

03062 5  
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“ Purificación y caracterización de la glicoproteína de 50-55 kD de  
*Mycobacterium tuberculosis* ”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA  
EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA  
PRESENTA:  
Q.B.P. DELIA DEL ROSARIO LEYVA MEZA

México 1977



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres, por el apoyo y el amor que me han dado.**

**A mis hermanos, por su confianza.**

**A mis amigos y compañeros de laboratorio: Germán, Judith, Ismael, Gustavo,  
José Luis, Erika, Octavio, por los ratos compartidos.**

**Al Dr. Raúl Mancilla, por su orientación y apoyo.**

**Al Dr. Rafael Saavedra, por su paciencia y dedicación.**

**A la Dr. Luz María López, por su disposición para la revisión y  
sugerencias a este trabajo.**

**A los Drs.: Enrique Ortega Soto.  
Edmundo Lamoyi Velázquez  
Leopoldo Santos Argumedo  
Abraham Landa Piedra  
Mario Calcagno Montáns  
Raúl Mancilla Jiménez**

**Miembros del Jurado, por su disposición para la revisión y  
sugerencias a este trabajo.**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. RAÚL MANCILLA JIMENEZ Y EL ASESORAMIENTO TÉCNICO DEL DR. RAFAEL SAAVEDRA DURÁN.**

# ÍNDICE

	Página
<b>I. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. Historia de la Tuberculosis	3
2. Epidemiología	5
3. Patógenesis de la tuberculosis	8
4. Respuesta Inmune Humoral	8
5. Respuesta Inmune Celular	10
6. Antígenos Micobacterianos	14
6.1 Antígenos Secretados y de Pared	16
6.2 Glicoproteínas de <i>M. tuberculosis</i>	17
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
1. Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> y Medidas de Seguridad	20
2. Obtención de proteínas del medio de cultivo	21
3. Análisis de proteínas	21
3.1 Electroforesis (SDS-PAGE)	21
3.2 Electroforesis en Geles de Acrilamida no Desnaturalizante	22
3.3 Inmunotransferencia	22
4. Purificación de proteínas	23
4.1 Fraccionamiento del Extracto Proteico por el método de Seibert.	23
4.2 Obtención de Gp 38 y de Gp 50-55 de Geles preparativos	23
4.3 Obtención de una Fracción Enriquecida en Glicoproteínas por una Columna de Con A	24

<b>5. Purificación de Gp 50-55 por Cromatografía de Afinidad con un</b>	
<b>Anticuerpo Monoclonal</b>	<b>26</b>
5.1 Obtención del Anticuerpo Monoclonal en contra de Gp 50-55	26
5.2 Obtención del Líquido de Ascitis	26
5.3 Precipitación de Inmunoglobulinas del Líquido de Ascitis	26
5.4 Purificación del AcMn 6A3 por Cromatografía de	
Intercambio Iónico	27
5.5 Acoplamiento del AcMn 6A3 al soporte de Affi-gel 10	27
5.6 Purificación de Gp 50-55	28
<b>6. Método de Dubois para la determinación de Carbohidratos</b>	<b>28</b>
<b>7. Respuesta Inmune Humoral Anti-Gp 50-55 en Pacientes con</b>	
<b>Tuberculosis Pulmonar por ELISA</b>	<b>29</b>
<b>8. Análisis de la Respuesta Inmune Celular <i>in vitro</i> a las</b>	
<b>Glicoproteínas</b>	<b>29</b>
8.2 Ensayo de Proliferación	30
8.3 Obtención de una línea T en contra de F <sub>4</sub>	30
8.4 Clonación de la Línea T Anti-F <sub>4</sub> por Dilución	
Limitante	31
8.5 Ensayos de Proliferación de las Clonas a Gp 38 y	
a Gp 50-55	31
8.6 Caracterización de la línea Anti-F <sub>4</sub> por Citometría	
de flujo	32
 <b>V. RESULTADOS</b>	 <b>34</b>
1. Obtención de Fracciones Enriquecidas en Gp 38 y Gp 50-55	34
2. Obtención de las Gps 38 y 50-55	35
3. Ensayos de Proliferación con la F <sub>4</sub>	35
4. Establecimiento de una Línea Celular Anti-F <sub>4</sub>	36
5. Establecimiento de Clonas	36
6. Obtención de otras Líneas T	37

<b>7. Purificación de Gp 50-55 por Cromatografía de Afinidad con un AcMn</b>	<b>38</b>
<b>7.1 Purificación del AcMn</b>	<b>38</b>
<b>7.2 Cromatografía de Afinidad con el AcMn 6A3</b>	<b>38</b>
<b>8. Determinación de Carbohidratos</b>	<b>40</b>
<b>9. Respuesta Humoral a Gp 50-55</b>	<b>40</b>
<b>10. Respuesta Inmune Celular a Gp 50-55</b>	<b>41</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>49</b>
<b>IX. APÉNDICE</b>	<b>60</b>

## I. RESUMEN

En nuestro laboratorio y más recientemente en otros, se han venido caracterizando antígenos de *M. tuberculosis* que poseen carbohidratos. Estos antígenos son de mucho interés pues es bien sabido que las glicoproteínas son moléculas biológicamente muy activas.

Por lo anterior en esta tesis nos propusimos caracterizar la respuesta inmune celular a los antígenos glicoproteicos de *M. tuberculosis*. En un primer esfuerzo se obtuvo una fracción enriquecida en glicoproteínas usando el fraccionamiento de Seibert. Primero se obtuvo una línea celular en contra de dicha fracción derivada de células de sangre periférica de un donador sano vacunado con BCG. De la línea, se obtuvieron clonas por dilución limitante estimulando con el mitógeno fitohemaglutinina; posteriormente se analizó la especificidad de las clonas contra la Gp 38 y la Gp 50-55 purificadas por elución con urea 6 M, no observándose proliferación en contra de ellas o de la fracción enriquecida, lo que podría atribuirse a inestabilidad de las células por tiempo prolongado de cultivo.

Ante estas dificultades se optó por trabajar únicamente con Gp 50-55, aprovechando la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal obtenido en el laboratorio. Con este anticuerpo se purificó la Gp 50-55 por cromatografía de afinidad, obteniéndola con un alto grado de pureza. La glicoproteína purificada se determinó que posea un 9.2% de carbohidratos, y se demostró retenía su reactividad con Con A.

Para caracterizar inmunológicamente a la Gp 50-55 se investigó su capacidad para inducir la síntesis de anticuerpos y la activación de linfocitos T. En primer lugar, se realizó un ensayo de ELISA con 79 sueros de pacientes enfermos con tuberculosis pulmonar y 54



sueros de donadores sanos, encontrándose una especificidad del 95% y una sensibilidad del 33%. En seguida se realizaron ensayos de transformación blástica con células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos no vacunados con BCG, donadores sanos vacunados con BCG y de pacientes con tuberculosis pulmonar. Se observó un índice de proliferación positivo en 3/4 pacientes tuberculosos y en 5/8 donadores sanos vacunados, no observándose una respuesta proliferativa en los dos donadores sanos no vacunados. De lo anterior se puede pensar en la Gp 50-55 como un antígeno capaz de inducir una respuesta inmune celular en individuos que por infección o vacunación han sido previamente expuestos al complejo *M. tuberculosis*. Lo anterior más el hecho de que este antígeno es un inductor pobre de respuesta humoral, le sugieren un potencial en el desarrollo de inmunidad protectora y por lo tanto en el diseño de nuevas vacunas.

## II. INTRODUCCION

### 1. HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo aerobio estricto, intracelular facultativo y ácido-alcohol resistente. La expresión clínica de la infección es variada y depende de factores del hospedero como malnutrición, factores genéticos, inmunodeficiencia, vacunación con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG) y de la virulencia del microorganismo. La enfermedad se desarrolla principalmente en pulmón, de donde puede dispersarse al sistema genitourinario, ganglios linfáticos, pleura, peritoneo y meninges (Farer, 1979)

Existen registros que indican que la tuberculosis pulmonar se conoció en Europa antes del cristianismo. Hipócrates describió la enfermedad en la antigua Grecia y hay evidencias arqueológicas de lesiones tuberculosas en momias egipcias (Zimmerman, 1979). Aunque la tuberculosis ya se conocía en Europa desde la edad media, la infección era rara hasta antes de la Revolución Industrial. El explosivo incremento en la incidencia de la tuberculosis durante esta época se debió a la gran urbanización, a la alta densidad de la población, mala nutrición, malas condiciones de trabajo e ignorancia. La enfermedad alcanzó proporciones epidémicas durante los primeros años del siglo XIX, cuando se le llamó "la gran plaga blanca" (Collins, 1984)

Aunque Villemin en 1865 fue el primero en describir las lesiones de la tuberculosis con detalle y demostró el carácter infeccioso de la enfermedad, no fué sino hasta el estudio clásico de Koch (1882) que se aisló el agente causal en un medio de cultivo artificial y se demostró que produce en animales experimentales un tubérculo análogo al observado en la enfermedad humana.

En 1906 Calmette observó que la infección oral de cobayos con una cepa atenuada del bacilo de la tuberculosis confería resistencia a la reinfección por vía intravenosa. Calmette y Guérin, después de 39 pasajes en medio de cultivo, lograron aislar una cepa

atenuada de *Mycobacterium bovis* (BCG) que se ha administrado como vacuna desde 1921 hasta la fecha, con resultados muy variables. Los estudios epidemiológicos realizados en varias regiones del mundo indican que la protección varía de un 0% a 80% para tuberculosis pulmonar (Bloom, 1994); sin embargo, a pesar de la inconsistencia en la protección para tuberculosis pulmonar, la vacunación con el BCG previene otras formas de la enfermedad como son la tuberculosis meníngea y la diseminada (Rodríguez, 1995).

Aún no se ha establecido el porqué de esta variabilidad; se ha propuesto que diferencias en las cepas de el BCG utilizadas para vacunación podrían ser importantes, pero no hay información de peso para considerar este factor como determinante (Weigeshaus, 1989). Otra posibilidad está relacionada con factores genéticos, por diferencias observadas en la susceptibilidad a la tuberculosis entre grupos raciales (Stead, 1990; 1992), lo que hace suponer que puede haber diferencias genéticas en la respuesta a la vacunación con BCG. Se ha observado mejor respuesta en individuos de raza blanca que en individuos de raza negra en Georgia y Alabama, pero no hay bases epidemiológicas suficientes que apoyen a las diferencias genéticas como responsables. La hipótesis más aceptada señala que la infección previa con micobacterias ambientales o atípicas proporciona protección contra la tuberculosis (Bloom, 1994). Por lo anterior es urgente desarrollar nuevas vacunas que permitan controlar y erradicar la infección con *M. tuberculosis*, por lo que es relevante identificar antígenos inmunoprotectores. Se ha sugerido que las proteínas de superficie y las activamente secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* son importantes blancos para el sistema inmune durante la primera fase de la infección (Andersen, 1992; 1993; 1994; Orme, 1988; Pal, 1992). Por lo tanto, tales antígenos son buenos candidatos para ser incluidos en vacunas vivas, por ejemplo el BCG genéticamente modificado.

## **2. EPIDEMIOLOGÍA**

La infección con *M. tuberculosis* es una importante fuente de morbilidad y mortalidad en el mundo, particularmente en los países del trópico y en vías de desarrollo. Casi 2 billones de personas (una tercera parte de la población mundial) están infectadas con el bacilo y aproximadamente 3 millones de personas mueren cada año por esta enfermedad (Shinnick, 1985). En la tabla I se muestran datos promedio de casos de tuberculosis notificados a nivel mundial en el periodo 1974-89.

En 1990, la región con mayor prevalencia es el oeste del Pacífico donde 44% de la población está infectada y la de menor prevalencia es el este del Mediterraneo (19% de la población infectada). La mayoría de los individuos infectados se localizan en el sureste de Asia (25%) y China (22%); en Europa y cinco países industrializados solo se concentra el 22% (Sudre, 1992).

Se estima que la incidencia global de tuberculosis se incrementará de 7.5 millones de nuevos casos en 1990 a 10.2 millones de nuevos casos anuales para el año 2000, es decir un aumento del 36%. El 70% de estos nuevos casos afectarán a personas en edad económicamente productiva entre 15 y 59 años. Para el periodo de 1990-99, se calcula que 88.2 millones de personas desarrollarán la enfermedad, de los cuales 8 millones estarán relacionados con la infección por VIH. Durante el mismo periodo se estima que 30 millones de personas morirán de tuberculosis, 2.9 millones de las cuales estarán coinfectadas con el VIH (Dolin, 1994).

En México, los datos presentados por la Secretaría de Salud (Informe Epid. anual SS, 1993) en el periodo 1985-1993 muestran un patrón ascendente en los índices de morbilidad de la tuberculosis (Fig. 1). La tasa de morbilidad más alta se registró en 1988 (13.83 por 100 000 habitantes) y la más baja en 1987 (8.56 por 100 000 habitantes). Para conocer las tasas de incidencia y mortalidad en los estados de la República Mexicana para 1993, los valores de ambos indicadores epidemiológicos se dividen en tres grupos: baja, media, y alta. La incidencia baja (0 a 1.5 por 100 000 habitantes) se presentó en 17

estados: Sonora, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Colima, Michoacán, Estado de México, Tlaxcala, Distrito Federal, Morelos, Puebla, Yucatán y Quintana Roo.

La incidencia media (4.1 a 8.0 por 100 000 habitantes) se observó en Chihuahua, Coahuila, Sinaloa, Nuevo León, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Campeche. Una incidencia alta (8.1 y más por 100 000 habitantes) se observó en 5 estados: Baja California Norte y Sur, Tamaulipas, Nayarit e Hidalgo. Como se puede observar, más de la mitad de los estados, preferentemente del centro del país, se ubican en la incidencia baja.

La tasa de mortalidad fue baja en Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Tlaxcala, Distrito Federal, Morelos, Campeche y Quintana Roo.

La mortalidad fue media en 15 estados. Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Sinaloa, Durango, Nuevo León, Nayarit, Querétaro, Hidalgo, Colima, Guerrero, Puebla, Tabasco y Yucatán. La mortalidad alta se presentó en Baja California Norte, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Tuberculosis en México 1993. Ciencia Médica, boletín de la división de estudios de posgrado e investigación de la facultad de medicina. UNAM 1995).

A pesar de la importancia que ocupa la tuberculosis dentro de los problemas de salud en el país, la red de laboratorios que practican estudios bacteriológicos no es suficiente para dar cobertura a la necesidades, ya que existen sólo 200 laboratorios que realizan microscopía y 19 que realizan microscopía y cultivo, siendo este último el método más sensible y específico de los que se conocen (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 1992), por lo consiguiente no es raro que las estadísticas de tuberculosis en el país estén subestimadas, ya que en 1994 se registraron 16 353 casos en todas sus formas, con una tasa de 18.1 por cada 100 000 habitantes; sin embargo, algunos autores han llegado a estimar una cifra tres veces mayor (INDRE, 1992).

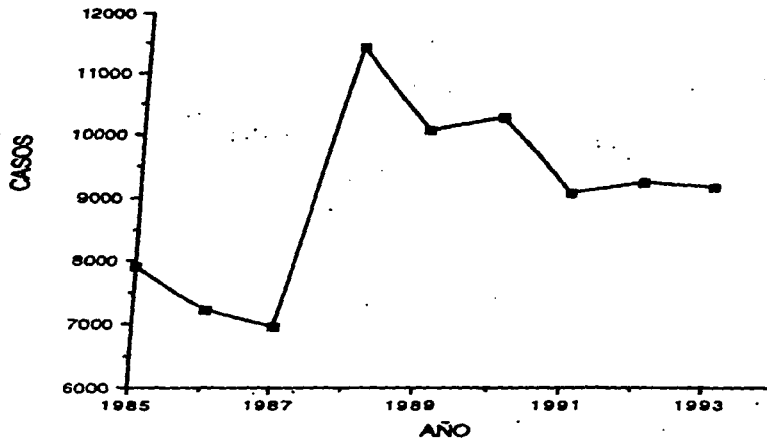
Tabla I. Casos de tuberculosis notificados en el mundo (1974-89)

Región	1974-1979		1980-1984		1985-1989	
	Casos	Tasa <sup>a</sup>	Casos	Tasa <sup>a</sup>	Casos	Tasa <sup>a</sup>
África	187 084	56	230 063	57	210 695	57
América	172 220	52	203 345	54	173 654	42
Mediterráneo (Este)	274 643	108	427 832	143	224 302	67
Sureste de Asia	696 931	73	943 140	87	1 023 850	85
Pacífico (Oeste)	288 885	174	337 907	183	304 238	154
Europa	279 905	54	179 941	34	273 166	33
Otros <sup>b</sup>	132 701	35	96 617	25	82 224	20
<b>Total</b>	<b>2 032 369</b>	<b>63</b>	<b>2 418 845</b>	<b>68</b>	<b>2 239 694</b>	<b>58</b>

<sup>a</sup> Tasa por 100 000 habitantes.

<sup>b</sup> USA, Canada, Japón, Australia y Nueva Zelanda.

**CASOS DE TUBERCULOSIS TODAS FORMAS  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
1985-1993**



Fuente: Registro Nacional de casos de tuberculosis. DGE/SSA

Figura 1.

### **3. PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS**

El desarrollo de la tuberculosis puede dividirse en cuatro etapas. En la primera el bacilo es destruido o inhibido en su crecimiento por los macrófagos alveolares que lo han fagocitado; si el bacilo no es destruido, se multiplica y destruye al macrófago. Durante la segunda etapa, considerada de simbiosis, el bacilo crece logarítmicamente dentro del macrófago inmaduro para formar la primera lesión. Durante la tercera etapa, el número de bacilos viables es estacionario, pues el crecimiento es inhibido por la respuesta inmune celular formándose centros caseosos dentro de los cuales el bacilo no puede multiplicarse; alrededor de este centro, los macrófagos inmaduros permiten la multiplicación intracelular pero los activados la inhiben y destruyen al bacilo. La evolución de la enfermedad en esta etapa depende del tipo de macrófagos que predomine en el centro caseoso. Durante el cuarto estadio, el bacilo evade la respuesta inmune del hospedero y la lisis del centro caseoso es frecuentemente seguida por cavitación. En el centro caseoso destruido, el bacilo se multiplica extracelularmente. Se cree que aun si la inmunidad celular está presente, es inefectiva para controlar la carga bacilar. Los bacilos entran al árbol bronquial, se esparcen a otras partes del pulmón y en esta etapa son eliminados al ambiente. El desarrollo de la enfermedad en esta etapa depende de si el número de bacilos y sus productos antigénicos exceden la capacidad de respuesta del hospedero (Dannenberg, 1991).

### **4. RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

Los individuos tuberculosos desarrollan títulos altos de anticuerpos anti-*M. tuberculosis*, pero hay evidencias de que éstos no confieren protección, pero se ha tratado de utilizar esta herramienta inmunológica para el desarrollo de pruebas de diagnóstico, ya que las más utilizadas en los centros médicos actualmente no son muy prácticas.

El diagnóstico de uso común de la tuberculosis depende de la identificación del bacilo en secreciones o tejidos del paciente; sin embargo, no es fácil aislar al bacilo en



casos de enfermedad pulmonar circunscrita, extrapulmonar o en niños. Además, las micobacterias son organismos de crecimiento lento y el cultivo frecuentemente toma de 2 a 6 semanas. La evidencia obtenida por radiografía de tórax y la tuberculino-reacción son útiles pero no contundentes, por lo que son necesarias otras pruebas de laboratorio capaces de detectar la enfermedad temprana, lo que podría ayudar a iniciar la terapia precozmente. Hay que señalar, sin embargo, que las pruebas serológicas como el ELISA se enfrentan a problemas de sensibilidad y especificidad (Daniel, 1987; Nassua, 1976).

Actualmente se está trabajando con pruebas de serodiagnóstico que involucran la participación de anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de *M. tuberculosis*. Se están aplicando a ensayos de competencia con sueros de tuberculosos identificando antígenos de 16, 19 y 38 kD (Gp 38) (Letter to the editor, 1986; Daniel, 1982; Morten, 1992). Entre los antígenos más importantes para el inmunodiagnóstico está la Gp 38, cuyos epítopos TB71 y TB72 están restringidos al bacilo de la tuberculosis. En una prueba de ELISA utilizando la combinación de estos epítopos se encontró una especificidad del 84%. Se han observado títulos de anticuerpos contra esta proteína solo en personas con baciloscopia positiva (Benjamín, 1982). Otros antígenos que se han ensayado son el de 19 kD que da reactividad cruzada con *M. avium* (Nair, 1992) y el de 16 kD, con el que se detectó un gran número de personas sanas infectadas. Se han encontrado anticuerpos contra la proteína que une fibronectina (30-31 kD) los cuales tienen reacción cruzada con otras especies micobacterianas (Daniel, 1987). Por lo anterior es importante identificar un antígeno específico de especie, útil para el diagnóstico.

En la actualidad se están probando técnicas de biología molecular para el diagnóstico, utilizando MPT40, IS6110 y la subunidad ribosomal 23s de *M. tuberculosis* por PCR con resultados aun no muy claros (Noordhoek, 1996).

## 5. RESPUESTA INMUNE CELULAR

La mayoría de las personas que se infectan con *M. tuberculosis* controlan la infección primaria y desarrollan inmunidad celular manifestada por hipersensibilidad retardada. Aproximadamente del 5 al 10% desarrollarán una infección primaria progresiva en dos años postinfección o la reactivación de la tuberculosis después de un periodo latente (American Thoracic Society, 1990). En base a estudios realizados en animales, se ha demostrado que la respuesta inmune protectora a la tuberculosis implica a células T y fagocitos mononucleares que actúan conjuntamente para el control de la infección (Nathan, 1983; Orme, 1993b). Se cree que las células T CD4<sup>+</sup> son las responsables de regular la respuesta inmune celular en contra de *M. tuberculosis*. Se toma como evidencia de la participación de células T, el hecho de que la respuesta de hipersensibilidad retardada se observa en personas sanas después de que se ha controlado la infección primaria con *M. tuberculosis* y éstas retienen la actividad *in vitro* a antígenos micobacterianos después de varios años. Lo que indica el establecimiento de una inmunidad de memoria, que se cree proporciona protección a reinfecciones exógenas. Existe relación entre la respuesta de células T y la extensión de la enfermedad (Toossi, 1986): se ha observado anergia a la prueba de tuberculina en pacientes con enfermedad diseminada y escasa proliferación de células T CD4<sup>+</sup> *in vitro* a antígenos micobacterianos, en contraste con la respuesta observada en pacientes con enfermedad mínima o controlada, quienes tienen una vigorosa respuesta de hipersensibilidad retardada y cuyas células T responden a antígenos del bacilo *in vitro*. Las proteínas del PPD y del filtrado del medio de cultivo de *M. tuberculosis* estimulan a las células T CD4<sup>+</sup> y se pueden obtener clones T CD4<sup>+</sup> de personas sensibilizadas utilizando estos antígenos. Al estudiar los perfiles de citocinas de las clones T CD4<sup>+</sup> se observó que secretan principalmente IFN- $\gamma$  y que hay una escasa o nula producción de IL-4 o IL-5. El patrón de producción de citocinas de éstas clones coincide con el llamado de tipo Th-1 de las células T de ayuda. Estudios posteriores han mostrado la producción de diferentes patrones de

citocinas a diferentes antígenos micobacterianos. En humanos no era clara la división de la dicotomía de las células T CD4<sup>+</sup> en Th1 y Th2, como la observada entre clonas T murinas (Hannen, 1991; Salgame, 1991; Boom, 1991), pero recientemente se ha observado la participación de citocinas en la diferenciación de células Th1 y Th2 en humanos (Manetti, 1993; Maggi, 1992; Parronchi, 1992).

La participación de las células T en la tuberculosis consiste en ser una fuente de citocinas que activan a los fagocitos mononucleares para matar o inhibir eficientemente el crecimiento del bacilo de la tuberculosis. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> secretan citocinas tales como INF- $\gamma$ , que es considerado un potente activador de macrófagos para su actividad microbicida en el modelo murino y en el humano.

Los datos publicados acerca de la producción de citocinas en respuesta a *M. tuberculosis* son controversiales. Algunos estudios muestran que la mayoría de las células CD4<sup>+</sup> que responden a *M. tuberculosis* son de tipo Th1, produciendo altas concentraciones de INF- $\gamma$  pero bajas de IL-4 e IL-5. En contraste otro estudio demostró que la mayoría de las clonas T que reconocen antígenos micobacterianos secretan INF- $\gamma$  e IL-4 y hay además reportes que indican que las clonas producen citocinas de tipo Th1 y Th2, incluyendo IL-2, IL-5, IL-10 e INF- $\gamma$  (Primepares, 1992). Aunado a la producción de citocinas, la población de células T CD4<sup>+</sup> aisladas de individuos infectados con *M. tuberculosis* son directamente citotóxicas para monocitos pulsados con antígenos micobacterianos (Mustafa, 1987; Hancock, 1989).

En la infección experimental del ratón con *M. tuberculosis* se ha observado que en la respuesta inmune celular participan los tres subtipos de células T: CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$  (Orme, 1993a). Poco después de la inoculación de ratones con dosis subletales de *M. tuberculosis*, la población de células T CD4<sup>+</sup> se hace evidente; en una primera fase de la respuesta se han caracterizado células productoras de INF- $\gamma$ , la molécula efectora más importante en la protección en infecciones intracelulares en el ratón. Hay también evidencias de la producción de MIF, un potente inductor de la fusión fagolisosomal e

inductor del reclutamiento de monocitos (Orme, 1993b). Posteriormente en una segunda fase se identifican células productoras de IL-4 (Orme, 1993c). Esta respuesta temprana de células T protectoras parece ser de corta duración, ya que se ha observado que la transferencia de protección decae con el tiempo, asimismo, la producción de INF- $\gamma$  decae después de 20 días de infección (Orme, 1992; 1993c). Otras células CD4<sup>+</sup> detectadas 20 ó 40 días postinoculación poseen actividad citolítica cuya función aparente es actuar como un mecanismo de vigilancia, viajando a través del granuloma en busca de bacilos vivos, así esta población de células CD4<sup>+</sup> actúa lisando a células infectadas (Orme, 1994). Cuando la respuesta de las células CD4<sup>+</sup> citolíticas es débil, la población bacteriana puede permanecer y posteriormente recrudecerse la enfermedad.

Una tercera clase de células CD4<sup>+</sup> son de memoria. La respuesta de estas células a retos secundarios es muy rápida, lo cual implica que actúan directamente sin interactuar con células intermediarias o bien que el antígeno es presentado muy rápidamente por la célula infectada. Se ha observado que la micobacteria muerta por calor no genera inmunidad de memoria (Orme, 1986) a diferencia de las proteínas secretadas (Andersen, 1993).

En la infección tuberculosa se ha demostrado la participación de células CD8<sup>+</sup> restringidas por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, lo que implica función citotóxica. En el modelo de tuberculosis en ratón la transferencia de células CD8<sup>+</sup> confiere resistencia a la enfermedad (Orme, 1987) y la administración de anticuerpos monoclonales anti-CD8 disminuye la resistencia, lo que indica un papel en protección antimicobacteriana (Orme, 1994). Se ha observado que células CD8<sup>+</sup> de ratones infectados con *M. bovis* y retados con PPD producen INF- $\gamma$  y en cocultivos de células CD8<sup>+</sup> y macrófagos infectados con *M. bovis* inducen tuberculostasis independiente de INF- $\gamma$  y probablemente dependiente de la lisis de la célula blanco (Kaufmann, 1988).

Se han realizado estudios con ratones a los que se les ha eliminado un gen, con los que se ha demostrado un papel relevante de células CD4<sup>+</sup> (restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II: CMH II) en infección con *M. bovis* BCG. Pero los ratones deficientes en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I) fueron más susceptibles a inóculos de *M. bovis* BCG. Se cree que las células T CD4<sup>+</sup> son importantes para contener a la bacteria dentro del granuloma, pero no pueden eliminar al patógeno intracelular, por lo que es probable que esto corresponda a las células CD8<sup>+</sup> (Ladel, 1995a).

Las evidencias de la participación de células CD8<sup>+</sup> en la inmunidad contra patógenos intracelulares en el humano son escasas. En el análisis inmunohistológico de lesiones inducidas con PPD en individuos PPD<sup>+</sup> se ha observado la presencia de células CD8<sup>+</sup> (Kaufmann, 1988). En estudios realizados con células de lavado pleural de pacientes con tuberculosis se logró aislar clonas de células CD8<sup>+</sup> que reconocen a la proteína de choque térmico de 71 kD en presencia de células presentadoras de antígeno (CPA) e IL-2 (Rees, 1988).

El descubrimiento reciente de una tercera población de linfocitos T que expresan el receptor para antígeno  $\gamma\delta$  ha generado interés en su posible papel en enfermedades infecciosas, incluyendo las micobacterianas. Por su distribución en áreas como la piel, estómago y en el tracto respiratorio superior se ha sugerido que representan una primera línea de defensa. Es de interés su acumulación en tejidos infectados por micobacterias. También se ha observado una rápida acumulación preferencial de células  $\gamma\delta$  en la cavidad peritoneal de ratones inyectados con BCG (Inoue, 1991). La inmunización de ratones con *M. tuberculosis* en el cojinete plantar incrementa la población  $\gamma\delta$  en los nódulos linfáticos y en ratones expuestos a PPD en aerosol esta población se eleva en el pulmón (Born, 1990), además de que las células  $\gamma\delta$  de ratón son estimuladas *in vitro* después de la inmunización con micobacterias. En estudios recientes utilizando ratones deficientes en el receptor  $\gamma\delta$ , se comparó la sobrevivencia a la infección con *M. tuberculosis* y con

BCG, observándose que los ratones deficientes en dicho receptor sobreviven durante más tiempo que aquellos que presentan defecto en el receptor  $\alpha\beta$ , pero en los primeros se observó un número mayor de unidades formadoras de colonias en comparación con los ratones control, lo que sugiere una función auxiliar de los linfocitos  $\gamma\delta$  en la protección contra *M. tuberculosis* y BCG (Ladel, 1995b). En el humano se ha encontrado que el porcentaje de células  $\gamma\delta$  en sangre periférica es de 1 a 9%, aunque después de la estimulación *in vitro* el porcentaje aumento de 12 a 42%; también se ha encontrado que la estimulación con *M. tuberculosis* induce a la célula  $\gamma\delta$  a producir IL-2 y a expresar el receptor para IL-2; también presentan actividad citolítica contra blancos pulsados con *M. tuberculosis* (Munk, 1990). Se han generado líneas de células  $\gamma\delta$  de fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, de lesiones de lepra, y en pacientes con tuberculosis pulmonar, que reaccionan con PPD. Una gran porción de las células  $\gamma\delta$  reconocen proteínas de choque térmico, las cuales son altamente conservadas en todos los organismos. Algunos hibridomas  $\gamma\delta$  reconocen a la proteína de choque térmico de 65 kD y PPD de *M. tuberculosis*, varios de estos hibridomas reaccionan con la GroEL de *E. coli* (Born, 1990). De estas dos observaciones se desprende la teoría de que las células  $\gamma\delta$  han sido seleccionadas durante la evolución para responder rápidamente a ciertos antígenos microbianos mientras que la población  $\alpha\beta$  responde más tardíamente (Janis, 1989).

## 6. ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS

Las proteínas secretadas en el medio de cultivo por *M. tuberculosis* han sido el principal blanco de la investigación por considerarlas vitales para entender la interacción de patógenos con el sistema inmune y con el propósito de identificar aquellas que puedan ser importantes en la inmunoprotección (Young, 1992). La eliminación de los carbohidratos de este material por precipitación con sulfato de amonio o ácido tricloroacético dió como resultado el extracto proteínico purificado (PPD), que se utiliza todavía en algunas regiones para el diagnóstico. En 1965 Florence Seibert desarrolló un

método para separar el filtrado del medio de cultivo de *M. tuberculosis* en fracciones de proteínas y polisacáridos. Este método separó a las proteínas en las fracciones A, B y C y a los polisacáridos en I y II (Fraccionamiento de Seibert). Janiki, en los setentas siguiendo una serie de fraccionamientos bioquímicos, reconocimiento con sueros hiperinmunes y por un sistema de inmunoelectroforesis propuso un sistema de clasificación en el que se identificaron 7 antígenos (Sistema de referencia US-Japón). Actualmente los antígenos micobacterianos (Tabla II y III) se designan con base en su peso molecular aproximado obtenido mediante geles SDS-PAGE (Young, 1992). Desde el descubrimiento del bacilo por Roberto Koch los antígenos micobacterianos han estado sujetos a investigación para tratar de discernir cuáles de ellos provocan la respuesta inmune protectora, y si es un pequeño grupo de antígenos involucrados o son diferentes los antígenos responsables en diferentes individuos inmunes.

Se conoce que un gran número de proteínas micobacterianas son capaces de inducir respuesta inmune y muchas de ellas han sido seleccionadas para estudiar diferentes aspectos de la enfermedad. Para el inmunodiagnóstico por ejemplo, se han buscado antígenos inductores de respuesta inmune específica de especie, capaces de producir anticuerpos o hipersensibilidad retardada (Ivanyi, 1988). La selección de antígenos para una vacuna es más complicada, ya que el reconocimiento de diferentes antígenos puede estar asociado con aspectos de protección o patológicos de la respuesta inmune. Para dilucidar esta situación se ha comparado la respuesta inmune a los diferentes antígenos en individuos sanos, enfermos y probando el efecto protector en modelos de animales infectados después de la inmunización con alguna proteína micobacteriana (Young, 1992).

Hay interés en estudiar la posibilidad de que la micobacteria viva secrete ciertos antígenos que puedan ser relevantes para el rápido reconocimiento de los focos infecciosos; esta posibilidad ha sido vislumbrada por el hecho de que muchas clonas T que reconocen sonificado de micobacterias no reconocen bacilos vivos (Rook, 1986). Los

antígenos liberados por el bacilo vivo o expuestos en su superficie son potencialmente importantes en la respuesta inmune mediada por células, por ejemplo, los polipéptidos asociados con la pared celular de *M. leprae* inducen reacción de hipersensibilidad e inducen proliferación de células T en individuos sanos lepromina-positivos (Brennan, 1988). Es probable que la pared celular de *M. tuberculosis* contenga antígenos inmunodominantes para células T que puedan inducir inmunidad protectora contra el desarrollo de la tuberculosis. Se ha sugerido que los antígenos secretados por la bacteria viva son importantes para estimular la respuesta inmune protectora (Ribi, 1966; 1982).

### **6. 1 Antígenos secretados y de pared**

Las bacterias patógenas interactúan con su hospedero en diferentes formas. Cada especie bacteriana ha evolucionado en forma única, ya sea para atacar al hospedero o para evadir la respuesta inmune. *Mycobacterium* hace uso de un mecanismo sutil pero efectivo para vivir dentro del hospedero. No se han descrito exotoxinas pero mucho del tejido dañado se debe a la respuesta inmune del hospedero en el intento por combatir la infección.

En 1986 Rook observó un patrón variable de reactividad de líneas T humanas a sonicados del BCG y sugirió que el bacilo vivo puede liberar antígenos protectores o que pueden ser expuestos en su superficie (Rook, 1986). Con base en observaciones de que la resistencia específica a la micobacteria fue difícil de inducir usando bacilos no viables, se sugirió que las proteínas protectoras contra *M. tuberculosis* pueden ser metabolitos del organismo en división y no las proteínas constitutivas que siempre están presentes en la preparación de bacterias muertas (Orme, 1993b). La micobacteria secreta proteínas que son extremadamente potentes para inducir respuesta inmune celular en ratones infectados con *M. tuberculosis* viva (Tuberculosis). Se ha observado en este modelo animal que solamente la micobacteria viva en división induce una efectiva inmunidad protectora (Orme, 1988). La inmunización de cobayos con una fracción de proteínas secretadas



induce inmunidad mediada por células e inmunidad protectora contra un reto de *M. tuberculosis* por aerosol (Pal, 1992). En humanos se ha observado respuesta de contactos sanos y de pacientes con tuberculosis pulmonar mínima a proteínas del filtrado del medio de cultivo y se ha probado que esta respuesta se debe a la población CD4<sup>+</sup> productora de IFN- $\gamma$  (Boesen, 1995). Estos hallazgos han sido fundamentales para suponer que las proteínas secretadas en la primera etapa de infección son responsables de inducir células T protectoras (Andersen, 1991; Orme, 1993). La amplia variedad de moléculas secretadas por *M. tuberculosis* son de gran interés por sus características para el inmunodiagnóstico, y por su posible papel en la protección contra la enfermedad las proteínas de 10, 19, 30-31, 38, 50-55, kD.

## **6.2 Glicoproteínas de *M. tuberculosis***

Aunque la presencia de glicoproteínas en organismos procariontes es rara, estas han sido observadas en arqueobacterias como: *Halobacterium salinarium*. Las glicoproteínas bacterianas mejor caracterizadas son aquellas presentes en la superficie cristalina de las arqueobacterias (Dobos, 1995), una de las características de las glicoproteínas bacterianas es su localización en la superficie de la célula, aunque se han reportado glicoproteínas solubles en *Streptococcus faecium*, *Streptomyces* spp. En *M. tuberculosis* se ha reportado, principalmente dentro del filtrado de cultivo la existencia de un grupo de proteínas que se han definido como glicoproteínas con base en su unión con Con A. Espitia y Mancilla (1989) demostraron que las proteínas de 38 kD (Gp 38) y 50-55 kD (Gp 50-55) son reconocidas por Con A, y que la Gp 38 purificada por métodos fisicoquímicos posee el 25.7% de carbohidratos, mientras que la Gp 50-55 presenta el 34.6%. Espitia observó que la Gp 50-55 induce hipersensibilidad retardada en ratones BALB/c, posteriormente demostró que la digestión de la Gp 50-55 con  $\alpha$ -D-manosidasa

inhibe la unión a esta lectina. Garbe (1993) demostró que la protefna de 19 kD posee un péptido señal que se glicosila al expresarla en *M. smegmatis*. Recientemente Dobos presentó evidencias de glicosilación en la protefna de 45 kD de *M. tuberculosis* por espectrometría de masas, en esta protefna se encontró el 4% de carbohidratos (peso/peso) y se encontró que posee el 75% de homología en la porción N-terminal con la Gp 50-55.

TABLA II

Antígenos de *M. tuberculosis* con función conocida. (Young, 1992)

Nombre	Peso (kDa)	Función	Características	Inmunología
DnaK	70	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteína de choque térmico involucrada en plegamiento y traslocación de proteínas</li> <li>- Proteína de adhesión a macrófagos(*)</li> </ul>	->50% de identidad con DnaK de <i>E. coli</i> y con la proteína humana	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuesta de anticuerpos en ratón y humanos.</li> <li>- Proliferación de células T en humanos sanos y enfermos.</li> </ul>
GroEl	65	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteína de choque térmico involucrada en plegamiento y traslocación de proteínas.</li> </ul>	-> 50% de identidad con GroEl de <i>E. coli</i> y con la proteína humana	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuesta de anticuerpos en ratón.</li> <li>- Respuesta proliferativa de células T citotóxicas en pacientes y controles sanos.</li> <li>- Es reconocida por células T <math>\gamma/\delta</math></li> <li>- Respuesta de autoreactividad en roedores y humanos.</li> </ul>
TB43	43	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piridina nucleótido transhidrogenasa</li> </ul>	- Implicada en virulencia	- Antígeno potencial para el diagnóstico.
PhoS	38	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Participa en el transporte de fosfatos. (**)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Posee péptido señal y consenso de lipoproteína.</li> <li>- Se asocia con carbohidratos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuesta de anticuerpos específicos para el complejo <i>M. tuberculosis</i> en pacientes con baciloscopia positiva.</li> <li>- Respuesta de células T en pacientes tuberculosis y controles sanos después de la vacunación con BCG.</li> </ul>

Continuación de la tabla II

Nombre	Peso (kDa)	Función	Característica	Inmunología
	30/31	- Proteína de unión a fibronectina.	ND	- Induce DTH en cobayos. - Induce la producción de IFN- $\gamma$ en enfermos tuberculosos. - Respuesta cruzada en pacientes con lepra y tuberculosis.
SodA	23	- Elimina radicales libres de oxígeno	->50 % de identidad con la Sod de <i>E. coli</i> y MnSOD de mitocondrias humanas.	ND
GroES	12	- Proteína de choque térmico involucrada en plegamiento y traslocación de proteínas funciona junto con GroE1		
	44	- L-alanina dehidrogenasa	ND	ND

\* Gonzalez, 1993

\*\* Espitia, 1992

**TABLA III**

**Antígenos de *M. tuberculosis* con secuencia conocida pero sin función identificada (Young, 1992).**

<b>Peso (kDa)</b>	<b>Características</b>	<b>Características Inmunológicas</b>
84	- Presente en el citoplasma	- Reactividad del 60% con sueros de pacientes leprosos y baja reactividad con sueros de pacientes tuberculosos.
35	- Proteína asociada a la membrana.	ND
19	- Posee secuencia consenso de lipoproteína. - Glicoproteína	- Respuesta de anticuerpos en humanos y ratones - Respuesta inmune celular en individuos sanos y en pacientes tuberculosos.
14	ND	- Antígeno específico de especie. - Induce la producción de anticuerpos y la proliferación de células T en pacientes tuberculosos.
10	- Proteína de secreción. - Presenta homología con GroES de <i>E. coli</i> .	- Induce respuesta DTH en humanos. - Induce la producción de INF- $\gamma$ en células T de individuos sanos y en pacientes con tuberculosis.

### **III. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este proyecto fué la caracterización de la inmunogenicidad de las glicoproteínas de *M. tuberculosis*.

Los objetivos secundarios fueron la obtención de fracciones enriquecidas con las glicoproteínas (Gps) de 38 y 50-55 kD, a partir del medio de cultivo, desarrollar métodos para su purificación, evaluar la síntesis de anticuerpos y la respuesta celular *in vitro* en individuos sanos y pacientes.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CULTIVO DE *M. tuberculosis* Y MEDIDAS DE SEGURIDAD

La cepa de *M. tuberculosis* H37/Rv se obtuvo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. La bacteria se cultivó en el medio líquido sintético de Proskawer y Beck modificado por Youmans (Youmans, 1949) (apéndice 1) durante 4-6 semanas a 37°C. La siembra se hizo por asada, tomando una pequeña fracción de la película formada por el crecimiento de la bacteria en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar vertical.

El personal que trabaja con *M. tuberculosis*, tiene alto riesgo en adquirir la enfermedad. Afortunadamente hay métodos para el manejo de *M. tuberculosis*, que por su patogenicidad está clasificado en el grupo 3 de seguridad biológica por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de América (National Institute of Health, 1986). Los patógenos clasificados en este grupo requieren de manejos especiales para evitar el riesgo de infección, ya que en el caso de *M. tuberculosis* las personas pueden adquirir la enfermedad por inhalación de menos de 10 bacilos, por lo que para la manipulación de la bacteria el personal debe observar medidas de seguridad como:

- 1) Todo el trabajo que implique el manejo del bacilo debe realizarse en un área especial y en campana de seguridad biológica de flujo laminar vertical de tipo II.
- 2) En la misma área también debe encontrarse la incubadora y todo lo necesario para la manipulación del patógeno.
- 3) El personal debe trabajar con cubrebocas, bata, cofia y guantes.
- 4) Evitar la formación de aerosoles, escurrimientos y salpicaduras.
- 5) Nunca pipetear con la boca.
- 6) No comer, beber ni fumar en el área de trabajo.
- 7) Evitar al máximo el uso de jeringas, agujas, pipetas Pasteur, tubos capilares y bisturíes; cuando éstos deban ser usados manejarlos con precaución para evitar accidentes.

- 8) El área de trabajo debe limpiarse después de haber trabajado, usando cloro y fenol.
- 9) Todo el material que haya estado en contacto con la bacteria debe ser puesto en bolsas para esterilizar, sellado y colocado en luz ultravioleta, para después esterilizarlo en autoclave (Barkley, 1994).

## **2. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DEL MEDIO DE CULTIVO (EP)**

El medio de cultivo se filtró por vacío utilizando una trampa con fenol al 10%, a través de un filtro Whatman No. 3 y posteriormente y de manera sucesiva a través de filtros de 1.2, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, Bedford, MA). El filtrado se precipitó inmediatamente con 0.5 g/ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 4° C en agitación durante toda la noche. Se centrifugó a 10 000 g por 15 min, el extracto proteínico (EP) se resuspendió en un volumen mínimo de PBS pH 7.4 (apéndice 2) y se dializó exhaustivamente contra el mismo amortiguador. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry, 1954) (apéndice 3). El EP se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso y se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

## **3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **3.1 Electroforesis (SDS-PAGE)**

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE) de acuerdo con el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La separación electroforética se llevó a cabo en geles de acrilamida al 10% para el gel separador y 3% de acrilamida para el gel concentrador (apéndice 4). Las muestras se diluyeron 1:1 en cóctel de electroforesis (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS y 0.1% glicerol) y se hirvieron durante 5 min en baño María. La electroforesis se corrió a



7.5 mA/gel durante toda la noche. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie (apéndice 5) o se transfirieron a papel de nitrocelulosa.

### **3.2 Electroforesis en geles de acrilamida no desnaturizante**

Se realizó también electroforesis en geles de acrilamida al 7.5% en condiciones no desnaturizantes y no reductoras (apéndice 9). El gel se montó en una cámara de electroforesis de 0.75 mm de grosor, vertical y constituida por 2 placas de vidrio de 18 x 16 cm. Después de vaciar la solución de acrilamida, se colocó el peine y se dejó polimerizar. La muestra de líquido de ascitis se diluyó 1:4 en solución de muestra (apéndice 9) y se aplicó al gel, el cual se corrió a un voltaje constante de 200 V hasta que el colorante alcanza la parte inferior. Ya finalizada la electroforesis se tiñó el gel con azul coomasie G250 (apéndice 10) por 3 h y se destiñó con una solución de ácido acético al 10% (Saavedra, 1985).

### **3.3 Inmunotransferencia**

Para los estudios de inmunotransferencia, el gel se montó en una cámara de electrotransferencia (Idea Scientific, Corvallis, PA, USA) y se transfirió a nitrocelulosa (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA) a 1 A durante 1 h, en buffer de glicina pH 8.35 (apéndice 6), siguiendo el método descrito por Towbin (Towbin, 1979). La transferencia se comprobó por tinción de los marcadores de pesos moleculares con rojo Ponceau (apéndice 7). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó por incubación con BSA 1% en PBS pH 7.4 + Tween 20 0.3% a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 3 lavados de 5 min con PBS + Tween 20 0.3%, la membrana se incubó con los anticuerpos a la concentración adecuada diluidos en PBS pH 7.4 + BSA 1% + Tween 20 0.3%, durante toda la noche a 4° C. Se realizaron 2 lavados rápidos con PBS pH 7.4 + Tween 20 0.3%, y otros 3 durante 10 min en la misma solución. El inmunoblot se reveló por incubación con proteína A (dilución 1:1 000) o anticuerpo anti-IgG de ratón (1:2 000) marcados con peroxidasa (ambos de Sigma

Chemical Co., St Louis Mo), por 2 h a temperatura ambiente. Después de lavar como en el paso anterior, se reveló con  $H_2O_2$  y 4-cloro 1 naftol, (apéndice 8).

#### **4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

##### **4.1 Fraccionamiento del extracto proteico por el método de Seibert**

Florence Seibert (Seibert, 1949) utilizó en 1946 el fraccionamiento ácido alcohólico en la purificación de proteínas del filtrado del medio de cultivo de *M. tuberculosis*. La metodología consiste en una precipitación inicial del EP (extracto proteico) por ajuste del pH a 4 con ácido acético glacial a 4° C; al precipitado obtenido se le denominó Fracción 1 ( $F_1$ ). El sobrenadante de esta precipitación se ajustó a pH 7 con NaOH 5 N y se le agregó etanol hasta obtener una concentración del 30%; al precipitado se le denominó Fracción 2 ( $F_2$ ). El sobrenadante se ajustó a pH 4 con HCl 1 N, obteniéndose un precipitado al que se le llamó Fracción 3 ( $F_3$ ). El sobrenadante se llevó a una concentración de 70% de etanol denominándose al precipitado Fracción 4 ( $F_4$ ) y al sobrenadante se le denominó Fracción 5 ( $F_5$ ). Las fracciones obtenidas se dializaron contra PBS pH 7.4 y se les determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry, 1954). Cada fracción se analizó por tinción con azul Coomassie (apéndice 5) e inmunoblot. En la figura 2 se esquematiza el fraccionamiento ácido alcohólico de Seibert.

##### **4.2 Obtención de Gp 38 y de Gp 50-55 de geles preparativos**

La Gp 38 y la Gp 50-55 se obtuvieron de la  $F_5$  y de la  $F_4$  respectivamente, obtenidas del fraccionamiento de Seibert. Las fracciones se cargaron en geles preparativos de acrilamida de 3 mm de espesor al 10% para el gel separador y 3% para el concentrador (apéndice 4) con una concentración de 2-6 mg de proteína/gel. La electroforesis se corrió durante 4 h a 40 mA según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron con acetato de sodio 4 M (Higgins, 1970) a temperatura ambiente durante 20 min. Los geles se observaron en una

cámara oscura y la banda correspondiente al peso molecular seleccionado se cortó y posteriormente se trituró pasándola a través de una jeringa de 10 ml sin aguja. El material triturado se recibió en una solución de urea 6 M (Lamb, 1988) (apéndice 11), con volumen suficiente para cubrirlo, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se pasó por un filtro Whatman No. 4 con vacío; el filtrado se dializó contra PBS pH 7.4 y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry. Se confirmó la identidad del antígeno por inmunoblot revelando con sueros de conejo anti-EP H37/Rv, anti-Gp 38 y anti-Gp 50-55.

#### **4.3 Obtención de una fracción enriquecida en glicoproteínas por una columna de Con A**

Para obtener una fracción enriquecida en Gp 38 y Gp 50-55 del EP, se utilizó cromatografía de afinidad a Concanavalina A (Con A) (Daniel, 1974). El EP de *M. tuberculosis* H37/Rv se dializó contra un buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 5 (apéndice 12) a 4°C durante 24 h con 2 cambios y se centrifugó a 10 000 g por 15 min. El sobrenadante se incubó con Sefarosa-Con A (Sigma C-9017) en una columna de 20 cm x 18 mm, (lavada previamente con 5 volúmenes de columna con PBS pH 7.4 y 10 volúmenes de columna con buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 5) a razón de 14 mg de proteína/ml de gel durante toda la noche a 4°C en agitación. El material no acoplado se lavó con el buffer de incubación y el material acoplado inespecíficamente se lavó con NaCl 0.5 M. La elución se realizó con  $\alpha$ -metilmanósido 0.01 M (Espitia, 1991) (apéndice 13), colectando fracciones de 80 gotas. Se determinó la  $DO_{280}$  nm, cuando esta bajó a 0.02 se hizo el cambio de cada solución. Las fracciones del pico se dializaron contra PBS pH 7.4, se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry, se verificó el patrón electroforético por inmunoblot y por tinción con azul Coomassie (apéndice 5). La columna se lavó con PBS pH 7.4 y se conservó a 4°C en buffer catiónico (apéndice 14).

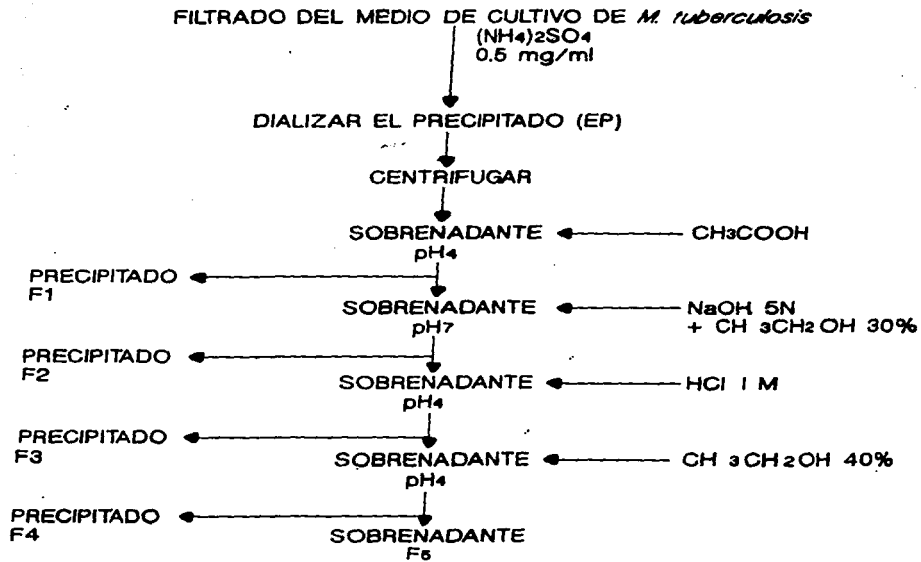


Figura 2.

## **5. PURIFICACIÓN DE Gp 50-55 POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON UN ANTICUERPO MONOCLONAL**

### **5.1 Obtención del anticuerpo monoclonal en contra de Gp 50-55**

Durante el curso de esta tesis Rafaela Espinosa y Rafael Saavedra produjeron un anticuerpo monoclonal en contra de la Gp 50-55, de la siguiente manera: el hibridoma 6A3 obtenido por la fusión de células de mieloma SP2/0-Ag14 y células de bazo de ratones hembra BALB/c (Espitia, 1995), se cultivó en medio DMEM complementado con 10% de FCS, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato de sodio y 50 U/ml de penicilina-estreptomicina. Se mantuvo en cultivo hasta un crecimiento óptimo de  $4 \times 10^5$  células/ml aproximadamente, lo cual se logró diluyendo 1:5 diariamente (Saavedra, 1985).

### **5.2 Obtención del líquido de ascitis**

Las células a inocular se centrifugaron, se lavaron una vez con medio DMEM sin FCS y se resuspendieron en el mismo a una concentración de  $10^7$  células/ml. Ratones de la cepa BALB/c de 6-8 semanas inyectados 1 semana antes por vía intraperitoneal con 200  $\mu$ l de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano), se inocularon con aproximadamente  $2 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ l de DMEM sin FCS vía intraperitoneal. Cuando los ratones presentaron los síntomas de tumor se obtuvo el líquido de ascitis por punción de la cavidad peritoneal. El líquido se dejó 2 h a temperatura ambiente para que se formara el coágulo de fibrina y para que sedimentara el material celular. Se centrifugó a 830 g por 10 min y el sobrenadante se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se repitió la operación cada tercer día hasta la muerte del animal (Saavedra, 1985).

### **5.3 Precipitación de inmunoglobulinas del líquido de ascitis**

El líquido de ascitis (ver 6.1 y 6.2) se diluyó 1:4 con PBS pH 7.8 (apéndice 15) y se centrifugó durante 30 min a 50 000-100 000 g a  $4^\circ\text{C}$  para eliminar lípidos. Posteriormente se agregó un volumen equivalente de solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a  $4^\circ\text{C}$ , lentamente y con

agitación. Se dejó a 4°C durante 1 h en agitación y se centrifugó a 12 500 g por 15 min. El precipitado se disolvió en solución A y se dializó contra 100 volúmenes de precipitado con solución B (apéndice 15) en una probeta sin agitación; la solución se cambió 3-4 h después y se dializó 8 h más como mínimo. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la  $DO_{280}$  nm; la lectura se dividió entre el factor 1.4 (Hybridoma-Techniqst, 1980) y se obtuvo la concentración de inmunoglobulina como mg/ml. Se recuperaron aproximadamente de 8 a 12 mg de proteína/ml de ascitis (Saavedra, 1985).

#### **5.4 Purificación del AcMn 6A3 por cromatografía de intercambio iónico**

DEAE-Celulosa (Sigma D-3764) se resuspendió en la solución B (apéndice 15), retirando las partículas finas varias veces. Se conservó a temperatura ambiente en suspensión al 25% aproximadamente, con  $NaN_3$  al 0.1%. La columna de 30 cm x 18 mm se montó con 1 ml de resina por cada 5 mg de proteína, y se equilibró con solución B. La muestra se diluyó con un volumen igual de solución D (apéndice 15) y se aplicó sobre la columna, colectando fracciones de 9 min con flujo de 0.33 ml/min. Se lavó con 2 volúmenes de columna de solución B y se eluyó con un gradiente de NaCl 20-200 mM (soluciones B-C), usando de 5 a 10 volúmenes de columna. Se determinó la  $DO_{280}$  nm de las fracciones, se reunieron aquellas que presentaron absorbancia, se dializó contra  $NaHCO_3$  0.1 M pH 8, y se verificó la pureza del AcMn en un gel de acrilamida PAGE-SDS (ver 4.1) teñido con azul Coomassie (apéndice 5) (Saavedra, 1985). La columna se lavó con NaCl 1 M y se conservó en solución B +  $NaN_3$  0.1% a 4°C.

#### **5.5 Acoplamiento del AcMn 6A3 al soporte de Affi-gel 10**

Para montar la columna de afinidad, el AcMn puro se acopló a un gel de agarosa (Affi-gel 10, Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante para el acoplamiento. El AcMn se incubó en agitación con el gel durante 4 h a 4°C, a razón de 10 mg/ml de soporte; se

centrifugó a 500 g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante para determinar el porcentaje de eficiencia en el acoplamiento. Se bloquearon los sitios no ocupados por incubación con etanolamina 0.1 M pH 8 a 4° C durante 1 h. Se lavó con PBS pH 7.4 a 4° C, y la columna se almacenó en PBS pH 7.4 + NaN<sub>3</sub> 0.1% a 4°C.

### **5.6 Purificación de Gp 50-55**

El EP en PBS pH 7.4 se incubó durante toda la noche con 1.5 ml de agarosa-AcMn 6A3 a razón de 17 mg de proteína/ml de soporte en una columna poly-prep (Bio-Rad) de 0.8 x 4 cm, haciéndolo circular con una bomba peristáltica con flujo de 0.3 ml/min. Con el mismo flujo y colectando fracciones de 6 min se eliminó todo el material no acoplado y acoplado inespecíficamente a la columna lavando sucesivamente con 15 volúmenes de columna de PBS pH 7.4; con 5 volúmenes de columna con Tris 25 mM pH 7.5 + NaCl 0.5 M + Tritón X-100 al 2% (Staehelin, 1981), y 20 volúmenes de columna de PBS pH 7.4. La elución se realizó con 10 volúmenes de columna de NH<sub>4</sub>OH 0.1 M neutralizando inmediatamente con HCl 1 N. Se dializó exhaustivamente con agua megapura a 4° C. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry. La eficiencia de la purificación se comprobó por electroforesis tiñendo con azul Coomassie (apéndice 5) y por inmunoblot revelado con suero anti-EP H37/Rv y con el AcMn 6A3. La columna se lavó exhaustivamente con PBS pH 7.4 y se conservó en PBS pH 7.4 + NaN<sub>3</sub> 0.1%, para reusarla dos veces más.

### **6. MÉTODO DE DUBOIS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATO**

La determinación del porcentaje de azúcares en la glicoproteína Gp 50-55 purificada por afinidad se determinó por el método de Dubois. Para la curva estándar (apéndice 21) se utilizó manosa en un volumen final de 200 µl a diferentes concentraciones. La proteína liofilizada (250 µg) se resuspendió en 200 µl de agua destilada, se adicionaron 200 µl del reactivo A

(apéndice 21), rápidamente se adicionó 1 ml del reactivo B cuidando que la solución no tocara las paredes del tubo. Se dejó reposar durante 10 min antes de agitar vigorosamente. Se determinó la absorbancia a 490 nm después de 30 min (Chapli,1986).

## **7. RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTI-Gp 50-55 EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR POR ELISA**

Se obtuvieron 54 sueros de pacientes adultos con tuberculosis pulmonar comprobada y 42 sueros controles de donadores sanos. La Gp 50-55 purificada por cromatografía de afinidad se diluyó en el buffer de carbonatos (apéndice 19) a 5 µg/ml y se colocaron 100 µl/pozo en una placa de 96 pozos. Se incubó a 37°C durante toda la noche y se lavó 3 veces con PBS pH 7.4 + Tween 20 al 0.05% durante 3 min en agitación. Se agregaron 200 µl de PBS pH 7.4 + BSA al 1% y se incubó durante 1 h a 37°C. Se incubó con 100 µl de suero diluído 1:500 en PBS pH 7.4 + BSA al 1%, durante 1 h a 37°C. Se lavó 5 veces y se incubó con 100 µl de Proteína A- Peroxidasa diluída 1:1 000 en PBS pH 7.4 + BSA al 1% a 37°C por 1h. Se lavó la placa 5 veces con PBS pH 7.4 + Tween 20 al 0.05% por 3 min en agitación. Se agregaron 50 µl de solución reveladora (apéndice 20), se dejó 4 min en oscuridad y se paro la reacción con 200 µl de ácido sulfúrico 1 N. Se leyó la DO<sub>490 nm</sub> en un lector de ELISA.

## **8. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR *in vitro* A LAS GLICOPROTEÍNAS**

### **8.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMP).**

Se obtuvo sangre periférica de voluntarios por punción venosa asépticamente. La sangre se recibió en un tubo de poliestireno con 100 U de heparina por ml de sangre y se diluyó 1:1



con solución de Hank's (Sigma). Las células mononucleares se separaron por un gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) en tubos de 15 ml con 3 ml de Ficoll; 8 ml de sangre diluida se vertió lentamente y sin mezclar sobre el Ficoll y se centrifugó a 1 500 g durante 30 min a temperatura ambiente. Al final de la centrifugación, se colectaron las células de la interfase Ficoll-plasma con ayuda de una pipeta Pasteur y se lavaron con 20 ml de solución de Hank's (1000 g por 10 min). Se repitió el lavado una vez más con 20 ml solución de Hank's (1 200 g por 10 min) y posteriormente las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado (Saavedra, 1991) (apéndice 16). Se determinó la viabilidad celular con azul tripano al 0.4% en un hematocitómetro y se ajustó a la concentración deseada

## **8.2 Ensayos de proliferación**

Las células se cultivaron *in vitro* por triplicado, en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar) a razón de  $10^5$  células/pozo con el antígeno, en un volumen final de 200  $\mu$ l en medio RPMI-1640 suplementado. Se incubaron durante 7 días con el antígeno o durante 3 con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) 1:300 (Gibco), a 37°C con 95% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. La proliferación se determinó por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (NEN), agregando 0.5  $\mu$ Ci en 20  $\mu$ l de medio por pozo e incubando durante las últimas 18 h. La radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo. Los resultados se reportaron en índices de estimulación (IE = proliferación en presencia de antígeno/proliferación en ausencia de antígeno), considerando positivos los IE  $\geq$  3.

## **8.3 Obtención de una línea T en contra de F4**

La línea T se estableció de células mononucleares de sangre periférica con índice de estimulación positivo a la F<sub>4</sub>. Se obtuvo sangre periférica y se separaron las células mononucleares como se describe en 9.1. Se incubó con el antígeno en las condiciones ya establecidas en placas de 24 pozos en un volumen final de 2 ml. Al día 7 de incubación se

recuperaron las células viables por Ficoll-Paque y se resuspendieron a  $2 \times 10^5$  células por pozo en RPMI-1640 suplementado, se incubó con el antígeno y con células presentadoras de antígeno autólogas tratadas con mitomicina C (CPA) (apéndice 17) a razón de  $10^6$  por pozo e IL-2 (Boehringer Mannheim) a 10 U/ml en un volumen final de 2 ml. Se siguió el mismo procedimiento 2 veces más y se probó la especificidad de la línea. La especificidad de la línea se determinó por un ensayo de transformación blástica, colocando 20 000 células de la línea T por pozo, en placas de 96 pozos en presencia de 50 000 CPA autólogas y bajo el estímulo de la F4 o el mitógeno PHA (1:300). La proliferación se determinó por incorporación de [ $H^3$ ]-Timidina como se describe en 9.2 (Ver figura 3).

#### **8.4 Clonación de la línea T anti-F<sub>4</sub> por dilución limitante**

La línea de células T en crecimiento se expandió en placas de 6 pozos (Costar) hasta que mostraron confluencia, para posteriormente realizar la clonación por dilución limitante. Se diluyeron a 6 células/ml (0.3/pozo), 20 células/ml (1/pozo), 60 células/ml (3/pozo), 200 células/ml (10/pozo) y se agregaron 100  $\mu$ l de estas diluciones en placas de 96 pozos junto con CPA ( $1 \times 10^5$ /pozo), PHA (1:300) e IL-2 (2 U/pozo). Semanalmente se alimentaron con IL-2 (2 U/pozo) y quincenalmente con PHA y CPA en las condiciones ya mencionadas. Se verificó el crecimiento de las clonas periódicamente. De los pozos en los que se observó crecimiento se sacaron las células y se expandieron en placas de 24 pozos con CPA ( $1 \times 10^6$ /pozo), PHA (1:300) e IL-2(20U/pozo) en un volumen final de 2 ml. (Ver figura 3).

#### **8.5 Ensayos de proliferación de las clonas a Gp 38 y a Gp 50-55**

Para los ensayos de estimulación *in vitro* de las clonas, las células de la clona T se cultivaron en RPMI-1640 suplementado en placas de 96 pozos (20 000 células/pozo), en presencia de CPA autólogas (50 000/pozo) y ante el estímulo de las Gps de 38 y 50-55 eluidas

por urea 6 M (Lamb, 1988), a diferentes concentraciones (10, 3, 1, 0.3 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) o con el mitógeno PHA (1:300) durante 3 días. La proliferación se determinó por incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-Timidina como se describe en 9.2.

### **8.6 Caracterización de la línea anti-F<sub>1</sub> por citometría de flujo**

Se colocaron  $10^6$  células de la línea T por tubo (Falcon 2054) y se lavaron con 2 ml de PBS pH 7.2 (apéndice 18) +  $\text{NaN}_3$  0.1% + FCS 2% a  $4^\circ\text{C}$  (2 000 g x 10 min). Para la inmunofluorescencia indirecta, se incubaron las células con 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultivos de hibridomas productores de anticuerpos anti-CD3 (AcMn OKT3), anti-CD4 (AcMn OKT4), anti-CD8 (AcMn OKT8) y con 100  $\mu\text{l}$  de ascitis de ratón anti- $\gamma/\delta$  (Anti-TCR  $\gamma\text{l}$  donado por el Dr. Brenner) diluido 1:1 000, en PBS pH 7.2 +  $\text{NaN}_3$  0.1% + FCS 2% durante 40 min a  $4^\circ\text{C}$ . Se lavaron 3 veces con 3 ml de PBS pH 7.2 +  $\text{NaN}_3$  0.1% y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de conjugado GAM-FITC (anti-ratón específico para la fracción Fc de IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína) diluido 1:100 en PBS pH 7.2 +  $\text{NaN}_3$  0.1% + FCS y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  por 40 min en oscuridad. Para la fluorescencia directa se incubaron con 20  $\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-TCR  $\alpha/\beta$  obtenido en ratón (Becton Dickinson, San José CA. USA) acoplado a fluoresceína durante 40 min a  $4^\circ\text{C}$ , en oscuridad. Se lavaron 3 veces con 3 ml de PBS pH 7.2 +  $\text{NaN}_3$  0.1%. Las células se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de PBS pH 7.2 + *p*-formaldehído 1% fresco y se leyeron en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, San José CA. USA).

MÉTODO PARA OBTENER CLONAS DE CÉLULAS T  
Clonas T vs gps de 38 y 50-55 kD  
de *M. tuberculosis*

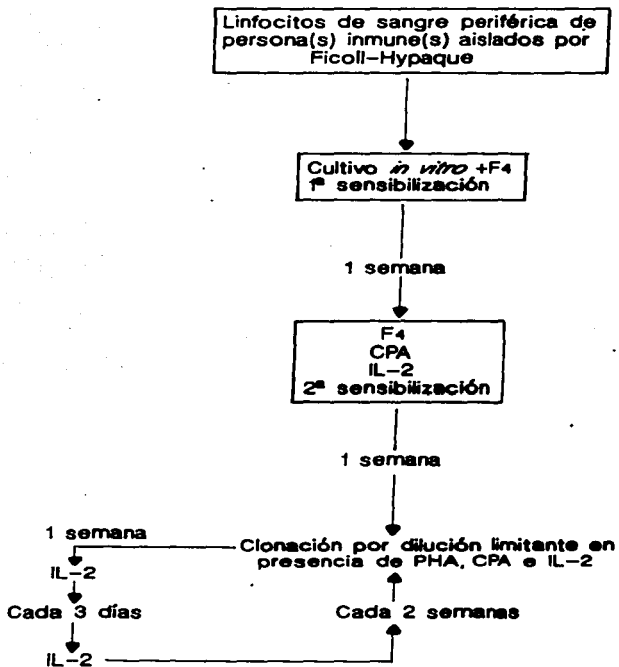


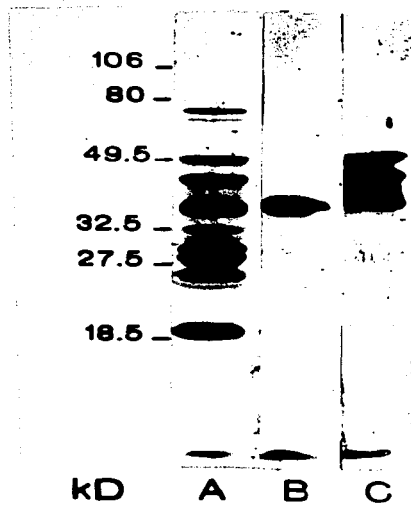
Figura 3.

## V. RESULTADOS

### 1. OBTENCIÓN DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN Gp 38 Y Gp 50-55.

El fraccionamiento ácido-alcohólico de Seibert ha sido ampliamente utilizado en el laboratorio. Este método permite el enriquecimiento en algunas protefnas. Como primer paso en la obtención de líneas T específicas de la Gp 50-55 y la Gp 38, se procedió a buscar una fracción de Seibert enriquecida en estas glicoprotefnas. En la Figura 4 se muestra el fraccionamiento ácido-alcohólico de Seibert del EP de la cepa H37/Rv (carril A). En la F<sub>1</sub>, se pueden apreciar en su gran mayoría las mismas bandas observadas en el EP, aunque algunas se hicieron menos evidentes como las de 70, 62 y el doblete de 50-55 (Gp 50-55); en esta fracción permanecen las protefnas de 45, 38 y en el doblete de 30-31 kD. En la F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>, se observan prácticamente las mismas bandas que en la F<sub>1</sub>, solo que en éstas se aprecia nuevamente el doblete de la Gp 50-55 y de manera abundante la protefna de 23 kD en la F<sub>2</sub>. En la F<sub>4</sub> están presentes principalmente las protefna de 30-31 kD y las Gps de 38 y 50-55. En la F<sub>5</sub> se observan de manera abundante la Gp 38 y la protefna de 30-31 kD, en compañía de otras bandas menos evidentes de menor peso molecular. En la F<sub>6</sub> están presentes las protefnas de interés con escasa presencia de otras protefnas. Para comprobar que en la F<sub>6</sub> están presentes las Gps de 38 y 50-55 se realizó un inmunoblot revelado por sueros policlonales anti- Gp 38 y anti-Gp 50-55 mono-específicos. En la Figura 5 se observa el inmunoblot revelado con suero anti-EP (carril A), en el que se pueden apreciar las Gps 38 y 50-55, además del doblete 30-31 y la protefna de 23 kD. En el carril B la reacción del suero anti-Gp 38 y en el carril C, la del suero anti-Gp 50-55. En vista de lo anterior, la F<sub>6</sub> fué seleccionada como fuente de antígeno.

**Figura 4.**  
**Análisis del fraccionamiento ácido alcohólico de Seibert del EP de *M. tuberculosis* por inmunoblot, incubado con suero de conejo anti-EP y revelado con Proteína A-peroxidasa.**



**Figura 5.**  
Immunoblot de F<sub>4</sub> revelada con suero de conejo anti-EP (A); F<sub>4</sub> revelada con suero anti-Gp 38 (B) y F<sub>4</sub> revelada con suero anti-Gp 50-55 (C).

## **2. OBTENCIÓN DE LAS Gps 38 Y 50-55.**

Como se mencionó en el párrafo anterior la  $F_4$  se seleccionó para estimular linfocitos *in vitro*, derivar líneas y clonas T en contra de las Gps 38 y 50-55, de estas líneas posteriormente se obtendrían clonas contras estas Gps. Para lo anterior era necesario obtener fracciones enriquecidas en estas Gps, por lo que se aprovechó también el fraccionamiento ácido-alcohólico de Seibert, la Gp 38 se aisló por electroforesis preparativa por elución con urea 6 M de la  $F_5$ . En la Figura 6 se observa un inmunoblot de la Gp 38 revelado con suero anti-*M. tuberculosis* y un anticuerpo policlonal monovalente anti-Gp 38.

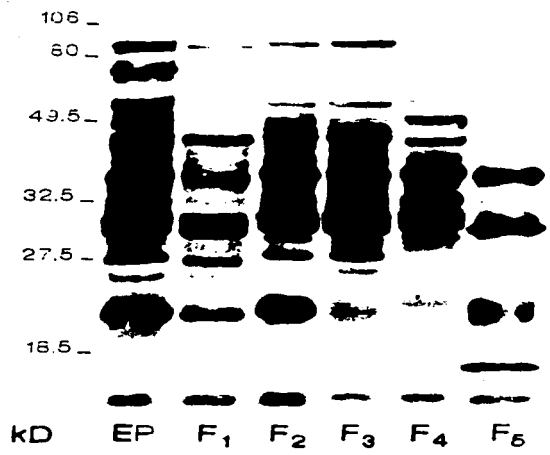
La Gp 50-55 se obtuvo de la  $F_4$ . En el inmunoblot de esta fracción (Figura 5) revelado con suero anti-EP se identifica el doblete que corresponde a este peso molecular, y se comprueba la identidad incubando el inmunoblot de la fracción con suero policlonal monovalente anti-Gp 50-55. En la Figura 7 se muestra el inmunoblot de la Gp 50-55 obtenida de la  $F_4$  por electroforesis preparativa por elución con urea 6 M.

Estos estudios muestran un buen grado de pureza con este procedimiento, aunque no se descarta la posibilidad de algunas proteínas contaminantes no detectadas por el suero anti-*M. tuberculosis*

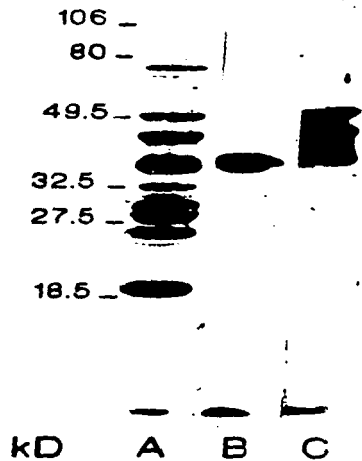
## **3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CON LA $F_4$**

Para la obtención de líneas y clonas en contra de las Gps 38 y 50-55 se seleccionó la  $F_4$  por ser rica en estas Gps. Para establecer la concentración óptima de la  $F_4$ , se realizó un ensayo de proliferación usando células mononucleares de sangre periférica (CMP) de personas sanas vacunadas con BCG, una PPD+ y otra PPD-. Se probaron varias concentraciones de la  $F_4$  (30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) y se utilizó como control el EP (100, 30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) y fitohemaglutinina PHA (1:300). En la Figura 8 se puede observar que las células de ambos donadores responden al EP y a la  $F_4$  de una manera dependiente de la dosis. Las concentraciones de antígeno a las que observamos índices de estimulación máximos fueron de 10  $\mu\text{g/ml}$  para el EP y  $\geq 30$   $\mu\text{g/ml}$  para la  $F_4$ . No se probaron

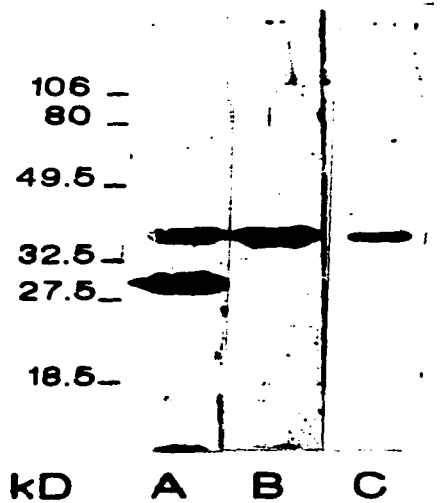




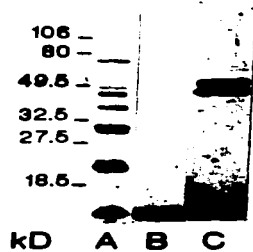
**Figura 4.**  
**Análisis del fraccionamiento ácido alcohólico de Seibert del EP de *M. tuberculosis* por inmunoblot, incubado con suero de conejo anti-EP y revelado con Proteína A-peroxidasa.**



**Figura 5.**  
Immunoblot de  $F_4$  revelada con suero de conejo anti-EP (A);  $F_4$  revelada con suero anti-Gp 38 (B) y  $F_4$  revelada con suero anti-Gp 50-55 (C).



**Figura 6.**  
**Immunoblot de la fracción enriquecida en Gp 38. F<sub>5</sub> incubada con suero anti-EP (A); Gp 38 purificada de F<sub>5</sub> incubada con suero anti-EP (B); Gp 38 incubada con suero anti-Gp 38 (C).**



**Figura 7.**

**Immunoblot de la fracción enriquecida en Gp 50-55. F<sub>4</sub> revelada con suero anti-EP (A); Gp 50-55, tira incubada con suero anti-EP (B); Gp 50-55 purificada e incubada con suero anti-Gp 50-55 (C).**

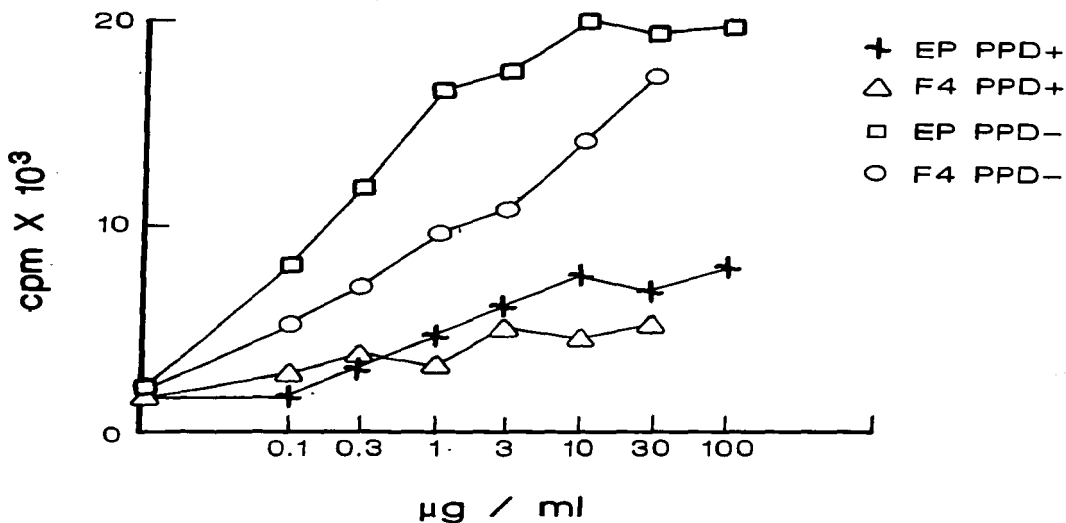


Figura 8.

Proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMP) a  $F_4$ , de dos donadores sanos, uno con reacción PPD+ y otro PPD-.  $2 \times 10^5$  CMP se incubaron con diferentes concentraciones de EP y de  $F_4$ , durante 7 días. La proliferación se determinó por incorporación de  $[^3H]$ -timidina ( $0.5 \mu\text{Ci/pozo}$ ) durante las últimas 18 h de incubación.

concentraciones más altas de la  $F_4$  debido al bajo rendimiento del método de Seibert. Estos estudios muestran que la  $F_4$  es inductora de transformación blástica y llama la atención la mayor respuesta blástica en el individuo PPD-.

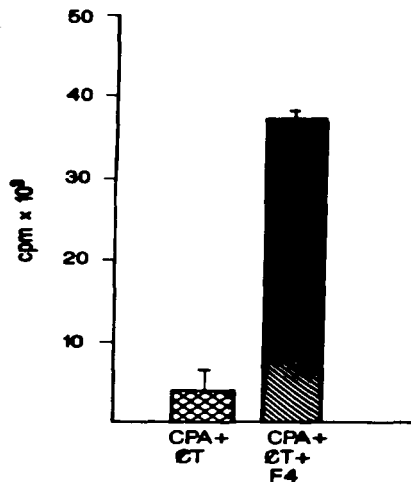
#### **4. ESTABLECIMIENTO DE UNA LÍNEA CELULAR T ANTI- $F_4$**

Se derivó una línea T en contra de la  $F_4$  utilizando CMP de un donador sano PPD-vacunado con el BCG, cuyas células respondieron al EP y a la  $F_4$ . Las células se reestimularon en 3 ocasiones con la  $F_4$  (Ver diagrama en Materiales y Métodos, Figura 3) y posteriormente se probó su especificidad mediante un ensayo de proliferación. En la Figura 9 se observa únicamente proliferación al estimular en presencia de  $F_4$  pero no en su ausencia, lo cual indica que las células T son específicas de antígenos presentes en la  $F_4$ .

Se determinó el fenotipo de la línea por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD3, CD4, CD8 y contra los receptores T para antígeno  $\alpha/\beta$  y  $\gamma/\delta$ . Como se puede observar en la Figura 10, el 94.2% de las células expresan el marcador CD3, el 71.66% la molécula CD4 y el 29.04% la molécula CD8. El 94.9% expresan el receptor para antígeno  $\alpha/\beta$  y el 5.11% presentan el receptor para antígeno  $\gamma/\delta$ .

#### **5. ESTABLECIMIENTO DE CLONAS**

La línea de células T se clonó por dilución limitante en placas de 96 pozos sembrando 1, 3 y 10 células/pozo en presencia de fitohemaglutinina (1:300), células alimentadoras e IL-2r. Se reestimularon por dos meses con IL-2r, fitohemaglutinina y células alimentadoras, (ver diagrama en Materiales y Métodos, Figura 3). En la primera clonación se obtuvieron 4 clonas ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ ) con una probabilidad de monoclonalidad del 88%. Estas clonas se expandieron con fitohemaglutinina, células alimentadoras e IL-2r en placas de 6 pozos; al día 10 de su reestimulación se realizó un ensayo de proliferación para probar su especificidad con las Gps 38 y 50-55 a diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en la Figura 11 y



**Figura 9.**

Ensayo de especificidad de la línea T anti-F<sub>4</sub> (ET). Células de la línea T ( $2 \times 10^4$ ) fueron incubadas con  $5 \times 10^4$  células mononucleares de sangre periférica autólogas tratadas con mitomicina (CPA), en presencia o ausencia de 30  $\mu\text{g/ml}$  de F<sub>4</sub> durante 3 días. La proliferación se determinó por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5  $\mu\text{Ci/pozo}$ ) durante las últimas 18 h.

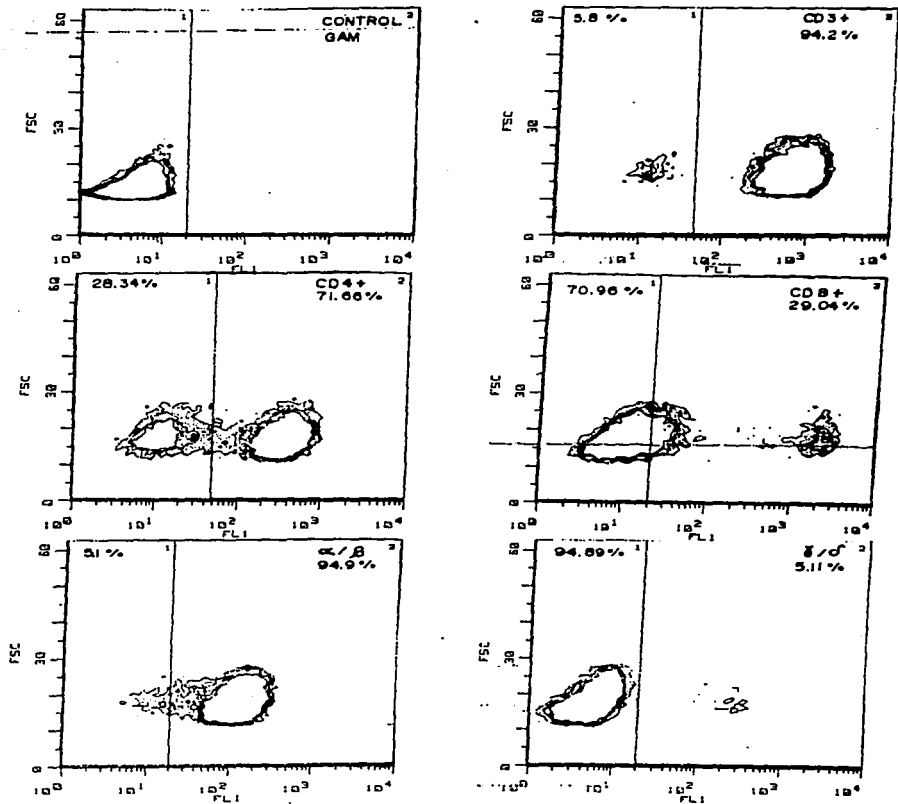
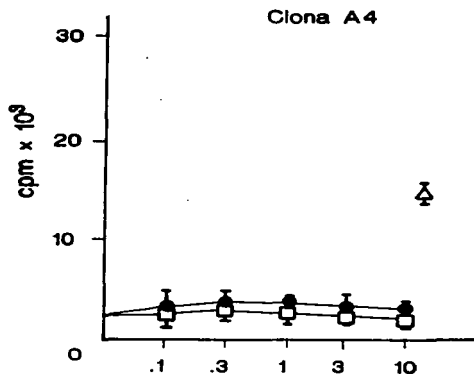
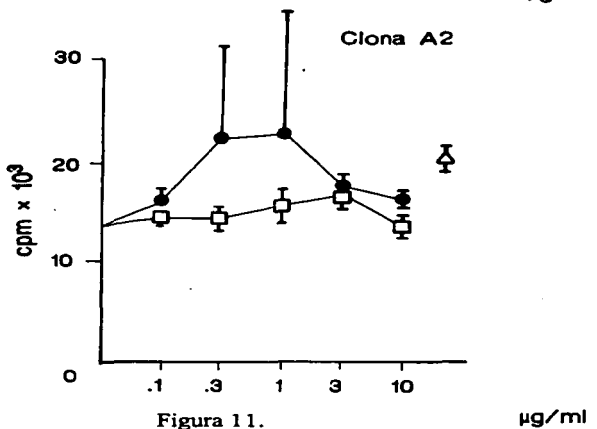
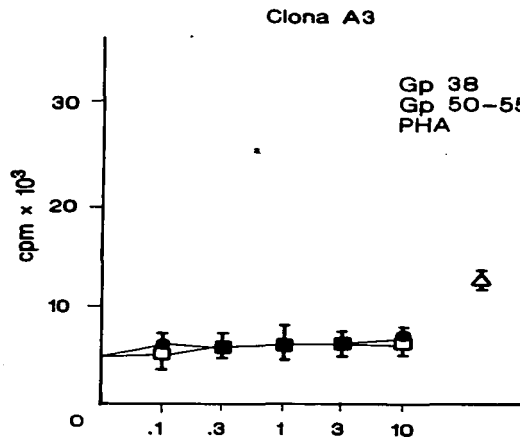
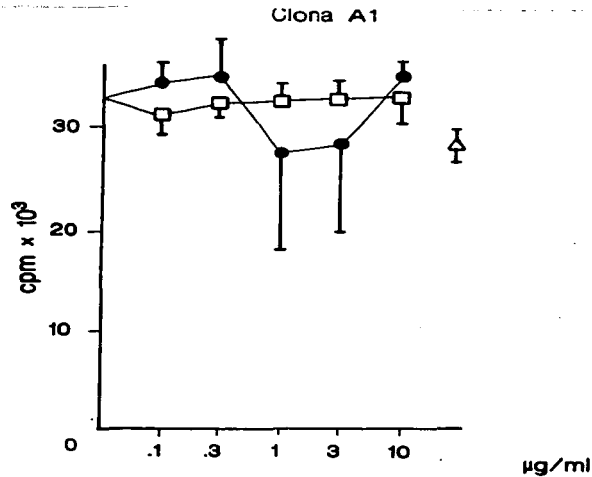


Figura 10.

Determinación del fenotipo de la línea T por citometría de flujo (FACS). Las células ( $1 \times 10^6$ ) de las línea T se incubaron con anticuerpos monoclonales contra los marcadores celulares CD3 (AcMn OKT3) B), CD4 (AcMn OKT4) C), CD8 (AcMn OKT8) D) y  $\gamma/\delta(\gamma 1)$  F), como segundo anticuerpo se usó un anti-IgG murino marcado con isotiocianato de fluoresceína. Para el receptor de antígeno  $\alpha/\beta$  E) se utilizó un Ac obtenido en ratón acoplado a fluoresceína.





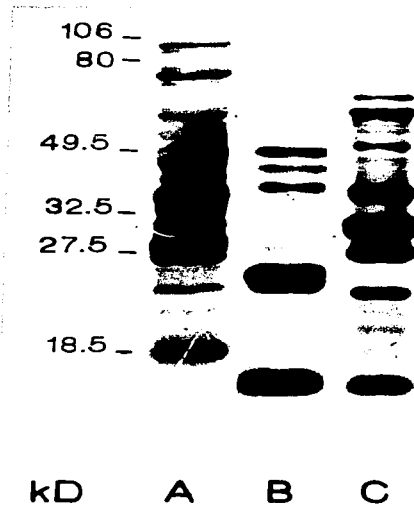
**Figura 11.**

Proliferación de clonas a las Gps 38 y 50-55. Células de las clonas T ( $2 \times 10^4$ ) fueron cultivadas con  $5 \times 10^4$  células presentadoras de antígeno tratadas con mitomicina, IL-2r a 20 U/ml y diferentes concentraciones de Ag. Incubadas por 3 días y marcadas con 0.5  $\mu$ Ci/pozo de [<sup>3</sup>H] timidina por las últimas 18 hrs.

se puede observar que las clonas A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> no responden a los antígenos a las concentraciones probadas, a diferencia de lo observado con las clonas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, las que respondieron tanto a la Gp 38 como a la Gp 50-55 y aun en ausencia de antígeno por lo tanto A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> no son específicas del antígeno. Hay que señalar que la respuesta a fitohemaglutinina de todas las clonas fué normal. De otros ensayos se obtuvieron 5 clonas, denominadas como A<sub>8</sub>, A<sub>9</sub>, A<sub>16</sub>, A<sub>18</sub> y A<sub>20</sub>, con una probabilidad de monoclonalidad  $\geq 70\%$ . Las clonas se expandieron en placas de 6 pozos y se realizó un ensayo de proliferación con las Gps 38 y 50-55 con y sin IL-2r, en el que no se observó respuesta específica a los antígenos, ya que la proliferación inducida por IL-2 r no aumentó cuando se adicionaba antígeno. De las 9 clonas derivadas ninguna proliferó contra las glicoproteínas de interés.

## 6. OBTENCIÓN DE OTRAS LÍNEAS T

Ante el fracaso de la clonación por dilución limitante de la línea T contra la F<sub>4</sub>, se pensó en la posibilidad de derivar líneas contra una fracción enriquecida en glicoproteínas obtenida por una columna de Con A. Esta fracción se obtiene en cantidades suficientes para realizar ensayos de transformación blástica y son abundantes en ella las Gps 38 y 50-55 (Figura 12). Para determinar la concentración óptima de antígeno y el día de proliferación máxima, se realizó un ensayo de transformación blástica utilizando 10, 30 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno. En este experimento se trabajó con 3 donadores vacunados con BCG, 2 con reacción PPD+ y 1 sin reacción al PPD (Figura 13), de los que se obtuvieron 3 líneas T (una de cada uno). Obtener una fracción de Gps utilizando una lectina que a la vez es mitógeno implica el riesgo de que la fracción esté contaminada y de que la estimulación desarrollada sea en respuesta al mitógeno. Ante la posibilidad de que Con A desprendida de la columna al eluir con  $\alpha$ -metilmanósido estuviera contaminando al antígeno y fuera responsable de la respuesta blástica observada, se hizo un ensayo de proliferación utilizando una de las líneas obtenidas para determinar si tal cosa ocurría. En la Figura 14 se puede observar que la fracción enriquecida en glicoproteínas está contaminada con Con A, al inhibirse la respuesta de la línea



**Figura 12.**

**Immunoblot de la fracción enriquecida en Gps del EP de *M. tuberculosis*. EP revelado con suero anti-EP (A); fracción enriquecida en Gps eluida de una columna de Con A (B); fracción acoplada inespecíficamente eluida con NaCl 0.5 M (C).**

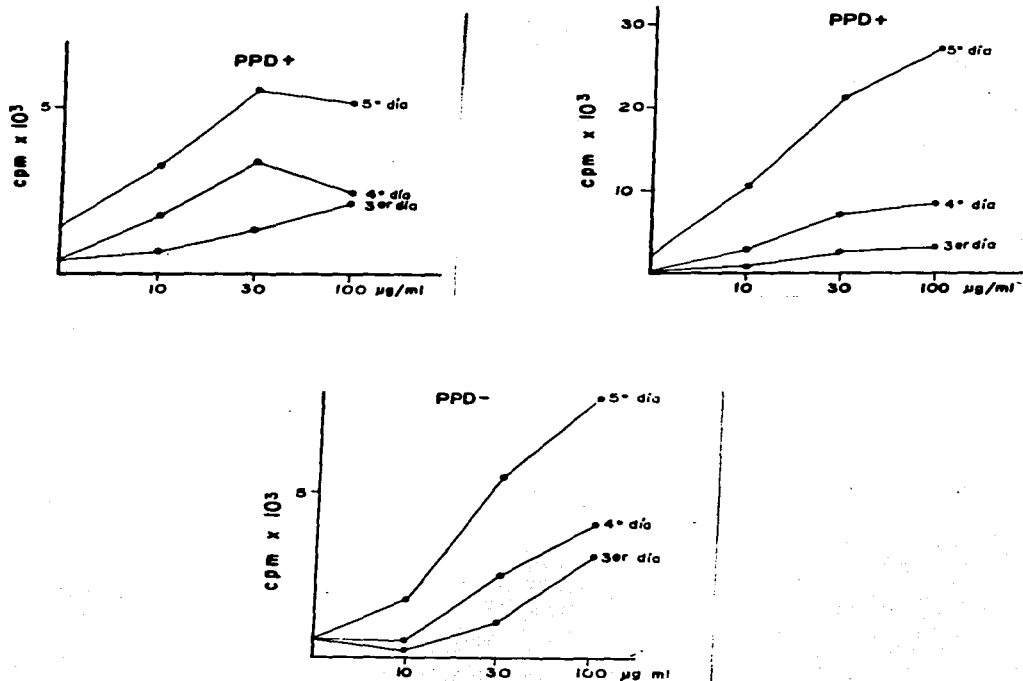
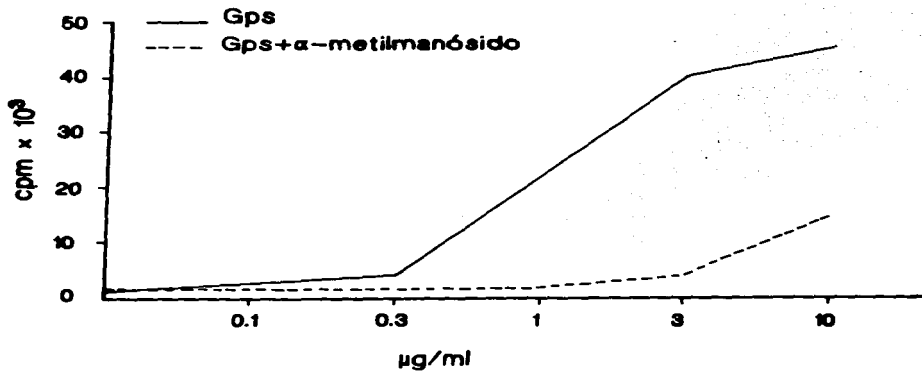


Figura 13.

Cinética de la proliferación de CMP de 3 donadores sanos a una fracción enriquecida con Gps obtenida por cromatografía de afinidad con Con A.  $1 \times 10^6$  células/ml fueron incubadas a tres concentraciones de Ag, la proliferación se determinó por incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina (0.5 µCi/pozo).



**Figura 14.**

Proliferación de células T a la fracción unida a Con A.  $1 \times 10^6$  CMP/ml fueron incubadas a distintas concentraciones de la fracción enriquecida en Gps, en presencia o ausencia de 0.025 M de  $\alpha$ -metilmanósido, durante 5 días. La proliferación se determinó por incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina.

en presencia de  $\alpha$ -metilmanósido. Por lo tanto, esta fracción a pesar de poseer casi exclusivamente Gp 38 y Gp 50-55 no es la adecuada para el desarrollo de líneas T.

## **7. PURIFICACIÓN DE Gp 50-55 POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON UN AcMn**

Paralelo a este trabajo, en el laboratorio se aisló un AcMn contra Gp 50-55 obtenido en ratones BALB/c (Espitia, 1995), lo que permitió purificar por cromatografía de afinidad a Gp 50-55 a partir de EP con un buen rendimiento.

### **7.1 Purificación del AcMn**

Para obtener grandes cantidades de AcMn, el hibridoma se inyectó en ratones BALB/c, y se obtuvo el líquido de ascitis. Para confirmar que en este último contenía el anticuerpo, se sometieron las diferentes muestras del líquido de ascitis a una electroforesis en gel de acrilamida al 7.5%, en condiciones no desnaturalizantes y no reductoras. En la Figura 15 se observa que en todas las muestras hay una buena cantidad de inmunoglobulina, por lo que se reunieron y el anticuerpo se purificó por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa). En la Figura 16 se muestra el cromatograma de la purificación de este AcMn el cual eluye entre 20 y 400 mM de NaCl. La pureza se verificó por electroforesis teñida con azul Coomassie (Figura 17). El Ac purificado se acopló a Affi-gel 10 obteniendo un 98% de acoplamiento. La columna se resuspendió al 10% en PBS, pH 7.4, NaN<sub>3</sub> 0.1%.

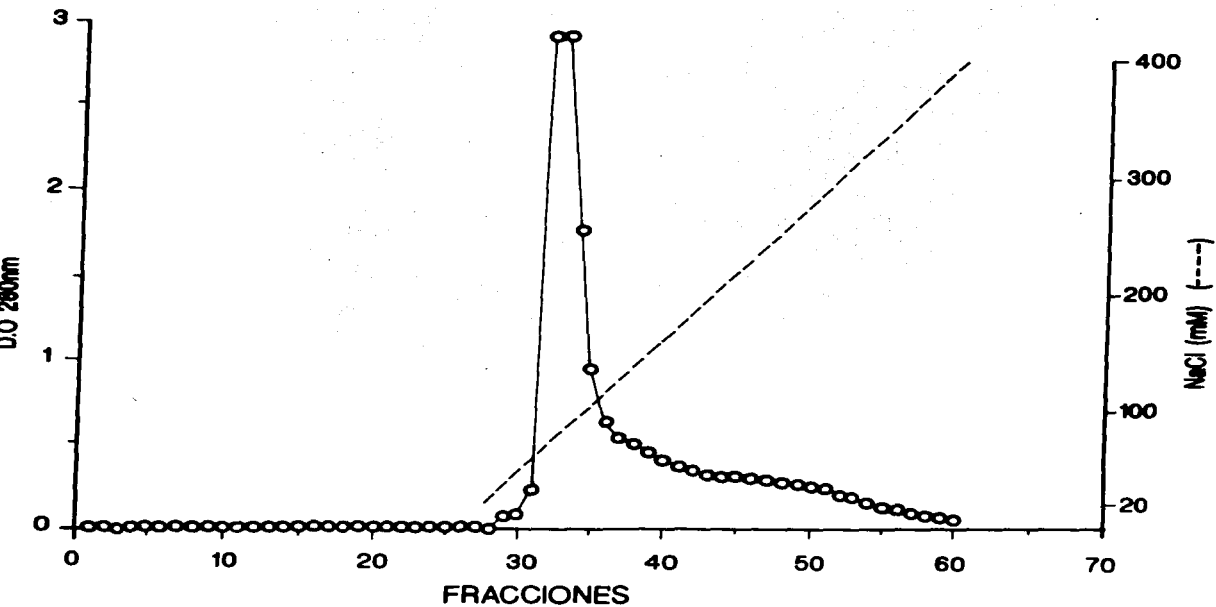
### **7.2 Cromatografía de afinidad con el AcMn 6A3**

Para determinar las condiciones óptimas del acoplamiento y elución de Gp 50-55 se realizaron ensayos preliminares en tubos Eppendorf. En primer lugar se probó la capacidad del AcMn acoplado a la columna para unir a la proteína, y la factibilidad de eluir al antígeno. En este experimento, 120  $\mu$ g de EP se incubaron con 60  $\mu$ l de gel (correspondientes a 65  $\mu$ g de AcMn 6A3) en PBS, pH 7.4 a 4°C, en agitación durante toda la noche. Posteriormente se



Figura 15.

Líquidos de ascitis de ratones Balb/c inyectados con el hibridoma 6A3. La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 7.5% en condiciones no reductoras y teñido con azul de Coomassie G250. La flecha indica la posición de la IgG.



**Figura 16.**  
Purificación del AcMn 6A3 en una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa por un gradiente de NaCl (20-400 mM)



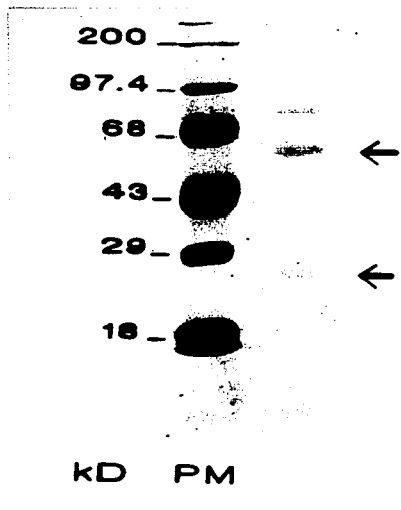


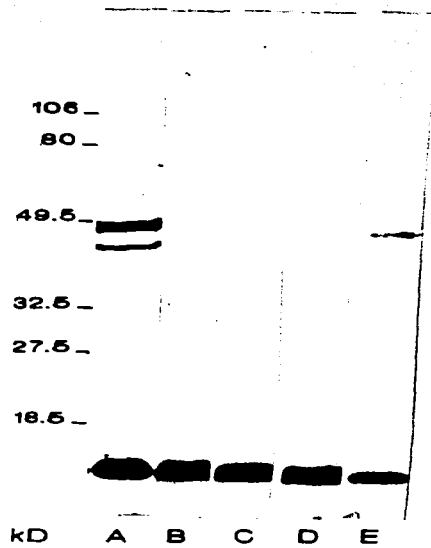
Figura 17.

AcMn purificado por cromatografía de intercambio iónico. La electroforesis se realizó en un gel al 10% SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Las flechas indican la posición de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina.

realizaron 3 lavados con PBS, pH 7.4 y se eluyó con el buffer de SDS-urea 8M (apéndice 22); el sobrenadante de la incubación, lavados y el material eluido se aplicaron a un gel al 10% y se analizaron por inmunoblot revelado con el AcMn. En este experimento (Fig. 18) se pudieron determinar las condiciones de incubación para la cromatografía de afinidad y además se comprobó la factibilidad de eluir a la Gp 50-55 de la columna.

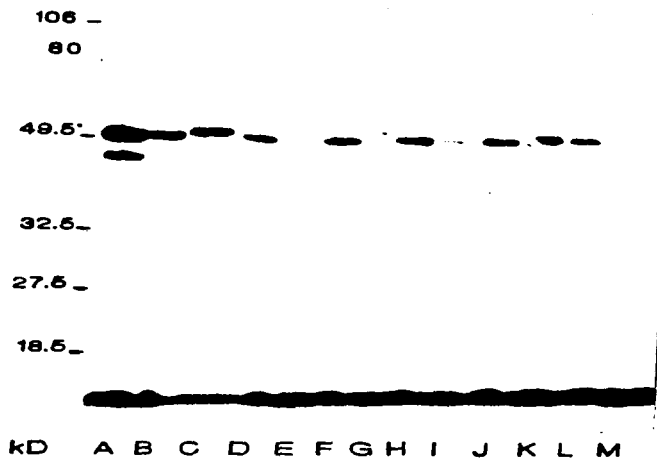
La elución es usualmente el paso más difícil en la cromatografía de afinidad, en donde el objetivo es obtener a la proteína como un producto estable, activo y con alta pureza. Para el experimento anterior se usó como eluyente un buffer de SDS-urea 8 M que se utilizó sólo como control, pues la presencia de SDS imposibilitaría su uso *in vitro*. Para identificar el mejor método de elución se probaron los siguientes eluyentes: buffer de urea 8 M sin SDS, buffer de urea 4 M sin SDS, agua bidestilada, ácido acético 0.1 N,  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M y glicina 0.1 M+NaCl 0.15M/HCl pH 2.6. Para este ensayo las mini-columnas se incubaron con EP, se lavó como en el experimento anterior y las fracciones eluidas se analizaron por inmunoblot o con el AcMn 6A3. En la Figura 19 se puede observar que la única solución exitosa fue la de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M (carril K). En los demás carriles se observan trazas de proteína, pero esto se debe probablemente a que se trabajó con excesos de EP que no son completamente eliminados durante los lavados, o a que los eluyentes logran despegar pequeñas cantidades de proteína, siendo el mejor en este caso el  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5M.

Para establecer la molaridad óptima de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , para eluir a la proteína se probaron concentraciones menores (0.5 , 0.4 , 0.3 , 0.2 , 0.1 M). En la Figura 20 se observa que con todas las concentraciones probadas la proteína fue eluida, por lo que se determinó usar el  $\text{NH}_4\text{OH}$  a la concentración mínima necesaria (0.1 M). En la misma Figura se observan algunos contaminantes en la fracción eluida que probablemente se unen inespecíficamente a la columna, ya que anteriormente se había probado que el AcMn 6A3 sólo reconoce a Gp 50-55. Para eliminar estos contaminantes se utilizó Tris 25 mM pH 7.5 + NaCl 0.5M + Tritón X100 2% como solución de lavado previa a la elución. En la Figura 21 se observa que los



**Figura 18.**

**Inmunoblot revelado con el AcMn 6A3. El EP se incubó con la columna a 4°C durante toda la noche, para posteriormente lavar y eluir. EP (A); sobrenadante de la incubación (B); 1<sup>er</sup> lavado con PBS pH 7.4 (C); 2° lavado (D); elución con SDS-urea 8 M (E).**



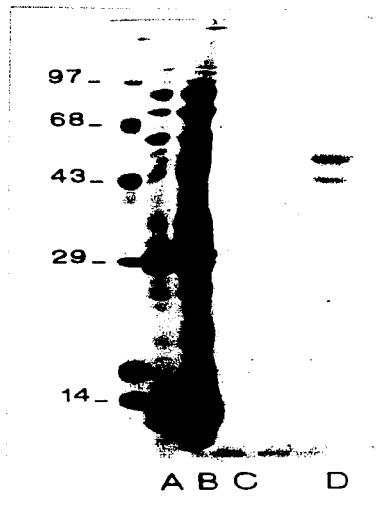
**Figura 19.**

**Determinación del eluyente para Gp 50-55 de la columna de afinidad. Inmunoblot revelado con el AcMn 6A3. EP (A); sobrenadantes de las incubaciones del EP con la columna (B, D, F, H, J, L) y de las eluciones con: SDS-urea 8 M (C); urea 8 M (E); urea 4 M (G); ácido acético 0.1 N (I);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M (K) y glicina 0.1 M + NaCl 0.15 M/HCl pH 2.6 (M).**



**Figura 20.**

**Ensayo para determinar la concentración óptima del eluyente de la cromatografía de afinidad. Inmunoblót revelado con suero anti-EP. EP (A); sobrenadante de las incubaciones del EP (B, D, F, H, J, L); fracciones eluidas con diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{OH}$ : elución con SDS-urea 8 M (C);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.5 M (E);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.4 M (G);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.3 M (I);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.2 M (K);  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.1 M (M).**



**Figura 21.**

**Purificación de Gp 50-55 por cromatografía de afinidad. Gel teñido con azul Coomassie de las fracciones de la cromatografía. EP (A); lo no acoplado (B); lavado con Tritón X-100 al 2% + NaCl 0.5 M + Trizma base 0.25 mM pH 7.5 (C); proteína purificada (D).**

contaminantes son eliminados durante los lavados con la solución antes mencionada, obteniéndose la Gp 50-55 pura.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la cromatografía de afinidad, se montó la columna abierta (como se describe en Materiales y Métodos 6.6) con capacidad para 19.39 mg de proteína. En la Figura 22 se muestra el cromatograma de la purificación donde se observa el pico de elución. Las fracciones correspondientes a este pico se reunieron, se verificó la pureza de la proteína por inmunoblot al revelar con suero anti-EP (Figura 23); se realizó también una tinción con azul Coomassie (Figura 21) y por ambos métodos se observó la Gp 50-55 sin bandas contaminantes. El inmunoblot de la Figura 24, revelado con el anticuerpo monoclonal nos muestra que el pico de elución corresponde a Gp 50-55, además de que ha sido absorbida completamente del EP. Con este método de purificación se logró determinar que Gp 50-55 corresponde aproximadamente al 2% del EP.

Para determinar si en la fracción eluida hay contaminación con el AcMn, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) y se transfirió a nitrocelulosa, el inmunoblot se incubó únicamente con anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa, en la Figura 25 se puede observar la banda que corresponde a las cadenas pesadas de la IgG.

## **8. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS**

En vista de que Gp 50-55 ha sido considerada en nuestro laboratorio como una glicoproteína con residuos de manosa (Espitia, 1991), en este trabajo quisimos corroborarlo con la proteína purificada por cromatografía de afinidad. Para lo que hicimos estudios de inmunoblot que muestran que la proteína purificada reaccionan con Con A marcada con peroxidasa (Figura 26) y por el método de Dubois se demostró un 9.2% de carbohidratos.

## **9. RESPUESTA HUMORAL A Gp 50-55.**

Una vez que obtuvimos la Gp 50-55 determinamos la respuesta inmune humoral en pacientes tuberculosos y en personas sanas vacunadas. Para este fin se realizó un ELISA

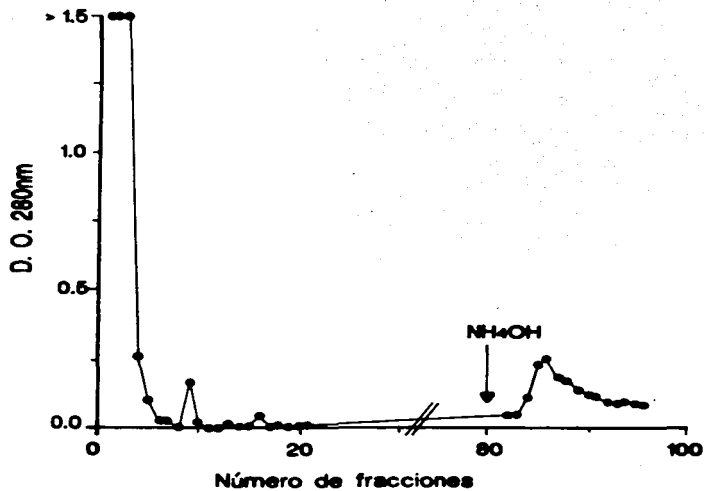
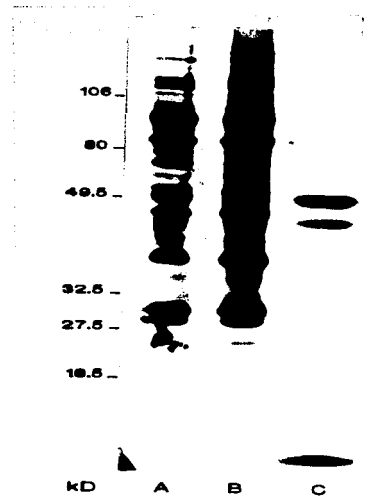
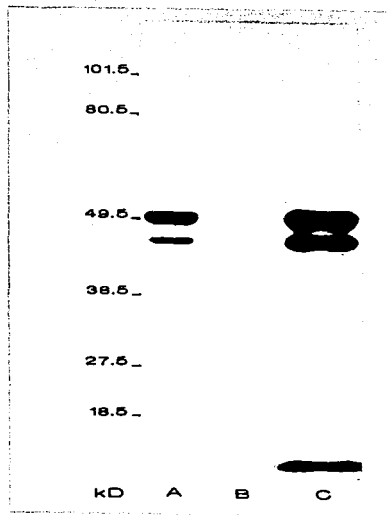


Figura 22.  
Cromatograma de la purificación de Gp 50-55 a partir del EP de *M. tuberculosis* H37/Rv, utilizando el AcMn 6A3.



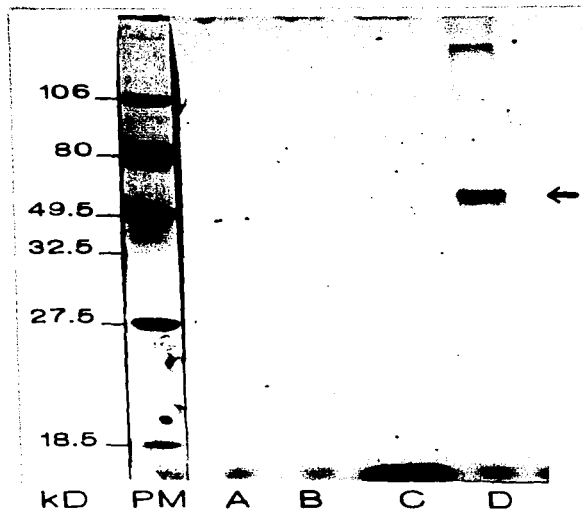


**Figura 23.**  
Verificación de la pureza de Gp 50-55 obtenida por cromatografía de afinidad. Inmunoblot de la purificación, revelado con suero anti-EP; EP (A); fracción no acoplada a la columna (B); fracción eluida con NH<sub>4</sub>OH 0.1 M (C).

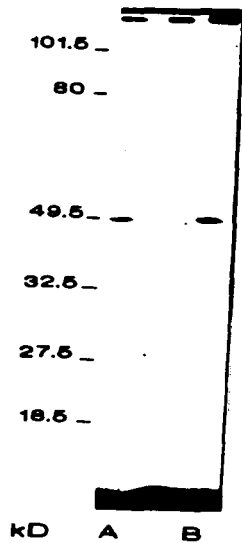


**Figura 24.**

**Purificación de Gp 50-55. Inmunoblot de las fracciones de la cromatografía de afinidad revelado con el AcMn 6A3. EP (A); fracción no acoplada a la columna (B) y fracción eluida con  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.1 M (C).**



**Figura 25.**  
Inmunoblot para determinar contaminación con el AcMn 6A3 durante la purificación de Gp 50-55. EP (A); fracción no acoplada a la columna (B); Gp 50-55 (C) y AcMn 6A3 (D), se reveló con anti-IgG murina.



**Figura 26.**

**Immunoblot de la reacción de la proteína purificada por cromatografía de afinidad con Con A marcada con peroxidasa. Gp 50-55 eluida con urea 6 M de una fracción enriquecida en Gps (A); Gp 50-55 purificada por afinidad con el AcMn 6A3 (B).**

utilizando 79 sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar y 54 sueros de personas sanas (Figura 27). Se puede observar que la Gp 50-55 al parecer es un antígeno muy pobre para inducir respuesta inmune humoral, en pacientes con tuberculosis se observaron títulos de anticuerpos bajos con una densidad óptica media de 0.503 con una SD de 0.29 y para los individuos sanos fue de 0.261 y una SD de 0.11. El punto de corte se estableció con dos desviaciones estándar por encima del valor de la media; con lo que se obtuvo una especificidad alta de 0.95 pero la sensibilidad fué muy baja (0.33).

En los resultados obtenidos con el EP el 64% de los sueros de enfermos tuberculosos sobrepasan la media ( $\bar{x} = 0.78$ ) y algunos de ellos alcanzan lecturas  $> 2.9$ ; el 94.5% de los sueros de personas sanas dan lecturas menores a la media ( $\bar{x} = 0.78$ ).

#### **10. RESPUESTA INMUNE CELULAR A Gp 50-55**

Se analizó la respuesta de células T a Gp 50-55 en 14 individuos: 4 pacientes con tuberculosis pulmonar y 10 individuos sanos; 8 de estos últimos vacunados con BCG y 2 sin vacunación con BCG. Para los ensayos de transformación blástica se utilizaron  $1 \mu\text{g/ml}$  de Gp 50-55 y como control EP ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) y fitohemaglutinina (1:300). Las células se cosecharon a los 7 días, 18 horas antes se marcaron con [ $^3\text{H}$ ]-Timidina ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) los resultados se expresan como índices de estimulación (IE). Los resultados (Figura 28) muestran que todos los individuos sanos vacunados con BCG responden al EP ( $\bar{x} = 15.86$ ) y 5 de 8 a Gp 50-55 ( $\bar{x} = 5.2$ ). De los 4 pacientes tuberculosos uno fue anérgico tanto al EP como a Gp 50-55 y los tres restantes respondieron a ambos antígenos (EP  $\bar{x} = 22.97$ , Gp 50-55  $\bar{x} = 5.4$ ), tal vez esto se relacione con la gravedad de la enfermedad, ya que el paciente anérgico presentaba un cuadro clínico de daño severo, en tanto que el enfermo con mayor respuesta al EP y a Gp 50-55 respondió satisfactoriamente al tratamiento. Ninguno de los 2 individuos sanos no vacunados con BCG respondió a Gp 50-55 ( $\bar{x} = 2.14$ ) y solo uno de ellos respondió débilmente al EP ( $\bar{x} = 2.5$ ).

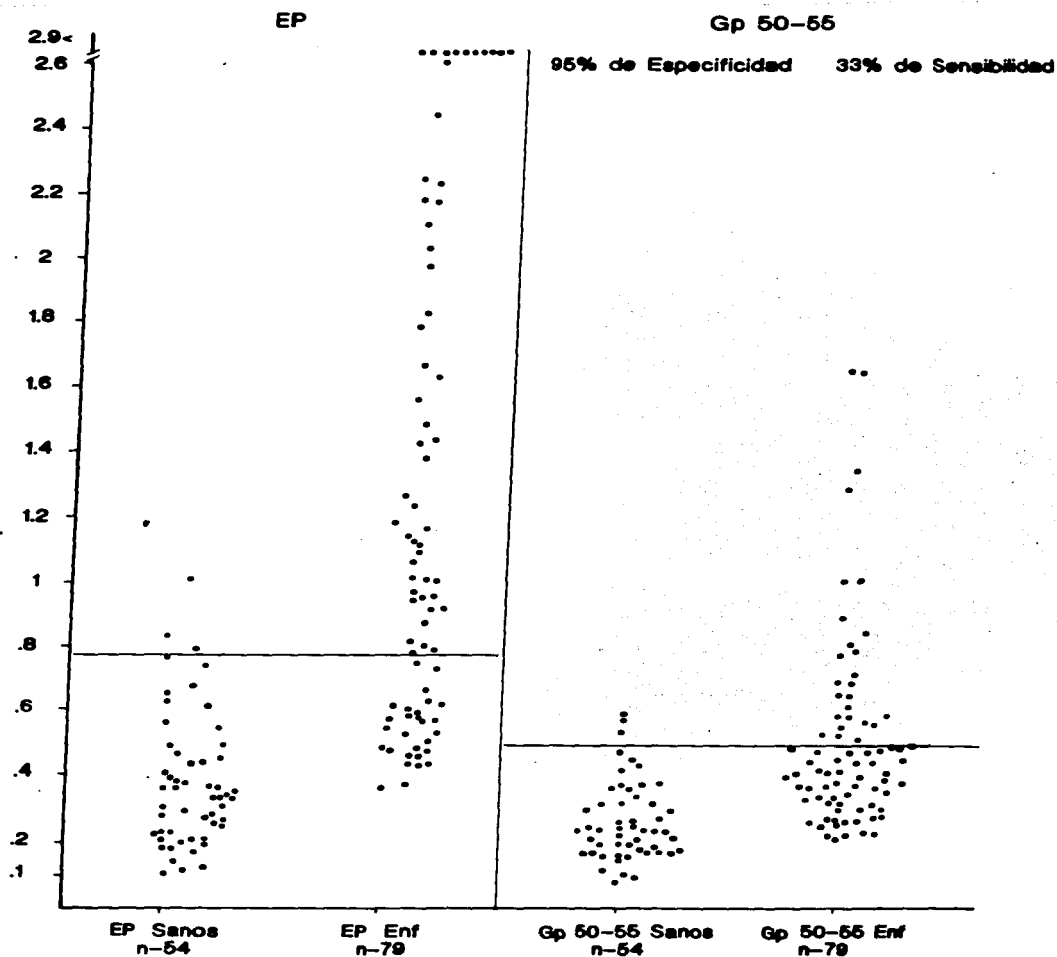


Figura 27.

ELISA con Gp 50-55. Se utilizaron 79 sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar. El grupo control estuvo constituido por 54 individuos sanos. Los pozos se cubrieron con 0.5 mg de Ag y los sueros se diluyeron 1:500.

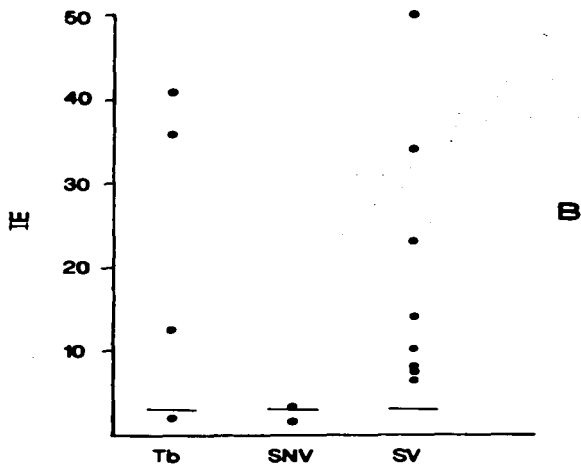
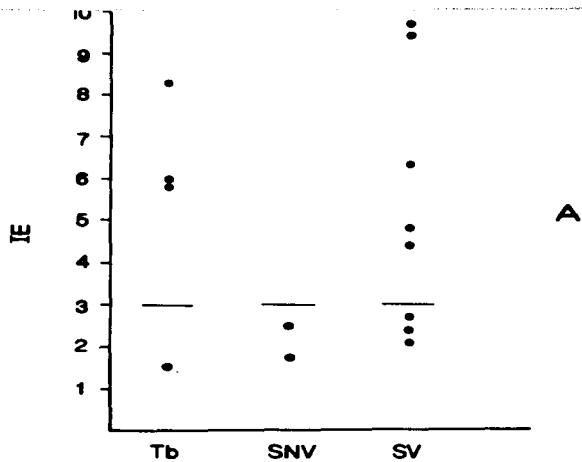


Figura 28.

Respuesta celular a Gp 50-55 (A) y al EP de *M. tuberculosis* (B). Se utilizaron CMP de individuos enfermos con tuberculosis pulmonar (Tb) e individuos sanos vacunados (SV) con o no (SNV) con BCG. Las células se estimularon con 1  $\mu\text{g/ml}$  de Gp 50-55 y con 10  $\mu\text{g/ml}$  de EP. Los resultados se expresan como

## VI. DISCUSIÓN

Durante los últimos años ha habido un interés creciente en caracterizar a nivel molecular al agente causal de la tuberculosis. Se piensa que este conocimiento permitiría identificar moléculas involucradas en diversos aspectos de la patogénesis de la tuberculosis como son la virulencia, infectividad y la capacidad de inducir una respuesta inmune. En particular ha habido interés en identificar antígenos que permitan desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y de vacunación. En la última década hubo un considerable adelanto en el conocimiento de la estructura molecular de *M. tuberculosis* gracias al advenimiento de técnicas modernas de purificación de proteínas, la disponibilidad de anticuerpos monoclonales y más recientemente la biología molecular ha permitido la clonación de genes y la obtención de proteínas recombinantes.

En nuestro laboratorio ha habido mucho interés en estudiar antígenos micobacterianos. Así, en 1989 se hicieron observaciones pioneras que indicaban que algunas de las proteínas de *M. tuberculosis* estaban glicosiladas. Específicamente se demostró que las proteínas de 38 y 50-55 kD poseían carbohidratos que reaccionaban de manera específica con Con A indicando la presencia de residuos de manosa o de glucosa (Espitia y Mancilla, 1989). Estudios posteriores más refinados usando endoglicosidasa vinieron a apoyar la tesis de que Gp 50-55 era una glicoproteína (Espitia y col., 1995) y más recientemente se demostró en otro laboratorio la unión covalente de carbohidratos y polipéptidos en la Gp 50-55. También se han obtenido evidencias de que las proteínas de *M. tuberculosis* de 19 y 10 kD están también glicosiladas (Garbe, 1993). Estos hallazgos son importantes, pues aun cuando se ha demostrado claramente la presencia de glicoproteínas en archaeobacterias, en eubacterias son recientes las evidencias de glicosilación (Wu, 1986). Por ejemplo, después de la hidrólisis suave de una presunta glicoproteína de *Bacillus stearothermophilus* con ácido fluorhídrico, se identificaron residuos de rhamnosa. La tinción de Schiff y la unión a lectinas después de una electroforesis (SDS-PAGE) también se han usado para sugerir la presencia de glicoproteínas y se han encontrado entre los antígenos de pared de *Streptococcus sanguis* (Morris, 1987; Weerkamp, 1982), *Streptococcus faecium* (Kawamura, 1983) y *Streptococcus pyogenes* (Bencheur, 1978), *Myxococcus xanthus* (Maeba, 1986), *Micrococcus*



*lysodeikticus* (Andreu, 1978), *Clostridium acetobutylicum* (Erickson, 1993), *Bacillus stearothermophilus* (Messner, 1988), *Bacillus magaterium* (Taku, 1976) y *Bacillus thuringiensis* (Bulla, 1977). Debido a que la unión a lectinas y la tinción con PAS, pueden identificar una asociación carbohidrato-proteína, esto no garantiza que se trate de una unión covalente, por lo que se ha trabajado en obtener evidencias directas de uniones covalentes entre proteínas de eubacterias y carbohidratos. En la proteína purificada de 115 kD de *S. sanguis* se encontró el 39% de carbohidratos por HPLC. La asociación covalente de carbohidratos en esta proteína de pared se demostró usando inhibidores específicos de la síntesis de carbohidratos, por el tratamiento con glicosidasas y el análisis de aminoácidos y carbohidratos en glicopéptidos pequeños por resonancia magnética nuclear (Erickson, 1993). Recientemente se han obtenido evidencias de glicosilación en una proteína de *M. tuberculosis* de 45 kD por espectrometría de masas (Dobos, 1995). Esta glicoproteína es reconocida por el anticuerpo monoclonal 6A3 obtenido en nuestro laboratorio en contra de Gp 50-55 lo que al podría indicar que la proteína de 45 kD es parte del complejo que nosotros hemos estudiado. En la proteína de 45 kD se encontró 4% de carbohidratos (peso/peso) (Dobos, 1995) y en el doblete de 50-55 kD purificado por cromatografía de afinidad encontramos un 9.2% de carbohidratos. En la proteína purificada por elución con urea 6 M se determinó el 34.6%, lo que indicaría una probable contaminación con lipoarabinomanana unida no covalentemente.

El objetivo inicial de esta tesis era estudiar la inmunogenicidad de las glicoproteínas de 38 y 50-55 kD, sobre todo a nivel celular. Para lo anterior, se obtuvo *in vitro*, a partir de células de sangre periférica de donadores sanos vacunados con BCG, una línea celular que es estimulada por una fracción rica en glicoproteínas. Esta fracción se obtuvo del extracto total del medio de cultivo por el método de Seibert. Una vez establecida la línea se determinó su respuesta a la fracción enriquecida y se observó proliferación celular. De la línea, se obtuvieron clonas por dilución limitante estimulando con fitohemaglutinina; posteriormente se analizó la especificidad de las clonas contra las glicoproteínas nativas purificadas, no observándose proliferación en contra de la fracción enriquecida, del extracto proteico o de las glicoproteínas de 38 y 50-55 kD purificadas por elución de geles preparativos. El no haber aislado clonas específicas podría deberse a que las condiciones de clonación no fueron

apropiadas o al tiempo prolongado de cultivo, ya que se ha observado que después de dos meses puede haber "crisis" durante las cuales baja el rango de crecimiento y si las células sobreviven y se expanden inespecíficamente responden sólo a IL-2 lo cual puede reflejar inestabilidad del cultivo asociado a anomalías cariotípicas (Hudson, 1989; Coligan, 1991). Otra posibilidad sería una baja frecuencia de células específicas en contra de las glicoproteínas en sangre periférica. Esto es apoyado por la observación en enfermos tuberculosos, en los que se encontró baja frecuencia de células específicas a PPD en linfocitos de sangre periférica, en contraste a su alta frecuencia en linfocitos de lavado pleural (Manca, 1991).

Los problemas que se tuvieron para establecer las clonas T específicas para las glicoproteínas de 38 y 50-55 podrían eliminarse si se trabajara con proteínas purificadas por cromatografía de afinidad, lo que descartaría la posibilidad de que la proliferación de células T que responden a otras proteínas o lipoglicanos presentes en las fracciones probadas interfiera con la respuesta a los antígenos de interés.

Ante las dificultades para obtener clonas específicas en contra de las glicoproteínas presentes en la fracción enriquecida se optó por trabajar únicamente con Gp 50-55 aprovechando que en el laboratorio se cuenta con un anticuerpo monoclonal. Por otra parte, esta proteína posee atributos suficientes para considerarla biológicamente relevante. Hay observaciones que indican que se trata de un antígeno de secreción inmunodominante tanto a nivel celular como humoral (Romain, 1992; 1993). Otra evidencia que indicaría un papel relevante en la interacción huésped-parásito es su localización y abundancia en la pared de la bacteria como se ha demostrado en nuestro laboratorio por digestión con lisozima y por inmunoelectromicroscopía ( Espinoza R. y col., datos no publicados).

El contar con el anticuerpo monoclonal hizo factible purificar Gp 50-55 por cromatografía de afinidad directamente del extracto proteico de manera rápida, eficiente y con un alto grado de pureza, debido esto a que el monoclonal reconoce únicamente a esta proteína. Cuando se seleccionó el eluyente y se afinaron las condiciones de purificación, se trató de mantener el menor tiempo posible al antígeno en contacto con el  $\text{NH}_4\text{OH}$  que fué el eluyente seleccionado, neutralizando inmediatamente, la proteína purificada retuvo su antigenicidad y su capacidad para reaccionar con Con A.

Los antígenos secretados, como parece ser Gp 50-55, podrían jugar un papel importante en la virulencia y en la inducción de respuesta inmune celular y humoral. Así mismo hay datos que indican que los antígenos secretados por *Mycobacterium tuberculosis* son importantes en la inducción de respuesta inmune protectora, como lo demuestra el hecho que la bacteria viva es más eficiente que la bacteria muerta induciendo inmunidad protectora (Orme, 1988). Se ha observado que las proteínas de 10 y 19 kD, las cuales son secretadas por *M. tuberculosis*, inducen proliferación de células T en humanos (Barnes, 1992; Torres, 1994).

Una vez purificada la proteína se procedió a analizar su antigenicidad. En primer lugar se estudió la respuesta humoral de pacientes con tuberculosis lo cual se realizó por ELISA. Nassau y colaboradores fueron los primeros en reportar la técnica de ELISA para el serodiagnóstico de la tuberculosis (Daniel, 1987) usando el filtrado del medio de cultivo de *M. tuberculosis* H37/Rv, encontrando una especificidad de 0.979 y una sensibilidad de 0.565; Otros investigadores han reportado resultados similares utilizando diversas preparaciones antigénicas así como proteínas puras. En nuestro laboratorio hemos demostrado niveles muy altos de especificidad y sensibilidad utilizando diversas proteínas purificadas del medio de cultivo. Para utilizar con amplia confiabilidad el ELISA se necesita mejorar al máximo la especificidad, usando antígenos no compartidos con micobacterias ambientales o con otros patógenos. Se pensó que Gp de 50-55 podría ser un buen candidato para el inmunodiagnóstico, ya que al parecer el epítipo reconocido por el AcMn 6A3 está presente solamente en *M. tuberculosis* y BCG (Espitia, 1995), lo que podría indicar restricción de especie.

En el ELISA realizado con Gp 50-55 purificada por afinidad se obtuvo una especificidad muy alta (0.94) y una sensibilidad muy baja ( 0.33), por lo que podría concluirse que este antígeno no es un buen candidato para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis, a diferencia de lo reportado con otros antígenos purificados. En estudio de ELISA previo realizado con Gp 50-55 se obtuvieron títulos diagnósticos con 70% de los sueros de pacientes con tuberculosis y con solo el 2% de sueros de individuos sanos (Espita, 1995), esto podría deberse que en ese estudio la Gp 50-55 se obtuvo por elución de geles preparativos con urea, lo cual podría haber resultado en contaminación con otros antígenos, específicamente

esta proteína migra a la misma distancia en los geles de acrilamida que glicoconjugados no proteicos, que reaccionan con sueros de individuos tuberculosos (Sada, 1990)

En los estudios de transformación blástica se encontró que Gp 50-55 es buena inductora de inmunidad celular, ya que las células de 3 de 4 pacientes con tuberculosis pulmonar proliferaron intensamente *in vitro*. Hay que mencionar que estos pacientes estaban respondiendo adecuadamente al tratamiento. En cambio el paciente que no respondió, tenía tuberculosis muy activa y extensa. En cuanto a la respuesta de los controles sanos, 5 de 8 vacunados con BCG respondieron, mientras que los no vacunados no respondieron. Nuestros hallazgos difieren de otros reportados en la literatura en los cuales se ha encontrado generalmente una respuesta inmune celular mucho mayor en sujetos sanos que en enfermos. Sin embargo hay observaciones que concuerdan con nuestros hallazgos. En un estudio reciente (Torres, 1994) no se encontraron diferencias en la respuesta a diferentes fracciones de antígeno de *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis activa y en contactos sanos; una excepción fue la fracción 14-19 kD la cual indujo una respuesta mayor en pacientes tuberculosos. En cambio la respuesta a la proteína de choque térmico de 64 kD fue semejante en pacientes y contactos sanos, por lo que podría pensarse que tiene un papel limitado en la respuesta inmune protectora (Torres, 1994). El antígeno 6/a el cual corresponde a la proteína de 30 kD no induce transformación blástica en pacientes con tuberculosis, pero sí en donadores sanos, por lo que se podría especular sobre su participación en inmunidad protectora (Havlir, 1991).

Se ha pensado que las proteínas secretadas, así como las proteínas somáticas son esenciales para la inducción de resistencia a la infección por *M. tuberculosis*. Recientemente se comparó la respuesta de CMP a proteínas secretadas de 10 y 38 kD y a proteínas de choque térmico de 65 y 71 kD. Se observó que las células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos tuberculina positivos responden a ambos antígenos secretados, pero en mayor intensidad a la proteína de 10 kD y de las proteínas de choque térmico de 65 kD fue la más inmunogénica. También se observó que la reactividad inducida por el antígeno de 10 kD fue similar a la inducida por el BCG completo, se cree que esta proteína posee epitopos T compartidos con micobacterias ambientales (Barnes, 1992; Mendez, 1995).

**Podría concluirse que la Gp 50-55 es un antígeno buen inductor de inmunidad celular en sujetos que han sido expuestos al bacilo, ya sea por vacunación con el BCG o por infección, aún cuando hay que señalar que la respuesta es más intensa en sujetos sanos que en enfermos. De este estudio no es posible concluir si la inmunidad inducida por la Gp 50-55 es inmunoprotectora. Para avanzar en este sentido sería conveniente caracterizar cualitativamente la respuesta en los dos grupos, determinando si es Th1 o Th2.**

## VII. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio acerca de la Gp 50-55 son las siguientes:

- Está abundantemente representada en el medio de cultivo ( 2 % ) lo cual sugiere que se trata de una proteína de secreción.
- Es posible purificar la Gp 50-55 por cromatografía de afinidad con un anticuerpo monoclonal con un alto grado de pureza, además se logró determinar que esta posee 9.2% de carbohidratos, que conserva su reactividad con Con A y preserva su antigenicidad.
- Esta glicoproteína es capaz de inducir *in vitro* la proliferación de linfocitos de individuos sanos vacunados con BCG, así como de pacientes con tuberculosis pulmonar.
- La Gp 50-55 es poco inmunogénica a nivel humoral, ya que solo el 33% de los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar tuvieron títulos altos de anticuerpos por ELISA.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- American Thoracic Society.** 1990. Center for disease control. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142:725-735.
- Andersen, P.** 1994. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect. Immun.* 62:2536-2544.
- Andersen, P. and I. Heron.** 1993. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 61:844-851.
- Andersen, P., D. Askgaard, A. Gottschau, J. Bennedgen, S. Nagai and I Heron.** 1992. Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J. Immunol.* 36:823 -831.
- Andersen, P., D. Askgaard, L. Ljungqvist, M.W. Bentzon and I. Heron.** 1991. T cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 59:1558-1563.
- Andreu, J. M., R. Warth and E. Muñoz.** 1978. Glycoprotein nature of energy-transducing ATPases. *FEBS Lett.* 86:1-5.
- Ashbridge, K.R., R. J. Booth, J. D. Watson and R.B. Lathigra.** 1989. Nucleotide sequence of the 19 kDa antigen gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids. Res.* 17:1249.
- Balestrino, E. A., T. M. Daniel, M. D. S. De Latini, O. A. Latini, Y. Ma, B. Scoozza.** 1984. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull. W.H.O.* 62:755-761.
- Barkley, W. E., G. P. Kubica.** 1994. Biological safety in the experimental tuberculosis laboratory. In B. R. Bloom, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. ed ASM Press, Washington, DC. 61-71.

- Barnes, P., V. Mehra, B. Rivoire, S. Fong, P. Brennan, M. Voegtline, P. Minden, R. Houghteng, B. Bloom and R. Modlin.** 1992. Immunoreactivity of a 10-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 148:1835-1840.
- Benchetrit, L. C., E. D. Gray, R. D. Edstrom and L W. Wannamaker.** 1978. Purification and characterization of a hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of group A, type 49 streptococci. *J Bacteriol.* 134:221-228.
- Benjamin, R. G., T. M. Daniel.** 1982. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:1013-1016.
- Bloom, B. R., P. E. M. Fine.** 1994. The BCG Experience: Implications for Future Vaccines against Tuberculosis. In B. R. Bloom, editor. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control, ed. ASM Press, Washington, DC. 531-557.
- Boesen, H., B. N. Jensen, T. Wilcke and P. Andersen.** 1995. Human T-cell response to secreted antigen fractions of *mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:1491-1497.
- Boom, W. H., R.S. Wallis, K. A. Chervenak.** 1991. Human *Mybacterium tuberculosis* reactive CD4+ T cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 59:2737-2743.
- Born, W., M. P. Happ, A. Dallas, C. Reardon, P. Kubo, T. Shinnick, P. Brennan and R. O'Brien.** 1990. Recognition of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  cell function. *Immunol Today.* 11:40-43.
- Bulla, L A., K. J. Kramer and L. I. Davidson.** 1977.Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130:375-383.
- Collins, F. M., J. R. Lamb, and D.B. Young.** 1988. Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect Immun.* 56:1260.
- Coligan, J. E., A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober.** Current protocols in immunology. Vol. 1 National Institute of Health.



- Collins, M. F.** 1984. Tuberculosis. *Bacterial Vaccines*. 13:373-418.
- Chaplin, M. F. and Kennedy J. F. (Ed).** 1986 IRL Press, Oxford.
- Daniel, T. M., S, M. Debanne.** 1987. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:1137-1151.
- Daniel, T. M., E. A. Balestrino, O.C. Balestrino, et al.** 1982. The tuberculin specificity in humans of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:600-606
- Daniel, T. M., P. A. Anderson.** 1987. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterization of *Mybacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117:533-539.
- Daniel, T. M., Van Der Kuyp F, P. A. Anderson.** 1981. Initial clinical trial of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 in tuberculin-positive human subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123:517-520.
- Daniel, T. M.** 1974. The purification of Mycobacterial Polysaccharides with Concanavalin A. *Am. Rev. Res. Dis.* 110:634-640.
- Dannenberg, Arthur M., Jr.** 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today.* 12: 228- 232.
- Dobos, K. M., K. Swiderek, K. Khoo, P. J. Brennan and J. T. Belisle.** 1995. Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63:2846-2853.
- Dolin, P. J., M. C. Raviglione and A. Kochi.** 1994. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull. W.H.O.* 72:213 -220.
- Erickson, P. R., M. C. Herzberg.** 1993. Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J Biol. Chem.* 268:23780-23783.
- Espitia, C., I. Cervera, R. Gonzáles, R. Mancilla.** 1989. A 38 kD *Mycobacteyium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin. Exp. Immunol.* 77:373-377.

- Espitia, C., R. Mancilla.** 1989. Identification isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 77: 378-383.
- Espitia, C., M. Elinos, R. Hernández-Pando and R. Mancilla.** 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: Demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect. Immun.* 60:2998-3001.
- Espitia, C.** 1991 Purificación de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* de 70, 50-55, 38, 30-31 y 16 kilodaltones. Análisis de sus propiedades antigenicas a nivel celular y humoral. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto Investigaciones Biomédicas.
- Espitia, C., R. Espinosa, R. Saavedra, R. Mancilla, F. Romain, A. Laqueyriere and C. Moreno.** 1995. Antigenic and strural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50-to 55 kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47 kilodalton antigens. *Infect. Immunity.* 63:580-584.
- Farer, L. S., L. M. Lowell and M. P. Meador.** 1979. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol.* 109:205-217.
- Fifis, T., C. Costopoulos, A. J. Radford, A. Bacic and P.R. Wood.** 1991. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect. Immun.* 59:800-807.
- Garbe, T., D. Harris, M. Vordermeier, R. Lathigra, J. Ivanyi and D. young.** 1993. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect. Immun.* 61:260-267.
- Gonzalez, C. J.** 1993. Interacción de las proteínas de M. tuberculosis con macrófagos alveolares. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gururaj, V. Kadival, Sotiros D. Chaparas, and David Hussong.** 1987. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38 kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Immun.* 139:2447-2451.
- Haanen, J. B. A.G., M. R. de Waal, P. C. M. Res, et al.** 1991. Selection of human T helper type 1-like T cell subset by micobacteria. *J. Exp. Med* 174:583-592.

- Hancock, G. E., Z. A. Cohn, G. Kaplan.** 1989. The generation of antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes of the CD4+ phenotype. *J. Exp. Med* 169:909-919.
- Haregewoin, A, G. Soman, R. C. Hom, R. W. Finberg.** 1989. Human  $\gamma\delta$ + T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature*. 340:309-312
- Havlir.** 199 1. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect.Immun.* 59:665-670.
- Higgins, R. C., and M.E. Dahmus.** 1970. Rapid visualization of protein bands in preparativa SDS poliacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 93:257-260.
- Hudson, L. and F. C. Hay.** 1989. Practical immunology. 3th Ed. Blackwell Scientific publications.
- Hybridoma-Techniqs.** Embo, SKMB Course 1980, Basel.  
*Immunol. Today.* 11:40-43.
- Incidencia de tuberculosis según entidad federativo 1985-1993.** Dirección general de epidemiología.
- Informe epidemiológico anual de morbilidad. 1993.** Bol. Epidemiología. SS (México) tomo IV.
- Inoue, T., Y. Yoshikal, G. Matsuzaki and K. Nomoto.** 1991. Early appearing  $\gamma/\delta$ - bearing T cells during infection with Calmète Guéring bacillus. *J. Immunol.* 146:2754-2762.
- Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).** 1992. Boletín.
- Ivanyi, J., G. H. Bothamley, and P. S. Jackett.** 1988. Immunodiagnostic assays for tuberculosis and leprosy. *Br. Med Bull.* 44:635-644.
- Izuta, S. and Saneyoshi, M.** 1988. AraUTP-Affi-Gel 10: a novel affinity adsorbent for the specific purification of DNA polimerasa  $\alpha$ -primase. *Anal. Biochem.* 174:318.
- Janis, E. M., S. H. E. Kaufmann, R. H. Schwartz and D. M. Pardoll.** 1989. Activation of  $\gamma\delta$ . *Science.* 244:713-716.
- Kaufmann, S. H. E.** 1988. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today.* 9(6):168-174.

- Kawamura, T. and G. D. Shockman.** 1983. Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* 258:9514-9521.
- Ladel, C. H., J. Hess, S. Daugelat, P. Mombaerts, S. Tonegawa and S. H. E. Kaufmann.** 1995b. Contribution of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes to immunity against *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin: studies with T cell receptor deficient mutant mice. *Eur. J. Immunol.* 25:838-846.
- Ladel, H., S. Daugelat, H. E. Kaufmann.** 1995a. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guérin infection in major histocompatibility complex class I and II- deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur. J. Immunol.* 25:377-384.
- Laemmlí, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lamb, F. I., A. E. Kingston, G.I. Estrada, and M. J. Colston.** 1988. Heterologous expression of the 65 kilodalton antigen *Mycobacterium leprae* and murine T cell response to the gene product. *Infect. Immun.* 56:1237-1241.
- Letter to the editor.** 1986. Results of a World Health Organization-Sponsored Workshop to Characterize Antigens Recognized by Mycobacterium-Specific Monoclonal Antibodies. 51:718-19.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and, R. J. Randell.** 1954. Protein measurement with Follin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 26:350-356.
- Maeba, P. Y.** 1986. Isolation of a surface glycoprotein from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 166:644-650.
- Manca, F., G. Rossi, M. T. Valle, S. Lantero, G. Li Pira, D. Fenoglio, J. Bruin, M. Constantini, G. Damiani, B. Balbi and F. Celada.** 1991. Limited clonal heterogeneity of antigen-specific T cells localizing in the pleural space during mycobacterial infection. *Infect. Immun.* 59:503-513.
- Melancon-Kaplan, S. W. Hunter, M. McNeil, C. Stewart, R. L. Modlin, T. H. Rea, J. Convit, P. Salgame, V. Mehra, B. R. Bloom and P. L. Brennan.** 1988. Immunological significance of *Mycobacterium leprae* cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1917-1925.

- Mendez, S.P., L. Gonzalez, P. P. Fragoso, and E. Ramos.** 1995. Specificity of T Cells in Human Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell. Immunol.* 162:194-201.
- Messner, P., U. B. Sleytr.** 1988. Asparaginy-rhamnose: a novel type of protein-carbohydrate linkage in a eubacterial surface-layer glycoprotein. *FEBS Lett.* 228:317- 320.
- Milstein, C., G. Galfre.** 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 92: Part E 42-44.
- Modlin, R. L., C. Pirmez, F. M. Hofman, et al.** 1989. Lymphocytes bearing antigenspecific  $\gamma\delta$  T cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature.* 339:544-548.
- Morris, E. J., N. Ganeshkumar, M. Song and B. C. McBride.** 1987. Identification and preliminary Characterization of a *Streptococcus sanguis* fibrillar glycoprotein. *J. Bacteriol.* 169:164-171.
- Morten, H. and G. Harald Wilker.** 1992. The 38-kDa Protein of *Mycobacterium tuberculosis*: A Review. *J. Infect Dis.* 166:874-884.
- Munk, M. E., A. J. Gatrill and S. H. E. Kaufmann.** 1990. Target cell lysis and IL-2secretion by  $\gamma\delta$  T lymphocytes after activation with bacteria. *J. Immunol.* 145:24342439.
- Mustafa, A. S., T. Godal.** 1987. BCG induced CD4+ cytotoxic T cell from BCG vaccinated healthy subjects: relation between cytotoxicity and supresion *in vitro*. *Clin Exp. Immunol.* 25:62.
- Nair, J., D. A. Rouse and S. L Morris.** 1992. Nucleotides sequence analysis and serologic characterization of the *Mycobacterium intracellulare* homologue of the *Mycobacterium tuberculosis* 19kDa antigen. *Mol. Microbiol.* 6:1431-1439.
- Nassua, E., E. R. Parson, G. D. Johnson.** 1976. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57:67-70.
- Nathan, C.F., H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin.** 1983. Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158:670-689.

- National Institute of Health.** 1986. Department of health and human services, part III. Federal register (USA). 51: 16958-1696 1.
- Noordhoek, G., J. van Embde and H.J. Kolk.** 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 34:2522-2525.
- Orme I. M., P. Andersen, and W. H. Boom.** 1993b. T cell response to *M. tuberculosis*. *J. Infect. Dis* 167:1481-1497.
- Orme, I. M.** 1987. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 138:293-298.
- Orme, I. M.** 1993a. The role of CD8+ T cells immunity to tuberculosis infection. *Trends Microbiol.* 1: 77-78
- Orme, I. M. and F. M. Collins.** 1986. Crossprotection against nontuberculous mycobacterial infections by *Mycobacterium tuberculosis* memory immune T lymphocytes. *J Exp. Med.* 163:203-208.
- Orme, I. M. and F. M. Collins.** 1994. Mouse model of tuberculosis. In B. R. Bloom, editor. *Tuberculosis: Pathogenesis Protection and Control* ed. ASM Press, Washington, D. C. 113-134.
- Orme, I. M., A. D. Roberts, J. P. Griffin and J. S. Abrams.** 1993c. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 151:518-525.
- Orme, I. M., E. S. Miller, A. D. Roberts, J. P. Furney, K. M. Griffin, K. M. Dobos, D. Chi, B. Rivoire and P. J. Brennan.** 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 148:189-196.
- Orme, I. M.** 1988. Induction of nonspecific acquired resistance and delayed-type hypersensitivity, but not specific acquired resistance, in mice inoculated with killed mycobacterial vaccines. *Infect. Immun.* 56:3310-3312.
- Orme, I. M.** 1988. Characteristics and specificity of acquired immunologic memory to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 140:3589.
- Pal. P.G., and M. A. Horwitz.** 1992. Immunization with extra-cellular proteins of

- Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 60:4781-4792.
- Pollard, W. J., M. J. Walker.** 1989. Animal cell culture. Methods in molecular biology. De Humana Press, Clifton N.J. USA. 5:601-668.
- Primepares, G. Pal, and M. A. Horwitz.** 1992. Immunization with extracellular of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 60:4781-4792.
- Rees, A., A. Scoging, A. Mehlert, D. B. Young, and J. Ivany.** 1988. Specificity of proliferative response of human CD8 clones to mycobacterial antigens. *Eur. J. Immunol.* 18:1881-1887.
- Ribi, E., D. L. Granger, K. C. Milner, K. Yamamoto, S. M. Strain, R. Parker, R. W. Smith, W. Brehmer and I. Azuma.** 1982. Induction of resistance to tuberculosis in mice with defined components of micobacteria and with some unrelated materials. *Immunol.* 46:297.
- Ribi, E., D. L. Anacker, W. Brehmer, G. Goode, C. L. Larson, R. H. List, K.C. Milner, and W.C. Wicht.** 1966. Factors Influencing protection against experimental tuberculosis in mice by heat-stable cell wall vaccines. *J. Bacteriol.* 92:869.
- Rodrigues, L. C., V. K. Diwan, and J. G. Wheeler.** 1995. Protective effect of BCG againsts tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int. J*
- Romain, F., A. Laqueyrie, P. Militze, P. Pescher, P. Chavarot, K Lagranderie, G. Auregan, M. Gheorghiu and G. Marchal.** 1992. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigenic complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect. Immun.* 61:742-750.
- Romain, F., P. Augier, P. Pescher and G. Marchal.** 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. USA.* 90:5322-5326.

- Rook, G. A. W., J. Steele, S. Barnass, J. Mace, J. L. Standford.** 1986. Responsiveness to live *M. tuberculosis*, and common antigens, of sonicated-stimulated T cell lines from normal donors. *Clin. Exp. Immunol.* 63: 105-10
- Saavedra, R.** 1985. Obtenición y caracterización de anticuerpos monoclonales contra el factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Saavedra, R. and P. Herion.** 1991. Human T cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of IFN-gamma and IL-2 and strain cross reactivity. *Parasitol. Res.* 77:379.
- Salgame, P., J. S. Abrams, C. Clayberger, et al.** 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 254:279-282
- Seibert, F.B. L. F. Affronti.** 1965. Mycobacterial antigen fractionations. *Am Rev.* 92(2):1-8.
- Seibert, F.B.** 1949. Isolation of three different proteins and two polysaccharides tuberculin by alcohol fractions their chemical and biological properties. *Am. Rev. Tuberc.* 59:86-101.
- Shinnick, T. M., H. King, Frederick D.** 1985. Molecular Biology, Virulence, and Pathogenicity of Mycobacteria. *Am. J. Sciences.* 309:92-98
- Stachelin, T., D. S. Hobbs, H. Kung, C. Lai and S. Pestka.** 1981. Purification and characterization of recombinant human leukocyte interferon (IFLrA) with monoclonal antibodies. *J Biol. Chem.* 256:9750-9754.
- Stead, W.W.** 1992. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering. *Am. Intern. Med.* 116:937-941.
- Stead, W.W., J. P. Lofgren, J. W. Senner, and W.T. Reddick.** 1990. Racial differences in susceptibility to infection with *M. tuberculosis*. *N. Engl. J. Med.* 322:422-427.
- Sudre, P., G. ten Dam, & A. Kochi.** 1992. Tuberculosis: a global overview of the situation today. *Bull. W.H.O.* 70:149-159.
- Taku, A., D. P. Fan.** 1976. Purification and properties of a protein factor stimulating peptidoglycan synthesis in toluene- and LiCl-treated *Bacillus megaterium* cells. *J Biol. Chem.* 251:1889-1895.



- Toossi Z., M. E., Kleinherz, J. J. Ellner.** 1986. Defective IL-2 production and responsiveness in human tuberculosis. *J. Exp. Med.* 163:1162-1172.
- Torres, M. P. Mendez-Sampeiro, L. Jimenez, L. Teran, A. Camarena, R. Quezada, E. Ramos and E. Sada.** 1994. Comparison of the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. *Clin. Exp. Immunol.* 96:75-78.
- Towbin, H., T. Staehelin, and Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- Tuberculosis en México 1993.** 1995. Ciencia médica, boletín de la división de estudios de posgrado e investigación de la facultad de medicina. UNAM.
- Weerkamp, A. H., T. Jacobs.** 1982. Cell wall-associated protein antigens of *Streptococcus salivarius*: purification, properties and function in adherence. *Infect. Immun.* 38:233-242.
- Weigeshaus, E. H., and Smith.** 1989. Review of the protective potency of new tuberculosis vaccines. *Rev. Infect. Dis.* 11:484-490.
- Wu, H. C. and M. Tokunaga.** 1986. Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 123:127-157.
- Youmans, G.P.** 1946. A method for determination of the culture cycle and the growth rate virulent human type tubercle bacilli. *J. Bact.* 51: 703-710.
- Young, D., Kent L., Rees A., Lamb J., Ivany J.** 1986. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 54:177-183.
- Young, D. B., and T. R. Garbe.** 1991. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res. Microbiol.* 142:55-65.
- Young, D.B., S. H. E. Kaufmann, P. W. M. Hermans, and J. E. R. Thole.** 1992. MicroReview. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol. Microbiol.* 6(2), 133-145.
- Zimmerman, M. R.** 1979. Pulmonary and osseous tuberculosis in an egyptian mummy. *Bull. N.Y Acad Med.* 55:604-608.

ESTA TESIS NO DEBE  
 SER DE LA BIBLIOTECA

## IX. APÉNDICE

### 1. MEDIO DE CULTIVO PBY (Proskauer and Beck, modificado por Youmans).

ASPARAGINA	37.80 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	36.00 mM
$\text{K}_2\text{SO}_4$	2.80 mM
CITRATO DE SODIO·2H <sub>2</sub> O	2.00 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.96 mM
GLICEROL	0.68 mM

Ajustar el pH a 6.8 con NAOH 5 N. Se esteriliza en autoclave.

### 2. PBS (BUFFER DE FOSFATOS) 10x pH 7.4.

NaCl 0.15M- Fosfatos 0.15M

Preparar las siguientes soluciones:

- A) NaCl 1.5 M
- B)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.5 M
- C)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.5 M

Ajustar el pH de la solución B a 7.4 con la solución C A 900 ml de solución A agregar 100 ml de la solución B Ajustada.

Nota: El fosfato de sodio dibásico se disuelve solamente calentando ligeramente el agua.

### 3. MÉTODO DE LOWRY PARA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

#### SOLUCIONES

- C.  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2%
- D.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2%
- E.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en NAOH 0.1 N 2%

#### REACTIVO A

Mezclar: 0.5 ml de C + 0.5 ml de D llevar a 50 ml con E

## REACTIVO B

Folin-ciocalteu/H<sub>2</sub>O destilada 1:1

## PROCEDIMIENTO

### CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA (BSA 1 mg/ml)

TUBO	BSA (ml)	H <sub>2</sub> O (ml)	Proteína (µg/ml)
0	-	-	-
1	0.050	0.2	200.0
2	0.025	0.225	100.0
3	0.025	0.475	50.0
4	0.25	0.250	25.0
5	0.25	0.250	12.5

Adicionar 1 ml del reactivo A, agitar vigorosamente y dejar reposar por 10 min a temperatura ambiente. Agregar 100 µl del reactivo B, agitar vigorosamente e incubar 30 min a temperatura ambiente.

Se lee la absorbancia a 600 nm.

## 4. PREPARACIÓN DE GELES SDS-PAGE.

### GEL SEPARADOR AL 10%

Acrilamida 30%-

Bis-acrilamida 0.8% 10.00 ml

Tris-HCl pH 8.8 1.5 M 7.50 ml

H<sub>2</sub>O Bidestilada 11.65 ml

SDS al 10% 0.60 ml

Persulfato de amonio al 10%\*

(100 mg/ml) 0.20 ml

TEMED 20.00 µl

\* Agregar el persulfato de amonio y desgacificar durante 2 min, después agregar el

TEMED.

Colocar el gel e inmediatamente poner unas gotas de isopropanol, dejar que polimerize y

enjuagar con agua bidestilada.

### **GEL CONCENTRADOR 3%**

**Acrilamida 30%-**

**Bis-acrilamida 0.8%**                      1.00 ml

**Tris 0.5 M pH 6.8**                      2.50 ml

**H<sub>2</sub>O**    6.36 ml

**SDS al 10%**                                      0.10 ml

**Persulfato de amonio al 10%\***

**(100 mg/ml)**                                      33.00 µl

**TEMED**    5.00 µl

**\*Agregar el persulfato y degasificar por 2 min, después agregar el TEMED.**

**Colocar el peine y agregar la mezcla, esperar 20 min a que polimerize.**

### **5. COLORACIÓN RÁPIDA DE COOMASIE PARA GELES DE ACRILAMIDA.**

**Solución fijadora:**

**CH<sub>3</sub>COOH**      5% (V/V)

**CH<sub>3</sub>OH**              10% (V/V)

**Solución colorante:**

**Azul de Coomasie brillante G250 al 1% en agua**

**Solución decolorante:**

**CH<sub>3</sub>COOH**      7% (V/V)

1. Lavar el gel con suficiente solución fijadora para cubrirlo durante 15 min a 50-55°C.
2. Retirar la solución, agregar un volumen suficiente de solución fijadora para cubrir el gel conteniendo 10% de solución colorante. Dejar 15-20 min a 50-55°C.
3. Retirar la solución y agregar un volumen suficiente de solución decolorante; dejar a 50-55°C por 15 min.
4. Cambiar la solución cuantas veces sea necesario.

#### **6. BUFFER DE TRANSFERENCIA pH 8.35.**

A 800 ml de buffer Tris-base 0.025 M + Glicina 0.193 M desgacificar mínimo durante 30 min y adicionar 200 ml de metanol.

#### **7. TINCION CON ROJO PONCEAU.**

Colorante: Rojo Ponceau (0.3%) en ácido tricloroacético ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$  al 3 %).

Tañir la tira de nitrocelulosa durante 10 min y lavar con ácido acético al 10%.

#### **8. SOLUCIÓN DE REVELADO PARA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.**

(se prepara al momento de usarla)

A 50 ml de PBS pH 7.4 se agregan 8 ml de metanol, 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y 2 ml de 4-cloro-1-naphthol (30 mg en 2 ml de metanol). Incubar las tiras de nitrocelulosa a temperatura ambiente y parar la reacción con agua.

#### **9. ELECTROFORESIS NO DESNATURALIZANTE EN GELES DE ACRILAMIDA.**

##### **SOLUCIONES**

**Solución A:** Acrilamida al 30%, Bis-acrilamida 0.8%

**Solución B:** Preparar Tris-base a 1.5 M en 24 ml de HCl 1 M y adicionar 230  $\mu\text{l}$  de TEMED, ajustar a pH 8.9 y aforar a 100 ml.

**Solución C:** Preparar 10 ml de persulfato de amonio 0.061 M.

**Solución D:** Preparar 500 ml de Tris-base 0.049 M + Glicina 0.38 M y ajustar a pH 8.3.

**Solución de muestra:** 2 ml de solución B + 6 ml de glicerol al 10% + 20  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol al 1%.

**Solución de corrida:** Diluir 1:10 la solución D al volumen que sea necesario.

### **PREPARACIÓN DEL GEL:**

Mezclar 3 ml de solución A y 3 ml de solución B; desgacificar con vacío y agregar 6 ml de la solución C recientemente preparada. El gel queda a una concentración final de 7.5% de acrilamida y 0.2 de bisacrilamida.

### **10. TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE G250.**

Colorante: azul de Coomassie G250 al 0.04% (P/V) en  $\text{HClO}_4$  al 3.5 %, agitar 1 h a temperatura ambiente y filtrar. Conservar en oscuridad a 4°C.

Tañir el gel por 3 h a temperatura ambiente y desteñir con ácido acético al 10%.

### **11. UREA 6 M.**

Urea                    6 M

$\text{K}_2\text{HPO}_4$                     50 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                     50 mM

EDTA                    20 mM

### **12. ACETATO DE SODIO 0.1 M pH 5.**

#### **SOLUCIONES**

A: Ácido acético            0.2 M

B: Acetato de sodio        0.2 M

El acetato de sodio 0.1 M pH 5 se obtiene mezclando 140 ml de la solución A con 352 ml de la solución B y aforando a 1 000 ml.

### **13. BUFFER DE ELUCIÓN PARA LA COLUMNA DE Con A.**

Alfa-metilmanosido        0.01 M

aforar con acetato de Na 0.1 M pH 5

#### **14. BUFFER CATIONICO pH 6 PARA CONSERVAR LA COLUMNA DE Con A.**

<b>CH<sub>3</sub>COONa</b>	<b>0.1 M</b>
<b>NaCl</b>	<b>1 M</b>
<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	<b>1 mM</b>
<b>MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	<b>1 mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>1 mN*</b>
<b>NaN<sub>3</sub></b>	<b>0.01%</b>

\*El CaCl<sub>2</sub> se disuelve aparte y se añade después de ajustar el pH a 6 con ácido acético.

#### **15. SOLUCIONES PARA LA PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE RATÓN A PARTIR DE LÍQUIDO DE ASCITIS.**

##### **PBS lx pH 7.8**

<b>Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>0.02 M</b>
<b>NaCl</b>	<b>0.15 M</b>

**SOLUCIÓN A:** Trizma base 20 mM + NaCl 40 mM pH 7.8

**SOLUCIÓN B:** Trizma base 20 mM + NaCl 20 mM pH 7.8

**SOLUCIÓN C:** Trizma base 20 mM + NaCl 400 mM pH 7.8

**SOLUCIÓN D:** Trizma base 20 mM pH 7.8

#### **16. RPMI-1640 SUPLEMENTADO.**

<b>Aminoácidos no esenciales</b>	<b>0.1 mM</b>
<b>β-mercaptoethanol</b>	<b>0.5 mM</b>
<b>Piruvato de sodio</b>	<b>1.0 mM</b>
<b>Suero fetal bovino</b>	<b>10 %</b>
<b>Penicilina-streptomicina</b>	<b>50 U/ml</b>
<b>HEPES</b>	<b>25 mM</b>

### **17. CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO TRATADAS CON MITOMICINA.**

- Obtener células mononucleares de sangre periférica (como se explica en 9. 1), resuspenderlas a  $4 \times 10^6$  células/ml e incubarlas con 25  $\mu$ /ml de mitomicina C (Sigma) a 37°C por 30 min.
- Lavar (1 500 g por 10 m) las células 5 veces con el mayor volumen posible de Hank's en tubos de polipropileno (Costar) de 50 ml.
- Resuspender las células en el menor volumen posible de RPMI- 1640 suplementado y contar viabilidad con azul tripano 0.4% en un hematocitómetro y ajustar a la concentración deseada.

### **18. PBS (BUFFER DE FOSFATOS) 1x pH 7.2.**

NaCl	0.13	M
KCl	2.60	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.00	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4	mM

### **19. BUFFER DE CARBONATOS PARA ELISA.**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15.0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	34.8 mM

Ajustar el pH a 9.6 con HCl o NaOH.

### **20. SOLUCIÓN REVELADORA PARA ELISA**

(Se prepara al momento de usarla)

1. A 10 ml de ácido cítrico 0. 1 M adicionar citrato de sodio 0. 1 M hasta ajustar el pH a 4.5.
2. Tomar 10 ml de la solución anterior y adicionarlos a un tubo que contenga 1 mg/ml de *o*-fenilendiamina y agregar a 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)



## 21. MÉTODO DE DUBOIS.

Sensibilidad: ~ 1-60  $\mu\text{g}$  de glucosa en 200  $\mu\text{l}$ .

### REACTIVOS

A. Fenol 5% (p/v)

B. Ácido sulfúrico concentrado.

Curva estándar:

1. Preparar una solución madre con 0.0250 g de manosa en 50 ml de agua bidestilada.

2. Preparación de la curva:

Concentración de manosa ( $\mu\text{g}$ )	Solución madre ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O Dest. ( $\mu\text{l}$ )
100	200	0
75	150	50
50	100	100
25	50	150
10	20	180
0	0	200

3. Mezclar las muestras con 200  $\mu\text{l}$  del reactivo A.
4. Adicionar 1 ml del reactivo B rápida y directamente a la superficie de la muestra, cuidando de no tocar las paredes del tubo.
5. Dejar reposar durante 10 min antes de agitar vigorosamente.
6. Agitar vigorosamente dejar reposar 30 min y determinar la absorbancia a 490 nm.

## 22. BUFFER DE SDS-UREA 8 M

Tris-Base pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	1.0 %
SDS	87.0 mM
Urea	8.0 M