

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Identificación de Antígenos Inmunodominantes en el Filtrado Proteico de
Mycobacterium tuberculosis H37Rv Cultivado en Medio Líquido Sauton,
Utilizando el Suero de Pacientes con Tuberculosis del Hospital Infantil del
Estado de Sonora



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

Presenta

Karla Alejandra Monge Villegas

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2011

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 **Karla Alejandra Monge Villegas**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dra. Maria del Carmen Candia Plata
Director de Tesis

Dr. Gerardo Álvarez Hernández
Secretario

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña
Vocal

Dr. Enrique Bolado Martínez
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, al Programa de Maestría en Ciencias de la Salud 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.

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 QB María del Rosario Aguayo Verdugo, QB Miriam Patricia Lugo Zazueta y QB Lizbeth Alejandra Burboa Rodríguez por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria del Hospital Infantil de Sonora, al Dr. Gerardo Álvarez Hernández por su disposición para la realización de este trabajo, así como a los Doctores Manuel Alberto Cano Rangel, María de los Ángeles Durazo Arvizu y Roberto Dórame Castillo.

A mi directora de tesis Dra. Maria del Carmen Candia Plata un agradecimiento infinito por depositar su confianza en mí, por ser mi guía, por su tiempo y apoyo para la realización de este trabajo, por ser ejemplo de profesionalismo, además de excelente persona. Sin usted no hubiera sido posible lograr esto, muchas gracias.

A mis sinodales Dr. Gerardo Álvarez Hernández, Dr. Enrique Bolado Martínez y MC Lucía Guadalupe Castellón Campaña por sus contribuciones para la finalización de este trabajo. Maestra Lucía gracias por compartir su experiencia en el laboratorio desde el inicio del proyecto y por brindarme parte de su tiempo para la realización del trabajo, así como su amistad.

A mis amigos de laboratorio: QB Claudia Celeste Molina Domínguez MC Miriam Denisse García Villa, Dr. Luis Fernando López Soto, Dra. Adriana Soto Guzmán, QB Aby Cervantes Domínguez, MC Edson Norberto Cárcamo Noriega, Dr. José Manuel Galván Moroyoqui, pQB Nancy Carolina Rodríguez Munguía, QB Melissa Castañeda Rivera, QB Gabriela Zubiata Cabanillas y QB Fátima Romero Ayala por compartir buenos momentos en el laboratorio, por su apoyo incondicional, por su gran amistad y compartir sus conocimientos conmigo.

DEDICATORIA

A mi bella familia, por estar siempre conmigo en cada paso que doy, en especial a mi madre y abuelos, por apoyarme en todo momento y no dejarme caer nunca; a Aarón por haber llegado a mi vida y descubrir un mundo nuevo a su lado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
OBJETIVOS.....	viii
Objetivo General.....	viii
Objetivos Específicos.....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Tuberculosis.....	4
Definición.....	4
Epidemiología.....	5
Patogenia.....	6
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
Características Generales	7
Genoma.....	8
Proteoma.....	11
Proteínas de Filtrado de Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
Proteínas con Potencial Valor Serodiagnóstico.....	13
Proteínas con Potencial Valor Preventivo.....	16
Métodos para el Estudio del Proteoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	20
Electroforesis en una Dimensión	20
Electrotransferencia e Inmunodetección (Western-blot).....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Muestras Séricas de Pacientes.....	25
Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	25

Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	25
Filtrado de Cultivo.....	26
Estimación de la Concentración Proteica del Filtrado de Cultivo.....	26
Electroforesis SDS-PAGE de Filtrado de Cultivo.....	26
Inmunoensayos en una Dimensión.....	27
Plan de Análisis.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Estimación de la Concentración Proteica del Filtrado de Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	28
Electroforesis de Filtrado de Cultivo en una Dimensión.....	28
Inmunodetección en SDS-PAGE de una Dimensión.....	30
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de la pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
2	Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	10
3	Representación esquemática de la separación de los componentes de una mezcla proteica en SDS-PAGE.....	21
4	Esquematación del método de electrotransferencia e inmunodetección.....	24
5	Perfil electroforético del filtrado proteico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv obtenido del desarrollo en medio líquido Sauton después de cuatro semanas de incubación.....	29
6	Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros control.....	31
7	Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de contactos.....	33
8	Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes con tuberculosis.....	34
9	Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar	36
10	Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes post-tratamiento.....	38

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar polipéptidos inmunodominantes del filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv obtenido del medio líquido Sauton, utilizando los sueros de pacientes pediátricos con tuberculosis del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

Objetivos Específicos

1. Cultivar la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio líquido Sauton, para obtener el filtrado proteico.
2. Obtener los perfiles electroforéticos, en una dimensión, del filtrado proteico.
3. Identificar polipéptidos inmunodominantes mediante ensayos inmunoquímicos con los sueros de pacientes con tuberculosis del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

RESUMEN

En los últimos años, la investigación del proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se ha centrado en las proteínas que esta bacteria libera al medio de cultivo en el que crece *in vitro*. Las proteínas secretadas o CFP (Culture Filtrate Proteins) son antígenos con un alto potencial serodiagnóstico y preventivo, pero para evaluar su inmunodominancia se requieren estudios en distintas poblaciones, ya que los resultados obtenidos en poblaciones adultas sugieren que no hay un antígeno o un grupo de ellos que sea reconocido por todos o la gran mayoría de los pacientes con tuberculosis. En las poblaciones pediátricas es escaso el conocimiento de la inmunodominancia de las CFP. Por esta razón, en este trabajo se realizó la identificación de antígenos inmunodominantes en el filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, utilizando el suero de pacientes pediátricos con tuberculosis. Para lograr esto, se ensayó el suero de 19 pacientes pediátricos con tuberculosis pulmonar, 8 pacientes post-tratamiento, 9 casos de tuberculosis extrapulmonar (6 tuberculosis ósea, 1 caso de tuberculosis intestinal, 1 caso de tuberculosis renal y 1 caso identificado por PCR), 9 contactos y 15 controles. Los resultados obtenidos en el patrón de reconocimiento por el grupo control mostraron un amplio reconocimiento hacia las CFP de 16 a 138 kDa, sin variaciones interindividuales, pero distinto de los reportados previamente en países en los que no se vacuna sistemáticamente a la población pediátrica. El grupo de contactos mostró mayor reactividad hacia una banda de 23 kDa, que no fue reconocida por el grupo control y podría corresponder a la superóxido dismutasa, una proteína inmunodominante entre pacientes con tuberculosis activa, pero que no se había mostrado inmunorreactiva en contactos. El grupo de tuberculosis pulmonar mostró intensa seroreactividad hacia las bandas de 66 y 82 kDa; estos resultados son similares a los reportados previamente. El 33% del grupo de pacientes con tuberculosis extrapulmonar mostró reactividad hacia una banda de 17 kDa, que podría corresponder a la proteína de choque térmico 16.3, reconocida como un factor de virulencia esencial para la supervivencia del bacilo en ambientes hostiles del hospedero e inmunogénica en las

formas extrapulmonares de TB. Finalmente, el grupo de post-tratamiento reaccionó con bandas en el rango de 14-20 kDa; no se han publicado reportes utilizando sueros de pacientes post-tratamiento, por lo que la información obtenida en este caso, podría representar una avenida para el avance de la respuesta inmunológica de los pacientes que concluyeron el tratamiento.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un grave problema de salud tanto a nivel mundial como nacional (Herranz y Bernaola, 2007; Moreno y col., 2009). La Organización Mundial de la Salud estima que anualmente se presentan 9.2 millones de casos nuevos de tuberculosis (Guio y col., 2010), provocando la muerte de dos millones de personas, de las cuales 400,000 ocurren en la población infantil; el 90% de estos decesos se presentan en los países en vías de desarrollo (Herranz y Bernaola, 2007). En México, la tuberculosis infantil representa el 5.3% del total de casos reportados (Orozco y col., 2009) y se expresa con una diversidad de manifestaciones clínicas, tanto pulmonares como extrapulmonares (Herrmann y col., 2009), siendo la tuberculosis miliar y meníngea las formas más graves (Herranz y Bernaola, 2007).

La tuberculosis infantil es un gran desafío en términos diagnósticos (Lawn y Zumla, 2011) debido a la naturaleza paucibacilar de la enfermedad (Herranz y Bernaola, 2007). La confirmación bacteriológica de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) en niños sólo es posible en menos del 40% de los casos sospechosos. En la práctica, a pesar de la alta prevalencia de la enfermedad en los países con recursos limitados, el diagnóstico se basa en los antecedentes clínicos (familiares y personales), radiográficos y en la prueba dérmica de la tuberculina (Hatherrill y col., 2006). Esta última, es una prueba inespecífica para el diagnóstico de la tuberculosis, por su incapacidad de distinguir entre pacientes infectados con *M. tuberculosis* e individuos sensibilizados con otras micobacterias, incluyendo a los individuos vacunados con el bacillo de Calmette Guerin (Herranz y Bernaola, 2007). En cambio, los métodos moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) son muy sensibles y específicos para la identificación de especies micobacterianas (Hatherrill y col., 2006), pero son difíciles de aplicar para el diagnóstico de rutina en los países en vías de desarrollo (Castro y col., 2005).

Por tales razones, es necesario continuar en la búsqueda de métodos de diagnóstico alternativos para el control de la tuberculosis. Además, el desarrollo de una nueva vacuna, que sea efectiva contra la tuberculosis, es la más alta prioridad en investigación a nivel internacional (Lawn y Zumla, 2011; Weldingh y col., 2005). Debido a la gran heterogeneidad de la respuesta de anticuerpos en pacientes con tuberculosis, uno de los pasos más importantes para el progreso en el diseño de vacunas y nuevos métodos serodiagnósticos es la identificación de antígenos inmunodominantes micobacterianos en distintas poblaciones. En los últimos años, dichos estudios han demostrado que algunas de las proteínas que *M. tuberculosis* libera al medio líquido en el que se cultiva (filtrado de cultivo o CFP por sus siglas en inglés), son blancos de la respuesta inmune del hospedero infectado. De este modo, los filtrados de cultivos líquidos de *M. tuberculosis* constituyen una fuente importante de antígenos con potencial valor diagnóstico e inmunoprotector (Abebe y col., 2007; Weldingh y col., 2005).

Entre los medios líquidos más empleados en este tipo de investigaciones se cuenta con el medio Sauton, que contiene componentes necesarios para el crecimiento óptimo de *M. tuberculosis*. Hasta ahora, se han podido identificar 510 proteínas entre las más de 1,000 proteínas presentes en los filtrados de cultivo (Proteome 2D-PAGE Database, 2011), de las cuales, más de 33 proteínas, con pesos moleculares en el rango de 14-112kDa (Andersen y col., 1991; Samanich y col., 2001), tienen un valor serodiagnóstico comprobado en pacientes adultos con tuberculosis (Samanich y col., 2001). Sin embargo, se desconoce cuáles de estas proteínas son inmunogénicas en la población pediátrica.

Por lo anterior, en el presente trabajo se cultivó *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en medio líquido Sauton para obtener proteínas solubles, separarlas por electroforesis de una dimensión, y realizar ensayos inmunoquímicos con muestras de suero de pacientes pediátricos con tuberculosis, para identificar polipéptidos

inmunodominantes con potencial valor serodiagnóstico y preventivo en población pediátrica.

ANTECEDENTES

Tuberculosis

Definición

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa de naturaleza crónica, que afecta a seres humanos de todas las edades (Palma-Nicolás y col., 2007). Es causada por bacterias del Complejo *M. tuberculosis*, pero principalmente por la especie *M. tuberculosis* (Zenteno-Cuevas, 2003).

La tuberculosis continúa siendo un problema de magnitud mundial, ya que es la primera causa de muerte de origen infeccioso en el mundo y ha sido declarada como una emergencia global por la Organización Mundial de la Salud (Moreno y col., 2009; WHO, 2008). Se creía que la tuberculosis era una enfermedad controlada, sin embargo se ha observado una reemergencia en nuestro medio (Moreno y col., 2009) debido a diversos factores como la aparición de cepas multidrogo-resistentes y su co-existencia con el virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Rosas y Arce, 2007; Lawn y Zumla, 2001) y la diabetes (Dooley y col., 2009), que se han sumado a factores socioeconómicos y genéticos, determinando una mayor susceptibilidad de la población a esta enfermedad (Herrera y col., 2005).

A pesar de la amplia disponibilidad de la vacuna antituberculosa (BCG), la incidencia de la tuberculosis ha ido en aumento; por ello, en los últimos años se ha cuestionado su eficacia, aunque está claro que las personas vacunadas tienen menor riesgo de desarrollar las formas extrapulmonares de la enfermedad, especialmente la tuberculosis meníngea en los niños (Palma Nicolás y col., 2007).

Epidemiología

La tuberculosis es todavía una importante causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Orozco y col., 2009), estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud indican que una de cada tres personas se encuentra infectada por *M. tuberculosis* (Herranz y Bernaola, 2007).

En el año de 2009, se presentaron alrededor de 9.4 millones de nuevos casos por tuberculosis alrededor del mundo, causando la muerte de 1.7 millones de personas en este periodo (WHO, 2010). En ese año, la incidencia global fue de 137 casos por 100,000 habitantes, después de alcanzar un máximo en el 2004 de 142 casos por 100,000 habitantes (WHO, 2010), siendo mucho mayor en ciertas zonas geográficas, como en África y Asia, con una pequeña proporción de casos en la región europea mediterránea oriental y en América (Lawn y Zumla, 2011).

Dentro del contexto nacional, el comportamiento de la tuberculosis respiratoria ha experimentado una disminución tanto de su morbilidad como mortalidad. De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, en el 2007 México registró una tasa de 16.3 por cada 100,000 habitantes, con un total de 17,143 casos nuevos, lo que refleja una disminución del 11% respecto a la tasa registrada en el año 2000, fecha en la que se identificaron 18,434 casos con una tasa de 18.3 por cada 100,000 habitantes. Del total de casos notificados en el 2007, la forma más frecuente fue la tuberculosis pulmonar, con un total de 14,422 casos nuevos (SINAVE, 2008). Los estados que presentaron las tasas más altas de tuberculosis en la población pediátrica fueron: Baja California (18.5); Tamaulipas (7.9); Baja California Sur (7.5); Colima (7.5); Sonora (7.2); Guerrero (6.9); Chiapas (6.8) y Nayarit (5.7) (Orozco y col., 2009). La tuberculosis infantil está íntimamente ligada a la del adulto y el riesgo de desarrollarla varía en función de la edad, siendo más alto en mayores de 10 años, aunque las formas de tuberculosis más graves predominan en menores de 5 años (Orozco y col., 2009).

Patogenia

La infección tuberculosa se produce cuando un sujeto entra en contacto con *M. tuberculosis*, desencadenándose en su organismo una respuesta inmune (García y col., 2003). Esta interacción está determinada por la virulencia de la cepa y la resistencia del hospedero, en la que la inmunidad mediada por células juega un papel importante en la prevención de la enfermedad activa. La infección primaria por tuberculosis suele ser el resultado de la inhalación de pequeñas gotas que contienen bacilos viables de *M. tuberculosis*, desde un individuo con una infección pulmonar activa. Las bacterias inhaladas se depositan en los pulmones, pero el hospedero responde en la mayoría de los casos con una respuesta inmune frente a la bacteria, que origina una reacción de hipersensibilidad tardía y la formación de agregados de macrófagos activados denominados tubérculos (Madigan y col., 2009). Cuando los bacilos ingeridos por estos macrófagos alveolares tienen la habilidad de sobrevivir y multiplicarse intracelularmente por la inhibición de la formación del fagolisosoma (Kindt y col., 2007) la infección pulmonar se convierte en aguda, ocasionando una destrucción masiva del tejido pulmonar (Madigan y col., 2009). Al lisarse estos macrófagos infectados, como eventualmente ocurre, un gran número de bacilos son liberados y pueden diseminarse por la sangre y vasos linfáticos hacia la cavidad pleural, huesos, sistema urogenital, meninges, peritoneo y piel (Kindt y col., 2007) y provocar la muerte. Sin embargo, en la mayoría de los casos no se evidencia una infección aguda, ya que ésta permanece localizada y no muestra progresión clínica (Madigan y col., 2009). A diferencia de la infección en adultos, los niños que sufren de infección tuberculosa progresan más rápido a la enfermedad, y tienen un mayor riesgo de presentar formas graves y diseminadas de tuberculosis, debido a la inmadurez de su sistema inmune que provoca la acelerada multiplicación de los bacilos (Herranz y Bernaola, 2007).

Mycobacterium tuberculosis

Características Generales

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular obligado que puede infectar a varias especies animales, aunque los seres humanos son su principal hospedero (Lawn y Zumla, 2011). Es un bacilo recto y delgado con dimensiones de 0.4 x 3 μm , no forma esporas y es inmóvil, (Brooks y col., 2008), aerobio (Lawn y Zumla, 2011). Es de crecimiento lento, ya que sus colonias son visibles hasta las tres semanas de incubación; cuando éstas crecen en medio sólido, se observan colonias densas, compactas y rugosas (Madigan y col., 2009). En medios líquidos las micobacterias crecen en cúmulos debido al carácter hidrófobo de su superficie celular (Brooks y col., 2008). Sus necesidades nutricionales son relativamente sencillas, ya que puede crecer en un medio sencillo, con sales minerales con amonio como fuente de nitrógeno y glicerol o acetato como única fuente de carbono (Madigan y col., 2009).

Este bacilo resiste condiciones alcalinas y ácidas y también es resistente a los fenoles debido a su alto contenido de lípidos en su pared celular; de ahí surge su propiedad ácido-alcohol resistente (Brooks y col., 2008). La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática. La cápsula es su capa más externa, que le sirve de protección contra los múltiples factores externos y está compuesta principalmente de ácidos micólicos y glicolípidos; estos últimos son los responsables principales de las características antigénicas de la micobacteria. La pared celular se localiza debajo de la cápsula y está separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido de lípidos y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano. Los ácidos micólicos son ácidos grasos formados por cadenas de 70-80 carbonos, a los cuales se les atribuye el carácter hidrófobo de la envoltura micobacteriana. Su membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, con la diferencia de que

los derivados de los fosfolípidos micobacterianos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (Gorocica y col., 2005) (Fig. 1).

Genoma

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv consiste en 4.4×10^6 pares de bases, conteniendo aproximadamente 4,000 genes, que muestran las características únicas de esta bacteria (Fig. 2). Alrededor de 200 de estos genes codifican enzimas relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos, entre estos se encuentran aproximadamente 100 genes que codifican enzimas que intervienen en la β -oxidación de ácidos grasos. El gran número de enzimas micobacterianas puede estar relacionado con la habilidad de este patógeno para crecer en los tejidos del hospedero infectado, donde los ácidos grasos pueden ser la mayor fuente de carbono. Así mismo, otra característica del genoma de *M. tuberculosis* es la presencia de genes codificadores de proteínas ricas en glicina y de las familias de proteínas PE y PPE, nombres que derivan de las secuencias de aminoácidos Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE) encontradas en las regiones N-terminal de cada una de estas proteínas, que tienen entre 110 y 180 aminoácidos (Smith, 2003). La función de estas grandes familias proteicas es desconocida, pero se ha observado que son de tamaño variable y se encuentran 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).

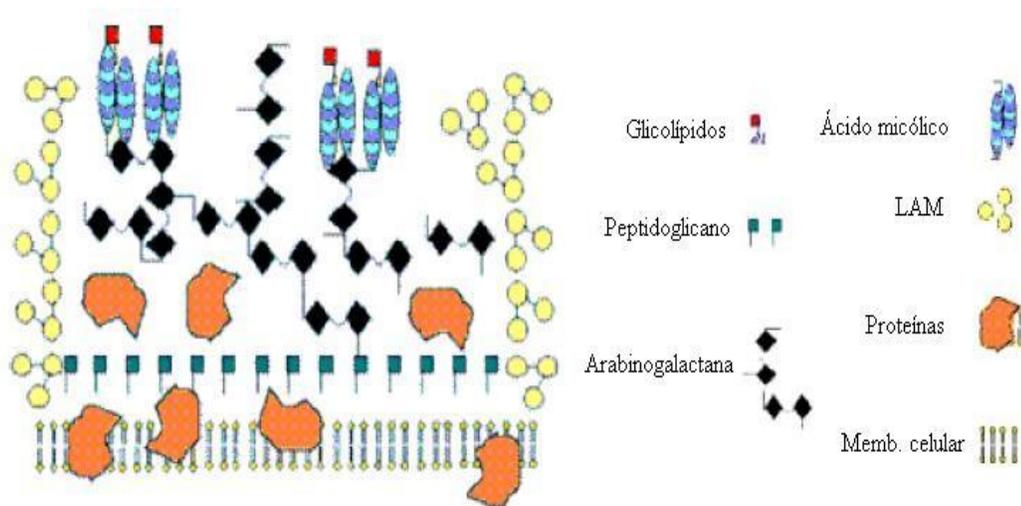


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Gorocica y col., 2005).

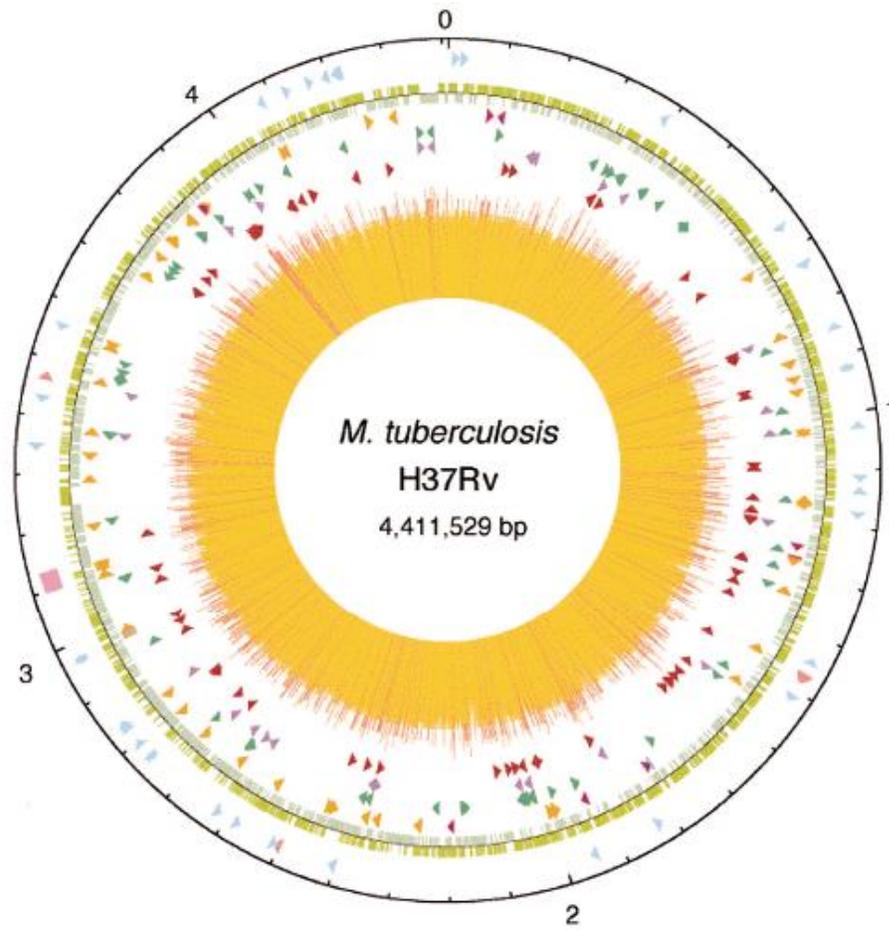


Figura 2. Genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Smith, 2003).

Al culminar la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* se logró un gran avance en el conocimiento de la biología de esta especie, pero aún con esto no se puede explicar la diversidad en la secuencia genómica entre especies, ni tampoco en la expresión proteica, ya que diversos estudios han demostrado que existen proteínas no identificadas por los análisis genómicos que en cambio se pueden detectar eficazmente por medio de análisis proteómico (Fleischmann y col., 2002; Jungblut y col., 2001).

Proteoma

El proteoma es definido como la expresión proteica total de cualquier organismo (Starck y col., 2004), ya que este no sólo representa los productos génicos, sino también sus modificaciones cotraduccionales y post-traduccionales (Jungblut y col., 1999). El proteoma, en analogía al genoma, se utiliza para describir el conjunto de proteínas expresadas por un organismo bajo un conjunto de condiciones definidas. El genoma es considerado estático, pero el proteoma es dinámico y mucho más complejo, ya que es constantemente alterado en respuesta a los cambios del ambiente (Hitchen y Dell, 2006). La proteómica es el estudio del proteoma que intenta correlacionar la diversidad funcional y estructural de las proteínas con los procesos biológicos asociados a ellas. Esta disciplina ha creado oportunidades 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 las proteínas, su identificación y cuantificación, análisis secuencial proteico, interacción proteómica y modificación proteica. En su sentido más amplio, involucra la actividad de las proteínas, sus modificaciones, interacciones y localización dentro de un organismo ó célula (Kavallaris y Marshall, 2005).

La gran cantidad de información disponible actualmente sobre el contenido proteómico micobacteriano, ha proporcionado nuevos conocimientos sobre los procesos bioquímicos y fisiológicos que rigen la vida del bacilo de la tuberculosis (Tekaiya y col., 1999). En los próximos años, el análisis proteómico de cepas del Complejo *M.*

tuberculosis será fundamental para la comprensión de las bases moleculares de su virulencia y patogenicidad (Jungblut y col., 1999; Rosenkrands y col., 2000).

Hasta ahora, se ha logrado la separación de alrededor de 1,800 manchas proteicas por electroforesis en dos dimensiones (2-DE), y a pesar de la similitud de los patrones en general, se han logrado observar diferencias claras y reproducibles comparando cepas virulentas de *M. tuberculosis* con cepas vacunales atenuadas (Jungblut y col., 2001). Estos reportes acerca del proteoma de varias cepas micobacterianas se han realizado en proteínas citosólicas así como de proteínas de la pared celular y proteínas de filtrado de cultivo (Starck y col., 2004). En un estudio realizado por Mattow y col., en el 2003, aplicando 2-DE, se observaron 1,250 manchas proteicas a partir del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, para la comparación del análisis proteómico de la cepa H37Rv y la cepa vacunal *Mycobacterium bovis* BCG, identificándose 39 manchas proteicas correspondientes a 27 proteínas únicas de *M. tuberculosis*. En el 2007, otro estudio permitió la identificación de 257 proteínas presentes en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, de las cuales 159 contienen un péptido señal N-terminal, 25 poseen un dominio transmembranal y 36 son lipoproteínas (Målen y col., 2007).

Datos más recientes del proteoma micobacteriano, obtenidos por métodos bioinformáticos, sugieren que éste posee 99 lipoproteínas que representan el 2.5% del proteoma; además, a partir del análisis de los primeros 40 aminoácidos de la región amino terminal de estas lipoproteínas se encontró que 35 poseen sitios O-glicosilados (González y col., 2009). Esta última información es de gran importancia en el estudio del proteoma de *M. tuberculosis* porque las modificaciones post-traduccionales son las claves de la funcionalidad proteica (Del Portillo y col., 2007). Hasta el momento, se han identificado por 2-DE, 290 manchas asociadas con proteínas celulares y 510 con proteínas de filtrado de cultivo; sin embargo, se cree que estos dos conjuntos proteicos representan una fracción del proteoma (Proteome 2D-PAGE Database, 2011). Todos estos estudios tienen como finalidad completar el conocimiento acerca de las proteínas de *M. tuberculosis*, su función y sus vías de secreción, permitirá fin de desarrollar

nuevas técnicas diagnósticas y diseñar una nueva vacuna contra la tuberculosis (Mattow y col., 2003).

Proteínas de Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* son aquellas que la bacteria libera al medio de cultivo en el que crece (Smith, 2003). Estas proteínas, han sido tradicionalmente caracterizadas como importantes antígenos y moduladores del sistema inmune. Antes de ser liberadas, algunas de estas proteínas residen en la pared celular donde su función sigue siendo desconocida (Wolfe y col., 2010) así como su mecanismo de secreción (Smith, 2003). Sin embargo, un número significativo de publicaciones sugieren que estas proteínas son blanco de inmunorrespuestas en el hospedero infectado (Ramírez y col., 2002), de tal manera que el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* constituye una fuente importante de antígenos con enorme potencial en términos de su valor diagnóstico (Lyaschenko y col., 1998) y con capacidad de inducir inmunidad protectora (Gomez y col., 2000).

La mayoría de los estudios con estas proteínas están encaminados a la identificación de blancos moleculares con utilidad potencial para el desarrollo de una prueba diagnóstica (Samanich y col., 2001) y el desarrollo de nuevas vacunas; se cree que una de las posibles estrategias para el desarrollo de una vacuna mejorada contra la tuberculosis involucra el uso de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* durante su crecimiento *in vitro* (Attanasio y col., 2000).

Proteínas de Potencial Valor Serodiagnóstico

La glicoproteína inmunodominante de 38 kDa ha sido identificada como un componente de los filtrados obtenidos en plazos cortos (21 días) (Andersen y col., 1991). Este antígeno es una lipoproteína (Chang y col., 1994) que al parecer está involucrada en el metabolismo de fosfato en la micobacteria y presenta una homología

significativa con la proteína PhoS, una proteína unidora de fosfato localizada en el espacio periplásmico de *Escherichia coli*. La presencia de este antígeno en los filtrados de cultivos jóvenes, implica que es una proteína de secreción con funciones asociadas a la membrana celular, de la que se libera gradualmente (Andersen y col., 1991). Es conocida como un potente inmunógeno (Chang y col., 1994), ya que posee diferentes epítopes capaces de inducir la proliferación de anticuerpos específicos contra *M. tuberculosis* (Ramírez y col., 2002). La proteína de 38 kDa ha sido empleada en ensayos inmunoabsorbentes ligados a una enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) detectando del 40 al 80% de los casos de tuberculosis con baciloscopia positiva, en diferentes cohortes de pacientes. Además, diversos estudios han demostrado que los anticuerpos anti-38-kDa están presentes en pacientes con enfermedad avanzada, recurrente y crónica (Samanich y col., 2000) y por esta razón ha sido empleado para el desarrollo de ensayos comerciales para la detección de tuberculosis (Houghthon y col., 2002); Sin embargo, este antígeno no es el ideal para crear una prueba serodiagnóstica óptima (Dillon y col., 2000), ya que aunque su sensibilidad puede ser tan alta como del 80% (Samanich y col., 2000), la especificidad de los ensayos que usan este antígeno es muy baja como del 40% (Mukherjee y col., 2004; Abebe y col., 2007).

Las proteínas ESAT-6 (Rv3875) y CFP-10 (Rv3874) son miembros que pertenecen a la familia Esat6, relacionada con las proteínas de bajo peso molecular secretadas por *M. tuberculosis* (Smith, 2003). Diversos descubrimientos han mostrado que ESAT-6 y CFP-10 están presentes en todas las cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Dillon y col., 2000), debido a que estas dos proteínas tienen su código dentro de la región RD1 del genoma micobacteriano, región que se encuentra ausente en las cepas de *Mycobacterium bovis* BCG y micobacterias no tuberculosas (Ravn y col., 2005). Estas dos proteínas son inmunogénicas en humanos (Ernst y col., 2007), ya que ambas son antígenos inmunodominantes (reconocidos por la gran mayoría de pacientes con tuberculosis) (Smith, 2003). Por esta razón, tanto ESAT-6 como CFP-10, han sido utilizadas para el desarrollo de ensayos diagnósticos que emplean estas proteínas como

antígenos para la detección de respuestas inmunes específicas de *M. tuberculosis* (Ernst y col., 2007). El antígeno ESAT-6 ha sido empleado en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (gracias a que induce la producción de IFN- γ) y porque es una proteína expresada por la micobacteria durante la infección primaria y es indispensable para la supervivencia de la bacteria y su propagación *in vivo*. Este antígeno estimula respuestas inmunes protectoras en modelos murinos (Abebe y col., 2007). En el caso de la proteína CFP-10, se sabe que es reconocida por el sistema inmune de un gran porcentaje de individuos infectados con *M. tuberculosis*, tanto por pacientes con la enfermedad activa como por aquellos que han desarrollado una respuesta protectora. Los datos demuestran que la respuesta inmunológica protectora hacia CFP-10 y la susceptibilidad individual a la tuberculosis son cuantitativamente diferentes al momento de la medición. Esta dualidad de respuestas hacia este antígeno le confiere una potencial utilidad serodiagnóstica para la tuberculosis activa, así como para detectar la exposición a *M. tuberculosis* (Dillon y col., 2000).

La proteína de 16 kDa es codificada por el gen *hspX* (Hu y Coates, 1999); es una proteína citosólica reguladora (factor de virulencia), específica del Complejo de *M. tuberculosis*, esencial para la supervivencia del bacilo en ambientes hostiles del hospedero, particularmente en el estado de latencia (Abebe y col., 2007). Esta proteína es sintetizada en bajo nivel durante la fase logarítmica de crecimiento en cultivo, pero su síntesis se incrementa marcadamente durante la transición de la fase logarítmica hacia la fase estacionaria. Esta proteína se convierte en una de las más abundantes durante la fase estacionaria de crecimiento, por lo que se ha propuesto que la proteína de 16 kDa es esencial durante la supervivencia de la bacteria en su fase estacionaria (Hu y Coates, 1999) así como en condiciones adversas, como privación de oxígeno, agotamiento de nutrientes, bajo pH o acumulación de productos tóxicos (Abebe y col., 2007). Es uno de los antígenos de *M. tuberculosis* que sufre de modificaciones post-traduccionales. En presencia de adenosin trifosfato radioactivo, se ha demostrado que esta proteína se autofosforila en los residuos de serina (Abebe y col., 2007). Esta proteína que también

recibe el nombre de proteína homóloga α -cristalina y es reconocida por el suero de una alta proporción de pacientes con tuberculosis (Smith, 2003), por lo tanto ha sido empleada para la detección de isotipos de anticuerpos ya sea sola o en combinación con otros antígenos (Abebe y col., 2007). Con la proteína de 16 kDa y la proteína recombinante de 38 kDa, la sensibilidad y especificidad de los ensayos serodiagnósticos es hasta del 59% en pacientes con cultivo positivo, y la especificidad es del 98% en pacientes con tuberculosis pulmonar. En pacientes con formas extrapulmonares, la sensibilidad es de 56%, 65%, 40% y 43% en pacientes con tuberculosis ósea, renal, linfática y pleural, respectivamente, con una especificidad de 98%. Un reciente estudio sugirió que el antígeno de 16kDa puede ser de utilidad para la detección de la tuberculosis latente (Abebe y col., 2007).

Proteínas con Potencial Valor Preventivo

El complejo antigénico 85 (Ag85) es el principal constituyente de las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* (Wiker y Harboe, 1992; Målen y col., 2007) y *Mycobacterium bovis* BCG (Nagai y col., 1991). Este complejo está formado por proteínas conservadas que pertenecen a la familia de proteínas unidoras de fibronectina, que han sido consideradas factores de virulencia potenciales (Armitige y col., 2000). También es conocido como antígeno de 30/32kDa, porque está compuesto por las proteínas Ag85A (31 kDa), Ag85B (30 kDa) y Ag85C (31.5 kDa) (Kashyap y col., 2007) codificadas por los genes *fbpA*, *fbpB* y *fbpC*, respectivamente (Armitige y col., 2000). Los tres elementos que lo constituyen muestran una gran reactividad inmunológica cruzada; diversos estudios estructurales revelan una amplia homología así como características diferenciales entre los componentes individuales (Nagai y col., 1991). Los miembros del Ag85 son secretados hacia la pared celular de *M. tuberculosis* (Armitige y col., 2000); de los tres componentes, la proteína 85C es cuantitativamente menor, con relación a las fracciones 85A y 85B. El complejo antigénico 85 induce una inmunidad protectora contra la tuberculosis en cobayos, pero también la proliferación

intensa de células T y producción de interferón gamma (IFN- γ) de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de personas sanas con reactividad a la tuberculina. En otros estudios en los que se ha ensayado la inmunoreactividad de las tres proteínas nativas 85B, 85A y 85C, se han obtenido sensibilidades de 76, 50 y 12%, respectivamente. Sin embargo, el valor diagnóstico de la proteína 85B parece ser mayor al de la proteína 85A, porque la reactividad de los anticuerpos de personas sanas hacia la proteína 85A es mucho mayor que la reactividad hacia la proteína 85B (Lim y col., 1999). En un estudio realizado en la India, por Kashiap y col., en el año 2007, utilizando el método de ELISA indirecto, inmovilizando el complejo 85A, se obtuvo una sensibilidad del 82% y 86% de especificidad. Además, a escala experimental, otra investigación realizada con cobayos susceptibles a la tuberculosis pulmonar, demostró que la inmunización con la proteína de 30 kDa, sola o en combinación con otras proteínas de secreción abundantes, induce una fuerte respuesta inmune celular protectora ante a la exposición a aerosoles con bacilos de *M. tuberculosis* virulentos. La inmunoprotección se estimó por la disminución de la enfermedad clínica, a través de variables como la pérdida de peso, la mortalidad y el crecimiento de *M. tuberculosis* en los pulmones y el bazo de los animales inmunizados, en comparación con sus controles (Horwitz y col., 1995).

La proteína de 19 kDa (Ag 19 kDa) o Rv3763, es un antígeno inmunodominante que es capaz de estimular la inmunidad celular y humoral de los pacientes con tuberculosis (Smith, 2003). Este antígeno fue originalmente identificado utilizando un conjunto de anticuerpos monoclonales murinos afines a *M. tuberculosis*, subsecuentemente se evaluó su capacidad para estimular respuestas inmunes celulares y humorales en ratones y en pacientes con tuberculosis. Los resultados de los análisis de la secuencia de nucleótidos y la caracterización bioquímica de dicha proteína, sugieren que la proteína madura es una lipoproteína de secreción de *M. tuberculosis* (Hermmann y col., 1996). El Ag 19 kDa es una glicoproteína, cuya glicosilación se ha estudiado con

ensayos con la lectina *Canavalia ensiformis* (Con A) (Fifis y col., 1991), pero aún no se ha comprobado si esta modificación post-traducciona afecta su actividad inmunológica.

El complejo antigénico de 45/47 kDa (complejo Apa, por sus siglas en inglés) es una glicoproteína dimérica codificada en el gen *apa* (Romain y col., 1999) con una masa molecular de 28,780 Da por cadena polipeptídica. Con la excepción del complejo Apa, todas las proteínas glicosiladas de *M. tuberculosis* son lipoproteínas (Gonzalez y col., 2009). Este complejo está presente en los filtrados de *M. tuberculosis* y ha sido identificado y aislado por su habilidad de interactuar principalmente con linfocitos T y/o anticuerpos inducidos por inmunización de cobayos con utilizando la bacteria viva (Romain y col., 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos por la reactividad de la proteína con la lectina Con A, los glicanos que posee Apa están constituidos sólo de manosas, incluyendo el azúcar covalentemente unido a la proteína; este tipo de glicosilación es conocido como O-manosilación (González y col., 2009). Entre los productos de la proteólisis de Apa se encuentra un glicopéptido con una masa molecular promedio de 1,515 Da (Dobos y col., 1995). El análisis detallado de los glicopéptidos demostró que había cuatro sitios de glicosilación construidos sobre residuos de treonina. Los carbohidratos de Apa pueden ser α -manosa, α -manobiosa, o α -manotriosa, y se enlazan al aminoácido con uniones de tipo O; las con uniones glicosídicas son de tipo α -1,2. De los cuatro sitios de glicosilación, sólo uno muestra heterogeneidad en el número de residuos de manosa las glicofomas de 5, 6, 7 y 8 residuos de manosa son las más abundantes. También se ha detectado la presencia de otros glicopéptidos pero aún no están totalmente caracterizados. Se desconoce el papel de los oligosacáridos de las proteínas micobacterianas, pero la unión de manosa a estas proteínas puede ser importante para la respuesta inmune, ya que a diferencia de la Apa recombinante, la Apa nativa induce una respuesta de hipersensibilidad retardada y ha mostrado estimular *in vitro* a las células T (Romain y col., 1999).

El antígeno de 29 kDa, denominado CFP29, se caracteriza por desencadenar la liberación de altos niveles de IFN- γ en células de memoria efectoras de ratón, provocando inmunidad protectora contra la tuberculosis. Este antígeno es una proteína ampliamente distribuida en la especie micobacterianas y su expresión ha sido demostrada tanto en los filtrados de cultivo de especies patógenas, como de especies no patógenas de origen ambiental, sugiriendo su papel fisiológico en la micobacterias. Investigaciones de las fracciones subcelulares de *M. tuberculosis* muestran que la CFP29 está presente tanto en la membrana como en los filtrados de cultivo, pero no dentro de la fracción citosólica. Esto conduce a la conclusión que este antígeno es exportado y probablemente gradualmente liberado de la envoltura celular, haciendo posible el reconocimiento inmunológico en la fase temprana de la enfermedad. El análisis en dos dimensiones (2DE) de CFP29 muestra tres diferentes puntos puntos isoelectrónicos (pI) en el rango de 5.0-5.2, con una misma secuencia N-terminal. La causa de esta heterogeneidad aún no se conoce, pero puede ser explicada por la amidación, la oxidación de aminoácidos, o por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación proteica (Rosenkrands y col., 1998).

También las proteínas de choque térmico (HSPs) como la HSP 90, HSP 70, HSP 65 y HSP 10 han demostrado desencadenar una fuerte respuesta inmune en el hospedero durante la infección tuberculosa. Pero entre éstas, la proteína inmunodominante HSP 65 (de 65 kDa), presente en una amplia variedad de especies de *M. tuberculosis*, es capaz de desencadenar las respuestas inmunes celulares y humorales (Mudaliar y col., 2006).

Métodos para el Estudio del Proteoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Electroforesis en Una Dimensión

Al aplicarse un campo eléctrico a una solución, las moléculas de soluto con carga neta positiva se desplazarán hacia el cátodo y las moléculas con carga neta negativa se desplazarán hacia el ánodo. A este desplazamiento se denomina electroforesis. La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica empleada en bioquímica, genética y biología molecular para separar proteínas según su movilidad electroforética. Con esta técnica se logra descomponer la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, desplegándose la cadena polipeptídica que será rodeada por las moléculas de SDS. Las numerosas cargas negativas transportadas por las moléculas de SDS unidas a la proteína hacen que la carga que ésta transporta sea insignificante, así la cadena polipeptídica plegada se transforma en un objeto alargado, cuya carga y longitud son proporcionales al peso molecular de la cadena polipeptídica (Fig.3) (Mathews y col., 2010).

Al finalizar la electroforesis, los polipéptidos son teñidos con nitrato de plata o con azul de Coomassie brillante, o detectados con tinción fluorescente. Las bandas separadas en el gel de poliacrilamida pueden ser identificadas extrayéndolas, mediante cortes selectivos del gel de poliacrilamida. También es posible transferir las bandas proteicas a un soporte inerte de fácil manipulación, por ejemplo a una membrana de nitrocelulosa o de polivinildenedifluoruro (PVDF, por sus siglas en inglés). Estando en las membranas, las bandas pueden ser sometidas directamente (o después de su rompimiento enzimático o químico), al análisis inmunológico, para identificar antígenos específicos gracias a su detección con anticuerpos monoclonales específicos o con lectinas (Görg, 2007).

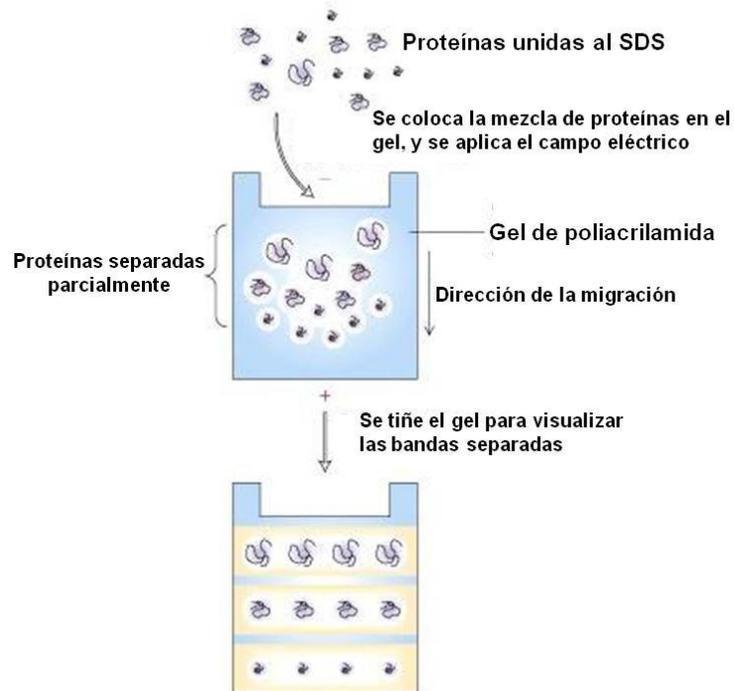


Figura 3. Representación esquemática de la separación de los componentes de una mezcla proteica, en SDS-PAGE.

Fuente: <http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/WesternBlotting.html> (Fecha de acceso 26 octubre 2011)

Electrotransferencia e Inmunodetección (Western blot)

Este método se refiere a la transferencia biológica de muestras puras o semipuras, de un gel (por ejemplo: poliacrilamida) a una membrana o soporte inerte, y su subsecuente detección sobre la superficie de la membrana, con anticuerpos, lectinas u otra sonda molecular. Este método también es llamado en inglés “immunoblotting” debido a que en muchos casos se usa un anticuerpo específico para detectar a su antígeno. Fue introducido por Towbin, y col., en 1979 y ahora es una técnica de rutina para el análisis de proteínas, y es comúnmente empleada para identificar una proteína específica dentro de una mezcla compleja de ellas así como para obtener datos cualitativos y semicuantitativos acerca de la proteína (Gravel, 2008).

Para realizar una electrotransferencia, es necesario que la mezcla de proteínas haya sido sometida primero a una separación analítica, generalmente por electroforesis en condiciones desnaturizantes, en una o dos dimensiones, de forma que las posiciones finales de las distintas proteínas en el gel dependen del tamaño de sus moléculas. A continuación, se transfiere el conjunto de proteínas separadas desde el gel de poliacrilamida de separación a una membrana de soporte, lo que hace que la membrana adquiera una réplica del conjunto de macromoléculas separadas en el gel. Durante el proceso de transferencia, el dodecil sulfato de sodio se separa de la proteína y a menudo se recuperan los determinantes antigénicos originales cuando la proteína vuelve a plegarse. La posición del antígeno proteico en la membrana puede detectarse gracias a su unión con un anticuerpo marcado, específico hacia esa proteína, lo que proporciona información sobre el tamaño y la cantidad de antígeno (Abbas y Lichtman, 2003).

Antes de hacer la inmunodetección de las moléculas separadas y transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF, es necesario bloquear la membrana para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos en la superficie de la membrana. De esta manera, al realizar la inmunodetección de las proteínas transferidas, el anticuerpo

marcado con una enzima, formará solamente un complejo con la proteína a la que esté dirigido. Después, se añade un sustrato apropiado para la enzima, a fin de producir un precipitado cromogénico o fluorogénico sobre la membrana que permita la detección (colorimétrica o fluorimétrica, respectivamente) de la proteína que se busca. El método de detección más sensible usa un sustrato quimioluminiscente, que produce luz como subproducto; la luz puede ser capturada utilizando una película o una cámara diseñada para la detección quimioluminiscente, pero cualquiera que sea el sustrato usado, la intensidad de la señal está relacionada con la abundancia de antígeno sobre la membrana (Fig. 4) (Gravel, 2008).

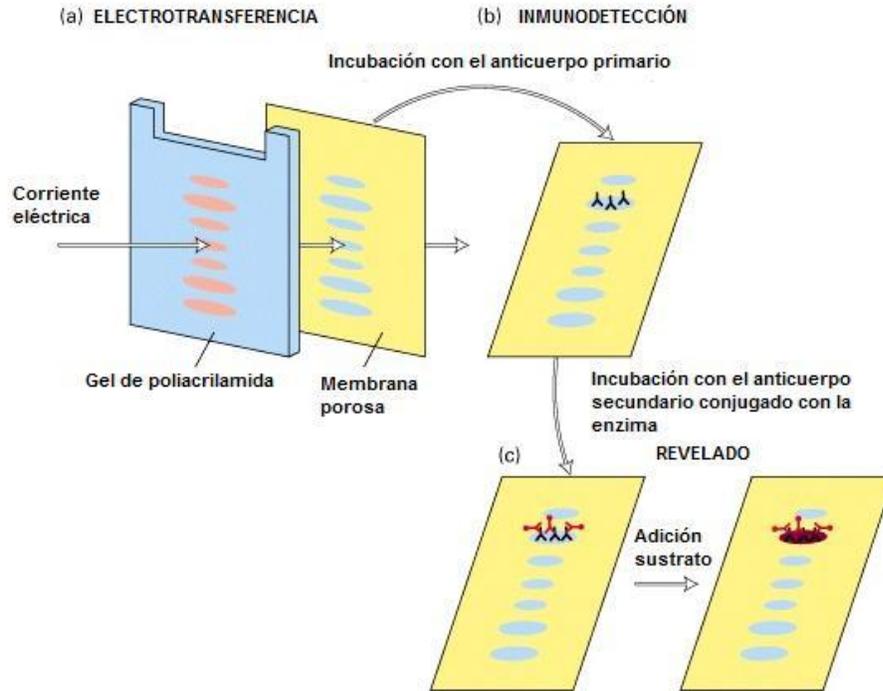


Figura 4. Esquematización del método de electrotransferencia e inmunodetección.

Fuente: <http://homepages.strath.ac.uk/~dfs99109/BB310/WesternBlotting.html> (Fecha de acceso 26 octubre 2001).

MATERIALES Y METODOS

Muestras Séricas de Pacientes

Se ensayaron muestras séricas de pacientes pediátricos con tuberculosis (TB), que asistieron a la Consulta Externa del Hospital Infantil del Estado de Sonora. Los pacientes donadores de las muestras fueron: 19 pacientes con tuberculosis pulmonar, 8 pacientes post-tratamiento, 9 casos de tuberculosis extrapulmonar, entre los cuales fueron identificados 6 casos de TB ósea, 1 TB intestinal, 1 TB renal y 1 un caso identificado mediante la técnica Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR, por sus siglas en inglés). Además, fueron incluidos 9 contactos y 15 niños aparentemente sanos como controles.

Cepa de *Mycobacterium tuberculosis*

Se utilizó la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Andersen y col., 1991; Castellón, 2008; Cárcamo, 2011), que fue tipificada en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) de México y proporcionada para este trabajo por el Departamento de Micobacterias del Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) de Hermosillo, Sonora.

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Los procedimientos que involucraron la manipulación de cepas fueron llevados a cabo en el Departamento de Micobacterias del LESP, utilizando una campana de bioseguridad tipo 2. La reactivación de la cepa, se realizó en tubos para cultivo con el medio de Löwenstein-Jensen en plano inclinado (Castellón, 2008; Cárcamo, 2011); la cepa fue sembrada en el medio e incubada a 37°C hasta observar el desarrollo del microorganismo (Castellón, 2008). La identificación de la cepa se realizó mediante pruebas bioquímicas para micobacterias y tinción de Ziehl-Neelsen (Castellón, 2008). Una vez identificada la cepa, se procedió a la inoculación de frascos de 400 mL de

medio de cultivo líquido Sauton (Salazar, 2008). Los frascos fueron incubados a 37°C en reposo durante 4 semanas (Andersen y col., 1991; Castellón, 2008; Salazar, 2008). La pureza de la cepa fue comprobada cultivando (en agar sangre) una asada del desarrollo bacteriano, e indirectamente por la ausencia de turbidez del medio de cultivo líquido (Castellón, 2008).

Filtrado de Cultivo

Para la obtención del filtrado proteico, cada cultivo fue filtrado en un sistema de filtración estéril acoplado a una bomba de vacío, utilizando una membrana de nylon con punto de corte de 0.2 µm (Millipore, Billerica, Ma, USA). Los filtrados se sometieron después a un proceso de diafiltración tangencial, utilizando centricones con membranas de nitrocelulosa con corte de 10,000 Da, en una centrífuga refrigerada a 4°C y 2,500 rpm (Sigma Chemical Co, St Louis Mo, USA). Después, el filtrado proteico concentrado fue dializado exhaustivamente contra agua tridestilada (Andersen y col., 1991; Castellón, 2008). Por último, el filtrado proteico fue liofilizado (Labconco Corporation, Kansas City, Mo, USA) y almacenado en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

Estimación de la Concentración Proteica del Filtrado de Cultivo

Se preparó una solución acuosa del filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, para estimar la concentración proteica de filtrado de cultivo por el método de Bradford (Bradford, 1976) en microplaca, utilizando albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) como proteína estándar para obtener una curva de calibración con rango de concentración de 3.125 µg/mL a 100 µg/mL (Monge, 2008).

Electroforesis SDS-PAGE de Filtrado de Cultivo

La masa de los componentes proteicos de los filtrados de *M. tuberculosis*, se estimó por medio de electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970) en geles al 15% de poliacrilamida. La corrida electroforética se realizó

a 80 volts constantes, cargando 10 µg de proteína por pozo (Monge, 2008). Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie y la masa de las diferentes cadenas polipeptídicas, se estimó empleando como marcadores de peso molecular a las proteínas estándares para electroforesis de Bio-Rad, No de catálogo: 161-0317; (Bio-Rad, Richmond, CA).

Inmunoensayos en una Dimensión

Una vez realizada la electroforesis de las proteínas de filtrado de cultivo, en geles de poliacrilamida en una dimensión, se llevó a cabo la electrotransferencia de las bandas proteicas a las membranas de nitrocelulosa, en una cámara semi-húmeda (Towbin y col., 1979) (Bio-Rad, Richmond, CA), a 120 mA constantes y 24 V por 1.3 horas. Para la inmunodetección, las membranas fueron bloqueadas con leche al 5%, BSA al 0.5% y Tween 0.02%, de 14-16 horas a 4°C. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos en agitación moderada, con PBS/Tween 0.05%. Después se incubaron las membranas con los distintos sueros (pacientes, controles y contactos), en dilución 1:100, a temperatura ambiente, en agitación moderada por 1.5 h. El antisuero secundario anti-human IgG (Fc specific) (Sigma Chemical Co, St Louis Mo, USA) conjugado con peroxidasa fue utilizado en dilución 1:4,000, incubando las membranas con el antisuero a temperatura ambiente, en agitación por 1.5 horas. La reacción fue revelada con diaminobencidina (DAB) tras la adición de peróxido de hidrógeno como sustrato (Sigma Chemical Co, St Louis Mo, USA).

Plan de Análisis

Se realizaron comparaciones individuales y por grupo (pacientes, contactos y controles) de cada una de las inmunodetecciones en una dimensión para identificar las diferencias cualitativas en los patrones de reconocimiento hacia las proteínas de filtrado de cultivo, además se compararon estos perfiles con respecto de los reportados en la literatura por otros autores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación de la Concentración Proteica del Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

La curva estándar con la que se estimó la concentración proteica del filtrado de cultivo tuvo un coeficiente de regresión lineal de 0.994. Con esta curva se estimó la concentración de proteína en el cultivo de *M. tuberculosis* filtrado (sin células), obteniéndose una concentración promedio de 11.66 µg/mL de cultivo.

Electroforesis de Filtrado de Cultivo en una Dimensión

El análisis electroforético en SDS-PAGE al 15% de filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mostró la presencia de 35 bandas proteicas con masas moleculares relativas que van desde los 14 hasta los 138 kDa (Fig. 5). Entre las 35 bandas presentes, se encontraron algunas que son fuertemente antigénicas, como el complejo antigénico 85, de 30/32 kDa (Lim y col., 1999), la proteína de 38 kDa (Samanich y col., 2000) y la proteína HSP de 65 kDa (Mudaliar y col., 2006).

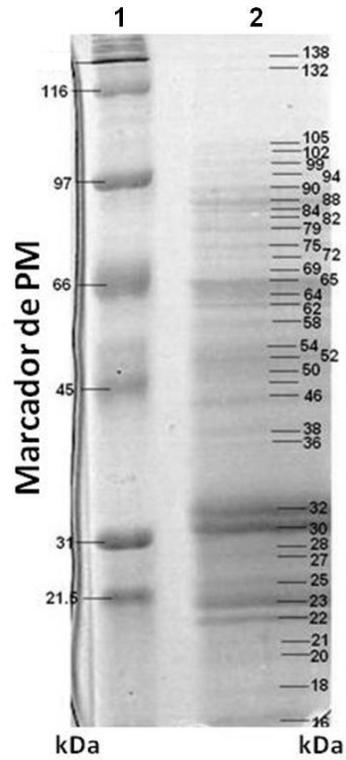


Figura 5. Perfil electroforético del filtrado proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv obtenido del desarrollo en medio líquido Sauton después de cuatro semanas de incubación. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: Proteínas de filtrado de cultivo.

Inmunodetección en SDS-PAGE de una Dimensión

En los últimos años, se han realizado diversos estudios para evaluar el potencial valor serodiagnóstico y preventivo de las proteínas de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, (Samanich y col., 2001; Lyaschenko y col., 1998). Los estudios, realizados en una población adulta estadounidense, mostraron una marcada homogeneidad en el patrón de reconocimiento antigénico, tanto de los pacientes con tuberculosis como de adultos controles (Samanich y col., 2001). No hay estudios análogos en poblaciones pediátricas, motivo por el que los resultados derivados del presente estudio pueden aportar información para el proceso de identificación de proteínas inmunorreactivas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, con potencial valor serodiagnóstico y preventivo pediátrico.

Para identificar polipéptidos inmunodominantes en el filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, la mezcla de proteínas del filtrado fue separada por SDS-PAGE en una dimensión y electrotransferidas a nitrocelulosa. Los inmunoensayos se llevaron a cabo con los 15 sueros controles pediátricos y los 45 sueros de pacientes pediátricos. De los 45 sueros obtenidos de pacientes, 19 provenían de pacientes pediátricos con tuberculosis pulmonar, ocho fueron de pacientes post-tratamiento, nueve de casos de tuberculosis extrapulmonar y 9 de contactos.

En el caso de los inmunoensayos realizados con los sueros control, se encontraron diferencias cualitativas con relación a los datos publicados por otros investigadores. Por ejemplo, a diferencia de los resultados obtenidos por Samanich y col., en el 2001, que demuestran que el suero de adultos controles norteamericanos solamente reacciona con las proteínas de 30/32kDa y el antígeno de 65 kDa, en los resultados obtenidos en este trabajo con los sueros pediátricos control (Fig. 6) se observó un perfil de reconocimiento muy amplio, que va de la banda de 22 kDa hasta la banda de 130 kDa. Estos resultados, podrían deberse a que todos los niños incluidos en el grupo

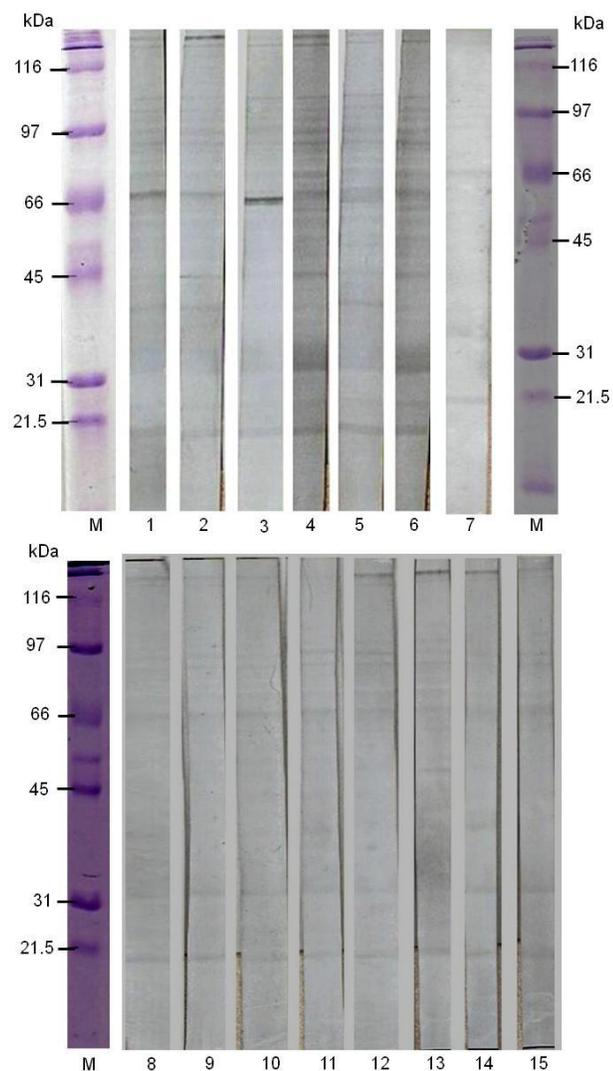


Figura 6. Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros control. Puede observarse que la reactividad es amplia (en el rango de 16-132 kDa), pero de baja intensidad. (M) Marcador de peso molecular de amplio rango, (kDa) kilodaltons.

control fueron vacunados a edad temprana con la vacuna BCG, de manera que al estar expuestos a los antígenos micobacterianos contenidos en la vacuna, desarrollaron una respuesta cruzada amplia frente a los antígenos micobacterianos comunes entre *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* (Andersen y col., 1991). Además, no se observaron diferencias interindividuales en el reconocimiento antigénico, lo que demuestra el alto grado de homogeneidad en la respuesta inmunológica de la población control estudiada.

En el grupo de contactos (Fig. 7), los inmunoensayos mostraron un patrón de reconocimiento similar al patrón observado en controles, con elevada reactividad hacia las bandas de la región que va desde los 22 kDa hasta los 137 kDa aproximadamente, Sin embargo, fue posible detectar una diferencia en el reconocimiento, que radica en la reactividad de una banda de alrededor de 23 kDa que se encuentra ausente en el grupo de controles. Esta banda, reconocida únicamente por el grupo de sueros de los contactos, puede corresponder a la proteína de 23 kDa denominada superóxido dismutasa, una metaloenzima que interviene en la patogénesis de la tuberculosis, inhibiendo la respuesta inmune del hospedero (Edwards y col., 2001). Se tiene conocimiento de la seroreactividad hacia esta proteína, entre pacientes con tuberculosis activa (Deshpande y col., 1993), pero hasta ahora no se habían reportado estudios que demuestren la seroreactividad de los contactos.

Dentro de los resultados obtenidos con el grupo de 19 pacientes con tuberculosis pulmonar (Fig. 8), se pudo observar una región de elevado reconocimiento antigénico en el rango de 30-45kDa. En este rango, se encuentran proteínas inmunodominantes para los pacientes con tuberculosis pulmonar, como el complejo de 45/47 kDa (Romain y col., 1999), L-alanina deshidrogenasa de 38 kDa (Samanich y col., 2000) y complejo antigénico de 30/32kDa (complejo 85) (Lim y col., 1999).

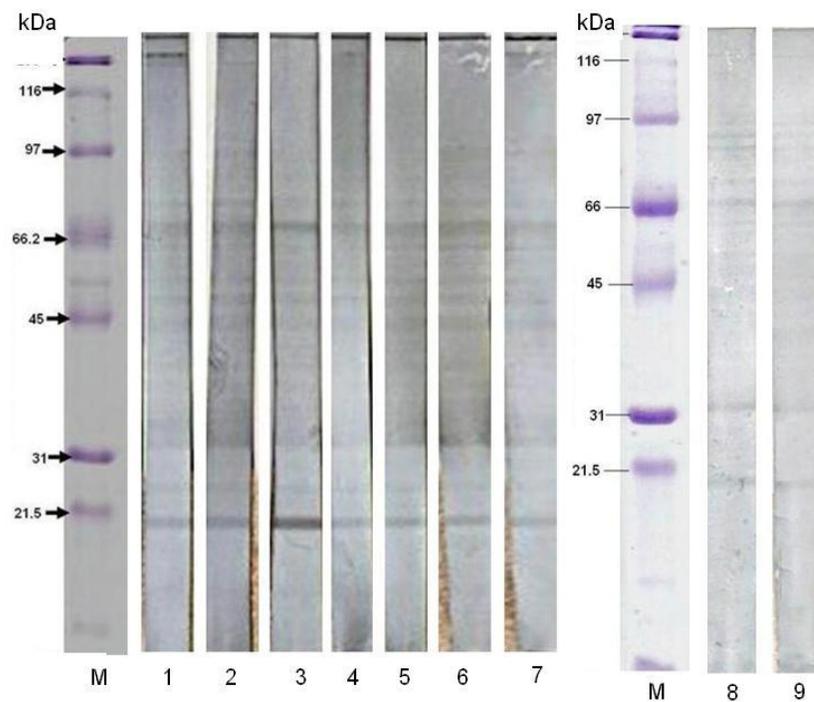


Figura 7. Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de contactos. Aunque el patrón de reconocimiento es amplio (en el rango de 22-136 kDa), se observa la reactividad intensa con una banda de 23 kDa que no reaccionó con los sueros control.

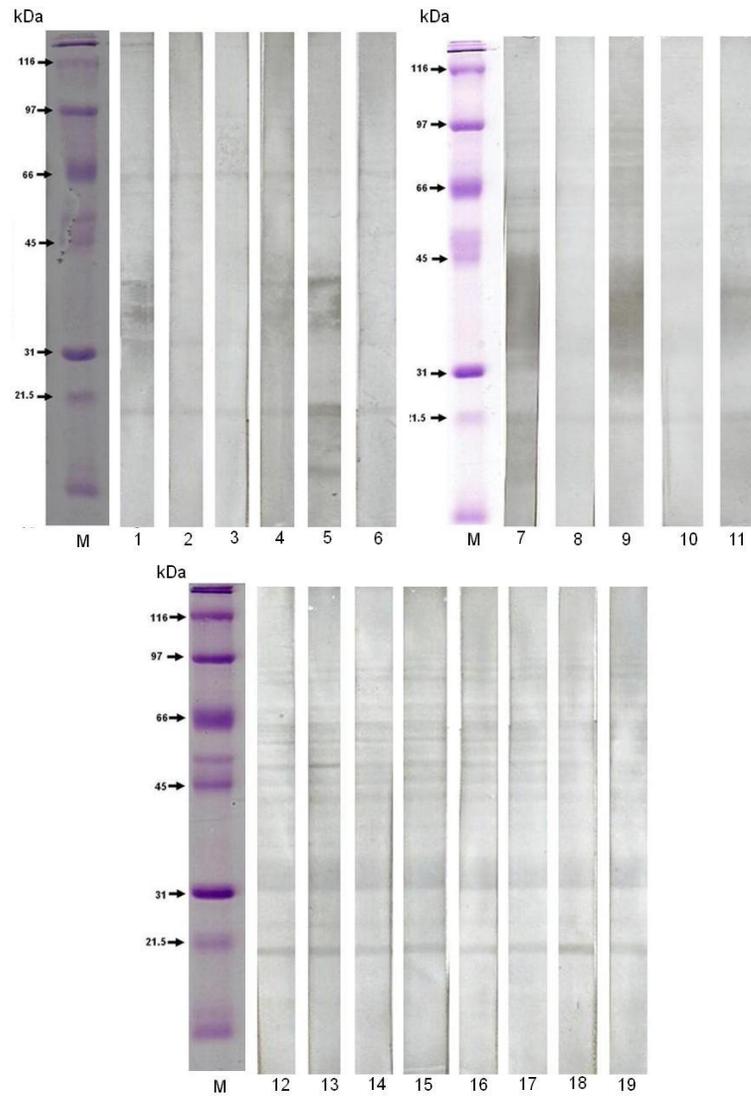


Figura 8. Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar. Los sueros 1, 4, 5, 7, 9 y 11, presentaron alta reactividad en el rango de 30-45 kDa. Los sueros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19, reconocieron intensamente una banda de alrededor de 66 kDa y los sueros 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19, reaccionaron intensamente con una banda de aproximadamente 82 kDa.

Este último, lo expresan tanto las micobacterias patógenas como las no patógenas, por lo que la exposición ambiental a estos últimos organismos provoca el desarrollo de reacciones inmunológicas cruzadas hacia el Ag85 de *Mycobacterium tuberculosis*. Aun así, la fuerte reactividad de los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar hacia estos antígenos, sugiere que las proteínas micobacterianas poseen epítopes serodominantes específicos (Samanich y col., 2001) que pueden tomarse en cuenta desde un punto de vista cuantitativo. Además de estas tres proteínas, se observó un patrón de inmunorreactividad amplio, que va desde las bandas de alrededor de 21 kDa hasta las de más de 135 kDa.

De los 19 sueros de pacientes con TB pulmonar, 16 reaccionaron con una banda de 66 kDa, que se encuentra ausente tanto en el grupo control como en el grupo de contactos; esta proteína puede corresponder al antígeno TB66, una proteína inmunodominante para los pacientes con tuberculosis pulmonar pero que no es reactiva con los sueros de individuos sanos (Deshpande y col., 1994). Ocho de los 19 sueros reconocieron una banda adicional, de alrededor de 82 kDa. Esta misma banda se encuentra presente también en el patrón obtenido por el grupo de tuberculosis post-tratamiento, y puede corresponder al antígeno MTB81 (malato sintetasa), que se ha reportado como un potente antígeno, capaz de desarrollar una fuerte respuesta de anticuerpos en pacientes con tuberculosis (Abebe y col., 2007). Estos resultados son similares a los publicados por Samanich y col. en el 2001, quienes destacan que los sueros de pacientes con tuberculosis reconocen bandas en el rango de 26 a 120 kDa aproximadamente, con una reactividad predominante en la región de 30/32 kDa, 38 kDa, el antígeno de 65 kDa, la malato sintetasa, así como un gran número de bandas intermedias.

Por otro lado, los patrones obtenidos con los sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar no revelaron diferencias en el reconocimiento antigénico con respecto a los obtenidos con el grupo control; los pesos moleculares de las bandas reconocidas oscilan entre los 20 y 130 kDa (Fig. 9). Únicamente en el caso particular de tres sueros

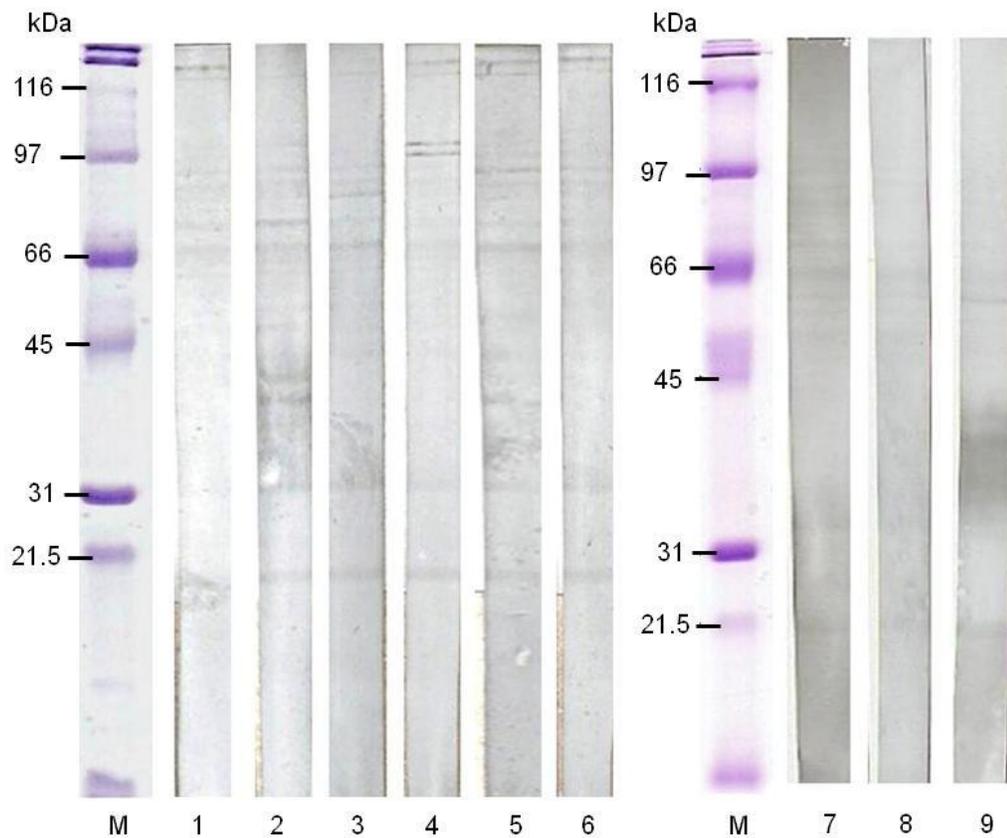


Figura 9. Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes con tuberculosis extrapulmonar. (1-6) tuberculosis ósea, (7) tuberculosis renal, (8) tuberculosis intestinal y (9) PCR+. Se observa reactividad hacia una banda de 17 kDa, que no fue reconocida por los sueros de otros pacientes.

de este grupo (33% de los pacientes de este grupo), se pudo observar el reconocimiento de una banda adicional de alrededor de 17 kDa, la cual podría estar relacionada con la proteína de 16 kDa, una proteína de choque térmico (HSP 16.3) conocida como un factor de virulencia esencial para la supervivencia del bacilo en ambientes hostiles del hospedero y reconocida intensamente por el suero de pacientes con formas extrapulmonares de TB (Abebe y col., 2007).

Finalmente, dentro de los resultados obtenidos con el grupo de tuberculosis post-tratamiento podemos observar la ampliación en el rango de reconocimiento de las proteínas de filtrado de cultivo (de 14-130 kDa). Sin embargo, en este grupo de pacientes, destaca la presencia de un grupo de proteínas de bajo peso molecular reconocidas exclusivamente por este grupo, que van de los 14 a los 20 kDa (Fig. 10). Entre las proteínas que podrían estar siendo reconocidas por este grupo de sueros se encuentran la proteína HSP 16.3, así como la lipoproteína de 19 kDa, que han sido reportadas como antígenos inmunodominantes en los pacientes con tuberculosis (Abebe y col., 2007). No se han publicado reportes utilizando sueros de pacientes post-tratamiento, por lo que la información obtenida en este caso, podría representar una avenida para el avance del estudio de la respuesta inmunológica de los pacientes que concluyeron el tratamiento.

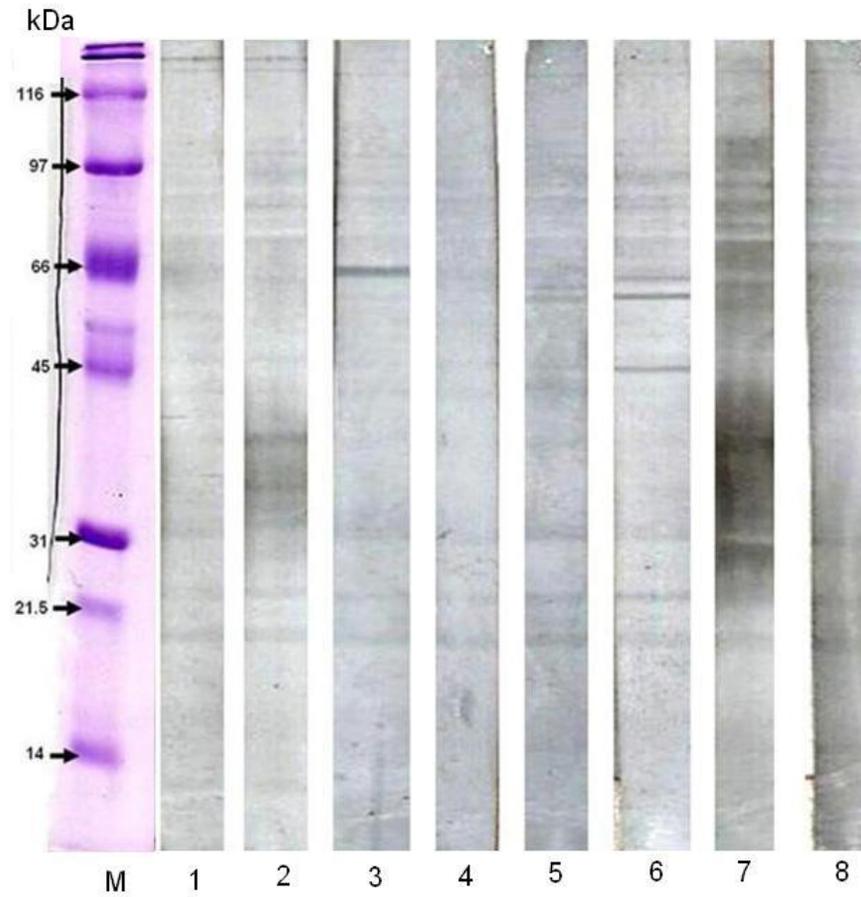


Figura 10. Inmunodetección en SDS-PAGE con el grupo de sueros de pacientes post-tratamiento. Se observa intensa reactividad hacia el grupo de bandas de 14 a 20 kDa.

CONCLUSIONES

1. El perfil electroforético (SDS-PAGE) del filtrado proteico del cultivo líquido Sauton de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de cuatro semanas de incubación, mostró la expresión de 35 bandas proteicas en SDS-PAGE, con pesos moleculares de 14 kDa a 138 kDa.
2. Los sueros del grupo de niños control, mostraron un patrón de reconocimiento muy amplio y homogéneo, en el que se observaron bandas entre los 16 y 132 kDa, sin variaciones interindividuales, pero distinto de los reportados previamente en países en los que no se vacuna sistemáticamente a la población pediátrica.
3. En el grupo de contactos, se observó una fuerte sero-reactividad hacia las bandas en el rango de 22 a 136 kDa, con intensa sero-reactividad hacia una banda de 23 kDa que no se observó en el grupo control y que podría corresponder a la superóxido dismutasa, una proteína inmunodominante entre pacientes con tuberculosis activa, pero que no se había mostrado inmunorreactiva en contactos.
4. Los resultados obtenidos con el grupo de tuberculosis pulmonar mostraron que 16 sueros poseen intensa reactividad hacia una banda de 66 kDa, y 8 sueros hacia la banda de 82 kDa. Ninguna de estas bandas fue reconocida por los sueros del grupo control pero los resultados son similares a los de trabajos publicados previamente.
5. El 33% del grupo de pacientes con tuberculosis extrapulmonar mostró reactividad hacia una banda de 17 kDa, que podría corresponder a la proteína de choque térmico 16.3, reconocida como un factor de virulencia esencial para la supervivencia del bacilo en ambientes hostiles del hospedero e inmunogénica en las formas extrapulmonares de TB.
6. El patrón de reconocimiento obtenido por el grupo de TB post-tratamiento fue amplio (entre 14 y 130 kDa), pero destacó la reactividad de los sueros con bandas en el rango de 14-20 kDa; no se han publicado reportes utilizando sueros de pacientes post-tratamiento, por lo que la información obtenida en este caso, podría

representar una avenida para el avance de la respuesta inmunológica de los pacientes que concluyeron el tratamiento.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. 2003. Técnicas de Laboratorio de uso Habitual en Inmunología. Apéndice III en Inmunología Celular y Molecular. Elsevier (5ta ed). p. 524. Madrid, España.
- Abebe, F., Holm, H. C., Wiker, H. G., Bjune, G. 2007. Progress in Serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Scand J Immun. 66(2):176-191.
- Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J., Heron I. 1991. Proteins Released from *Mycobacterium tuberculosis* During Growth. Infect Immun. 59(6):1905-1910.
- Armitige, L. Y., Jagannath, C., Wanger, A. R., Norris, S. J. 2000. Disruption of the Genes Encoding Antigen 85A and Antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Effect on Growth in Culture and in Macrophages. Infect Immun. 68(2):767-778.
- Attanasio, R., McClure, H. M., Pehler, K. 2000. Immunogenicity and Safety of *Mycobacterium tuberculosis* Culture Proteins in non Human Primates. Clin Exp Immunol. 119(1):84-91.
- Banu, S., Honoré, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prévot, M. C., Cole, S. T. 2002. Are the PE-PGRS Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* Variable Surface Antigens?. Mol Microbiol. 44(1):9-19.
- 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. 72:248-254.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. 2008. Micobacterias. Cap. 24 en Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual Moderno (18a Ed). p. 24. 337-340. México DF, México.
- Cárcamo, NEN. 2011. Escaneo Cromatográfico de las Proteínas de Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Tesis de Maestría. Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora.

- Castillón, CLG. 2008. Estandarización del Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido M7H9 y Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas del Filtrado de Cultivo. Tesis de Maestría. Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora.
- Castro, C. M., Porras, T. B., Guerrero, M. I., León, C. I., Mojica, M. A., Lara, M., Parada, M. C., Espitia, C. 2005. Utilidad de una Prueba Serológica Multiantigénica en el Diagnóstico de Tuberculosis. *Biomédica*. 25:55-64.
- Chang Z., Choudhary A., Lathigra R., Quijcho F. A. 1994. The Immunodominant 38kDa Lipoprotein Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a Phosphate-binding Protein. *J Biol Chem*. 269(3):1956-1958.
- Del Portillo, P., Reyes, A., Salazar, L., Menéndez, M., García, M. 2007. Genomics and Proteomics. Ch4 in *Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care*. *Tuberculosis Textbook.com* (1st Ed) p.113-127.
- Deshpande, R. G., Khan, M.B., Navalkar, R. G. 1993. Superoxide Dismutase Activity of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated From Tuberculosis Patients and the Immunoreactivity of Superoxide Dismutase From *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuber Lung Disease*. 74(6):388-394.
- Deshpande, R. G., Khan, M.B., Bhat, D. A., Navalkar, R. G. 1994. Purification and Partial Characterisation of a Novel 66-kDa Seroreactive Protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Med Microbiol*. 41(3):173-178.
- Dillon, D.C., Alderson, M. R., Day, C. H., Bement, T., Campos-Neto, A., Skeiky, Y. A. W., Vedvick, T., Badaro, R., Reed, S. G., Houghton, R. 2000. Molecular and Immunological Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an Immunodiagnostic Antigen Missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol*. 38(9):3285-3290.
- Dobos, K., Swiderek, K., Khoo, K. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T. 1995. Evidence for Glycosylation Sites on the 45-kilodalton Glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 63(8):2846-2853.

- Dooley, K. E., Tang, T., Golub, J. E., Dorman, S. E., Gronin, W. 2009. Impact of Diabetes Mellitus on Treatment Outcomes of Patients With Active Tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg.* 80(4):634-639.
- Edwards, K. M., Cynamon, M. H. Voladri, R. K. R., Hager, C. C., De Estefano, M. S., Tham, K. T., Lakey, D. L., Bochan, M. R., Kernodle, D. S. 2001. Iron-cofactored Superoxide Dismutase Inhibits Host Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 164(12):2213-2219.
- Ernst, J. D., Trevejo, N. G., Banaiee, N. 2007. Genomics and the Evolution, Pathogenesis, and Diagnosis of Tuberculosis. *J Clin Invest.* 117(7):1738-1745.
- Fifis, T., Costopoulos, C., Radford, A. J., Bacic, A., Wood, P.R. 1991. Purification and Characterization of Major Antigens From a *Mycobacterium bovis* Culture Filtrate. *Infect Immun.* 59(3):800-807.
- Fleischmann, R. D., Alland, D., Eisen, J. A., Carpenter, L., White, O., Peterson, J., DeBoy, R., Dodson, R., Gwinn, M., Haft, D., Hickey, E., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Umayam, L. A., Ermolaeva, M., Salzberg, S. L., Delcher, A., Utterback, T., Weidman, J., Khouri, H., Gill, J., Mikula, A., Bichai, W., Jacobs, W. R., Venter, J. C., Fraser, C. M. 2002. Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. *J Bacteriol.* 184(19):5479-5490.
- García P. M. J., Rigueiro, V. M. T., Casariego, V. E., Correidora, S. J. C., Varela, O. T., García, R. J. F. 2003. Tuberculosis. *Guías Clínicas.* 3(25):1-7.
- Gomez, M., Johnson, S., Gennaro, M. L. 2000. Identification of Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a Bioinformatic Approach. *Infect Immun.* 68(4):2323-2327.
- González, Z. M., Mendoza, H. G., Xolalpa, W., Parada, C., Vallecillo, A. J., Bigi, F., Espitia, C. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* Glycoproteomics Based on ConA-Lectin Affinity Capture of Mannosylated Proteins. *J Proteome Res.* 8(2):721-733.
- Görg, A. 2003. Two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: a laboratory manual. Obtenido de: <http://patf.lf1.cuni.cz/proteomika/2d-manual.pdf>. Último acceso: 26 octubre 2011.

- Gorocica, P., Jimenez M. M. C., Garfias, Y., Sada, I., Lascurain, R. 2005. Componentes Glicosilados de la Envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que Intervienen en la Patógenesis de la Tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 18(2):142-153.
- Gravel, P. 2008. Protein Blotting. Ch24 in *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press (2nd Ed). p 365-375. Totowa, NJ, USA.
- Guio, H., Vilaplana, C., Cardona, P. J. 2010. Inmunodiagnóstico y Biomarcadores en Tuberculosis. *Med Clin (Barc).* 137(9):408-413.
- Hatherill, M., Hawkrigde, T., Whitelaw, A., Tameris, M., Mahomed, H., Moyo, S., Hanekom, W., Hussey, G. 2006. Isolation of Non-Tuberculous Mycobacteria in Children Investigated for Pulmonary Tuberculosis. *PLoS one.* 20(1):e21.
- 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):327-336.
- Herrmann, J. L., Gaora, P. O., Gallaguer, A., Thole, J. E. R., Young, D. D. 1996. Bacterial Glycoproteins: a Link Between Glycosilation and Proteolytic Cleavage of a 19kDa Antigen From *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 15(4):3547-3554.
- Herrmann, J. L., Belloy, M., Porcher, R., Simonney, N., Aboutaam, R., Lebourgeois, M., Gaudelus, J., De LosAngeles, L., Chadelat, K., Scheinmann, P., Beydon, N., Faurouz, B., Bingen, M., Terki, M., Barraud, D., Cruaud, P., Offredo, C., Ferroni, A., Berche, P., Moissenet, D., Vuthien, H., Doit, C., Bingen, E., Lagrange, P. H. 2009. Temporal Dynamics of Interferon Gamma Responses in Children Evaluated for Tuberculosis. *PLoS one.* 4(1):e4130.
- Herranz, M., Bernaola, E. 2007. Características de la Enfermedad Tuberculosa en la Infancia. *An Sist Sanit Navar.* 30:117-129.
- Hitchen, P. G., Dell, A. 2006. Bacterial Glycoproteomics. *Microbiology.* 152(6):1575-1580.

- Horwitz, M. A., Lee, B. W. E., Dillon, B. J., Harth, G. 1995. Protective Immunity Against Tuberculosis Induced by Vaccination with Major Extracellular Proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci. 92(5):1530-1534.
- Houghton, R. L., Lodes, M. J., Dillon, D. C., Reynolds, L. D., Day, C. H., Mc Neill, P. D., Hendrickson, R. C., Skeiky, Y., A., Sampaio, D. P., Badaro, R., Lyashchenko, K. P., Reed, S., G. 2002. Use of Multiepitope Polyproteins in Serodiagnosis of Active Tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol. 9(4):883-891.
- Hu, Y., Coates, A. R. M. 1999. Transcription of the Stationary-Phase-Associated *hspX* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Inversely Related to Synthesis of the 16-Kilodalton Protein. J Bacteriol. 181(5):1380-1387.
- Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., Kaufmann, H. E. 1999. Comparative Proteome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG Strains: Towards Functional Genomics of Microbial Pathogens. Mol Microbiol. 33(6):1103-1117.
- Jungblut, P., Muller, E., Mattow, J., Kaufmann, S. 2001. Proteomics Reveal Open Reading Frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not Predicted by Genomics. Infect Immun. 69(9):5905-5907.
- Kashyap, R. S., Rajan, A. N., Ramteke, S. S., Agrawal, V. S., Kelkar, S. S., Purohit, H. J., Taori, G. M., Daginawala, H. F. 2007. Diagnosis of Tuberculosis in an Indian Population by an Indirect ELISA Protocol Based on Detection of Antigen 85 Complex: a Prospective Cohort Study. BMC Infect Dis. 7(74):1471-2334.
- Kavallaris, M., Marshall, G. M. 2005. Proteomics and Disease: Opportunities and Challenges. Med J Aust. 182(11):575-579.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. 2007. Immune Response to Infectious Disease. Ch 18 in Kuby Immunology. W. H. Freeman and Co (6th ed). p. 458-459. New York, USA.
- Lawn, S. D., Zumla, A. I. 2011. Tuberculosis. Lancet. 378(9785):57-72.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Lim, J. H., Park J. K., Jo E. K., Song C. H, Min D., Song Y., Kim H. 1999. Purification and Immunoreactivity of Three Components from the 30/32kDa Antigen 85 Complex in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 67(11):6187-6190.
- Lyashchenko, K., Gennaro, M.L., Manca, C., Colangeli, R., Heijbel, A., Williams, A. 1998. Use of *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Specific Antigen Cocktails for a Skin Test Especific for Tuberculosis. *Infect Immun*. 66(8):3606-3610.
- Målen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., Wiker, H. G. 2007. Comprehensive Analysis of Exported Proteins From *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*. 7(10):1702-1718.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. 2009. Inmunología. Cap. 7 en Brock Biología de los Microorganismos. Pearson Educación (10ma Ed). p. 504-505. Madrid, España.
- Mattow, J., Schaible, U. E., Schimidt, F., Hagens, K., Siejak, F., Brestrich, G., Haeselbarth, G., Müller, E. C., Jungblut, P. R., Kaufmann, S. H. E. 2003. Comparative Proteome Analysis of Culture Supernatant Proteins From Virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *Mycobacterium bovis* BCG Copenhagen. *Electrophoresis*. 24(20):3405-3420.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. 2010. Matriz de la vida: Interacciones Débiles en un Medio Acuoso. Cap.2 en Bioquímica. Pearson Educación (3era Ed.). p. 60-61. Madrid, España.
- Monge, VKA. 2008. Estandarización de Métodos Inmunoquímicos con el Filtrado Proteico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Obtenido del Medio Líquido Sauton. Tesis de Especialidad. Programa de Especialización en Inmunología Diagnostica, Universidad de Sonora.
- Moreno, P. D., Andrés M. A., Altet G. N., Baquero-Artigao, F., Escribano M., A., Gómez-Pastrana, D. D., González M. R., Mellado P. M.J., Rodrigo-Gonzalo-de-

- Liria, C., Ruiz S. M. J. 2009. Diagnóstico de la Tuberculosis en la Edad Pediátrica. *Anales de Pediatría*. 73(3):1-14.
- Mudaliar, A. V., Kashyap, R. S., Purohit, H. J., Taori, G. M., Daginawala, H. F. 2006. Detection of 65kDa Heat Shock Protein in Cerebrospinal Fluid of Tuberculous Meningitis Patients. *BMC Neurol*. 6(34):1110-1116.
- Mukherjee, S., Daifalla N., Zhang, Y., Douglass, J., Brooks, L., Vedvick, T., Houghton, R., Reed, S. G., Campos-Neto, A. 2004. Potential Serological Use of a Recombinant Protein That Is a Replica of a *Mycobacterium tuberculosis* Protein Found in the Urine of Infected Mice. *Clin Diagn Lab Immunol*. 11(2):280-286.
- Nagai, S., Wiker, H. G., Harboe, M., Kinomoto, M. 1991. Isolation and Partial Characterization of Major Protein Antigens in the Culture Fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infec Immun*. 59(1):372-382.
- Orozco, A. I., Nesbitt, F. C., Ortíz, G. S. 2009. Tuberculosis en Pediatría: Epidemiología. *Rev Enf Infecc Ped*. 87(22):83-90.
- Palma-Nicolás J. P., Bocanegra-García, V. 2007. Estrategias Innovadoras Para el Diagnóstico de los Pacientes Tuberculosos. *Arch Bronconeumol*. 43(4):225-232.
- Proteome 2D-PAGE Database, 2011. Obtenido de: http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdbs/2d-page/extern/menu_frame.cgi?gel=15. Última fecha de acceso: 26 octubre 2011.
- Ramírez, R. N. A., Cocotle, R. B. E., Méndez, P. A. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*: su pared celular y la utilidad diagnóstica de las proteínas 16 y 38 kDa. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 2(2):39-43.
- Ravn, P., Munk, M. E., Andersen, A. B., Lundgren, B., Lundgren, J. D., Nielsen, L. N., Kok-Jengen, A., Andersen, P., Weldingh, K. 2005. Prospective Evaluation of a Whole-Blood Test Using *Mycobacterium tuberculosis*-Specific Antigens ESAT-6 and CFP-10 for Diagnosis Tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 12(4):491-496.
- Romain, F., Laqueyrie, A., Militzer, P., Pescher, P., Chavarot, P., Lagranderie, M., Auregan, G., Gheorghiu, M., Marchall, G. 1999. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-Kilodalton Antigen Complex, an

- Immunodominant Target for Antibody Response after Immunization with Living Bacteria. *Infect Immun.* 61(2):742-750.
- Rosas, T. A. G., Arce, M. A. Y. 2007. Tuberculosis: Mecanismo de Defensa, Inmunopatogénesis y Biomarcadores. *RESPYN.* 8(4):20-26.
- Rosenkrands, I., Rasmussen, P. B., Carnio, M., Jacobsen, S., Theisen, M., Andersen, P. 1998. Identification and Characterization of a 29-Kilodalton Protein from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate Recognized by Mouse Memory Effector Cells. *Infect Immun.* 66(6):2728-2735.
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C. V., Florio, W., Gianetri, I., Andersen, P. 2000. Mapping and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Proteins by Two-dimensional Gel Electrophoresis, Microsencuencing and Immunodetection. *Electrophoresis.* 21(5):935-948.
- Salazar LR. 2008. Aislamiento de Proteínas Hidrofóbicas del Filtrado de Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Medio Líquido Sauton. Tesis de Licenciatura. Depto. de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora.
- Samanich, K.M., Keen, M.A., Vissa, V.D., Harder, J.D., Spencer, J.S., Belisle, J.T., Zolla-Pazner, S., Laal, S. 2000. Serodiagnostic Potential of Culture Filtrate Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(4):662-668.
- Samanich, K. M., Belisle, J. T., Sonnenberg, M. G., Keen, Laal, S. 2001. Homogeneity of Antibody Responses in Tuberculosis Patients. *Infect Immun.* 69(7):4600-4609.
- SINAVE. 2008. Obtenido de: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem13/pdf/edit1308.pdf>. Última fecha de acceso: 26 octubre 2011.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clin Microbiol Rev.* 16(3):463-496.
- Starck, J., Källenius, G., Marklund, B., Andersson, D. I., Akerlund, T. 2004. Comparative Proteome Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Grown Under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Microbiology.* 150(11):3821-3829.

- Tekaia, F., Gordon, S., Garnier, T., Brosch, R., Barel, B., Cole, S. 1999. Analysis of Proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in Silico. *Tuber Lung Dis.* 99(6):329-342.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electroforetic Transfer of Proteins from Polyacrilamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9):4354-4354.
- Welding, K., Rosenkrands, I., Okkels, L. M., Doherty, T. M., Andersen, P. 2005. Assessing the Serodiagnostic Potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* Proteins and Identification of Four Novel Serological Antigens. *J Clin Microbiol.* 43(1):57-65.
- WHO. 2008. Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning and Financing. Obtenido de: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/summary/en/. Última fecha de acceso: 26 octubre 2011.
- WHO. 2010. 2010/2011 Tuberculosis Global Facts. Obtenido de: http://www.who.int/tb/publications/2010/factsheet_tb_2010.pdf. Última fecha de acceso: 26 octubre 2011.
- Wiker, H. G., Harboe, M. 1992. The Antigen 85 Complex: a Major Secretion of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev.* 56(4):648-661.
- Wolfe, L. M., Mahaffey, S. B., Kruh, N. A., Dobos, K. M. 2010. Proteomic Definition of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res.* 9(11):5816-5826.
- Zenteno-Cuevas, R., Guevara, G. A., Juárez, H. A. 2003. Tuberculosis y la Importancia de Incorporar Nuevas Metodologías Diagnósticas. *Med UNAB.* 6(16):46-51.