

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE SECRECIÓN DEL
AISLADO 96 DE *Mycobacterium tuberculosis* QUE
INDUCEN LA RESPUESTA INMUNE Th2**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A

BIOL. EXP. ROBERTO ESPINOSA NEIRA

**Director de tesis:
Dr. Mauricio Castañón Arreola**

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

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

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

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Investigador Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Asesores

Dr. Rogelio Hernández Pando

Investigador Titular. Departamento de Patología Experimental

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dra. Ma. Elizbeth Alvarez Sánchez

Investigadora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

M. en C. Máximo Martínez Benítez

Investigador Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Investigadora Titular. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias el apoyo académico y financiero que me otorgó la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio 2 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México bajo la dirección del Dr. Mauricio Castañón Arreola.

Los cultivos del aislado 96 de *Mycobacterium tuberculosis* fueron realizados en el Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” bajo la supervisión del Dr. Rogelio Hernández Pando, Dra. Brenda Nohemí Marquina Castillo, Dra. Dulce Mata Espinosa y Diana Aguilar.

El fraccionamiento de las proteínas de secreción fue realizado en la Unidad Externa de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la supervisión de la Dra. Rosario López.

La secuenciación por espectrometría de masas fue realizada en el laboratorio de Péptidos y Proteínas en el edificio de investigación de la Facultad de Medicina por el Dr. Guillermo Mendoza.

Dedicatoria

A mi familia

Roberto, Beatriz, Gilma, Alma, Dunia, Vlad, Enrique, David y Carlos por el apoyo brindado durante el tiempo que duró este trabajo y por aguantar mi carácter.

Especialmente a la M. en C. MINERVA JANINI MEJIA RANGEL por estar conmigo en esta difícil temporada y por soportar todas mis locuras. Además, gracias por los reactivos y material que me proporcionaste.

A mis amigos Carlos, Omar, Miguel, Juan Francisco, Misael y Mauricio y los que olvide.

Agradecimientos

Especialmente a:

Mis Jefes Olga Nohemí, Itzel, Lulu (las amibas) y Bertha Isabel.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando y a su equipo de trabajo.

A la Dra. Elizbeth Alvarez y Dr. José Olivares de la UACM.

A la Dra. Rosario López (Medicina Experimental UNAM).

A los compañeros del posgrado:

Helios, Ñerik, Froggy, Jorge Alberto, Karina, Manuel, Emmanuel.

A Mavil, Lalo Carrillo (Leobardito), Sollange Archer.

Sin su ayuda, sus conocimientos y sus donaciones no hubiera aprendido las técnicas utilizadas y este proyecto no se hubiera terminado satisfactoriamente. Espero que estos resultados justifiquen el tiempo invertido en mí.

Además, por ser amigos.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABLAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
Epidemiología Mundial	4
Epidemiología Nacional	4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
Patología	7
Granuloma tuberculoso	8
Inmunidad contra Mtb	9
Linfocitos CD4+	11
Linfocitos CD8+	12
Linfocitos T $\gamma\delta$	12
Evasión de la respuesta inmune	14
Producción de IL-4 durante la TB	14
<i>M.tuberculosis</i> aislado clínico 96	16
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos particulares	18

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
MATERIAL Y MÉTODO	20
Cultivos	20
Concentración de proteínas de SN	20
Cuantificación de proteínas	20
Electroforesis de doble dimensión	21
Isoelectroenfoque	21
Doble dimensión	21
Tinción de plata	21
Tinción de Coomassie Coloidal G250	22
Análisis de patrones 2D	22
Fraccionamiento de proteínas en geles SDS-PAGE	23
Western Blot	23
Ensayos de ELISA	24
Espectrometría de masas	25
RESULTADOS	26
Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> aislado 96	26
Concentración y cuantificación de PFC	26
Obtención del secretoma por electroforesis 2D	27
Análisis de patrones 2D	30
Fraccionamiento de PFC	35
Caracterización de fracciones de PFC mediante ensayos de ELISA	37
Inmunodetección de antígenos con IgG1 en patrones 1D	39
Inmunodetección de antígenos con IgG1 en patrones 2D	42
Espectrometría de masas de las proteínas inmunolocalizadas	46

DISCUSIÓN	48
CONCLUSIÓN	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS	57
ANEXO 1 - Medios de cultivo	61
ANEXO 2 - Comparación de bandas detectadas entre A96 y H37Rv	62
ANEXO 3 - Secuencias de las proteínas identificadas	63

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE	Electroforesis de doble dimensión
A96	Aislado 96
APC	Célula presentadora de antígeno
DC	Célula(s) dendrítica(s)
DTT	1,4-ditiotreitol
IAA	Iodoacetamida
IEE	Isoelectroenfoque
IFN- γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina gama
iNOS2	Sintetasa de óxido nítrico inducible tipo 2
IL-1, 6, etc.	Interleucina-1, 6...
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
LAM	Lipoarabinomanana
MHC I/II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo I o II
mRNA	RNA mensajero
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Ácido oléico-dextrosa-catalasa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMSF	Fenil-metano-sulfonil-fluoruro
SDS	Dodecil sulfato de amonio
SN	Sobrenadante
TB	Tuberculosis
TCR	Receptor de células T
Th1/2	Linfocitos CD4+ tipo I o II
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

1. Incidencia mundial de TB.
2. Incidencia de TB en México.
3. Composición del granuloma tuberculoso.
4. Mecanismos de la respuesta inmune celular durante la TB.
5. Balance Th1/Th2 durante la TB.
6. Infección de ratones con el aislado 96.
7. Arreglo de placas de 96 pozos para ensayos de ELISA.
8. Integridad de PFC de los cultivos.
9. Patrones 2D de proteínas de sobrenadante del aislado 96.
10. Análisis de patrón 2D de las PFC.
11. Análisis del empalme de patrones 2D.
12. Fraccionamiento por peso molecular de las PFC del A96.
13. Caracterización de fracciones por ELISA.
14. Inmunodetección de antígenos de *M. tuberculosis* con sueros infectados con A96.
15. Inmunodetección de antígenos de *M. tuberculosis* con sueros infectados con H37Rv.
16. Titulación de sueros de A96 y H37Rv.
17. Inmunodetección de antígenos de A96 en 2D.
18. Comparación de antígenos de H37Rv y A96 en 2D.
19. Detección de puntos reconocidos por IgG1 en 2D para secuenciación.

LISTA DE TABLAS

1. Análisis entre patrones 2D por *PD Quest*.
2. Cuantificación de fracciones de PFC del A96.
3. Resultados de la secuenciación.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), es la segunda causa de muerte en el mundo dentro de las enfermedades infecciosas. Se ha reportado que las proteínas secretadas al medio de cultivo durante el crecimiento del bacilo son una mezcla compleja en la que se encuentran una gran cantidad de antígenos capaces de estimular la respuesta inmune Th1 en animales y humanos, lo que las hace de interés diagnóstico y para el desarrollo de vacunas contra la TB. Sin embargo, también se encuentran proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmune. Para identificar antígenos de secreción que estuvieran involucrados en la polarización de la respuesta inmune Th1 hacia Th2, en este trabajo se utilizó el aislado clínico 96 (A96) de Mtb por ser hiperinductor de IL-4. En el secretoma de este aislado se logró resolver un promedio de 204 puntos. Las proteínas en el rango de 25 a 75 kDa fueron reconocidas por IgG1 que es característica de la fase progresiva de TB, este reconocimiento de antígenos fue desde el primer día de infección y se incrementó conforme la infección avanzó, aumentando considerablemente el número de antígenos reconocidos para el día 21. Con este aislado se encontraron proteínas que no fueron reconocidas por los sueros de ratones infectados con Mtb H37Rv, sin embargo, fueron reconocidas por los sueros de ratones infectados con el A96. Mediante espectrometría de masas se identificaron siete puntos posiblemente involucrados en la polarización de la respuesta inmune, que corresponden con las proteínas: DnaK, una dihidrolipoamida deshidrogenasa, una transaldolasa, PstS1, al antígeno-84, la proteína de membrana de 19-kDa y a CFP-10. Estos resultados sugieren que durante la infección con el A96 se induce la fase progresiva rápidamente por la expresión diferencial de algunas de estas proteínas, que pudieran estar induciendo la respuesta Th2 por una alta expresión desde el primer día de infección.

INTRODUCCION

Epidemiología

La tuberculosis (TB) sigue siendo la segunda causa más importante de muerte dentro de las enfermedades infecciosas en el mundo (Fig. 1). Es una enfermedad causada por la bacteria denominada *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). En 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 9.2 millones de casos nuevos de TB (139 por cada 100000 habitantes), de los cuales 4.1 millones fueron bacilíferos (44%) y 0.7 millones fueron coinfecciones con VIH (8%), además de 1.7 millones de defunciones por TB. En 2007, los casos nuevos se incrementaron 5.1 millones con respecto al año anterior (WHO 2008) y se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada con *Mtb*; sin embargo, sólo el 5-10% de estas personas desarrollarán la enfermedad en su forma activa dentro de los primeros dos años, o más tarde, mostrando síntomas clínicos por reactivación.

Los factores socioeconómicos y la predisposición genética del hospedero son factores importantes que determinan la susceptibilidad a esta enfermedad en la población. El aumento de la incidencia de TB se encuentra estrechamente asociado con la pandemia causada por la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la aparición de cepas multi-resistentes y extremadamente resistentes a drogas (MDR y XDR, respectivamente).

En la República Mexicana, según el Boletín Epidemiológico de la Dirección General de Epidemiología, hasta la semana 52 del año 2007 se habían notificado 14,454 nuevos casos de TB pulmonar, donde Veracruz ocupa el primer lugar en incidencia seguido de Baja California, Chiapas, Tamaulipas, Nuevo León y Jalisco (Fig. 2)(DGE 2007).

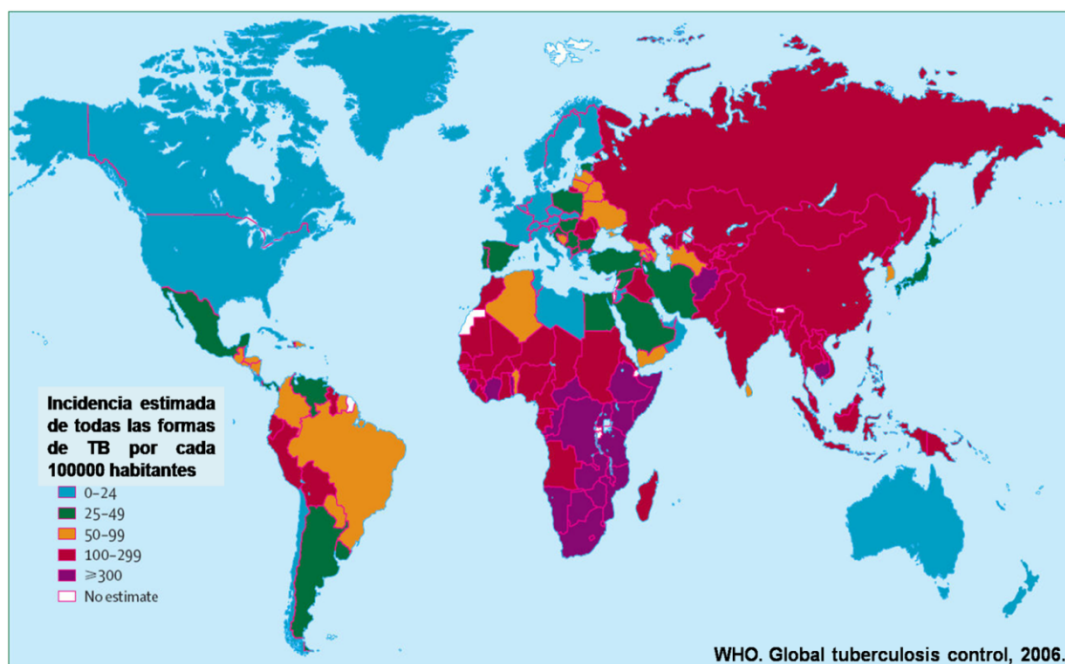


Figura 1. Incidencia mundial de TB. Hasta el año 2006 se calcularon 9.2 millones de casos nuevos, en color morado se puede observar que la mayor cantidad de casos se presentan en África y algunos países de Asia. El continente asiático ocupa el segundo lugar de incidencia de casos de TB y parte en África (World Health Organization, 2006).

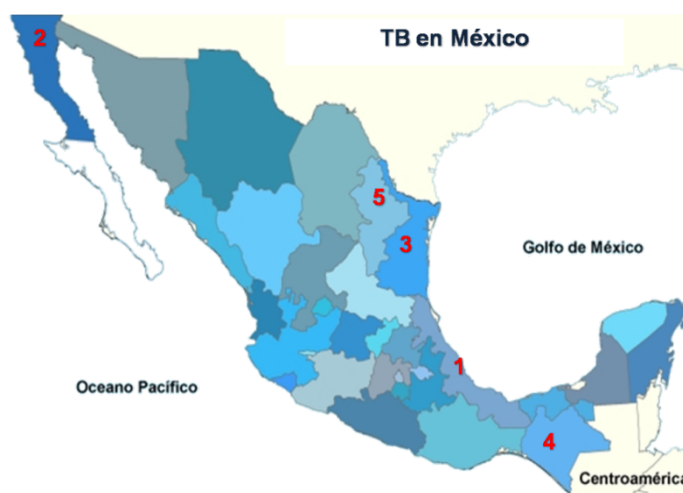


Figura 2. Incidencia de TB en la República Mexicana reportados para el año 2007 por la Dirección General de Epidemiología. Veracruz es el estado que presenta el mayor número de casos (1581 casos) de la enfermedad y es seguido por Baja California (1239), Chiapas (1123), Tamaulipas (967), y Nuevo León (835) (DGE, 2007).

Mycobacterium tuberculosis

Es un bacilo delgado, recto o ligeramente curvo y con los extremos redondos, mide entre 0.3 a 0.6 μm de ancho y de 1 a 4 μm de largo, además es una bacteria gram positiva, no forma esporas ni tienen capsula; es aerobio obligado y no prolifera en ausencia de oxígeno, incluso una pequeña reducción en la tensión de O_2 que se traduce en una disminución apreciable de la velocidad de multiplicación. La propiedad más singular del género *Mycobacterium spp.* es su tinción característica, se tiñen con dificultad y una vez coloreados son resistentes a la decoloración con alcohol ácido, por lo que se les denomina bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

Mtb tiene una gruesa pared compuesta de tres capas que encierran una membrana plasmática que es una estructura trilaminar. Los lípidos representan hasta 60% del peso seco de la pared y le confieren propiedades que permiten que resista las condiciones adversas. Los ácidos micólicos son uno de los principales y el más distintivo de los lípidos que forman la pared de la micobacteria. Dicho tipo de lípidos contiene ácidos grasos α -alquil- β -hidroxil de gran longitud y complejidad unidos por enlaces covalentes a la pared celular o por enlaces no-covalentes asociados en forma de un derivado glucosilado de dimicolato de trealosa. Los ácidos micólicos son heterogéneos en longitud, cantidad de dobles enlaces, grupos ciclopropil y grupos laterales como -ceto, -metoxi y -epoxi (Brennan and Nikaido 1995). En el género se encuentran especies saprófitas y microorganismos parásitos que no han sido cultivados *in vitro*.

Patología

La ruta más común de entrada del bacilo es por inhalación cuando ha sido expulsado durante la tos o estornudos de un individuo con TB. El bacilo de Mtb se transmite a través de la vía respiratoria y la interacción inicial con el huésped se da con los macrófagos alveolares en las vías aéreas. Entonces, el bacilo transita por el parénquima del pulmón, replicándose en los macrófagos residentes. En el sitio del tejido donde se implantan los bacilos, se realiza la acumulación de macrófagos y otras células para formar los granulomas compactos que contienen al patógeno (Fig. 3) (Dannenberg 1989).

La interacción macrófago-bacilo inicia una respuesta inflamatoria que incluye la producción de $\text{TNF}\alpha$, IL-12, IL-1, IL-6 y varias quimiocinas (Flynn and Chan 2001). Estas moléculas reclutan a otras células para entrar a los pulmones, incluyendo monocitos, neutrófilos y linfocitos. Las células dendríticas (DC), al endocitar los bacilos inician su maduración y migración hacia los nódulos linfáticos regionales (Bhatt, Hickman et al. 2004). Una vez en los nódulos linfáticos, las DC estimulan a los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ (Lazarevic, Myers et al. 2003). Posteriormente, las células T CD4^+ activadas específicas contra antígenos micobacterianos viajan hacia el sitio de la infección. Los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ son importantes en la respuesta inmune contra la micobacteria y su función es secretando citocinas (incluyendo aquellas que activan macrófagos, como IFN- γ y $\text{TNF}\alpha$) (Serbina and Flynn 1999); los linfocitos T CD8^+ destruyen células infectadas matando directamente a la bacteria intracelular mediante la secreción de gránulisina dentro de los macrófagos infectados (Stenger, Hanson et al. 1998).

Granuloma tuberculoso

El granuloma tuberculoso está compuesto típicamente de macrófagos (frecuentemente de epitelioides), células gigantes multinucleadas, linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$) y B, neutrófilos y fibroblastos. En la tuberculosis humana, los granulomas pueden presentar un centro necrótico, conocido como necrosis caseosa. La bacteria parece sobrevivir dentro de los macrófagos y en los centros caseosos del granuloma.

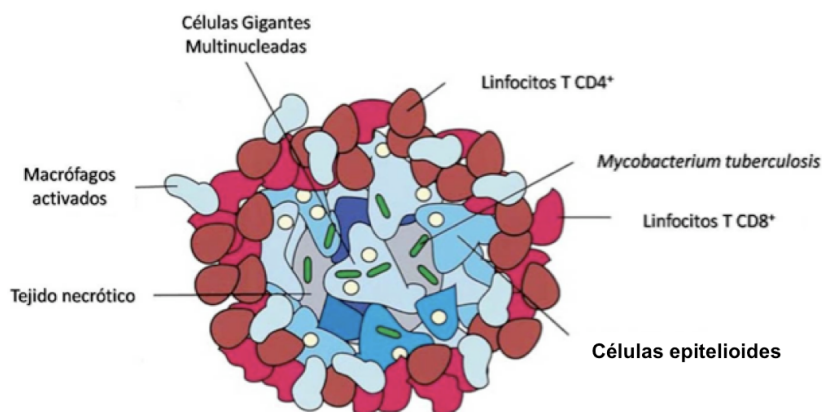


Figura 3. Composición del granuloma tuberculoso. Es una estructura organizada por agregados de células inmunes alrededor del tejido infectado. Dicha estructura actúa como una barricada que impide la salida de los bacilos de Mtb, así evita que se diseminen (Zahrt 2003).

La función del granuloma es contener al bacilo, esto permite que se de una respuesta inflamatoria localizada en el sitio de la infección y el reclutamiento de células inflamatorias a la proximidad del patógeno, además de funcionar como una barrera física que contiene al microorganismo. Los centros caseosos pueden inhibir la replicación de la bacteria y quizás contribuya al control de la infección. Se sabe que la formación de esta estructura es crítica para el control físico e inmunológico de la infección, además de que limita la propagación de la infección en el pulmón (Flynn and Chan 2005). Un aspecto clave en la formación del granuloma es el desarrollo de fibrosis alrededor del parénquima, esto provoca nódulos macroscópicos o tubérculos. En adultos, el avance de la enfermedad puede ser mediante un proceso necrotizante neumónico y resulta en la diseminación de la infección a otras áreas del pulmón (North and Jung 2004).

Inmunidad contra Mtb

Una vez que el bacilo llega a los pulmones se inicia una serie de mecanismos destinados a su eliminación. Se han descrito cuatro posibles eventos durante el proceso infeccioso: a) la respuesta puede ser efectiva conduciendo a la eliminación y muerte del bacilo, entonces el paciente nunca desarrollará TB clínica; b) la micobacteria no es eliminada totalmente y empieza a multiplicarse causando TB primaria como manifestación clínica; c) el sistema inmune es capaz de impedir el crecimiento del bacilo sin eliminarlo totalmente, causando infección latente y, d) los bacilos que han estado latentes, eventualmente vuelven a multiplicarse causando una reinfección (Schluger and Rom 1998).

Las células implicadas en limitar o eliminar al bacilo son los macrófagos que han sido reclutados por citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 y por quimiocinas (Tsao, Hong et al. 1999). Generalmente son producidas por una gran variedad de células, como linfocitos, células epiteliales, macrófagos, en respuesta a factores irritantes, activadores policlonales, antígenos y citocinas (Baggiolini, Dewald et al. 1997). Las citocinas proinflamatorias regulan positivamente la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y selectina-E en el endotelio y leucocitos, de esta forma los leucocitos circulantes pueden migrar al sitio de lesión mediante un proceso inflamatorio finamente regulado (Eigler, Sinha et al. 1997). Las quimiocinas participan dirigiendo el reclutamiento de leucocitos hacia el sitio de infección, además de regular la adhesión celular, el tráfico y la activación así como el retorno al sitio de activación inicial (homing) (Jung and Littman 1999).

Durante la fase temprana de la infección, algunas quimiocinas como IL-8 atraen a los neutrófilos, los cuales pueden fagocitar a la micobacteria, pero no tienen la capacidad suficiente para eliminarla. La función de los neutrófilos es contener a los bacilos para evitar su diseminación, mientras son sustituidos gradualmente por macrófagos activados. Otras quimiocinas como MCP-1, MIP-1 α , RANTES, IP-10, Mig, I-TAC dirigen la migración de monocitos y linfocitos para la formación del granuloma (Lin, Zhang et al. 1998; Sadek, Sada et al. 1998). La citocina TGF- β producida por los macrófagos activados, promueve el depósito de colágeno y favorece la quimiotaxis de otros macrófagos, teniendo una actividad permisiva en la formación del granuloma (Roman, Jeon et al.

1995).

Las quimiocinas favorecen la migración y activación de células fagocíticas circulantes, dirigiendo la migración de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), proceso que es conocido como hipersensibilidad de tipo IV. La acción efectora de linfocitos Th1 depende del reconocimiento de antígeno a través de su TCR y de la posterior activación mediada por citocinas como IL-2, TNF- α e IFN- γ , generando de esta forma la inmunidad celular necesaria para la eficaz eliminación de la micobacteria. La IL-12 e IL-18 favorecen la respuesta Th1, dichas citocinas son producidas por macrófagos reclutados y activados, ambas inducen la producción de IFN- γ en los linfocitos NK que a su vez activarán a más macrófagos e incrementan la actividad citotóxica de los linfocitos NK para eliminar los patógenos intracelulares (Krensky 2000).

La protección inmune específica contra Mtb inicia tras la activación de linfocitos T CD4⁺ capaces de secretar IFN- γ . Sin embargo, existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por TB como los linfocitos T CD8⁺ y linfocitos $\gamma\delta$.

Linfocitos CD4⁺

Encabezan la inmunidad protectora a través del reconocimiento de antígenos micobacterianos mediante la interacción TCR-MHC clase II, así los linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos, inician la fase efectora que consiste en la secreción de un patrón específico de citocinas. La subpoblación Th1 produce grandes cantidades de IL-2, TNF- α e IFN- γ promoviendo la respuesta inmune celular y la activación de macrófagos. Esta respuesta induce la activación y proliferación de linfocitos $\gamma\delta$, los cuales se han asociado al reconocimiento de antígenos micobacterianos no peptídicos a través del sistema CD1 (Moody, Ulrichs et al. 2000) (Fig. 4).

Se sabe que el IFN- γ modula negativamente la respuesta de tipo humoral mediada por linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) durante la TB, dicha subpoblación produce grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales favorecen la respuesta inmune contra patógenos extracelulares. IL-4, IL-10 e IL-13 tienen la capacidad de modular negativamente la respuesta Th1, por tanto, la protección contra organismos intracelulares como *Mtb* depende de la respuesta Th1 (Fig. 4). La cooperación entre linfocitos es fundamental para incrementar la actividad microbici da de los macrófagos, lo cual se manifiesta en el aumento de la producción de H₂O₂ y NO (Nathan, Murray et al. 1983).

Se ha demostrado que el IFN- γ puede ejercer su acción a través de los productos del gen Nramp, encargado del transporte de nitritos del citosol a los compartimientos celulares ácidos (fagolisosomas), donde son convertidos a óxido nítrico, el cual es el principal agente oxidante contra la micobacteria, de ahí que las proteínas Nramp se encuentren asociadas a la resistencia contra la infección (Blackwell 1996).

Linfocitos T CD8+

Se ha propuesto que la micobacteria libera antígenos al citoplasma y de esta forma son procesados para ser presentados por el MHC clase I (Canaday, Ziebold et al. 1999), y una vez activados por el antígeno los linfocitos T CD8⁺ producen IFN- γ . Sus acciones efectoras se realizan en dos sentidos: el primero es por medio de la exocitosis de sus granulos enzimáticos, ricos en granulinsina. Esta enzima forma parte de las proteínas tipo saponina, que interactúa con los lípidos de membrana, activando otras enzimas que degradan lípidos como las glucosilceramidases y esfingomielinasas, lo que conduce a un incremento en la concentración de ceramida, que está involucrada en la inducción de apoptosis, este mecanismo conduce a la muerte de la célula blanco y a la eliminación de los bacilos intracelulares. La otra forma de daño es la inducción de apoptosis por medio de la interacción de FasL (CD95L en CD8⁺) con Fas (CD95 en la célula blanco); esta genera señales de muerte mediante la iniciación de la cascada de caspasas. Algunos autores sugieren que la viabilidad del bacilo disminuye tras la inducción de apoptosis (Oddo, Renno et al. 1998).

Linfocitos T $\gamma\delta$

La mayor parte de los linfocitos T circulantes en sangre periférica presentan cadenas $\alpha\beta$ en su TCR mientras que los linfocitos $\gamma\delta$ constituyen del 1-5% en sangre periférica y generalmente se encuentran asociados abundantemente a mucosas (60%). Durante la TB su porcentaje en circulación aumenta hasta un 25-30% (Boom 1999). En individuos que están en contacto con pacientes tuberculosos, se observa un porcentaje superior de linfocitos T $\gamma\delta$ comparados con individuos no expuestos (Ueta, Tsuyuguchi et al. 1994). Los linfocitos T $\gamma\delta$ reconocen antígenos lipídicos mediante las moléculas de superficie CD1. Esta molécula tiene la capacidad de presentar glucolípidos como fosfatidilinositol-dimanosidos, glucosamonocolato y LAM restringiendo a esta población celular a respuestas contra antígenos lipídicos (Moody, Reinhold et al. 1997).

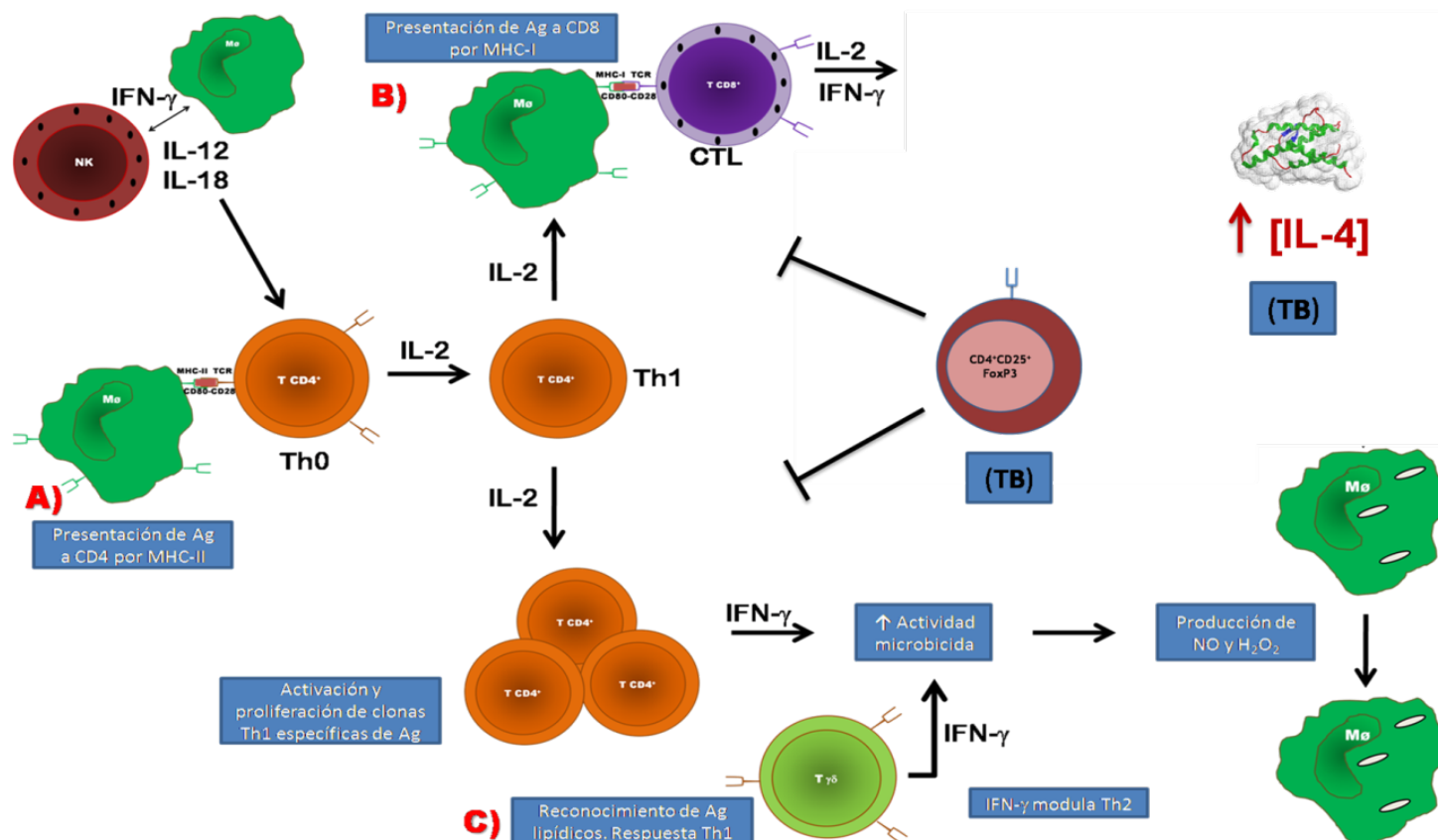


Figura 4. Mecanismos de la respuesta inmune durante la tuberculosis. A) La presentación antigénica mediada por MHC-II a linfocitos T CD4⁺ promueve activación y proliferación de clones específicas de antígeno, estas secretan IFN- γ que promueve la actividad microbicida de los macrófagos. B) La presentación antigénica mediada por MHC-I a linfocitos T CD8⁺ promueve la secreción de IFN- γ e IL-2, además del aumento en su actividad citotóxica mediada por el contacto célula-célula por dos mecanismos: 1) liberación de enzimas proteolíticas como granzima y granzima, y 2) promueven la apoptosis de macrófagos infectados por interacción célula-célula de la vía Fas-FasL. C) El reconocimiento de antígenos lipídicos por linfocitos $\gamma\delta$. Durante la tuberculosis en diversos estudios se han observado poblaciones de linfocitos T reguladores que se encuentran suprimiendo la respuesta celular en contra de la micobacteria. Además, durante la infección se ha observado que aumenta la producción de citocinas de tipo Th2, como IL-4. La presencia de estas citocinas promueven la polarización de la respuesta inmune celular hacia humoral.

Evasión de la respuesta inmune

La reemergencia de la tuberculosis, principalmente en las regiones endémicas donde se tienen coberturas de vacunación mayores al 98% sugiere la adaptación de las cepas y la selección de aquellas capaces de evadir la respuesta inmune inducida por vacunación, de modo tal que *Mycobacterium tuberculosis* ha evolucionado para evadir su destrucción por los mecanismos bactericidas de la inmunidad innata y adaptativa para inducir la patología en el pulmón de modo que asegure su transmisión por vía aérea. Estas incluyen la regulación de la presentación antigénica para evadir la eliminación por los linfocitos T, proteínas secretadas como la superóxido dismutasa y catalasa que son antagonistas de intermediarios reactivos de oxígeno. Algunos componentes micobacterianos como los sulfátidos, LAM y glucolípido-I fenólico son potentes atrapadores (scavengers) de radicales libres de oxígeno (Andersen, Askgaard et al. 1991). En macrófagos infectados se observó que disminuyen su capacidad para presentar antígeno a los linfocitos T CD4⁺. También se ha reportado que las micobacterias son capaces de escapar del fagosoma y multiplicarse en macrófagos infectados (Moreira, Wang et al. 1997). La prevención de la fusión del fagosoma con el lisosoma por derivados sulfátidos micobacteriales de trealosa 2-sulfato multiacetilado es un mecanismo por el cual Mtb evade la respuesta inmune y sobrevive dentro de los macrófagos (Goren, Brokl et al. 1976). En estudios *in vitro* se ha visto que el amonio generado por Mtb en cultivos tiene un efecto inhibitor sobre macrófagos. Los fagocitos activados por IFN- γ y TNF- α , generan NO y liberan intermediarios reactivos de nitrógeno mediante la inducción de iNOS2.

Producción de IL-4 durante la TB

La IL-4 es una proteína de 15 kDa producida por linfocitos T activados, células cebadas y basófilos. Esta citocina regula un amplio espectro de funciones celulares en linfocitos B, T, macrófagos, y otras células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. La IL-4 promueve la proliferación de linfocitos T, la generación del fenotipo Th2, la expresión del receptor de IL-4(IL-4R) y la proliferación de fibroblastos, quimiotaxis y expresión de ICAM-1 (Piela-Smith, Broketa et al. 1992).

En diferentes estudios se ha demostrado que durante la TB el balance de citocinas Th1/Th2 está relacionado con la inmunopatogénesis de la enfermedad (Fig. 5). Las células Th1, vinculadas a la respuesta protectora, debido a la secreción de IFN- γ , citocina que activa macrófagos para contener y matar a las micobacterias intracelulares eficientemente. El IFN- γ también induce la presentación antigénica al regular la expresión de moléculas de MHC. Por el contrario, las células Th2 están asociadas con la fase progresiva y crónica de la enfermedad, estas células secretan IL-4, 5 y 10 las cuales promueven la respuesta inmune humoral y suprimen la respuesta inmune celular (Surcel, Troye-Blomberg et al. 1994). La regulación de la actividad de IL-4 es importante para determinar el resultado en ciertas enfermedades. La producción de esta citocina se asocia con la infección crónica en la leishmaniasis murina y lepra humana (Heinzel, Sadick et al. 1989; Yamamura, Uyemura et al. 1991).

En la fase tardía de la TB, la IL-4 presente en lesiones antagoniza la respuesta Th1 y puede tener un papel regulador o anti-inflamatorio (Smith, Klein et al. 2002). En algunos casos, los linfocitos T reguladores expresan IL-4 además de las citocinas reguladoras clásicas, como IL-10 y TGF- β . En estudios de expresión de citocinas en modelos murinos se ha encontrado que durante la TB hay altos niveles de IFN- γ , seguido de la producción de IL-4 en la fase progresiva de TB (Hernandez-Pando, Orozco et al. 1996).

Durante la TB, la producción de IL-4 es fundamental en la infección, además, podría estar involucrada significativamente en la reducción de la inmunidad protectora y en el aumento de la inmunopatología. En ratones inmunizados que mostraban una respuesta Th2 contra uno o varios componentes de Mtb previo a la infección, la respuesta Th2 preexistente incrementa la susceptibilidad a la infección e incrementa la mortalidad de los animales (Hernandez-Pando, Pavon et al. 1997). En estudios con ratones IL-4^{-/-} se demostró que la ausencia de IL-4 está relacionada con la disminución del crecimiento bacteriano y con el desarrollo de fibrosis y daño asociado a TNF- α (Hernandez-Pando, Aguilar et al. 2004).

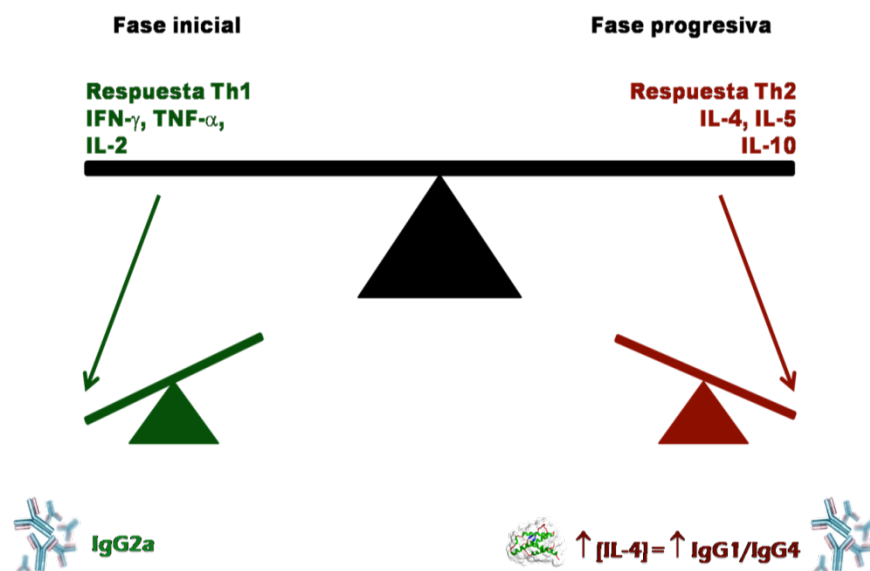


Figura 5. Balance Th1/Th2 durante la tuberculosis. En la fase inicial se observa una respuesta inmune celular mediada por citocinas como IFN- γ . Al entrar a la fase progresiva de la enfermedad se puede observar el inicio de una respuesta inmune humoral (Th2) y la disminución de la respuesta celular (Th1), evento que favorece la sobrevivencia de los bacilos.

***M. tuberculosis*: aislado clínico 96**

En un estudio donde se evaluó la virulencia de diversos aislados provenientes de Orizaba, Veracruz, y de los referidos al Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (InDRE, Secretaria de Salud) se encontró que una de las cepas (aislado #96) induce la expresión de IL-4 de forma significativa, a diferencia de otros aislados del mismo estudio, observándose la producción de la citocina desde el primer día de infección, evento que generalmente se observa a partir del día 21 (Fig. 6B, Hernández-Pando y col., datos sin publicar). El aislado 96 pertenece a la familia Latinoamericana Mediterranea de Mtb y se caracterizó por ser hiperinductor de la producción de IL-4 en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, lo cual se asoció a una mayor tasa de mortalidad al matar a los ratones en la cuarta semana comparado con las otras cepas del mismo estudio (Fig. 6A).

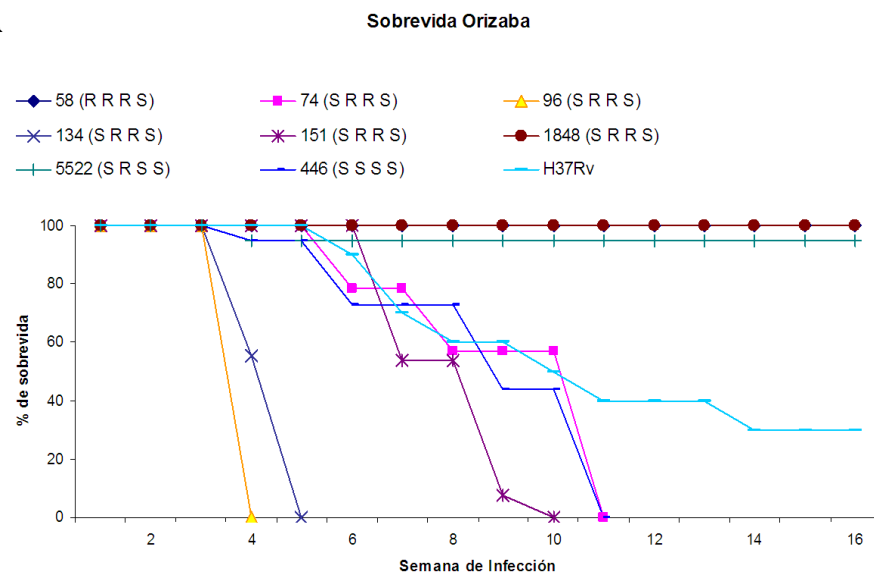
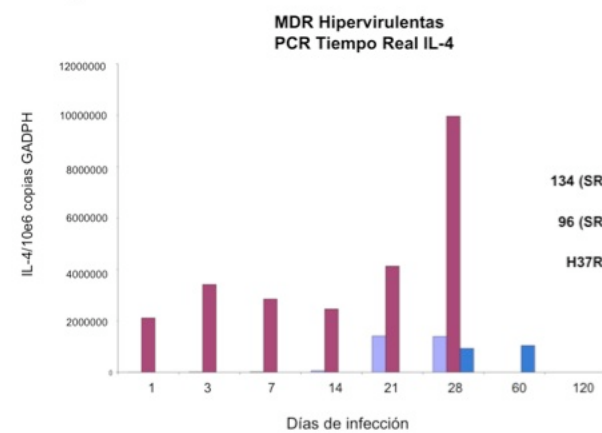
A**B**

Figura 6. Infección de ratones con el aislado 96. A) Ensayos de infección. B) cinética de IL-4 durante la infección. Durante los experimentos se observó que el aislado 96 mató a los ratones infectados en la semana cuatro (A), además otros estudios revelaron la inducción de IL-4 en los ratones a partir del día uno en grandes cantidades comparadas con otras cepas (B) (Datos sin publicar).

JUSTIFICACIÓN

La polarización de la respuesta inmune hacia el perfil Th2 es uno de los mecanismos que utilizan las micobacterias para inducir la progresión de la enfermedad, siendo la IL-4 una citocina clave en este evento, por lo que la identificación de las proteínas involucradas en la inducción de la respuesta Th2 es fundamental para desarrollar vacunas profilácticas o terapéuticas para el control de la TB.

OBJETIVOS

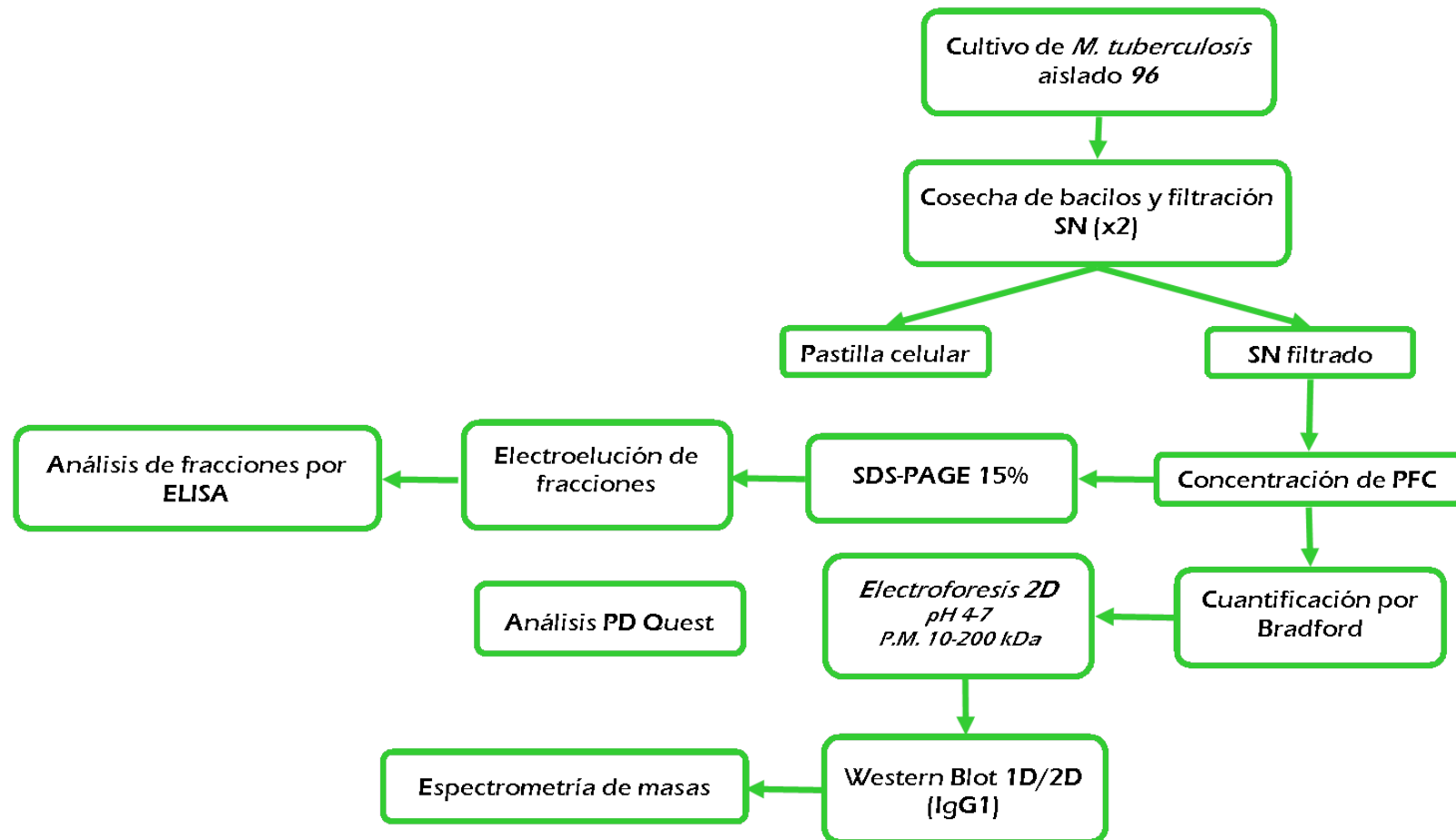
General

-  Identificar las proteínas reconocidas por IgG1 en el secretoma de *M. tuberculosis* aislado 96.

Particulares

-  Obtener el secretoma del aislado 96 de Mtb.
-  Fraccionar las proteínas de secreción en función de su peso molecular.
-  Caracterizar por ELISA las fracciones proteicas obtenidas.
-  Determinar el patrón de proteínas reconocidas por IgG1.
-  Identificar las proteínas detectadas con IgG1 mediante espectrometría de masas.

Estrategia experimental



MATERIALES Y METODO

Cultivos

La cepa de *M. tuberculosis* aislado 96 (proporcionado por el Dr. Rogelio Hernández Pando, INCMNSZ) se cultivó en placas de medio Middlebrook 7H10 suplementado ácido oleico, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson) durante 21 días a 37°C, posteriormente se resembraron en medio Sauton (sintético) durante 21 días a 37°C, en atmosfera con 5% de CO₂, después las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm y fueron lavadas tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar los componentes del medio de cultivo. Se hicieron alícuotas de 1 mL y los paquetes bacterianos se almacenaron a -70°C. Los sobrenadantes (SN) de los cultivos se esterilizaron por filtración con filtros Nalgene de 0.45 µm y enseguida de 0.22 µm y se congelaron a -70°C.

Concentración de proteínas de SN

Los SN fueron descongelados gradualmente hasta 4°C. Una vez descongelados, a cada uno se les adicionó azida de sodio al 0.01% y un inhibidor de proteasas de serina fenil-metano-sulfonil-fluoruro (PMSF) 5mM. Posteriormente se concentraron por ultracentrifugación en la unidad de filtración Amicon *stirred ultrafiltration cells 8200* (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una membrana con un poro de 3 kDa (Millipore) que fue activada con tres lavados de 20 minutos en dH₂O estéril y filtrada. Antes de adicionar el SN se hizo un prefiltrado usando 10 ml de dH₂O estéril y filtrada. Enseguida los SN se concentraron 50 veces a 4°C.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas filtradas de cultivo (PFC) concentradas de cada uno de los SN se cuantificaron por duplicado mediante el método de microBradford utilizando placas de 96 pozos en las que se incluyó una curva patrón de BSA en concentraciones 1.2, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/mL. Cada pozo de muestra contenía 40 µL de reactivo de Bradford (Biorad), 2 µL de proteína y el resto de dH₂O para completar un volumen de 200 µL; los pozos de la curva contenían volúmenes distintos de BSA según la concentración requerida. La lectura de estándares y muestras se realizó en un lector de

ELISA a 595 nm. Posteriormente las proteínas se corrieron en geles SDS-PAGE al 15% para observar su integridad.

Electroforesis de dos dimensiones (2D)

El isoelectroenfoque (IEE) se realizó usando tiras de gradiente de pH inmovilizado IPG ReadyStrip (Biorad Laboratories) de 7 y 11 cm con gradiente de pH 4-7. Para rehidratar las tiras se usaron 200 y 100 μ g de proteínas en IPG de 7 y 11 cm, respectivamente. Cada muestra se colocó en CHAPS al 4% hasta disolverse, enseguida el volumen se adicionó en un vial con urea 7 M hasta disolver; el volumen generado se le agregaron 35 μ L de solución DTT 70 mM y una vez disuelto se adicionaron 0.5 μ L de azul de bromofenol y la mezcla fue aforada a 500 μ L de volumen final; de esta solución se tomaron 180 μ L en un tubo nuevo y se adicionaron 2 μ L de anfolinas (Biorad) y con los 182 μ L homogenizados se rehidrató la tira IPG. Después de doce horas de rehidratación pasiva, el IEE se programó para correr en cinco pasos: 1) 500V durante 30 min; 2) 1000V durante 30 min; 3) 1500V durante 30 min; 4) 2000V durante 30 min; y 5) 2500V hasta llegar a 50000 volts/hora. Al término, las tiras IPG fueron equilibradas en una solución de DTT (0.075 g) durante 15 minutos, posteriormente la tira se lavó en una solución de IAA (0.1875 g) durante 15 minutos; ambas soluciones fueron diluidas en amortiguador de equilibrio (Urea 6M; glicerol 30%; Tris pH 8.8 50 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0.002%). La segunda dimensión fue hecha en geles SDS-PAGE al 12% de 20x18 cm en solución amortiguadora de corrida (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%). En este gel se colocó la tira IPG previamente equilibrada, evitando la formación de burbujas entre ambos geles, después se agregó agarosa al 0.5% para sellar los geles y la electroforesis se corrió a 100 voltios durante 13 horas.

Tinción con plata

Al finalizar la segunda dimensión los geles analíticos se sumergieron en solución de fijación (metanol 50% y ácido acético 12%) toda la noche; enseguida se hicieron dos lavados de 20 minutos cada uno con metanol al 30%, después se hicieron 3 lavados de 20 segundos con diH_2O hasta quitar el metanol y posteriormente se hizo un pretratamiento con tiosulfato de sodio pentahidratado 0.2g/L durante 2 minutos; se hicieron 2 lavados con diH_2O de 30 segundos cada uno. Después, el gel se sumergió en la solución de impregnación de plata (Pierce, Thermo

Scientific) durante 20 minutos y se lavó con diH_2O dos veces de 30 segundos cada uno para enseguida sumergirlo en la solución de revelado (Na_2CO_3 30 g/L + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L + formaldehído 37% 0.4 mL/L) agitando hasta ver puntos. La reacción de revelado fue detenida lavando el gel 2 veces de 2 minutos cada uno con diH_2O y posteriormente sumergirlo en solución de paro (ácido acético al 12%).

Tinción con azul de coomassie coloidal G250

El SDS-PAGE 2D se colocó en solución de fijación (metanol 50% y ácido acético 12%) toda la noche. Posteriormente se preparó la suspensión de Coomassie coloidal G250; mezclando 100 grs. de sulfato de amonio y 1 g. de azul brillante de Coomassie G250 (Biorad) en 400 mL de diH_2O hasta disolver el sulfato de amonio completamente y se agregaron 20 mL de ácido fosfórico en solución y 200 mL de metanol en pequeñas cantidades hasta adicionarlo completamente. Finalmente se aforó a 1 litro. El gel se sumergió en la solución de tinción de coomassie hasta que el patrón 2D se pudiera distinguir claramente. Enseguida se retiró el colorante y se agregó agua ultrapura para deteñir el gel hasta obtener el contraste deseado.

Análisis de los patrones 2D

El análisis de los geles 2D se realizó mediante el programa *PDQuest* (Biorad). Primero se llevó a cabo la adquisición de las imágenes en escala de grises y con formato TIFF con resolución de 300 dpi. En cada una de las imágenes se realizó la búsqueda de puntos usando los siguientes parámetros: la intensidad del punto más tenue, el más pequeño y el más grande e intenso; también se ajustaron parámetros para eliminar el fondo en las imágenes y la sensibilidad para la búsqueda. Dichos ajustes se hicieron según las características de cada tinción. Una vez obtenidos los puntos de cada uno de los geles se procedió a la edición manual de puntos, para obtener el análisis individual. Los patrones de puntos obtenidos se usaron para hacer la sobreposición entre geles para encontrar las diferencias entre cada uno de los patrones de PFC.

Fraccionamiento de proteínas en geles SDS-PAGE

Para obtener las fracciones, las proteínas fueron separadas en geles preparativos SDS-PAGE al 15%

en los que se cargaron 1 mg de proteínas. Al finalizar la electroforesis, las proteínas se electroeluyeron usando el equipo *Mini Whole Gel Eluter* (Biorad), según las instrucciones del fabricante. La electroelución se corrió a 10 watts durante 60 minutos en amortiguador de electroelución (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) esterilizado por filtración. Posteriormente se recuperaron 14 fracciones, y cada una de ellas fueron concentradas en unidades de filtración Microcon (Millipore) con membrana de 3 kDa. Una vez recuperadas, las proteínas fueron cuantificadas usando el NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) con el programa Protein A280.

Western Blot

Para identificar las proteínas reconocidas por los sueros de ratón, se corrieron minigeles SDS-PAGE preparativos al 15% cargados con 100 µg y los geles 2D con 200 µg de PFC. La electroforesis de los geles preparativos se realizó a 100 V durante 2 horas y para los geles 2D fue como se describió arriba; al finalizar la electroforesis se transfirieron las PFC a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm (Biorad). previamente equilibrados en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, MeOH 30%), después se realizó la transferencia en cámara húmeda y se corrió durante 45 minutos a 400 mA. Los geles SDS-PAGE 2D se transfirieron a nitrocelulosa utilizando la cámara de transferencia semi-seca Trans-Blot SD Semi-Dry (Biorad) durante 60 minutos a 20 volts. Al finalizar, los geles transferidos se tiñeron con azul de Coomassie R250 y a la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para confirmar la transferencia.

Las membranas preparativas se cortaron en tiras de 4mm de grosor y se bloquearon con leche sin grasa al 5% diluida en PBS1x-Tween20 0.05% (amortiguador de lavado) durante 2 horas en agitación. Enseguida se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno, para después adicionar los sueros de ratones infectados en diluciones 1:500 diluidos en PBS1x-Tween20-leche sin grasa 2.5% y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación. Los sueros de ratones infectados con el aislado 96 utilizados fueron de 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días de sacrificio; los sueros de ratones infectados con H37Rv que se utilizaron fueron de 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días de sacrificio.

Enseguida se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con el amortiguador de lavado. Posteriormente se agrego el anticuerpo secundario anti-IgG total anti-ratón acoplado a peroxidasa (Sigma Immuno Research) diluido 1:5000 en amortiguador de lavado con leche al 2.5% durante 2

horas. Finalmente se hicieron 4 lavados de 15 minutos c/u con amortiguador de lavado y se impregnaron las tiras con el sustrato quimioluminiscente ECL de Amersham durante 5 minutos para enseguida hacer la exposición de placas fotosensibles a diferentes tiempos. El mismo protocolo se siguió para la inmunodetección con el anticuerpo anti-IgG1 anti-ratón acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Lab) diluido 1:5000 y se usó sustrato quimioluminiscente ECL de Amersham. La inmunodetección en las membranas 2D se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Ensayos de ELISA

Para determinar los títulos de IgG1 en los sueros infectados se sensibilizaron placa de 96 pozos usando 1µg de PFC/mL en amortiguador de carbonatos estéril (0.318 g de carbonato de sodio y 0.568 g de bicarbonato de sodio disuelto en 200 mL de diH₂O). A cada pozo se le agregaron 100 µL de la mezcla anterior y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Enseguida se decantó la placa y se bloqueó 100 µL de albumina al 1% disuelta en PBS 1X durante 1.5 hrs a 37°C. Enseguida se decantó la placa y se hicieron 3 lavados de 1 minuto cada uno con PBS 1X-Tween20 (amortiguador de lavado) y se adicionó el anticuerpo primario en los pozos (5 µL suero del día 14, 21 y 28 de A96 y de 21, 28, 60 y 120 de H37Rv) por duplicado y enseguida se hicieron las diluciones seriadas 1:5 por duplicado (ver la figura 7) y fueron incubados durante 1.5 hrs a 37°C. Enseguida se decantó el contenido y se lavó la placa 5 veces durante 1 minuto cada uno con amortiguador de lavado. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario α-IgG1 α-ratón diluido 1:10000 en PBS 1X y se incubó 1.5 hrs a 37°C. Al término se decantó y se lavó la placa 5 veces por 1 minuto antes de agregar el sustrato *Sigma Fast OPD* (Sigma-Aldrich). Después de 20 minutos se midió la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm después de 20 min de incubación y 490 nm después de detener la reacción con 100 µL de HCl 3 M.

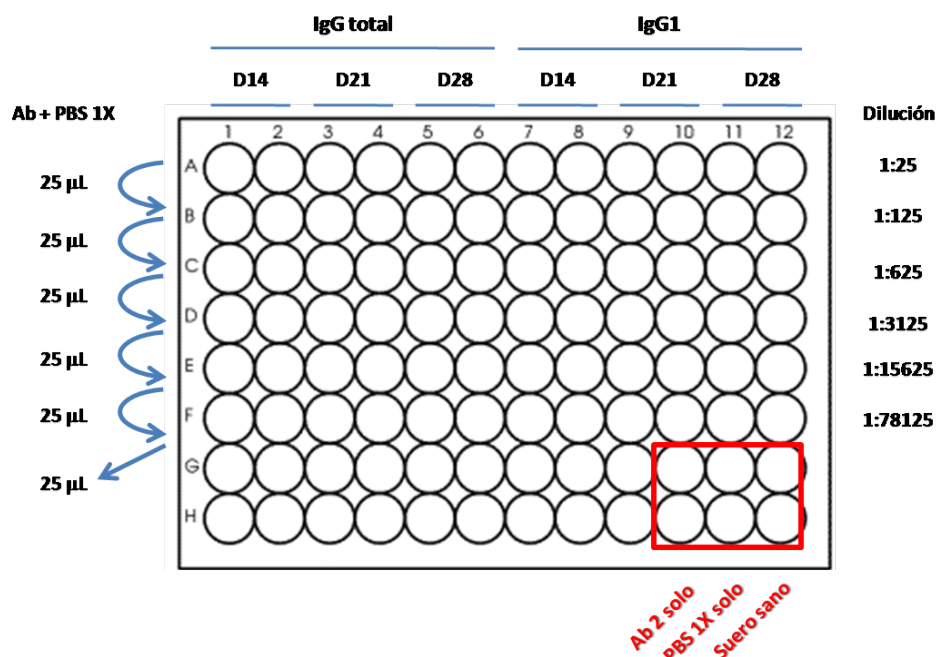


Figura 7. Arreglo de placas de 96 pozos para ensayos de ELISA. En todos los ensayos se utilizaron las mismas diluciones, la preparación de los sueros (Ab + PBS 1X) y la forma de hacer las diluciones seriadas tomando 25 µL a partir de la primera dilución (1:25). Los únicos cambios fueron los sueros de ratones infectados que se utilizaron: aislado 96 y H37Rv. En la figura observamos la plantilla del arreglo del experimento en el que la placa esta sensibilizada con PFC del aislado 96 y se utilizó como anticuerpo primario sueros infectados con dicha cepa en las diluciones antes mencionadas.

Espectrometría de masas

Los puntos de interés fueron cuidadosamente cortados del gel SDS-PAGE teñido con Coomassie, en pequeñas piezas de 1-2 mm³, enseguida fueron desteñidos y lavados a temperatura ambiente en una solución de ácido acético/metanol/agua (5:50:45, v/v/v) toda la noche y posteriormente otra incubación de 4 horas en la misma solución. Las piezas de gel desteñidas fueron completamente deshidratadas con acetonitrilo al 100 % y secadas en una centrifuga con vacío. Para la reducción, a las muestras se les agregó 30 µL de ditiotreitól 10 mM (DTT) en NH₂HCO₃ 50 mM. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la solución de DTT fue removida y se agregaron 30 µL de solución de iodoacetamida (IAA) 100 mM; la reacción de alquilación de las proteínas se realizó en la oscuridad durante 30 minutos. La solución de IAA fue removida y las

piezas de gel fueron deshidratadas con acetonitrilo al 100 % y lavadas durante 10 minutos con NH_2HCO_3 100 mM, se deshidrataron y secaron completamente mediante centrifugación con vacío. Para la tripsinólisis, a las muestras se les agregaron 30 μL de una solución de tripsina fría que contenía 20 ng/ μL de tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WI) en NH_2HCO_3 50 mM y se rehidrataron nuevamente sobre hielo durante 30 minutos con vórtex ocasionalmente y seguido de una incubación a 37°C. Los péptidos tripsinizados fueron extraídos del gel con NH_2HCO_3 50 mM y enseguida con solución de acetonitrilo/agua/ácido fórmico (50:45:5, v/v/v), dos veces de 10 minutos cada una. El volumen de los extractos combinados fue reducido por evaporación en una centrifuga con vacío a temperatura ambiente y se ajustó a 20 μL con ácido fórmico al 1 %, y desalado con una unidad Zip Tip μC18 (Millipore, Bedford, MA) y analizado por cromatografía líquida con un nanoACQUITY UltraPerformance LC (UPLC, Waters, Milford, Mass.) y enseguida en un espectrómetro de masas LC/ESI-MS/MS Q-TRAP 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada).

RESULTADOS

Cultivo de *M. tuberculosis* aislado 96.

Después de 21 días en medio sólido y otros 21 días en medio sintético Sauton, los cultivos se cosecharon para obtener los sobrenadantes que se trataron con inhibidores de proteasas para posteriormente concentrarlos y obtener las PFC para experimentos posteriores.

Concentración y cuantificación de PFC.

Después de los 21 días en el medio Sauton, los cultivos se cosecharon para obtener las PFC de los SN. Estos fueron descongelados gradualmente a 4°C para ser concentrados en la unidad de ultrafiltración Amicon con una membrana de 3 kDa. La concentración de los SN realizada hasta obtener un volumen de 1 mL por cada SN. Cabe mencionar que los cultivos realizados durante el transcurso de este trabajo fueron hechos con alícuotas tomadas del primer cultivo, lo anterior se realizó con el fin de evitar variaciones debidas a las resiembras del aislado. Enseguida se cuantificaron mediante el método de microbradford, obteniendo la cantidad total de proteína en el lote 1 de 1044.87 µg; el lote 2, 3643.86µg; el lote 3, 1148.8 µg. Para confirmar la integridad de las PFC se usaron 15 µg de PFC para correr un SDS-PAGE al 15%. En la figura 8 podemos observar la integridad de las PFC obtenidas de cada SN, se observa que no hubo degradación de PFC durante su manipulación y que existen regiones de proteínas muy abundantes entre los pesos moleculares de 10-15 kDa y entre 25 y 75 kDa.

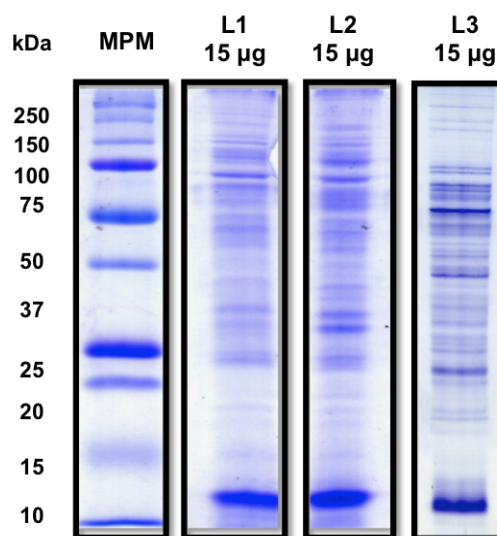


Figura 8. Integridad de PFC de cada cultivo. En los tres lotes de SN se observa la presencia de bandas muy abundantes entre 75 y 25 kDa y entre 15 y 10 kDa. MPM es el carril con marcador de peso molecular DualColor. L1, L2 y L3 son los lotes de proteínas de secreción del aislado 96. SDS-PAGE al 15% cargado con 15µg de cada muestra.

Obtención del secretoma por electroforesis 2D.

Para obtener el proteoma de las PFC del aislado 96 se realizó una 2D-PAGE. Para realizar la primera dimensión (IEE) se usaron anfolitos y tiras de gradiente inmovilizado (IPG) con un rango de pH entre 4-7, para separar las proteínas mediante su punto isoeléctrico (*pI*); debido a que en numerosos estudios han demostrado que esta región contiene la mayoría de las proteínas de secreción de Mtb. Para realizar la segunda dimensión (electroforesis) se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes para separar a las proteínas mediante su peso molecular (PM). Para poder visualizar las proteínas, los SDS-PAGE se tiñeron con plata debido a su alta sensibilidad para la detección de cantidades pequeñas de proteínas (nanogramos).

En la figura 9 podemos observar un patrón representativo de las PFC del aislado 96. En los geles A y B se observó que la presencia de dos grandes grupos de proteínas muy abundantes: el primero se encuentra en un rango de peso molecular de 20-75 kDa; el segundo grupo está ubicado entre 10-15 kDa, algunas son potentes antígenos estimuladores del sistema inmune (Skjot, Oettinger et al. 2000). El análisis de los geles se realizó por duplicado.

Una vez listos los geles 2D se pudieron detectar 211 y 194 puntos en los lotes 1 y 2, respectivamente; el IEE del lote 3 fue realizado en IPG de 7 cm y se detectaron 208 puntos (Fig. 9B). Cabe mencionar que el número actual de puntos visualizados puede depender en gran medida de la cantidad de muestra utilizada, de las condiciones de la tinción de plata y de la manipulación de la muestra para evitar la degradación.

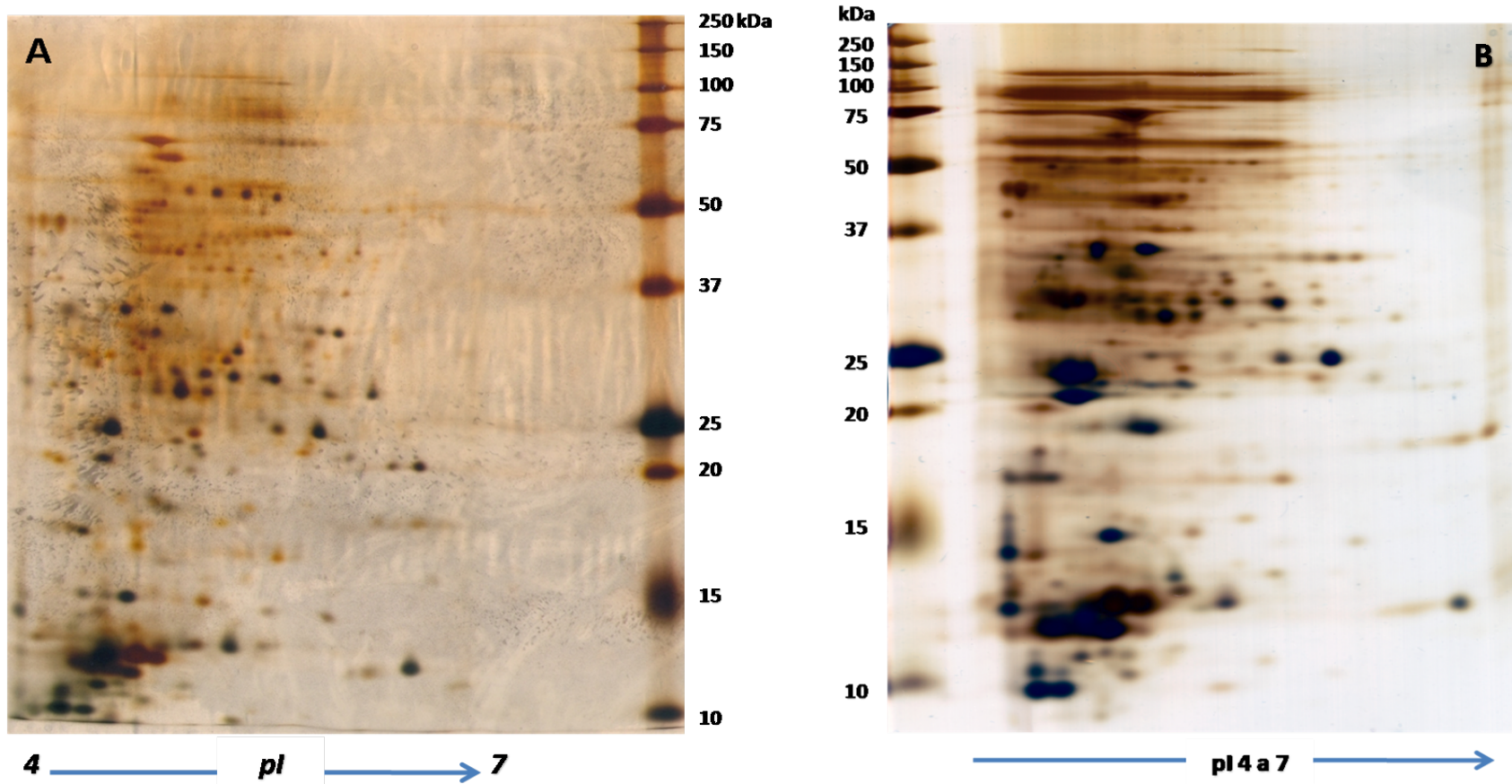


Figura 9. Análisis de patrones 2D teñidos con plata de las PFC del aislado 96. A) Patrón representativo de PFC de en IPG de 11 cm y en IPG de 7 cm (B) ambos de pH 4 a 7.

Análisis de patrones 2D.

Los patrones bidimensionales teñidos con plata fueron adquiridos digitalmente con un escáner convencional y se analizaron usando el programa *PDQuest*, que fue programado con los parámetros de detección básicos, que fueron: la elección del punto más tenue, el más pequeño y el más grande e intenso. A partir de estos datos el programa realizó la búsqueda de puntos en las imágenes basado en un rastreo en escala de grises. Además se ajustaron los valores de fondo de la imagen para la eliminación de manchas producidas por la plata y así evitar tener una detección incorrecta, también se ajustó la sensibilidad de la detección. Enseguida, los puntos encontrados por el programa fueron cotejados con los observados en los SDS-PAGE, después se realizó la edición de la búsqueda obtenida eliminando manualmente los puntos falsos y marcando los puntos no detectados. El proceso fue el mismo para los lotes de PFC del aislado 96 con lo que se obtuvieron imágenes corregidas y analizadas llamadas “patrón maestro”, con lo cual se visualizaron 211 y 194 puntos para los lotes 1 y 2 respectivamente (Fig. 10).

A partir de los geles maestros se llevo a cabo el empalme de los mismos para construir una plantilla en la que se indican los puntos de cada gel, además de señalar cuales se encuentran presentes solo en un gel. En este análisis se seleccionó una imagen como patrón de referencia para la generación de las comparaciones y así crear una imagen maestra del empalme (Fig. 11A). De este modo al sobreponer las imágenes de ambos lotes se observó que coincidieron 191 puntos que corresponden al 90% de similitud (Tabla 1).

Una vez realizado el análisis del empalme maestro se procedió a la localización de cada uno de los puntos a partir de parámetros como el peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de puntos conocidos para posteriormente generar un cuadrícula con valores de pI y PM (Fig. 11B), este análisis se utilizó para analizar las características y referencia de cada uno de los puntos del empalme maestro. Con los datos anteriores se procedió a representar los valores de los puntos en una gráfica de dispersión para tener una idea de su comportamiento a partir de las características antes mencionadas; En la figura 11C se observa que la mayoría de los puntos se encuentran en un rango de pI de 4 a 6 (ácidas) y dicha cantidad de puntos son de bajo peso molecular (entre 10 y 50 kDa).

Tabla 1. Análisis entre lotes de PFC				
Gel	Puntos	Coincidencias	% de coincidencia	Gel de referencia
*sud96_SN_Lt1 v1	211	211	100%	*sud96_SN_Lt1
sud96-L2-mayo v1	194	191	90%	*sud96_SN_Lt1

NOTA: SN: sobrenadante; Lt1: Lote 1, L2: Lote 2

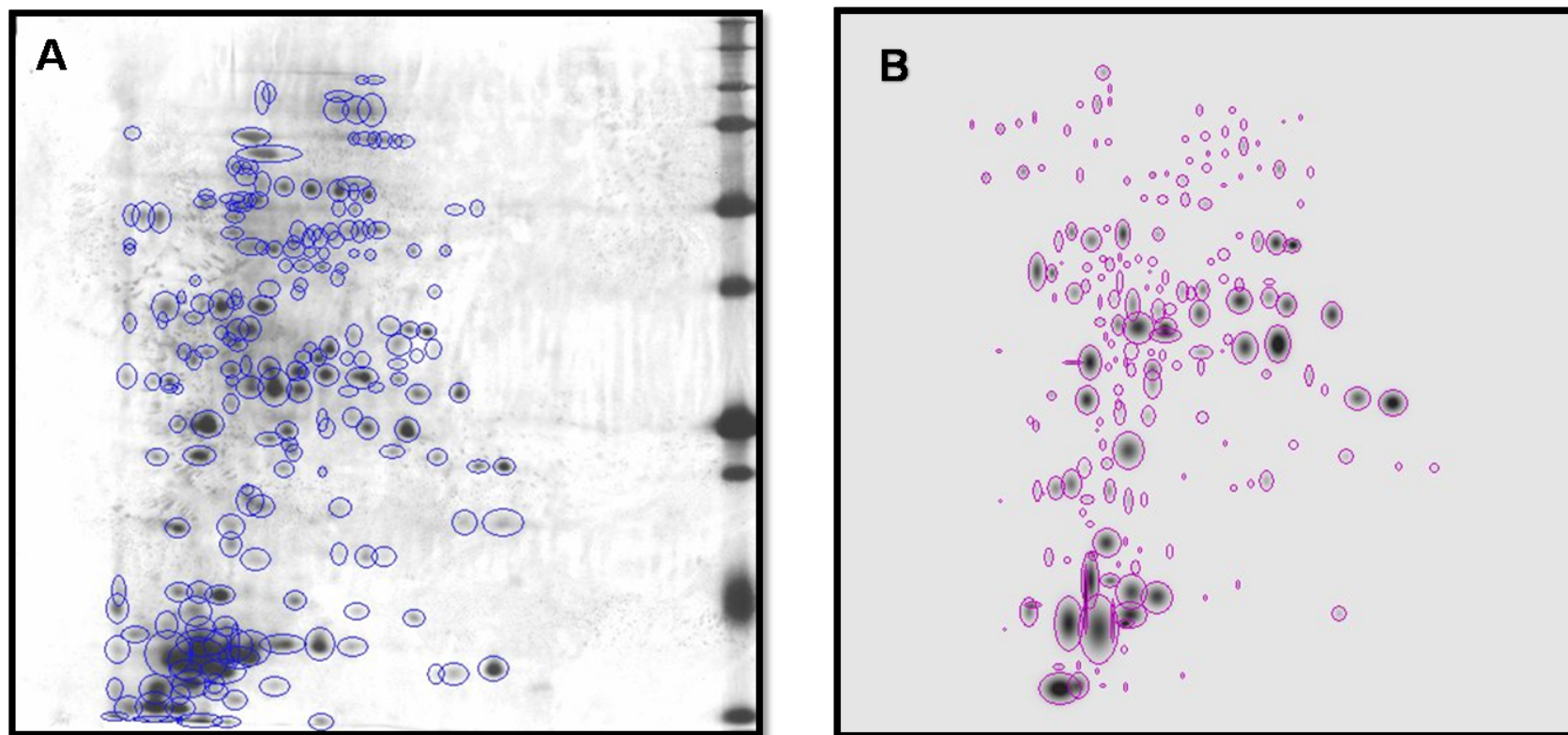
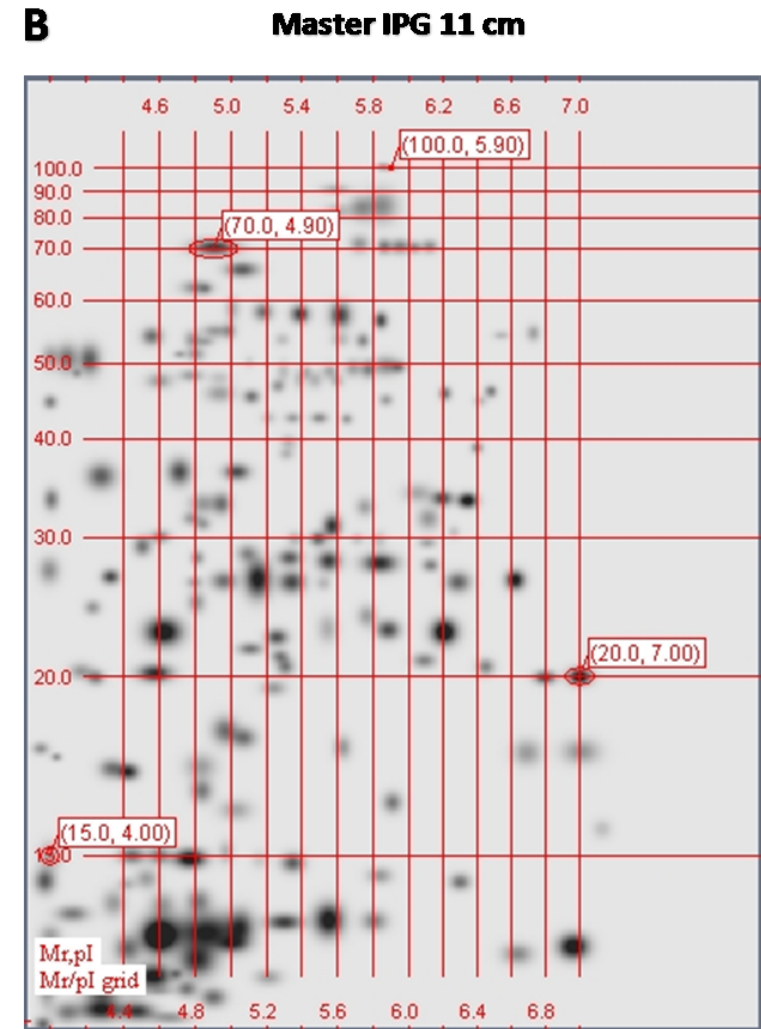
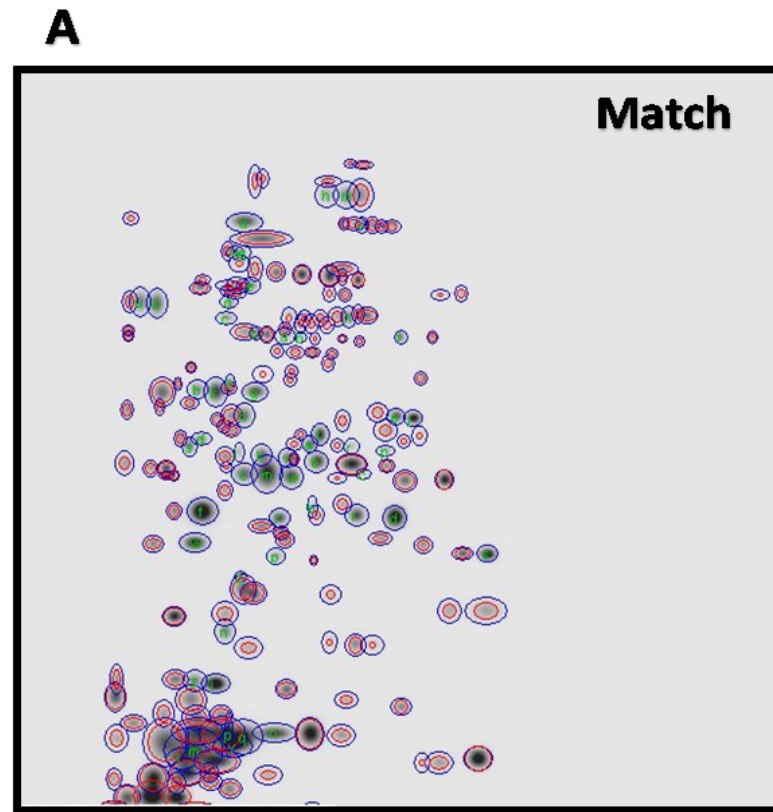


Figura 10. Análisis del patrón 2D de PFC. Observamos los análisis obtenidos por el programa donde se muestra la eliminación del fondo (B) del gel resaltando exclusivamente los puntos. Los geles SDS-PAGE teñidos con plata fueron analizados mediante el programa *PD Quest*. Este analizó cada imagen en busca del patrón de puntos; la búsqueda fue realizada partiendo de parámetros que están basados en el tamaño e intensidad de los puntos sobre una escala de grises. Dichos parámetros fueron el punto más tenue, el más pequeño y el más grande e intenso.



continua en la siguiente página...

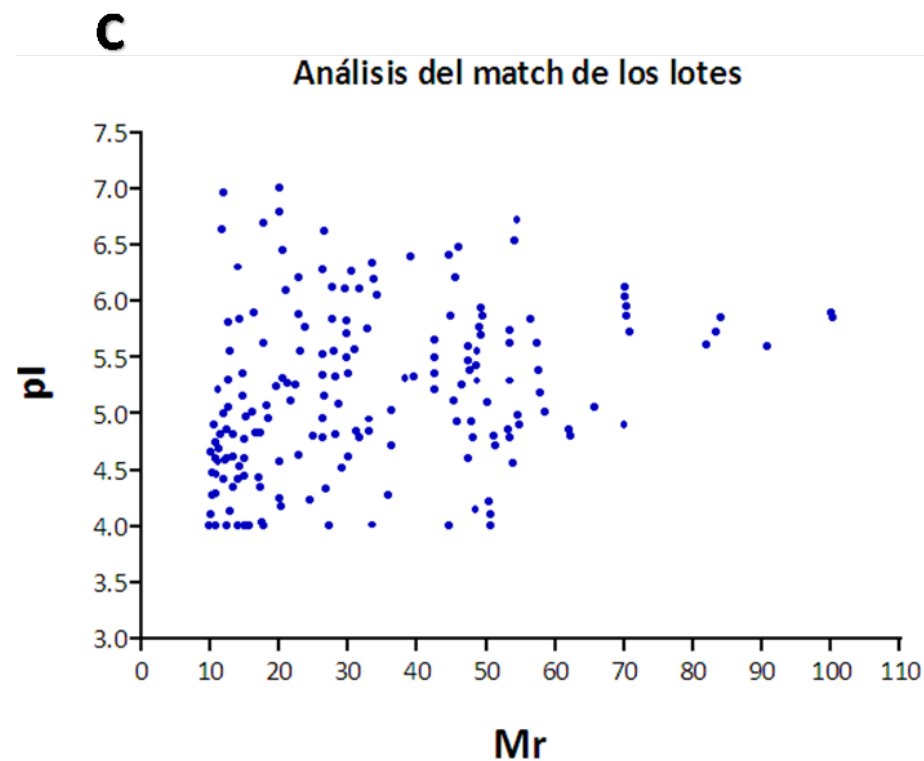


Figura 11. Análisis del empalme de geles maestros. A) Empalme de las imágenes maestras generadas durante el análisis individual de los lotes demostró la coincidencia entre los puntos de ambos geles. El resultado del análisis se observa en la tabla 2. En los círculos azules se pueden observar los puntos detectados en el lote 1; en círculos rojos se observan los puntos del lote 2. El empalme de círculos de diferentes colores refleja las coincidencias entre ambos lotes. B) Localización de cada punto en la imagen del empalme utilizando el peso molecular y punto isoeléctrico. C) Distribución de los puntos analizados mediante su punto isoeléctrico y peso molecular. IPG de 11 cm.

Fraccionamiento de PFC.

Para caracterizar el proteoma de A96 se realizó el fraccionamiento por PM, del cual obtuvimos 14 fracciones. Las fracciones se cuantificaron (tabla 2) y se corrieron en un gel SDS-PAGE con 1 µg de proteína de cada fracción y posteriormente se visualizó mediante tinción de plata. En la figura 12A se muestra el patrón de bandas característico del aislado 96 en el gel SDS-PAGE. En el panel B se muestra un gel teñido con plata donde se analizaron las PFC obtenidas; en las proteínas separadas en 14 fracciones se destacan dos regiones, la primera conformada por las fracciones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 que contienen proteínas de gran abundancia con PM entre 20-75 kDa; por otro lado, las fracciones 12, 13 y 14 conforman la segunda región de abundancia con PM entre 10-15 kDa. Con estos datos obtenidos se corroboran los resultados que se obtuvieron durante el análisis de los patrones de secreción de doble dimensión de las PFC.

En los carriles 1, 4, 8, 9, 10 y 11 se observaron bandas que migraron más abajo del PM correspondiente a la fracción y en los carriles 7 al 10 se pueden observar la presencia de dos bandas similares en PM entre 10 y 15 kDa (Fig. 12). Esto sugiere la presencia de complejos proteicos dentro de las fracciones, dichos complejos no se desnaturalizaron en el gel SDS-PAGE que se utilizó para el fraccionamiento, pero al desnaturalizar las proteínas en el SDS-PAGE teñido con plata, los complejos fueron separados. Las bandas entre 10 y 15 kDa anteriormente descritas coinciden con bandas del mismo tamaño en el gel de integridad teñido con Coomassie (Fig. 12A), lo cual apoya la presencia de complejos proteicos en las fracciones y descarta la degradación de las PFC.

Tabla 2. Cuantificación de fracciones de PFC aislado 96

Fracción #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
[µg]	1.33	0.83	0.42	0.29	0.33	0.38	0.33	0.39	0.40	0.31	0.24	0.26	0.45	1.17

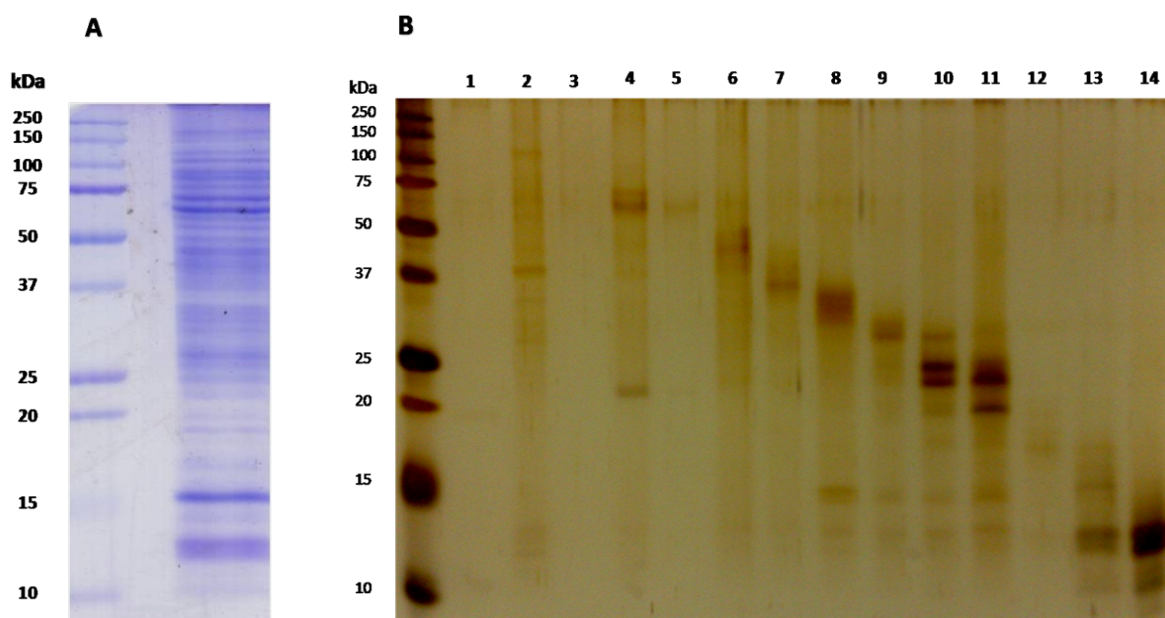


Figura 12. Fraccionamiento de PFC del aislado 96. A) SDS-PAGE con 10 µg de PFC totales teñido con azul de Coomassie. En B) Gel SDS-PAGE al 15% teñido con plata cargado con 1 µg de proteínas de cada una de las fracciones.

Caracterización de fracciones de PFC mediante ensayos de ELISA.

Las PFC fueron fraccionadas y se caracterizaron para conocer el título de IgG1 debido a que se ha reportado que es secretada en grandes cantidades durante la fase progresiva del modelo murino de TBp progresiva (Hernandez-Pando, Orozco et al. 1996). Como anticuerpo primario utilizamos sueros del día 28 de ratones infectados con A96 titulados previamente (Fig. 16).

En la figura 13A se muestra el título de IgG obtenido en cada fracción proteica realizado en diluciones seriadas; durante el experimento observamos dos grupos de fracciones en las que la 12 y 13 tuvieron el título más bajo (absorbancia menor a 1), en las fracciones 7, 11 y 14 se obtuvo un título del doble comparado con las anteriores, y las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 fueron las que tuvieron los títulos más altos de IgG1 (absorbancia superiores a 2). También observamos que la tendencia en los títulos fue proporcional en las demás diluciones, con lo que se confirma que los títulos obtenidos en la primera dilución fueron los correctos. El grupo de fracciones más concentrado presenta una clara abundancia de antígenos detectables por IgG1, pero el otro grupo es menos reactivo contra el suero de día 28, por lo que debe haber una cantidad de antígenos menor. En los paneles B, C y D solo se muestran los títulos anteriores por separado para una mejor visualización de las fracciones. Los títulos altos en las fracciones de mayor PM corroboran los resultados obtenidos en la inmunodetección en 2D, en los cuales el 70% de las proteínas detectadas estuvieron en el rango de 25 a 75 kDa. Esto sugiere que en este rango de PM se encuentra una cantidad considerable de antígenos reconocidos por inmunoglobulinas de fase progresiva (IgG1) de TBp en animales infectados con A96.

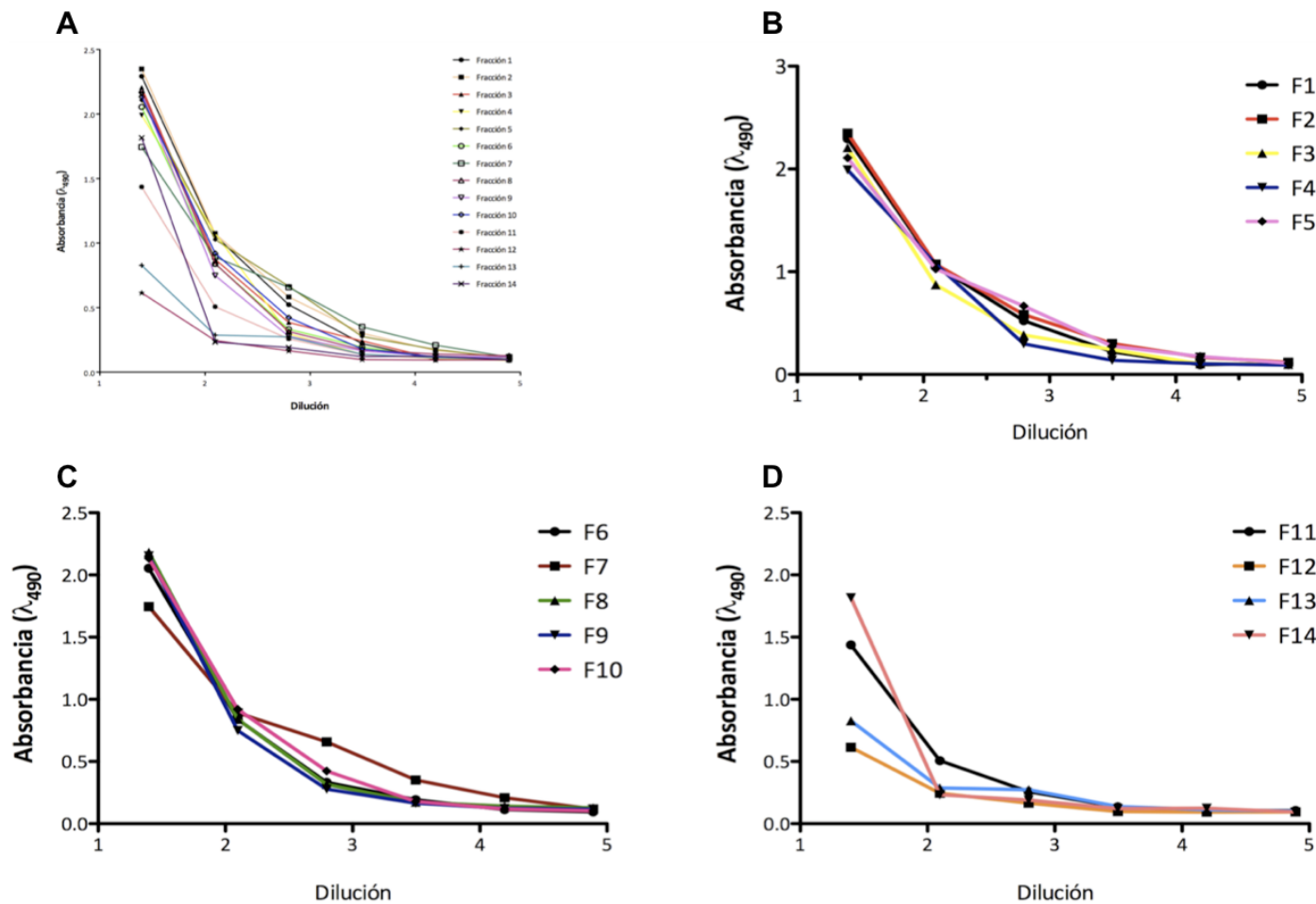


Figura 13. Caracterización de las proteínas fraccionadas por PM mediante el análisis del título de IgG1 (A). Las fracciones de mayor PM tuvieron la mayor cantidad de antígenos detectados por IgG1 (B y C), mientras que las fracciones de menor PM y más abundantes fueron las que presentaron el menor título ($Abs > 1$) (D). F es fracción. El anticuerpo primario se utilizó 1:500 y el secundario 1:10000.

Inmunodetección de antígenos con IgG1.

La siguiente etapa consistió en la búsqueda de proteínas que fueran reconocidas por IgG1 sobre las membranas de nitrocelulosa cargadas con PFC en patrones preparativos y de doble dimensión (Fig. 14, 15, 16 y 18). Los sueros de ratones infectados con las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y el aislado 96 fueron usados como anticuerpo primario en diluciones 1:500. Inicialmente, se realizó la inmunodetección con anti-IgG total para confirmar el reconocimiento de proteínas; la detección con IgG total demostró una señal fuerte con múltiples bandas muy definidas y gruesas en todas las tiras de membrana tratadas con sueros de A96 de los días 14 y 28 de infección (datos no mostrados), por lo que se procedió a los experimentos utilizando anti-IgG1 para una detección específica. Es importante mencionar que las tiras de nitrocelulosa utilizadas en los experimentos de H37Rv y A96 fueron cortadas del mismo ancho y largo, lo cual permitió tener la certeza de que al empalmarlas no hubo errores debido al tamaño de las mismas. En la figura 14 realizamos una cinética de detección usando mezclas de sueros inmunes infectados de los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 (6 sueros del mismo día es una mezcla). En el carril 1 utilizamos suero de ratones sanos como control negativo; en los carriles siguientes observamos los sueros del resto de los días. En el suero del día 1 de sacrificio se detectaron 6 bandas de distintos pesos moleculares; en el suero del día 3 detectamos 4 bandas; para el día 7 hubo 6 bandas; el día 14 mostró reconocimiento de 9 bandas; del día 21 se detectaron 11 bandas; y en el día 28 detectamos 17 bandas. Durante esta cinética se pudo observar el aumento de bandas de diferentes pesos moleculares, aunque dicho aumento no es muy grande, si podemos ver que las bandas que aparecen conforme el tiempo avanza son más intensas y definidas. Cabe señalar que durante toda la cinética y en el control siempre hubo un par de bandas muy cercanas poco mayores a los 37 kDa que predominaron en intensidad desde el control hasta el último día de infección.

A continuación, se compararon los datos obtenidos en la cinética de A96 con la cepa de referencia H37Rv. Se realizó una cinética utilizando sueros de ratones infectados con la cepa H37Rv (6 sueros del mismo día es una mezcla). En la figura 15 se observa la distribución de bandas en distintos pesos moleculares además de que aparecen en cantidades crecientes conforme la infección progresa. Enseguida se menciona el número de bandas detectadas por carril; el día 3, 8 bandas; día 7, 7 bandas; día 14, 8 bandas; el día 21, 10 bandas; día 28, 12 bandas, las más abundantes se encontraron distribuidas entre 25 y 150 kDa y entre 10 y 15 kDa; el día 60, 9 bandas y durante el

día 120, 18 bandas, todas fueron extremadamente definidas y delgadas. De igual forma, podemos observar que la detección realizada se encuentra en función del tiempo de infección, o sea, hubo mayor cantidad de bandas a mayor tiempo de infección.

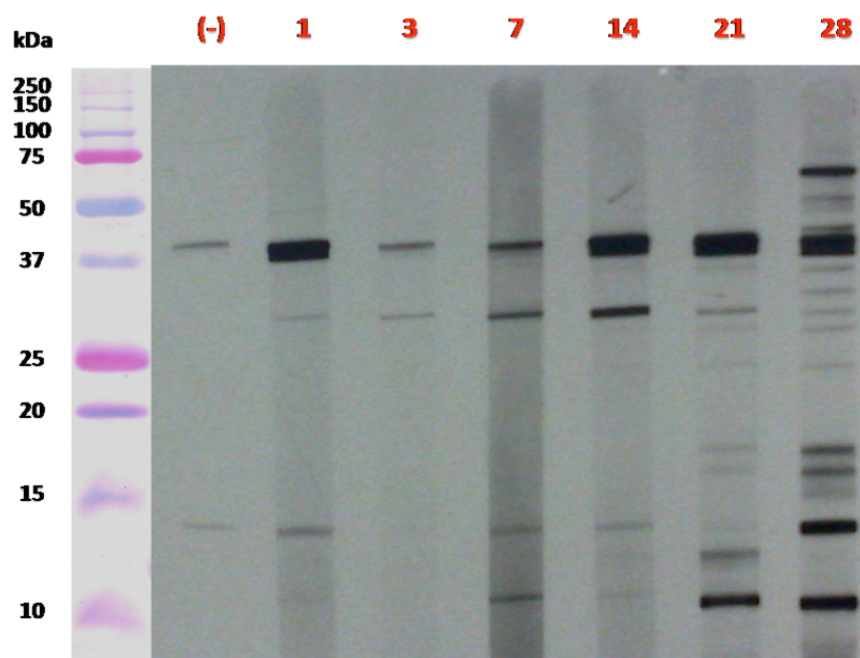


Figura 14. Inmunodetección de antígenos de *M. tuberculosis* aislado 96. La detección de antígenos presentes en las PFC de aislado 96 se realizó mediante western blot utilizando sueros de ratones infectados con el aislado 96 como anticuerpo primario. Se usaron anticuerpos anti-IgG1 para localizar que proteínas en la membrana de nitrocelulosa fueron reconocidas. En la figura se muestra la cinética de inmunodetección usando sueros de todos los días de infección con el aislado 96 y se detectó con anti-IgG1. En el carril 1 del panel derecho se utilizó como control negativo suero de ratón no infectado y nacido en aislamiento estricto. El anticuerpo primario (sueros) se utilizó 1:500 y el anticuerpo secundario (anti-IgG1-peroxidado) se utilizó diluido 1:5000 según el fabricante.

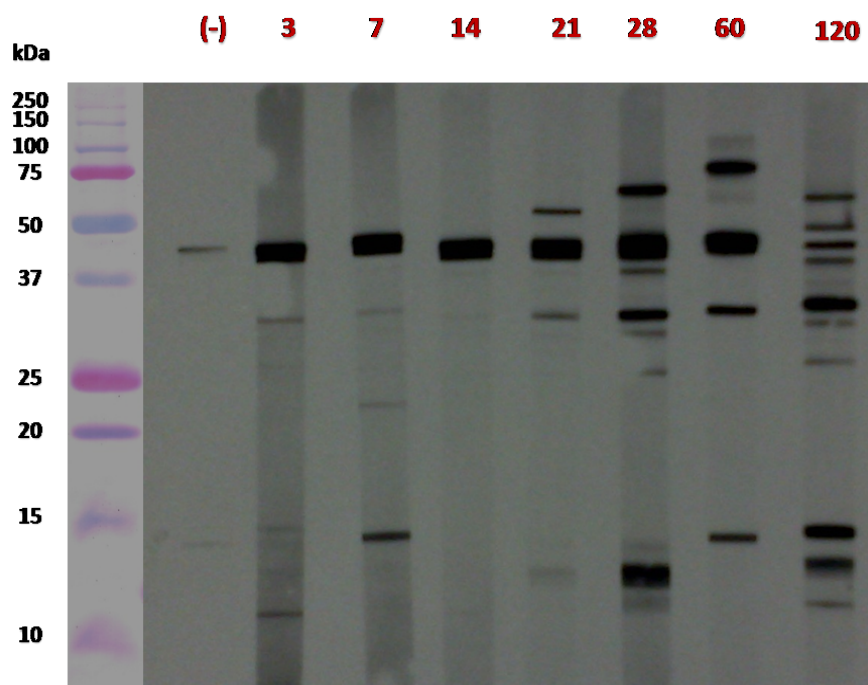


Figura 15. Inmunodetección de antígenos de PFC del aislado 96 usando sueros de ratones infectados con H37Rv como anticuerpo primario y revelado con anticuerpos anti-IgG1 acoplados a peroxidasa. Carril (-) es el control en el que se uso suero de ratones no infectados y en aislamiento. Los sueros fueron utilizados 1:500 y el Ab anti-IgG1 se utilizó 1:5000.

Inmunodetección de antígenos con IgG1 en patrones 2D.

El siguiente paso fue la búsqueda de antígenos sobre membranas 2D, primero se realizó la titulación de los sueros de H37Rv y A96 para determinar cual suero se usaría como anticuerpo primario. En la figura 16A se muestra el título de los sueros de A96 de los días 14, 21 y 28 utilizados en diluciones seriadas como se describió en la metodología (Fig. 7); se pudo observar que el suero con el mayor título de anticuerpos IgG1 fue del día 28, por lo tanto este suero fue el que se utilizó en las membranas 2D. En la figura 16B, se muestra el título de los sueros de ratones infectados con H37Rv; observando que el suero del día 28 presentó el título más alto de IgG1 por lo que este se utilizó para la inmunodetección.

Posteriormente para detectar los antígenos reconocidos por IgG1, se usaron sueros de ratones infectados con A96 de los días 14 y 28 de postinfección. En la figura 17A se observa la inmunodetección utilizando el suero del día 14 y se muestra que existe una detección de 3 puntos poco abundantes predominantemente entre 75 y 37 kDa y uno muy intenso de 20 kDa. En la figura 17B utilizamos suero del día 28 para la inmunodetección y se observó que hay mayor cantidad de puntos detectados por IgG1, los cuales son más abundantes entre 75 y 50 kDa, también hubo detección de 2 puntos entre 10 y 25 kDa. Estos datos confirman los resultados obtenidos durante las cinéticas utilizando los sueros de A96, en los que la tendencia es el aumento de antígenos reconocidos por IgG1 conforme los días de infección avanzan.

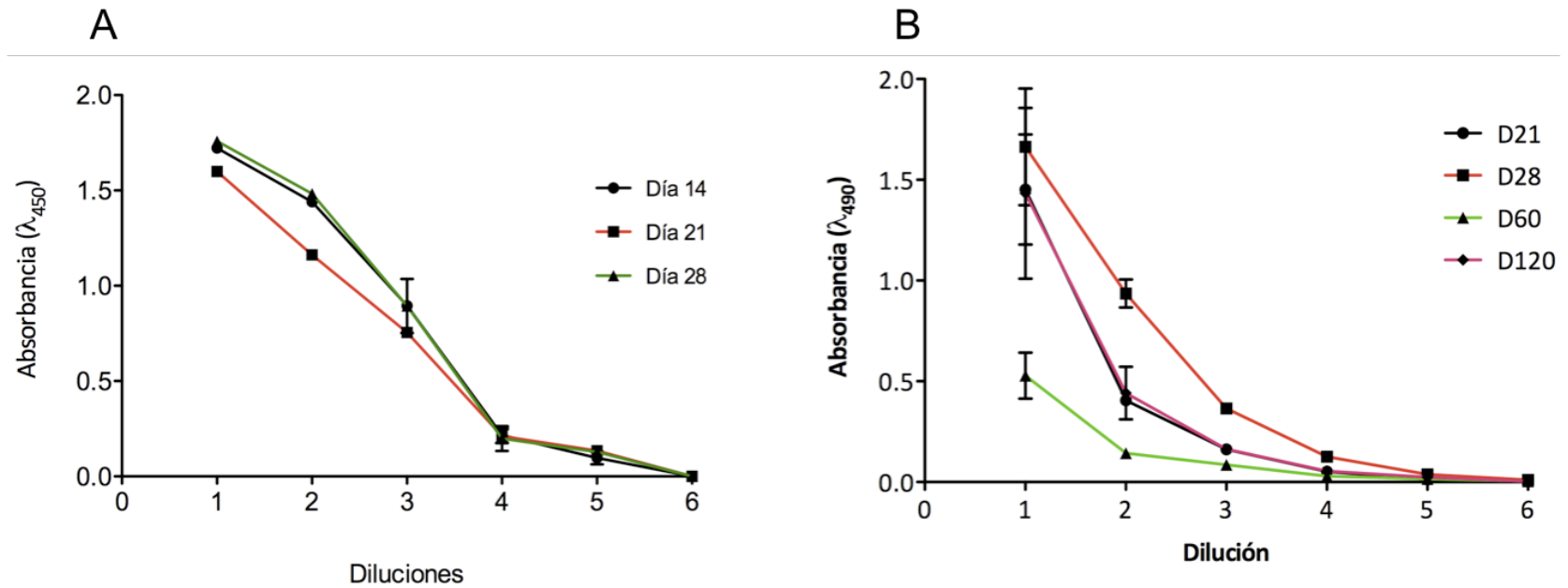


Figura 16. Titulación de sueros de A96 (A) y H37Rv (B). Mediante ELISA se realizó la detección del título de anticuerpos IgG1 en los sueros de ratones infectados con el aislado 96 y con H37Rv. En ambos experimentos en día 28 mantuvo los títulos más altos durante la cinética. Los sueros se utilizaron en diluciones seriadas descritas en la metodología y el anticuerpo secundario anti-IgG1 de utilizó diluido 1:10000.

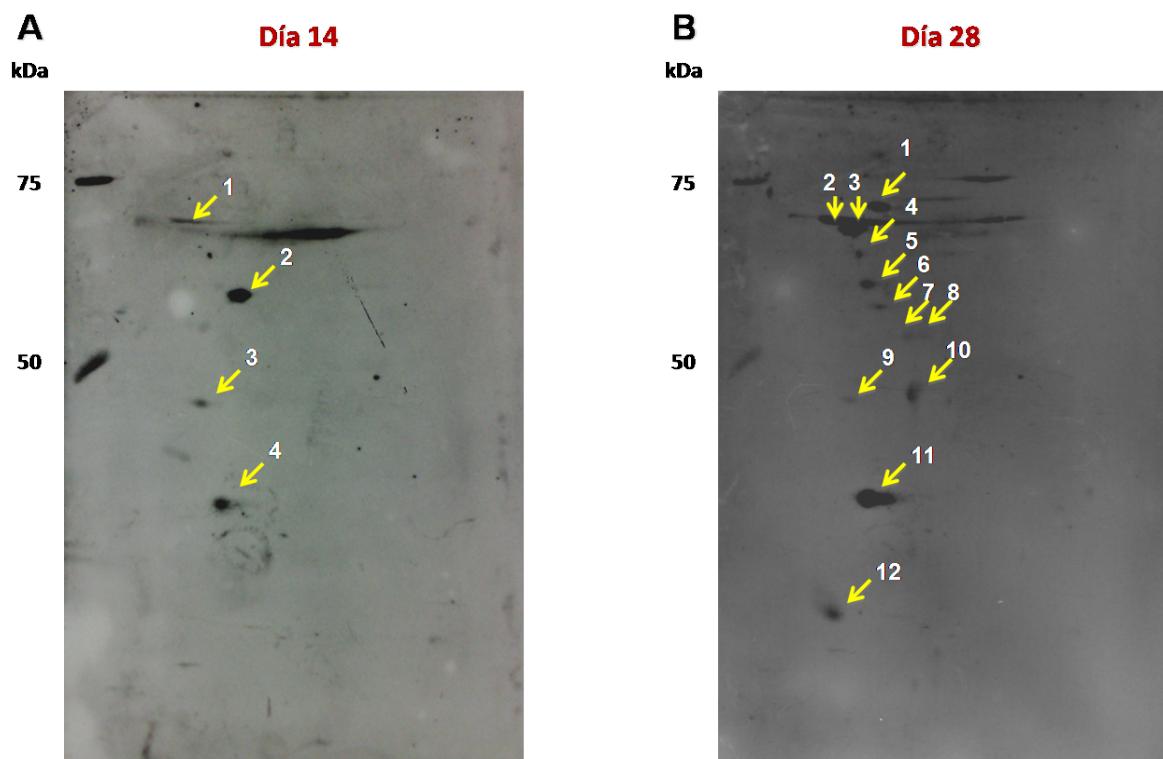


Figura 17. Inmunodetección de antígenos en doble dimensión. Se utilizaron sueros de ratones infectados con el aislado 96 de los días 14 y 28 de sacrificio. Durante la detección se observó que los antígenos detectados se incrementaban conforme aumentaba el tiempo de infección. Los sueros se utilizaron diluidos 1:500.

Una vez obtenidos los patrones de inmunodetección 2D de antígenos del A96, se analizó el patrón de inmunodetección 2D de antígenos de A96 pero utilizando como anticuerpo primario el suero de día 28 de los ratones infectados con la cepa H37Rv. En la figura 18A se muestra la inmunodetección con suero del día 28 de H37Rv; la cantidad de puntos que se visualizan son pocos al compararse con los obtenidos en A96 con sueros del mismo día (Fig. 17B). Observamos 3 puntos detectados por IgG1 localizados entre 75 y 50 kDa; entre 50 y 37 kDa se encontraron 2 puntos definidos y una región que desde los 30 segundos de exposición mostraba un barrido horizontal de 50 kDa (rectángulo azul); entre 37 y 20 kDa localizamos 3 puntos visibles (flechas azules). En la figura 18B se muestran los puntos detectados por IgG1, en la región de 75 kDa hay una zona no definida (rectángulo amarillo); entre 75 y 50 kDa hubo 2 puntos y una zona sin definir; entre 50 y 37 kDa detectamos 2 puntos; entre 37 y 10 kDa localizamos 8 puntos definidos (flechas amarillas).

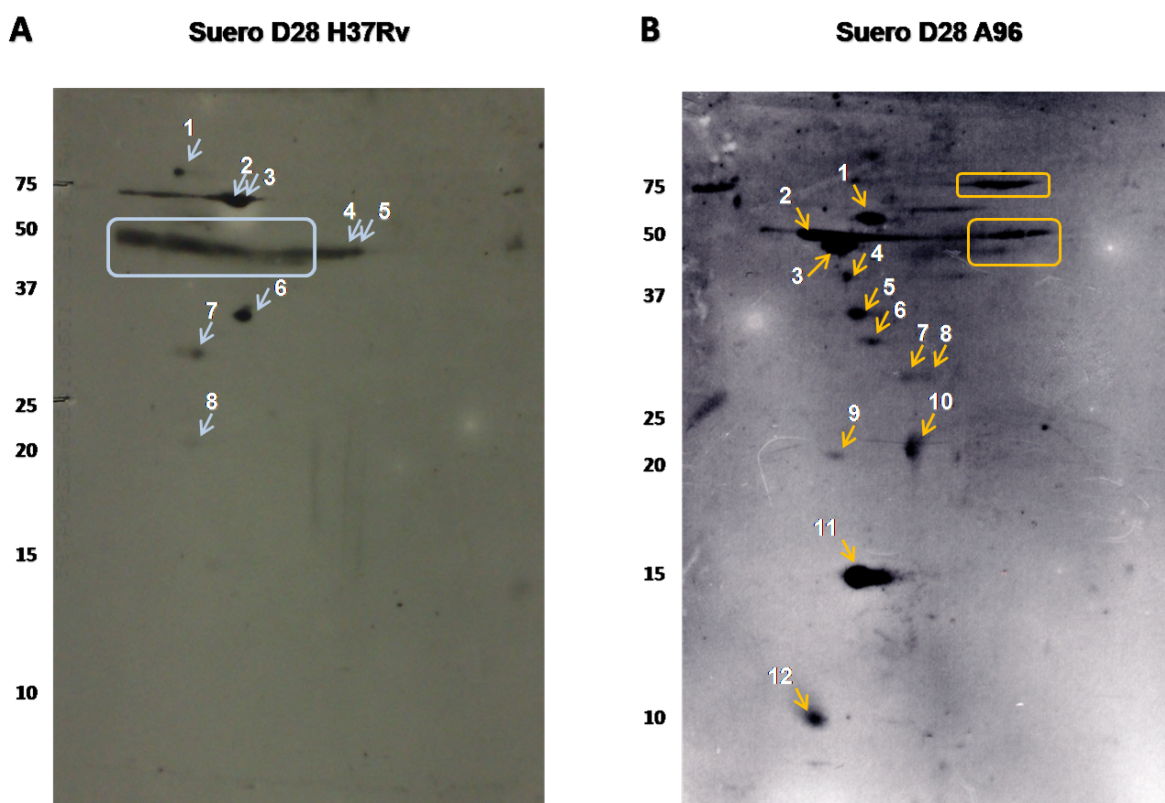


Figura 18. Reconocimiento 2D por sueros de H37Rv y A96 de *Mtb*. Inmunodetección de puntos en patrones 2D con sueros del día 28 de H37Rv y A96. En ambas detecciones se localizaron zonas que no tuvieron definición de puntos (rectángulos). A) Para H37Rv se detectaron 8 puntos definidos; B) para A96 hubo detección de 12 puntos. Para ambos experimentos se expusieron las placas a la quimioluminiscencia durante 1, 10, 30 y 60 minutos.

Después de localizar los puntos comunes entre *Mtb* H37Rv y A96 se realizó la selección de los puntos detectados por los sueros de los animales infectados con el aislado 96, pero que no fueron reconocidos por los sueros de los animales infectados con *Mtb* H37Rv, con el fin de realizar la secuenciación por espectrometría de masas. Los candidatos reconocidos diferencialmente por los sueros fueron localizados sobre un SDS-PAGE teñido con coomassie coloidal (Fig. 19).

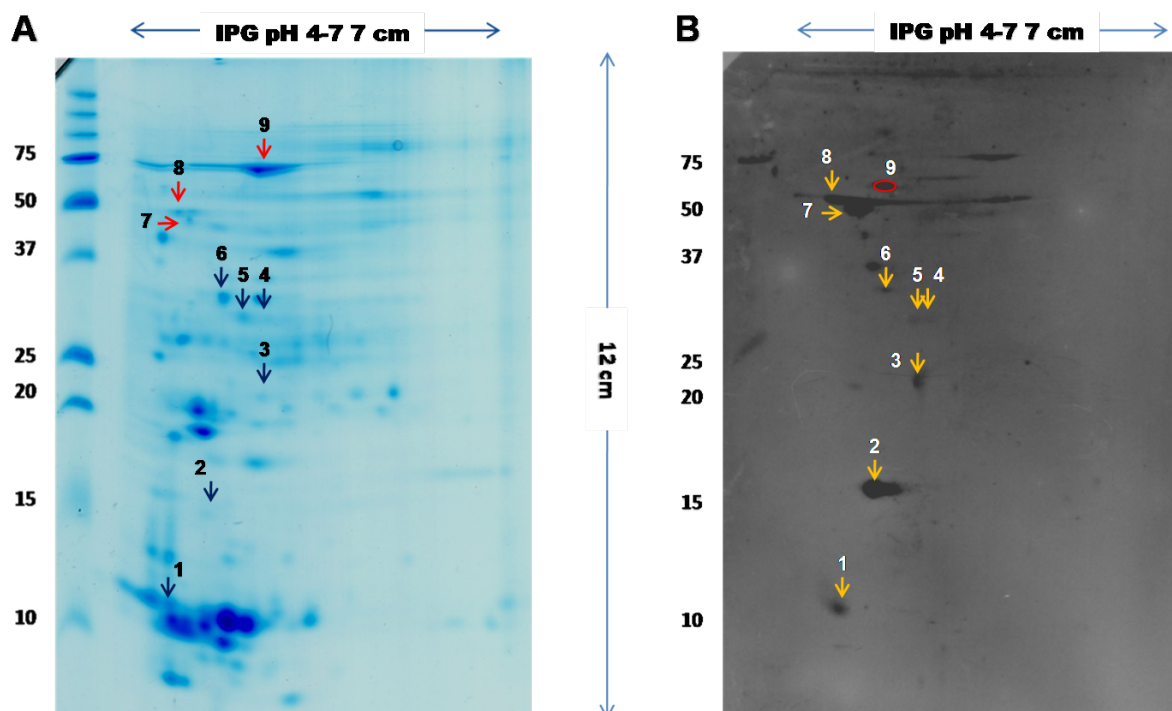


Figura 19. Detección de antígenos reconocidos por IgG1 en SDS-PAGE 2D. Los antígenos detectados con IgG1 en una membrana de nitrocelulosa 2D (B) fueron localizados sobre un SDS-PAGE 2D teñido con azul de Coomassie G250 coloidal (A) para su secuenciación por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas de las proteínas inmunolocalizadas.

De los nueve puntos elegidos para el análisis por espectrometría de masas, solo se identificaron siete, de los puntos marcados con el número 2 y 5 (Fig. 19) no se obtuvo dato alguno. Las proteínas identificadas a partir de los puntos elegidos correspondieron a la chaperona de choque térmico DnaK encargada de asistir al plegamiento de los péptidos nacientes y que utiliza ATP para ayudar al plegamiento; una dihidrolipoamida deshidrogenasa que forma parte del complejo alfa-cetoácido deshidrogenasa que participa en el metabolismo energético; una proteína de 40723 Da con actividad de transaldolasa que participa en la vía de las pentosas fosfato en plantas y bacterias; una proteína transportadora de fosfato de 38390 Da que es un complemento del sistema de transporte periplásmico ABC en bacterias; una proteína hipotética Rv2145c; la proteína principal de membrana de 19-kDa (MMP19) que tiene un peso molecular de 16086 Da y pertenece a la familia de pequeñas proteínas de choque térmico de tipo α -cristalina (Hsps); y por

último se detectó al antígeno filtrado de cultivo de 10-kDa EsxB (10787 Da) de función desconocida actualmente (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la secuenciación				
Proteína	PM (Da)	pI	Score	% Cobertura
10 kDa Culture Filtrate Antigen EsxB (CFP10)	10787	4.59	210	43
19 kDa Major Membrane Protein (MMP19)	16086	5.00	60	21
Hypothetical Protein Rv2145c ó Antigen 84	28260	4.80	131	25
Phosphate ABC Transporter, Phosphate-binding Protein (PstS1)	38390	5.14	203	36
Transaldolase	40720	4.87	85	5
Dihydrolipoamide dehydrogenase	49437	5.53	204	17
Molecular Chaperone DnaK (Hsp70)	66790	4.85	678	42

NOTA: Las secuencias completas de las proteínas se muestran en el anexo 3.

DISCUSION

Una de las características de *M. tuberculosis* es su adaptación a la vida intracelular, para lo cual uno de los puntos críticos en la supervivencia del bacilo es la evasión de la respuesta inmune, por lo que en este trabajo se buscó identificar proteínas posiblemente involucradas en este evento. Para alcanzar esta meta se utilizó un aislamiento clínico procedente de un estudio epidemiológico realizado en Orizaba, Veracruz, en el cuál se analizó la virulencia de varios aislados de *M. tuberculosis* y se encontró que un par de ellos eran hipervirulentos (A96 y A134) y mataban a los ratones entre la semana 4 y 5 después de la infección. La infección de los ratones con el A96 se caracterizó por la presencia de tejido pulmonar con neumonía extensa, además de altas cantidades del mensajero de IL-4 desde el primer día de infección, las cuales se incrementaron conforme progresaba la infección (Hernández-Pando, datos sin publicar). En contraste, los ratones infectados con el aislamiento A134 y las cepa tipo H37Rv, el mensajero para IL-4 se detectó a partir del día 21 y 28 de infección, respectivamente (Fig. 6). Por esta razón se seleccionó al aislado 96 para el presente estudio que se enfocó en la búsqueda de proteínas posiblemente involucradas en la polarización de la respuesta inmune a Th2, lo cual favorece la progresión de la enfermedad y la proliferación de la micobacteria.

El concepto Th1/Th2 esta apoyado en la dicotomía del perfil de secreción de citocinas; en el cual las células Th1 se caracterizan por la secreción de IFN- γ e IL-2, mientras que las células Th2 secretan principalmente IL-4 e IL-10. Una característica importante de la tuberculosis es el desarrollo de la respuesta inmune celular durante la fase aguda, seguida de la respuesta humoral durante la fase crónica (progresiva en el modelo murino). Una vez que las micobacterias son inhaladas y se alojan en el tejido pulmonar, son fagocitadas por los macrófagos alveolares, lo cual promueve la presentación antigénica a los linfocitos T y la secreción de IFN- γ que activa a los macrófagos que llegan al sitio de la infección reclutados por las quimiocinas. La secreción de IFN- γ se encarga de polarizar células Th0 hacia Th1, lo cual favorece el control y la eliminación de la micobacteria, y mientras más fuerte sea la respuesta inmune celular, más exitosa será la defensa del huesped. Sin embargo, un bajo porcentaje de individuos infectados desarrollarán la enfermedad crónica, la cual se caracteriza por el aumento en la respuesta inmune humoral mediada por la secreción de IL-4 principalmente. El aumento de dicha respuesta provoca el antagonismo de la respuesta celular, que al disminuir favorecerá que la micobacteria prolifere y se

disemine en el pulmón, provocando la destrucción del tejido por neumonía y necrosis. Por esto es de gran importancia definir las proteínas que favorecen la respuesta Th2 durante la TB, ya que es un mecanismo que la micobacteria utiliza para lograr sobrevivir. Sin embargo, la respuesta Th2 tardía pudiera tener un papel benefico, evitando la inflamación excesiva y el daño tisular.

En las últimas décadas ha adquirido importancia la caracterización de las proteínas filtradas de cultivo (PFC), debido a que en ellas se encuentran proteínas inmunodominantes que han demostrado ser potentes inductoras de la respuesta Th1, sin embargo también se encuentran algunas que de forma contraria están involucradas en el arresto de la maduración del fagosoma. Las PFC son una mezcla compleja de proteínas en concentraciones diferentes, desde las que son escasamente detectables con tinción de plata hasta las que son muy abundantes, y que a su vez varían entre aislamientos. Siebert y Munday fueron los primeros en evidenciar que el filtrado de cultivo es la principal fuente de antígenos involucrados en la respuesta inmune protectora (Siebert and Munday 1932; Pollock and Andersen 1997), en el se encuentran antígenos que son reconocidos por linfocitos T durante la infección de TB en ratones y en humanos (Boesen, Jensen et al. 1995). Los diversos intentos por definir los componentes inmunologicamente activos de las PFC han llevado a la identificación y caracterización de proteínas inductoras de respuesta Th1 como ESAT-6 que estimula linfocitos T para producir IFN- γ (Sorensen, Nagai et al. 1995); MPT64, las proteínas del complejo Ag85 que inducen respuesta celular (Harth, Lee et al. 1996) y MPT32 (Romain, Augier et al. 1993), entre otros. En contraste, también se han reportado algunas proteínas capaces de inducir la respuesta inmune Th2, pero estas han sido poco estudiadas.

Basados en la tecnología de IPGs logramos resolver un promedio de 204 proteínas en el sobrenadante de cultivo del aislado 96 (Fig. 10). Este análisis concuerda con los resultados de Sonnenberg *et al.* quien reportó 206 puntos en el secretoma de la cepa tipo H37Rv (ATCC 27294) (Sonnenberg and Belisle 1997); mientras que Jungblut y cols. reportaron 800 puntos en el secretoma de la misma cepa H37Rv y Erdman (Rosenkrands, King et al. 2000). Los resultados obtenidos del secretoma del A96 fueron consistentes con trabajos reportados previamente, las diferencias observadas sugieren la variabilidad genética entre diferentes cepas de *M. tuberculosis*. El análisis de este proteoma es una herramienta de comparación que posteriormente permitirá la identificación de factores de virulencia y proteínas involucradas en la sobrevivencia y patogenicidad de la micobacteria.

Durante el análisis en los títulos de IgG1 en cada una de las fracciones proteicas se pudieron observar dos grupos que se caracterizaron por tener un título alto y otro bajo de IgG1 (Fig. 13). El primer grupo estuvo conformado por las primeras diez fracciones, excepto la 7, en las cuales los títulos fueron característicos de la respuesta humoral, lo que sugiere que dentro de ese rango de peso molecular podemos encontrar una gran cantidad de antígenos que induzcan la respuesta Th2, además de que dentro de este rango de PM encontramos grupos de gran abundancia de puntos en los análisis 2D. También, en el rango de estas fracciones encontramos proteínas muy abundantes y que son reconocidas por IgG1 como Hsp70, dihidrolipoamida deshidrogenasa, transaldolasas, PstS1, antígeno-84, que fueron identificadas por western blot 2D (tabla 3). El segundo grupo presentó los títulos más bajos de IgG1, lo cual indica que dentro de estas fracciones hay escasos antígenos reconocidos por dicha Ig, lo que sugiere la presencia de pocos antígenos inductores de la respuesta humoral, además de que son poco abundantes. Dentro de este último grupo (7, 11, 12, 13 y 14) las fracciones contienen proteínas que predominantemente inducen respuestas de tipo Th1, como las que secuenciamos: la chaperona CFP-10 y la proteína de membrana de 19-kDa, MMP19.

Para detectar las proteínas que inducen la respuesta Th2 durante la infección con el aislado 96, se realizaron inmunodetecciones utilizando sueros de ratones infectados con H37Rv y con A96. En el primer grupo se observó el reconocimiento de pocos antígenos en los primeros días de infección y el número se incrementó conforme progresaba la infección (Fig. 15); lo cual correlaciona con lo observado en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, en el cual, durante la fase temprana predomina la respuesta Th1 y la producción de anticuerpos de tipo IgG2a (del día 1 al 21), pero conforme se desarrolla la fase progresiva (a partir del día 28) y se hace evidente la presencia de citocinas Th2, particularmente la IL-4, que promueve el cambio en la producción de anticuerpos IgG2a hacia IgG1 (Hernandez-Pando, Orozco et al. 1996). De forma contraria, durante la infección con el aislado 96 se desarrolla una respuesta humoral desde los primeros días de infección, pudiéndose detectar algunos antígenos desde el día 14 y un número mayor conforme los días transcurrieron (Fig. 14), siendo evidente la respuesta humoral entre los días 21 y 28. Cuando se compara la cinética de detección de antígenos durante la infección con el A96 y la cepa tipo H37Rv, se pudo observar que el patrón detectado durante los días 21 y 28 en los animales infectados el A96 es similar al encontrado en los días 28, 60 y 120 cuando los animales son

infectados con la cepa tipo H37Rv (**ver anexo 2**).

La presencia de anticuerpos IgG1 desde los primeros días de infección con el A96 sugiere que esta cepa induce rápidamente la fase progresiva de la enfermedad, evento que puede deberse a la alta producción de IL-4 que se induce en el huesped, lo que ocasiona que haya un balance Th1/Th2 desde el primer día de infección, que favorece la polarización de la respuesta inmune y el desarrollo de una respuesta humoral casi predominante que antagoniza la respuesta celular que se comienza a generar para controlar a la micobacteria. La polarización de la respuesta favorece el daño tisular en el pulmón, evento que se comienza a hacer visible desde el día 14 en ratones infectados con A96, mientras que en ratones infectados con H37Rv el mismo daño es visible hasta el día 21 (Hernández-Pando, datos sin publicar). Durante la infección con A96 se observa que la concentración de IFN- γ es extremadamente baja y aumenta a partir del día 14, evento que es totalmente contrario al aumento de la concentración de IL-4, la extensa neumonía en el pulmón desde las primeras semanas de infección.

En ambas cinéticas se observaron un par de bandas de entre 37 y 50 kDa y una de 14 kDa que se detectaron desde el día 1 y su señal se intensificó al pasar los días, lo cual nos hace pensar en la exposición a antígenos de micobacterias ambientales. Para comprobar esto se incluyeron sueros de ratones de 8 semanas de edad que nunca salieron del aislador del bioterio e interesantemente también fueron detectadas (carril 1 de Fig. 14 y 15), dicho, confirmándose la sensibilización previa de los animales.

En ratones libres de patógenos que no están expuestos a micobacterias ambientales, la TB progresiva puede ser causada con 10 a 200 bacilos, y la producción de IL-4 no es factor que incremente la susceptibilidad de los animales (Jung, LaCourse et al. 2002). Sin embargo, en regiones como México y Brasil, donde se ha visto que la exposición a micobacterias ambientales ocurre en los cuartos de reproducción, hay una sensibilización previa que hace que la enfermedad progresiva solo se presente cuando se utilizan retos con 10^5 a 10^6 bacilos (Arriaga, Orozco et al. 2002; Silva, Bonato et al. 2005), y la progresión de la enfermedad es precedida por la producción de IL-4.

En la inmunodetección de antígenos en plantillas de PFC en 2D, se visualizaron 4 puntos cuando se utilizaron sueros correspondientes al día 14 de infección con A96 y 12 cuando se utilizaron sueros

del día 28 de infección (Fig. 17). Al utilizar sueros del día 28 de infección con Mtb H37Rv, se detectaron 8 puntos, de los cuales 2 son comunes para ambos grupos. Estos datos nos indican que el aislamiento 96 induce la polarización de la respuesta mediante la expresión diferencial de otros antígenos, por lo que decidí identificar 9 puntos inmunodetectados por IgG1 en A96 y y que no estuvieran presentes en H37Rv. Las proteínas identificadas fueron la chaperona CFP10, MMP-19kDa, antígeno-84, un transportador de fosfato del sistema ABC (PstS1), una transaldolasa, la dihidrolipoamida deshidrogenasa y la chaparona Hsp70 o DnaK (ver tabla 3).

La proteína filtrada de cultivo de 10-kDa (CFP-10), se clasifica dentro de las proteínas de secreción (Cole, Brosch et al. 1998), es miembro de la familia de pequeñas proteínas de secreción encontradas en los SN de cultivos de Mtb, en la que también se encuentra a ESAT-6. CFP-10 es un antígeno muy inmunogénico reconocido en el suero de pacientes con TB (Skjot, Oettinger et al. 2000), además induce la producción de IFN- γ (Fathy, Asaad et al. 2007). Ambas proteínas se encuentran codificadas en el cluster de genes estructurales RD1, que es esencial para la virulencia de todas las cepas esenciales de Mtb.

La proteína principal de membrana de 19-kDa (MMP19), es un antígeno inmunodominante que es reconocido por células T y en suero de paciente con TB; la ausencia de esta proteína en algunas cepas de Mtb reduce la virulencia de las cepas e incrementa la probabilidad de que sea eliminada eficientemente por el sistema inmune, lo que sugiere que la proteína de 19-kDa es esencial en la virulencia de Mtb. La MMP19 se encuentra asociada a la pared celular del bacilo antes de infectar al huesped, después de la infección del huesped, la lipoproteína es liberada dentro del macrófago. En modelos murinos se ha reportado que la ausencia de neutrófilos en ratones infectados resulta en el aumento del crecimiento de la micobacteria, lo cual sugiere que los neutrófilos son capaces de inhibir el crecimiento bacilar, además, la MMP19 es un potente agente modulador de la activación de neutrófilos; también se ha observado que durante la respuesta contra Mtb, los neutrófilos tienen una función microbicida, además de ser células reguladoras al secretar citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Th1) (Neufert, Pai et al. 2001). Se ha observado que la estimulación de linfocitos humanos con la proteína purificada induce la producción de IL-12 (Brightbill, Libraty et al. 1999), mientras que la estimulación de macrófagos murinos con esta proteína causa la inhibición de la expresión de MHC-II y el procesamiento de antígenos (Neufert, Pai et al. 2001).

Otra proteína identificada fue la proteína hipotética Rv2145c de 28260 Da (tabla 3), también conocida como antígeno-84 (Ag84). Pertenece al grupo de moléculas de metabolismo de polisacáridos de superficie, LPSs, proteínas y antígenos (Cole, Brosch et al. 1998). Se ha detectado en suero de pacientes de lepra y TB, además de ser reportada como una proteína altamente inmunogénica (Hermans, Abebe et al. 1995) y de función no esta totalmente caracterizada.

También se obtuvo la secuencia de PstS1 que es un componente de receptor de unión a fosfato del tipo de transportadores ABC (Cole, Brosch et al. 1998; Tanghe, Lefevre et al. 1999). Durante la infección con *M. tuberculosis* promueve significantes niveles de anticuerpos específicos, además de inducir la producción de citocinas Th1 como IL-2 e IFN- γ en ratones (Tanghe, Lefevre et al. 1999). También fueron identificadas un par de proteínas perteneciente al grupo de pequeñas moléculas metabólicas, una con actividad de transaldolasa (Cole, Brosch et al. 1998); esta enzima participa en la vía de pentosas y esta involucrada en la biosíntesis de D-arabinosa que es el principal azúcar del polisacárido en la pared celular de Mtb, además de ser parte fundamental en la síntesis de lipoarabinomanana (LAM), uno de los factores de virulencia de mayor importancia por su papel inmunomodulador (Wolucka 2008). Se ha reportado que la estimulación de macrófagos con LAM inhibe la producción de IFN- γ (Chan, Fan et al. 1991), degrada radicales de oxígeno e inhibe la proteína cinasa C del huésped.

Otra proteína encontrada fue la enzima dihidrolipoamida deshidrogenasa que se ha reportado participa en la retención de coronina-1 en las vacuolas, la retención de la coronina-1 que es regulada por la enzima produce el arresto en la maduración del fagosoma, evento que esencial como mecanismo de persistencia de la micobacteria para sobrevivir dentro del macrófago (Deghmane, Soualhine et al. 2007).

Finalmente identificamos a DnaK (Hsp70), una proteína chaperona que se ha reportado participa en la respuesta al choque térmico leve y en respuesta a la alta temperatura. Algunos estudios han demostrado que las Hsps bacterianas pueden inducir células T específicas con fenotipos reguladores, y mientras que el LPS inhibe la maduración de DCs murinas *in vitro*, la mezcla LPS-Hsp70 induce la maduración de las DCs. En contraste la estimulación con Hsp70 purificada no induce la producción de TNF- α en DCs, pero si de IL-10 (citocina Th2), además de que inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por fitohemaglutinina, por lo que se piensa que Hsp70 tiene

algunas propiedades inmunosupresoras (Motta, Schmitz et al. 2007).

Durante la identificación de antígenos pudimos observar que proteínas como CPF-10, MMP19, PstS1 y la transaldolasa se encuentran involucradas en eventos que inducen la respuesta celular (Th1) mediante mecanismos regulados por citocinas o activando rutas de biosíntesis de componentes de la pared celular que son inmunogénicos.

Entre las proteínas que se han reportado como inmunogénicas y que inducen una fuerte respuesta humoral (Th2) (Laal, Samanich et al. 1997) esta MPT32 de 45-kDa que es secretada al medio por Mtb durante su crecimiento, esta proteína es un factor de virulencia involucrado en la invasión de células epiteliales con un papel fundamental en la fagocitosis de Mtb (Espitia, Espinosa et al. 1995). Un homólogo de PstS de 38-kDa (llamado PstS1) el cual se asocia a etapas avanzadas de TB en pacientes lo cual incrementa la mortalidad. También el complejo proteico de 88-kDa que promueve una alta producción de anticuerpos en pacientes de TBp (Sonnenberg and Belisle 1997). Aunque estos antígenos ya se habían descrito, aún no están completamente caracterizados

Seis de las proteínas encontradas participan en procesos durante la respuesta Th1 y fueron detectadas por IgG1 durante los días en que la respuesta humoral (Th2) se encuentra al máximo, estos eventos pudieran ser un mecanismo exclusivo del A96. Esto pudiera deberse a que la exposición a Mtb en dosis bajas puede generar protección a los animales o personas expuestas lo cual favorece la respuesta protectora contra el bacilo, pero la exposición a dosis altas de Mtb A96 promueve el aumento de citocinas de tipo Th2 evento que favorece el avance de la enfermedad debido a la proliferación de la micobacteria (Rook, G., Hernandez-Pando, R. et al. 2009 no publicado). En contraste, solo obtuvimos una proteína reportada como promotora de la respuesta Th2, Hsp70, que por su función inmunosupresora probablemente pudiera estar promoviendo generación de linfocitos T reguladores que secretan IL-10 y TGF- β , evento que favorecería la disminución de la respuesta celular; por otra parte, el incremento en la concentración de IL-4 promoviendo la respuesta Th2 ayudaría a inhibir la respuesta Th1 durante los primeros días de la infección, ambos eventos permitirían la multiplicación del bacilo y la progresión de la infección con A96. La alta carga de bacilar desde el día 1 de infección con A96 puede ser un evento que favorezca la detección de antígenos característicos de la fase temprana con anticuerpos de la fase progresiva.

CONCLUSION

-  De las PFC del A96 se logró definir un patrón de 204 puntos, predominantemente compuesto por proteínas de bajo peso molecular y de punto isoelectrico menor a 5.5.
-  La exposición a micobacterias ambientales produce una sensibilización que favorece el reconocimiento de dos proteínas, sin embargo, esta sensibilización no es responsable de la polarización de la respuesta inmune observada durante la infección con el aislado 96.
-  La secreción de IL-4 desde los primeros días de infección con el aislado 96 inducen el desarrollo de una respuesta humoral predominante que favorece la progresión de la infección de forma prematura.
-  Se lograron identificar proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, que están involucradas en la polarización de la respuesta inmune hacia Th2, proteínas de membrana y de secreción, cuya expresión podría favorecer la supervivencia de la micobacteria, su diseminación y la polarización de la respuesta inmune.
-  La identificación de proteínas de metabolismo inductoras de respuesta Th1 por IgG1 sugiere que la alta exposición a antígenos micobacterianos esta provocando la polarización de la respuesta inmune hacia Th2.

PERSPECTIVAS

-  Caracterizar *in vitro* el papel de las proteínas identificadas en la maduración de células dendríticas y la inducción de la respuesta Th2.
-  Evaluar la respuesta que inducen las proteínas identificadas en ensayos de proliferación de linfocitos.
-  Determinar el patrón de expresión de las proteínas identificadas durante la infección y progresión de la enfermedad.

REFERENCIAS

- Andersen, P., D. Askgaard, et al. (1991). "Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth." *Infect Immun* **59**(6): 1905-10.
- Arriaga, A. K., E. H. Orozco, et al. (2002). "Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis." *Clin Exp Immunol* **128**(2): 229-37.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* **15**: 675-705.
- Bhatt, K., S. P. Hickman, et al. (2004). "Cutting edge: a new approach to modeling early lung immunity in murine tuberculosis." *J Immunol* **172**(5): 2748-51.
- Blackwell, J. M. (1996). "Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility." *Mol Med Today* **2**(5): 205-11.
- Boesen, H., B. N. Jensen, et al. (1995). "Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **63**(4): 1491-7.
- Boom, W. H. (1999). "Gammadelta T cells and *Mycobacterium tuberculosis*." *Microbes Infect* **1**(3): 187-95.
- Brennan, P. J. and H. Nikaido (1995). "The envelope of mycobacteria." *Annu Rev Biochem* **64**: 29-63.
- Brightbill, H. D., D. H. Libraty, et al. (1999). "Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors." *Science* **285**(5428): 732-6.
- Canaday, D. H., C. Ziebold, et al. (1999). "Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway." *J Immunol* **162**(1): 372-9.
- Chan, J., X. D. Fan, et al. (1991). "Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages." *Infect Immun* **59**(5): 1755-61.
- Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* **393**(6685): 537-44.
- Dannenberg, A. M., Jr. (1989). "Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis." *Rev Infect Dis* **11 Suppl 2**: S369-78.
- Deghmane, A. E., H. Soualhine, et al. (2007). "Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation." *J Cell Sci* **120**(Pt 16): 2796-806.
- DGE (2007). Vigilancia Epidemiológica Semana 52, Direccion General de Epidemiología.
- Eigler, A., B. Sinha, et al. (1997). "Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine." *Immunol Today* **18**(10): 487-92.
- Espitia, C., R. Espinosa, et al. (1995). "Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens." *Infect Immun* **63**(2): 580-4.
- Fathy, M. M., A. Asaad, et al. (2007). "Cellular interferon-gamma based assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis." *Egypt J Immunol* **14**(1): 33-41.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129.
- Flynn, J. L. and J. Chan (2005). "What's good for the host is good for the bug." *Trends Microbiol* **13**(3): 98-102.
- Goren, M. B., O. Brokl, et al. (1976). "Sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*: the structure of

- the principal sulfatide (SL-I)." *Biochemistry* **15**(13): 2728-35.
- Harth, G., B. Y. Lee, et al. (1996). "Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **64**(8): 3038-47.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, et al. (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." *J Exp Med* **169**(1): 59-72.
- Hermans, P. W., F. Abebe, et al. (1995). "Molecular and immunological characterization of the highly conserved antigen 84 from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*." *Infect Immun* **63**(3): 954-60.
- Hernandez-Pando, R., D. Aguilar, et al. (2004). "Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis." *Eur J Immunol* **34**(1): 174-83.
- Hernandez-Pando, R., H. Orozco, et al. (1996). "Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis." *Immunology* **89**(1): 26-33.
- Hernandez-Pando, R., L. Pavon, et al. (1997). "Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection." *Infect Immun* **65**(8): 3317-27.
- Jung, S. and D. R. Littman (1999). "Chemokine receptors in lymphoid organ homeostasis." *Curr Opin Immunol* **11**(3): 319-25.
- Jung, Y. J., R. LaCourse, et al. (2002). "Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice." *Infect Immun* **70**(11): 6436-43.
- Krensky, A. M. (2000). "Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells." *Biochem Pharmacol* **59**(4): 317-20.
- Laal, S., K. M. Samanich, et al. (1997). "Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens." *Clin Diagn Lab Immunol* **4**(1): 49-56.
- Lazarevic, V., A. J. Myers, et al. (2003). "CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol *M. tuberculosis* infection." *Immunity* **19**(6): 823-35.
- Lin, Y., M. Zhang, et al. (1998). "Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **66**(3): 1121-6.
- Moody, D. B., B. B. Reinhold, et al. (1997). "Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells." *Science* **278**(5336): 283-6.
- Moody, D. B., T. Ulrichs, et al. (2000). "CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection." *Nature* **404**(6780): 884-8.
- Moreira, A. L., J. Wang, et al. (1997). "Sequestration of *Mycobacterium tuberculosis* in tight vacuoles in vivo in lung macrophages of mice infected by the respiratory route." *Infect Immun* **65**(1): 305-8.
- Motta, A., C. Schmitz, et al. (2007). "Mycobacterium tuberculosis heat-shock protein 70 impairs maturation of dendritic cells from bone marrow precursors, induces interleukin-10 production and inhibits T-cell proliferation in vitro." *Immunology* **121**(4): 462-72.
- Nathan, C. F., H. W. Murray, et al. (1983). "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." *J Exp Med* **158**(3): 670-89.
- Neufert, C., R. K. Pai, et al. (2001). "Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation." *J Immunol* **167**(3): 1542-9.

- North, R. J. and Y. J. Jung (2004). "Immunity to tuberculosis." Annu Rev Immunol **22**: 599-623.
- Oddo, M., T. Renno, et al. (1998). "Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*." J Immunol **160**(11): 5448-54.
- Piela-Smith, T. H., G. Broketa, et al. (1992). "Regulation of ICAM-1 expression and function in human dermal fibroblasts by IL-4." J Immunol **148**(5): 1375-81.
- Pollock, J. M. and P. Andersen (1997). "Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle." Infect Immun **65**(7): 2587-92.
- Romain, F., J. Augier, et al. (1993). "Isolation of a proline-rich mycobacterial protein eliciting delayed-type hypersensitivity reactions only in guinea pigs immunized with living mycobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5322-6.
- Roman, J., Y. J. Jeon, et al. (1995). "Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-beta 1 in human and experimental lung granulomatous inflammation." Am J Med Sci **309**(3): 124-33.
- Rosenkrands, I., A. King, et al. (2000). "Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*." Electrophoresis **21**(17): 3740-56.
- Sadek, M. I., E. Sada, et al. (1998). "Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(3): 513-21.
- Schluger, N. W. and W. N. Rom (1998). "The host immune response to tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **157**(3 Pt 1): 679-91.
- Serbina, N. V. and J. L. Flynn (1999). "Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice." Infect Immun **67**(8): 3980-8.
- Siebert, F. B. and B. Munday (1932). "The chemical composition of the active principle of tuberculin. XV. A precipitated purified protein suitable for the preparation of a standar tuberculin." Am. Rev. Tuberc. **25**: 724.
- Silva, C. L., V. L. Bonato, et al. (2005). "Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice." Gene Ther **12**(3): 281-7.
- Skjot, R. L., T. Oettinger, et al. (2000). "Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens." Infect Immun **68**(1): 214-20.
- Smith, S. M., M. R. Klein, et al. (2002). "Decreased IFN- gamma and increased IL-4 production by human CD8(+) T cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients." Tuberculosis (Edinb) **82**(1): 7-13.
- Sonnenberg, M. G. and J. T. Belisle (1997). "Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry." Infect Immun **65**(11): 4515-24.
- Sorensen, A. L., S. Nagai, et al. (1995). "Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **63**(5): 1710-7.
- Stenger, S., D. A. Hanson, et al. (1998). "An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin." Science **282**(5386): 121-5.
- Surcel, H. M., M. Troye-Blomberg, et al. (1994). "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens." Immunology **81**(2): 171-6.
- Tanghe, A., P. Lefevre, et al. (1999). "Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors." J Immunol **162**(2): 1113-9.

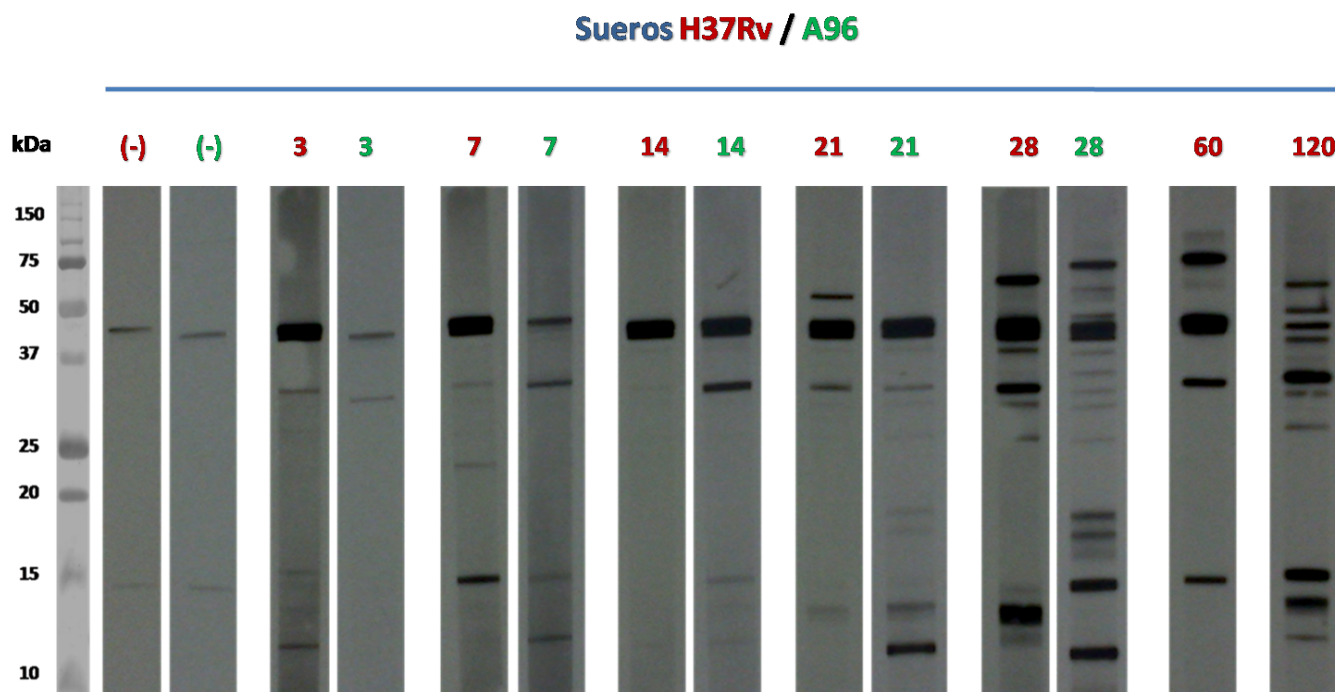
- Tsao, T. C., J. Hong, et al. (1999). "Increased TNF-alpha, IL-1 beta and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis." Tuber Lung Dis **79**(5): 279-85.
- Ueta, C., I. Tsuyuguchi, et al. (1994). "Increase of gamma/delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients." Infect Immun **62**(12): 5434-41.
- WHO (2008). Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing. World Health Organization. Geneva.
- Wolucka, B. A. (2008). "Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria - a novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy." FEBS J **275**(11): 2691-711.
- Yamamura, M., K. Uyemura, et al. (1991). "Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions." Science **254**(5029): 277-9.
- Zahrt, T. C. (2003). "Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection." Microbes Infect **5**(2): 159-67.

Anexo 1 – Medios de cultivo y soluciones

Middlebrook 7H10+OADC (Difco, Detroit, Mich.): 900 ml contienen 0.5 g de sulfato de amonio, 1.5 g de fosfato de monopotasio, 1.5 g de fosfato disódico, 0.4 g de citrato de sodio, 25 mg de sulfato de magnesio, 0.5 mg de cloruro de calcio, 1 mg de sulfato de zinc, 1 mg de sulfato de cobre, 0.5 g de ácido L-glutámico (sal de sodio), 0.04 g de citrato férrico de amonio, 1mg de hidrocloreuro de piridoxina, 0.5 mg de biotina, 250 µg de verde de malaquita, 15 g de agar. Se enriquecio con 7.65 g de cloruro de sodio, 18 g de dextrosa, 45 g de albúmina bovina (fracción V), 0.027 g de catalasa, 0.054 mL de ácido oléico.

Medio Sauton. Cada 1000 ml contienen 0.5 g de fosfato de potasio, 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 2 g de ácido cítrico, 0.05 g de citrato de amonio férrico, 60 mL de glicerol, 4 g de asparagina, además se ajustó el pH a 7.2.

Anexo 2 – Comparación de bandas detectadas entre A96 y H37Rv



La comparación entre cada uno de los días de infección con ambas cepas demostró la detección de bandas similares entre ambas. A partir de los días 21 del A96 y 28 de H37Rv se observa un patrón de detección característico de la etapa progresiva de TB. Cada uno de los días esta formado por 6 sueros de ratones infectados con cada cepa, por lo tanto la presencia y ausencia de bandas de un día para otro con la misma cepa puede variar.

Anexo 3. Secuencias de las proteínas identificadas

Spot No.	Nombre de la proteína	NCBI No.	Secuencia de la proteína	% cobertura
1	10-kDa Culture Filtrate Antigen EsxB (CFP10)	gi 15611010	01 MAEMK TDAAT LAQEAGNFER ISGDLKTQID QVESTAGSLQ GQWR GAAGTA 51 AQA AVVR FQ EE AANKQKQELD EISTNIRQAG VOYSR ADEEQ QOALSSOMGF 101	43
3	19-kDa Major Membrane Protein (MMP19)	gi 248681	01 ATTLPVQRHP RSLFPEFSEL FAFPSFAGL RPTFDTRLMR LEDEMKEGRY 51 EVR AELPGVD PDKDVDIMVR DGQLTIAER TEQKDFDGRS EFAYGSFVRT 101 VSLPVGADED DIKATYDKGI LTVSVAVSEG KPTEKHIQIR STN	21
4	Rv2145c ó Antigen-84	gi 15609282	1 MPLTPADVHN VAFSKPPIGK RGYNEDEVDA FLDLVENELT RLIEENSDLR 51 QRINELDQEL AAGGGAGVTP QATQAI PAYE PEPGKPAPAA VSAGMNEEQA 101 LKAAR VL SLA QDTADRLTNT AKAESDKMLA DARAN AEQIL GEARHTADAT 151 VAEARQRADA MLADAQSRSE AOLRQAQEK DALQADAERK HSEIMGTINQ 201 QRAVLEGRLE QLRTFEREYR TRLKTYLESQ LEELGQ RGSA APVDSNADAG 251 GFDQFNRGKN	25
6	Phosphate ABC transporter (PstS1)	gi 15840357	1 MKIRLHTLLA VLTAAPLLLA AAGCGSKPPS GSPETGAGAG TVATTPASSP 51 VTLAETGSTL LYPLFNLWGP AFHERYPNVT ITAQGTGSGA GIAQAAAGTV 101 NIGASDAYLS EGDMAAHK GL MNIALAISAQ QVNYNLP GV S EHLKLNGKVL 151 AA MY QGTIKT WDDPQIAALN PGVNLPGTAV VPLHR SDGSG DTFLFTQYLS 201 KQD PEGWGKS PGFGTTVDFP AVPGALGENG NGGMVTGCAE TPGCVAY IGI 251 SFLDQASQ RG LGEAQLGNSS GNFLLPDAQS IQAAAAGFAS KTPANQAISM 301 IDGPAPDGYP IINYEYAIVN NRQKDAATAQ TLQAF LHWAI TDGNKASFLD 351 QVHFQPLPPA VVKLS DALIA TISS	36
7	Transaldolasa	gi 15840907	1 MTAQNPNLAA LSAAGVSVWL DDLSRDLRS GNQLQELIDTK SVVGVTTNPS 51 IFQK ALSEGH TYDAQIAELA ARGADVDA TI RTVTDDVRS ACDVLVPQWE 101 DSDGVDGRVS IEVDPRLAHE TEKTIQQAIE LWKIVDRPNL FIKIPATKAG 151 LPAISAVLAE GISVNVTLIF SVQRYREVMD AYLTMGEKAR QAGHSLSKIH 201 SVASFFVSRV DTEIDKRLDR IGSRQALELR GQAGVANARL AYAAYREVF E 251 DSDRYRSLKV DGARVQRPLW ASTGVKNPDY SDTLYVTELV APHTVNTMPE 301 KTIDAVADHG VIQDGTVTGT ASDAQAVFDQ LGAIGIDLTD VFAVLEEEGV 351 RKFEASWNE LQETRAHLDT AAQ	5
8	Dihidrolipoamide dehidrogenase	gi 15607603	1 MTHYDVVVLG AGPGGYVAI RAAQLGLSTA IVEPKYWGGV CLNVGCIPSK 51 ALLRNAELVH IFTKDAKAFG ISGEVTFDYG IAYDRSRKVA EGR VAGVHFL 101 MKKNKITEIH GYGTFADANT LLVDLNDGGT ESVTFDNAII ATGSSTRLV 151 GTSLSANVVT YEEQILSREL PKSIIIAGAG AIGMEFGYVL KNYGVDVTIV 201 EFLPRALPNE DADVSKEIEK QFKK LGV TIL TATK VESIAD GGSQVTVTVT	17

			251 KDGVAQELKA EKVLOAIGFA PNVEGYGLDK AGVALTDRKA IGVDDYMRTN 301 VGHYAIGDV NGLLQLAHVA EAQGVVAAET IAGAETLTG DHRMLPRATF 351 CQPNVASFGL TEQQAR NEGY DVVVAKFPFT ANAKAHGVGD PSGFVKLVAD 401 AKHGELLGGH LVGHDVAELL PELTLAQRWD LTASELARNV HTHPTMSEAL 451 QECFHGLVGH MINF	
9	DnaK (Hsp70)	gi 15607491	1 MARAVGIDLG TTNSVSVLE GGDPVVVANS EGSRT TPSIV AFARNGEVLV 51 GQPAKNQAVT NVDRTVRSVK RHMGSDWSIE IDGKK YTAPE ISARILMKLK 101 RDAEAYLGED ITDAVITTPA YFNDAQR QAT KDAGQIAGLN VLRIVNEPTA 151 AALAYGLDKG EKEQRILVFD LGGGTFDVSL LEIGEGVVEV RATSGDNHLG 201 GDDWDQR VVD WLVDKFKGTS GIDLTKDKMA MQRLEAAEK AKIELSSSQS 251 TSINLPY ITV DADKNPLFLD EQLTRAEFQR ITQDLLDRTR KPFQSVIADT 301 GISVSEIDHV VLVGGSTR MP AVTDLVKELT GGKEPNKGVN PDEVVAVGAA	42

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 19 de Febrero del 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Biologo Experimental Roberto Espinosa Neira.

Dr. Mauricio Castañón Arreola

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
