lee, B. Y., Horwitz, M. A., Gibson, B. W. 1999. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun* 67(1):327-36.

Yamaguchi, R., Matsuo, K., Yamazaki, A., Abe, C., Nagai, S., Terasaka, K., Yamada T. 1989. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 57(1):283-8.

Zenteno-Cuevas, R. 2003. Pasado, presente y futuro de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 16(3):181-86.

Zhang, B., Su, Y.P., Ai, G.P., Liu, X.H., Wang, F.C., Cheng, T.M. 2003. Differentially expressed proteins of gamma-ray irradiated mouse intestinal epithelial cells by two dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *World J Gastroenterol* 9(12): 2726-31.

Zvi, A., Ariel, N., Fulkerson, J., Sadoff, J. C., Shafferman, A, 2008. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomics* 1:18.

APENDICE 1

Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Escala de medición	Tipo de Variable
Variable Dependiente				
Perfil o mapa proteico del filtrado de cultivo de la cepa clínica.	Proteínas acumuladas en el ambiente extracelular de un cultivo líquido <i>in vitro</i> y detectadas por electroforesis. (Sonnenberg y Belisle, 1997)	Proteínas detectadas en los filtrados de cultivo de <i>M. tuberculosis</i> en electroforesis mediante tinción Coomassie	Igual o Diferente a H37Rv	Cualitativa dicotómica
Variable independiente				
Presencia de proteínas	Detección electroforética de las diferentes proteínas en los filtrados de cultivo.	Presencia o ausencia de una mancha proteica según lo revelado por el método de tinción Coomassie y que pueda ser detectada por un densitómetro de alta resolución acoplado a un programa de análisis densitométrico.	Presencia o ausencia de la señal de una mancha proteica, en la intersección del punto isoeléctrico y masa molecular de la proteína en cuestión.	Cualitativa dicotómica
Cantidad de proteína.	Intensidad de la señal (volumen de la mancha) de cada proteína que compone al filtrado de cultivo (Manual PDQuest)	Densidad óptica promedio del área de la mancha proteica (Manual PDQuest).	Numérica, sin unidades.	Cuantitativa continua

APENDICE 2

Componentes del Medio Sauton

7.34 mM Fosfato de potasio monobásico

2.02 mM Sulfato de magnesio

0.0239 mM L-Asparagina

102 μ M Citrato de amonio férrico

9.51 mM Ácido cítrico monohidratado

0.684 M Glicerol

45.4 mM Piruvato de sodio

3.47 μ M Sulfato de zinc

27.7 mM Glucosa

Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 5N, Aforar a 1 litro, y esterilizar por filtración.