19
2e

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

## "PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS DE *Mycobacterium tuberculosis* EN MACROFAGOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :

SIGIFREDO PEDRAZA SANCHEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F. Octubre 1988

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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 está 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.

**ABREVIATURAS USADAS**

| | |
|---|---|
| Ac | Anticuerpo |
| Ag | Antígeno |
| BCG | Bacilo de Calmette y Guérin |
| BCGF | Factor de Crecimiento de Células B |
| BSA | Albúmina Serica Bovina |
| DMEM | Medio de Eagle Modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetil Sulfoxido |
| EDTA | Acido Etilendiamin Tetraacetico |
| FCR | Fuerza Centrífuga Relativa |
| HEPES | Acido -N-Hidroxietilpiperasin-N'-2-Etanesulfonico |
| Ia | Moleculas Clase II del MHC en el ratón |
| IET | Inmunoelectrotransferencia o Western Blotting |
| IRF | Intensidad Relativa de Fluorescencia |
| Kd | Kilodalton |
| Min | Minuto |
| MHC | Complejo Principal de Histocompatibilidad |
| PBS | Solución Salina amotriguada con Fosfatos |
| PBST | PBS con Tween 20 |
| PBY | Medio de cultivo Proskawer-Beck-Youmans |
| PMSF | Fluoruro de Fenil Metil Sulfoxido |
| PM | Peso Molecular |
| PPD | Derivado Proteico Purificado |
| Rf | Movilidad relativa |
| RPM | Revoluciones Por Minuto |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en presencia de SDS |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| SIS | Solución Isotonica de Sacarosa |
| Tb | Tuberculosis |
| TEMED | N,N,N'N'-Tetrametiletilendiamina |

NOTA : Las cifras que se expresan en el texto tales como 2 x 10 6 son equivalentes a las exponenciales, en este caso:

$$2 \times 10\ 6 = 2 \times 10^{6}$$

# I N D I C E


1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades . . . . . .4
1.2 Caracerísticas de *Mycobacterium tuberculosis*. .5
1.3 Relación parásito-hospedero en Tuberculosis . . . .7
1.4 Papel del macrófago en la respuesta inmune. Procesamiento de antígenos. . . . . .10
1.5 Cultivo de tejidos y lineas celulares . . . . . .13
1.6 Fraccionamiento subcelular. . . . . .16
1.7 Análisis de proteínas bacterianas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio e inmunoelectrotransferencia . . .18

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . . .20

3 JUSTIFICACION . . . . . .21

4 OBJETIVOS . . . . . .22

5 HIPOTESIS . . . . . .23

6 METODOLOGIA

6.1 Origen de los reactivos . . . . . .24
6.2 Cultivo celular . . . . . .24
6.3 Lisis celular . . . . . .26
6.4 Fraccionamiento subcelular. . . . . .27
6.5 Ensayo enzimatico de β-Hexosaminidasa . . . . . .29
6.6 Obtención del extracto antigenico de *M. tuberculosis* H37Rv . . . . . .30
6.7 Obtención del suero hiperinmune anti *M.tuberculosis* . . . . . .31
6.8 Experimentos de procesamiento de antígenos. . . . .31
6.9 Detección de antígenos de *M. tuberculosis* en lisosomas de celulas J774 por Inmunoelectrotransferencia. . .34
6.9.1 Preparación de las muestras . . . . . .34

6.9.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio . . . . . .35
6.9.3 Tinción con azul de Coomassie . . . . . .38
6.9.4 Inmunoelectrotransferencia. . . . . .38

7 RESULTADOS

7.1 Fraccionamiento subcelular. . . . . .42
7.2 Extracto antigenico de M. tuberculosis. . . . .47
7.3 Detección de antígenos de M. tuberculosis en lisosomas de células J774 . . . . . .48

8 DISCUSION . . . . . .50

9 CONCLUSIONES. . . . . .63

10 REFERENCIAS . . . . . .64

11 APENDICE. . . . . .69

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 Generalidades

Entre las enfermedades infecciosas, la tuberculosis (Tb) continúa siendo hoy en dia un problema de salud pública, sobre todo en los países en vias de desarrollo.

Al inicio de la década de los 80's se calculaba que la incidencia anual de esta anfermedad en todo el mundo era de unos 8 millones, con una mortalidad aproximada de 3 millones (1, 2).

En Mexico, la Tb ocupa el 11o. lugar como causa de muerte (3), a pesar de la existencia de la vacuna BCG y de tratamiento farmacológico para la enfermedad.

El agente causal de la Tb en el humano es Mycobacterium tuberculosis y en algunos casos Mycobacterium bovis. El género de las micobacterias está formado por unas 40 especies (4) e incluye además del bacilo de la tuberculosis, a la bacteria causante de la lepra. Estas dos enfermedades han sido quiza las enfermedades infecciosas que más daño han causado al hombre a lo largo de la historia (1, 5).

Por mucho, M. tuberculosis es la más virulenta de todas las micobacterias y la de mayor capacidad infectiva, aunque hasta la fecha no se conocen los mecanismos precisos de su virulencia (5).

La forma más común de la Tb es la pulmonar, ya que el agente etiológico es aerobio estricto, y es en estos órganos en donde se encuentran las condiciones más favorables para su desarrollo. Además de la forma pulmonar, se presentan con

menor frecuencia infecciones en riñón, hígado, huesos, sistema nervioso, genitourinario, así como infecciones diseminadas (6, 1).

Los focos primarios de infección en la Tb son los pulmones por inhalación, y con menor frecuencia a nivel enteral por ingestión (6). Al entrar a los pulmones a través de las vias respiratorias, y procedente de otra persona infectada, las micobacterias son ingeridas por las células fagociticas, en donde pueden permanecer y reproducirse. La formación de tuberculos (acumulación de bacterias, linfocitos, monocitos, fibroblastos y células epiteloides), trae como consecuencia la destrucción de los tejidos alveolares (7), sobreviniendo la muerte.

## 1.2 Características de *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* es un bacilo ácido-alcohol resistente que mide entre 3 y 4 µm de longitud y de 0.3 a 0.6 µm de diámetro (1). Es inmovil, no forma esporas y es un parásito intracelular obligado estrictamente aerobio.

El bacilo tuberculoso es resistente a la desecación, pero muere rapidamente al ser expuesto a la luz solar directa o a la luz ultravioleta. Absorbe el colorante carbofuscina cuando es calentado. y una vez teñido resiste a la decoloración por ácidos y alcoholes (6), de aquí su denominación como "ácido-alcohol resistente.

Además de su característica especial de tinción, *M.*

tuberculosis se distingue por un alto contenido de lípidos en su pared celular, ya que los lípidos de esta envoltura constituyen el 60% del peso seco de la misma. Las micobacterias son probablemente las que presentan mayor proporcion de lípidos de todas las bacterias (4).

La pared celular de M. tuberculosis está formada por cuatro capas. La más interna, pegada a la membrana celular, consiste de mureina o peptidoglicano; después se encuentra una capa de arabinogalactano, y otra mas exterior de ácidos micólicos. La capa superficial contiene sulfolípidos, micosidos (que son peptidoglicolipidos) y el factor cuerda -trealosa 6,6-dimicolato- ,responsable del crecimiento en cordones de las micobacterias(5).

El gran contenido de lípidos en la pared de esta bacteria le da una gran hidrofobicidad y resistencia al ataque químico por enzimas líticas cuando la bacteria se encuentra dentro de su hospedero. Esta cubierta quiza tambien sea responsable de la lenta reproducción del bacilo por la restriccion de la entrada de nutrimentos (incluyendo oxígeno) al organismo (4).

Intracelularmente, M. tuberculosis es similar a otras bacterias: su material genético (DNA) forma una masa alargada en el centro de la célula sin estar delimitado por una membrana, y su citoplasma contiene gotas de lípidos, ribosomas y granulos compuestos de polifosfatos (4, 5).

Para su crecimiento, M. tuberculosis requiere de un mínimo de nutrimentos: una fuente de carbon, una fuente de

nitrógeno y metales esenciales como Fe y Mg, además de la presencia de oxígeno (1).

## 1.3 Relación parásito-hospedero en Tuberculosis

La capacidad de M. tuberculosis para producir enfermedad depende de su éxito en evadir los mecanismos de defensa del hospedero.

El bacilo tuberculoso tiene por hospedero al macrófago, una célula del sistema inmune que tiene una importante función en la defensa antibacteriana. Estas células, al igual que sus percusores los monocitos, tienen su origen en la médula osea.

Los macrófagos son células fagocíticas que se encuentran en tejidos, mientras que los monocitos circulan en el torrente sanguíneo; otras células fagocíticas son los polimorfonucleares (neutrófilos) que también se encuentran en la sangre (8).

El macrófago tiene un aparato de Golgi bien desarrollado y muchos lisosomas; su membrana plasmática se caracteriza por microvellosidades prominentes y arrugas. Se adhieren al vidrio, ingieren por pinocitosis particulas menores a 0.1 µm, y por fagocitosis engloban particulas mayores a 0.1 µm (9).

La fagocitosis es un mecanismo de defensa inespecífico por el que se puede destruir a un agente invasor (bacterias, hongos, algunos virus y protozoarios) y activar otros mecanismos de defensa más específicos (8).

Cuando una bacteria se encuentra con una célula fagocítica es internalizada por fagocitosis. En este caso, la fagocitosis se inicia cuando M. tuberculosis se pega a la membrana del macrófago, y al invaginarse la membrana se forma una bolsa llamada fagosoma, que envuelve a la bacteria. El fagosoma dentro del fagocito se fusiona con lisosomas, los cuales liberan su contenido enzimatico para destruir al agente invasor (12).

Los lisosomas son organelos con un alto contenido de enzimas líticas (unas 40 diferentes) llamadas Hidrolasas Acidas, por funcionar a un pH acido -cercano a 5- que existe en estos organelos. Por ello, para que ocurra la fusion del fagosoma con el lisosoma se requiere que ambos compartimentos tengan un pH ácido (10, 11).

El macrófago al presentar en su superficie ciertos antígenos de la bacteria, estimula a los linfocitos T cooperadores (otras células del sistema inmune que participan en la respuesta mediada por células), y éstos producen unas moléculas llamadas linfocinas que a su vez activan al macrófago. El macrófago activado incrementa su motilidad, consumo de oxígeno, glucólisis, capacidad fagocítica así como un aumento posterior en el numero de mitocondrias, lisosomas y enzimas lisosomales (1, 8) haciéndolo más eficiente en la lucha antibacteriana.

Además de los macrófagos y los linfocitos T, existen en el sistema inmune los linfocitos B que producen anticuerpos (Ac) contra los antigenos (Ag) del agente invasor, respuesta

a la que se le ha llamado "inmunidad humoral" (11). En el caso de las infecciones micobacterianas la respuesta inmune de mayor importancia es la mediada por células (5).

En esta relación parásito-hospedero el macrófago busca destruir al agente invasor, mientras que la bacteria en su estrategia de supervivencia "permite" ser ingerida pero no digerida por el macrófago. Por lo tanto, la virulencia de las micobacterias puede ser el resultado de una combinación de varios factores (12), incluyendo:

a) Algún factor tóxico elaborado por la bacteria.

b) Destrucción de la membrana fagosomal, permitiendo a la bacteria escapar de la degradación y proliferar dentro del citoplasma.

c) Inhibición de la fusion fagosoma-lisosoma.

En relación a los factores tóxicos, por un tiempo se pensó que el factor cuerda (trealosa 6,6'-dimicolato) era lo que le daba la virulencia a M. tuberculosis. Sin embargo el factor cuerda se ha encontrado en muchas micobacterias, incluyendo especies saprófitas y cepas avirulentas (1, 5).

Se sabe que M. tuberculosis es capaz de inhibir la fusion fagosoma-lisosoma (13), y que tal inhibición puede ser causada por sulfatidos de la bacteria (14). Recientemente se ha encontrado que las proteinas del filtrado de un cultivo de M. tuberculosis alcalinizan los lisosomas de células fagociticas (10).

Los mecanismos de estas estrategias, que le permiten a la bacteria sobrevivir dentro de su hospedero, el macrófago, no han sido aún aclarados.

## 1.4 Papel del macrófago en la respuesta inmune. Procesamiento de antígenos

Cuando un agente extraño es fagocitado por un macrófago, los productos de su degradación pueden ser exocitados en vesiculas, o pueden ser presentados en la membrana plasmática para estimular a los linfocitos T cooperadores; Estos a su vez activan al macrófago y reclutan monocitos de la sangre que al llegar a los tejidos se convierten en macrófagos (8). Por otro lado, la estimulación de los linfocitos B por antígenos libres trae como econsecuencia la producción de anticuerpos contra tales antígenos, y la liberación del factor BCGF (Factor de Crecimiento de Células B, tambien llamado Interleucina 4) por los linfocitos T cooperadores, estimula la proliferación de los linfocitos B activados por el Ag (15).

Además de interactuar con los linfocitos T y B, los macrófagos son células altamente secretoras en el proceso de la respuesta inflamatoria, tienen receptores de superficie para linfocinas, tienen una alta actividad microbicida y tumoricida, e interactúan con muchas moléculas extracelulares -proteínas y polisacaridos- a las que someten a cambios metabolicos intracelulares (16). De este modo, el concepto que se tenía de éste fagocito a principios de siglo, ha pasado del de simple "basurero del ambiente extracelular" al de una célula con un importante papel inmunoregulador.

Los cambios metabolicos intracelulares que sufren las moléculas ajenas al macrófago, constituyen el procesamiento

de los antígenos.

Cuando un Ag entra a un organismo, éste puede desencadenar una respuesta inmune en su forma nativa, sin que tenga que sufrir ninguna modificación. Esto es posible cuando la molécula en su forma nativa tiene disponible el determinante antigenico que es reconocido por el receptor de las células T ó por los receptores de superficie de los linfocitos B (17). Cuando dicho determinante antigenico no se encuentra disponible en la molécula nativa, entonces se requiere de una modificación tal que lo ponga al descubierto. La proteolisis o el desdoblamiento del Ag pueden servir para tal fin, y pueden llevarse a cabo intracelularmente en los lisosomas, con la acción de las hidrolasas ácidas que se encuentran en el lumen de estos organelos (16, 18).

No se conocen con precisión los cambios bioquímicos que sufre un Ag dentro del macrófago, pero se sabe que una vez modificado o procesado, el Ag se presenta en la superficie de la célula junto con una molécula Clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (15).

El MHC es un grupo de genes que se encuentra en el cromosoma 6 en el humano y que codifican para dos clases de moléculas. Las moléculas de clase I se encuentran en la superficie de todas las células, e incluyen a los antígenos clásicos de trasplantes, mientras que las moléculas de clase II (llamadas Ia en el ratón) son heterodímeros que se encuentran en la superficie de macrófagos, linfocitos B y células de Langerhans, esto es, en las células presentadoras

de antígeno (15,16).

El hecho de que el macrófago presente en su superficie a los antígenos que ha procesado, en asociación con una molecula clase II, se debe a que los linfocitos T cooperadores tienen un receptor que sólo reconoce al antígeno cuando se asocia a dicha molécula autóloga.

Las estrategias seguidas para el estudio del procesamiento de antígenos por macrófagos han sido de varios tipos: una de ellas es utilizando microorganismos completos tales como Listeria monocytogenes (19). Otra de ellas ha sido utilizando proteinas puras como la albumina de huevo o el fibrinógeno (20, 21). Una tercera aproximación, más fina aún, ha sido usada para conocer el determinante antigenico que se une a la molecula de Ia (esto es a una molecula clase II), para estimular al linfocito T; en esta aproximación ya no se usan como Ag's proteínas completas, sino péptidos sintéticos de unos 10 aminoácidos (17). Estas estrategias se han valido de la proliferación de linfocitos T (normales o hibridomas) para evaluar la presentacion del Ag por el macrófago.

Entre las cosas que aún no se conocen con precisión del procesamiento de Ag's a nivel subcelular, está el sitio en el que se lleva a cabo la union del Ag -o el determinante antigenico que va a ser presentado- con la molécula clase II, para expresarse en la superficie del macrófago; tampoco se sabe cómo los Ag's son seleccionados para degradarse en los lisosomas o para ser presentados a las celulas T.

## 1.5 Cultivo de tejidos y lineas celulares.

El cultivo de tejidos animales se comenzó a desarrollar a principios de siglo para estudiar *in vitro* el comportamiento de células animales, sin las variaciones sistemicas *in vivo*.

El nombre de cultivo de tejidos implica que un fragmento de tejido, conservando sus caracteristicas de estructura tridimensional, es mantenido *in vitro* en un medio con nutrientes y bajo condiciones controladas que permitan la migración y la reproducción celular (22).

Un fragmento de tejido -biopsia- es extraído de un organismo en condiciones asépticas, lavado en amortiguador salino estéril y fragmentado en piezas de 2-4 $mm^3$ para colocarlo en un recipiente de vidrio o de plástico que contiene el medio de cultivo (26). El medio de cultivo además de contener nutrientes (sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros) es adicionado con antibioticos para evitar contaminación por hongos, bacterias y micoplasma.

También se le llama al cultivo de tejidos cultivo de órganos, por la retención de las interacciones celulares que se encuentran en el fragmento de tejido o explanto. La característica mas notable de un tejido cultivado *in vitro* es que las células no crecen rapidamente y prácticamente sólo hay proliferación celular en la periferia del explante. Al no poder ser propagado el tejido, cada experimento requiere de explantes frescos, lo que implica mayor trabajo y menor reproducibilidad (22).

Posterior al cultivo de tejidos, el cultivo de células derivadas de los explantes de tejidos animales abrió nuevos campos en la investigación biomédica. Un cultivo celular implica la dispersión de las células del explante primario, por algun medio mecánico o enzimatico, obteniendose una suspensión celular que puede ser cultivada así, o en monocapa al adherirse las células a la superficie del recipiente de plastico o vidrio que las contiene.

El cultivo celular primario derivado de la dispersión de células de un explante esta formado por una mezcla de varios tipos celulares en diferentes estadíos de desarrollo y diferenciación, y tienen diferente capacidad para sobrevivir y proliferar en las condiciones creadas por el investigador(26). Cuando la proliferación celular es demasiada se hace necesario subcultivar las células en otros recipientes, formándose así cultivos secundarios.

A medida que las células se subcultivan, la población celular es más homogenea por la presión selectiva que ejercen las condiciones de cultivo, hasta que llega el momento en que el cultivo está formado por un solo tipo de celulas, lo que constituye una linea celular.

Las lineas celulares continuas o inmortales son lineas derivadas de celulas transformadas,ya sean tumorales o células transformadas <u>in vitro</u> por carcinógenos químicos, radiaciones o virus oncogénicos (26), y tienen la propiedad de poder ser cultivadas indefinidamente. Estas lineas celulares, ya sean de origen humano o de algún otro mamífero,

han sido útiles en sistemas experimentales.

El uso de cultivos celulares y de lineas celulares en las ciencias biológicas es muy amplio: estudios de transcripción de DNA, síntesis de proteínas, flujo de hormonas y metabolitos, infecciones intracelulares (bacterianas o virales), efectos de fármacos, interacciones celulares, cariotipos, estudios genéticos y metabolicos en enfermedades de "errores en el metabolismo" y producción de anticuerpos monoclonales son algunas de las áreas de investigación que encuentran en el cultivo celular una herramienta muy útil (22, 26).

Las ventajas del cultivo celular son el control del ambiente (temperatura, humedad, presión osmótica, tensión de $O_2$ y de $CO_2$), la uniformidad de la población y la simplificación del sistema al eliminar las variables introducidas por la interaccion con otros tipos celulares. La desventaja más importante es la validez limitada que puedan tener los resultados obtenidos en un experimento *in vitro* al extrapolarlos *in vivo*. Al carecer de los componentes homeostaticos del sistema nervioso y endocrino, los cultivos celulares tienen limitaciones al compararlos con sistemas vivos mucho mas complejos. Otra desventaja es que se requiere de equipo especial para el manejo de los cultivos (campana de flujo laminar, incubadora de $CO_2$, tanque de $N_2$ líquido, etc.), lo que lo hace caro.

A pesar de sus limitaciones, el uso de lineas celulares en las ciencias biológicas sigue siendo muy valioso. Los modelos de fenómenos biológicos estudiados con lineas

celulares hacen posible lo que en un animal o en el ser humano sería imposible estudiar.

## 1.6 Fraccionamiento subcelular.

El fraccionamiento subcelular es una técnica que permite la separación de organelos celulares de acuerdo a sus densidades. Los organelos celulares sedimentan en un gradiente de densidad a una posición de equilibrio equivalente a su propia densidad, lo cual es llamado sedimentación isopícnica (22).

La separación de organelos requiere del rompimiento previo de las células y la separación de la fracción nuclear. Las células se pueden romper u homogeneizar en un homogeneizador de vidrio (dounce) con émbolo de vidrio, acero o teflón; las células se rompen al forzarlas a pasar por el espacio estrecho entre el émbolo y el tubo.

La cavitación en nitrógeno, la sonicación, los ciclos de congelamiento y descongelamiento rápido de las células y la lisis osmotica, son otras técnicas que se usan para romper células (23).

Para la preparación de gradientes de densidades por muchos años se han usado soluciones de sacarosa a diferentes concentraciones, colocándolas una sobre otra en un mismo tubo (24). Posteriormente los gradientes de densidades conseguidos por centrifugación se vieron favorecidos por un medio: el sílice coloidal. Este medio presenta varias ventajas sobre

las soluciones de sacarosa, principalmente su baja viscosidad y su baja osmolalidad. Sin embargo su uso en la separación de particulas biológicas (células, virus y organelos) se vió limitado debido a su toxicidad.

El percoll es un medio para formar gradientes de densidades basado en el sílice colidal. Su toxicidad se elimina por el recubrimiento de las partículas de sílice con Polivinilpirrolidona (PVP), lo que le da propiedades únicas para la separación de particulas biológicas en gradientes de densidad. La heterogeneidad de tamaño de las particulas del percoll, resulta en su sedimentacion a diferentes velocidades en un campo gravitacional, creando un gradiente de densidad. Una particula de la muestra alcanza su posición en el gradiente cuando su densidad y la del percoll que la rodea son iguales.

Las fracciones que se obtienen de un gradiente de densidad pueden someterse a la determinación de proteínas o a ensayos enzimaticos específicos para identificar distintos organelos. Los ensayos enzimaticos de la Fosfatasa Acida, β-Glucoronidasa y β-Hexosaminidasa son usados regularmente como marcadores lisosomales (25).

## 1.7 Análisis de proteínas bacterianas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio e inmunoelectrotransferencia.

La electroforesis se refiere a la migración de iones en un campo eléctrico. Una mezcla de diferentes especies ionicas puede ser separada en base a sus diferentes velocidades de migración.

En Biología se emplean técnicas electroforeticas para la separación de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas pueden considerarse como macroiones al tener como grupos ionizables a los grupos amino y carboxilo terminales.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) ha probado su utilidad en el análisis de proteínas bacterianas de diferentes géneros y especies (27). Esta técnica que permite la separación de proteínas en base a sus pesos moleculares, tiene además la ventaja de que pueden calcularse las concentraciones individuales de cada proteína separada, utilizando metodos cuantitativos de tinción (28).

La Inmunoelectrotransferencia (IET) o Western Blotting es una técnica que combina el gran poder de resolución de la SDS-PAGE con la sensibilidad de métodos enzimaticos. Consiste en transferir las proteínas separadas por SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa mediante un campo eléctrico. La detección de las proteínas se lleva a cabo en la membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos.

Después de transferidas las proteínas del gel a la

nitrocelulosa, los sitios en que no hay proteínas se bloquean con una molécula no reactiva para eliminar el fondo. En el siguiente paso, la nitrocelulosa se incuba con un primer anticuerpo (policlonal o monoclonal) que reconoce Ag's de la muestra transferida. Un segundo anticuerpo con enzima acoplada se pega al primer anticuerpo en la siguiente incubación y finalmente la reacción se evidencía por la aparición de una banda en el sitio de la reacción al poner un sustrato para la enzima utilizada (30).La gran sensibilidad de esta técnica permite la detección de hasta picogramos de proteínas (1 pg = 10 Exp -12 g) (29).

# 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la relación parásito-hospedero en la tuberculosis ha tenido la finalidad de comprender los mecanismos de infección de la bacteria causante, y las estrategias de defensa por parte del hospedero en esta enfermedad. Se ha encontrado que las proteínas de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* inhiben la proyección de pseudópodos en macrófagos y alcalinizan los lisosomas de estas células fagocíticas.

Con la finalidad de determinar la presencia de algún o algunos antígenos de la bacteria que pudieran influir sobre la morfología o fisiología del macrófago se propone el estudio del procesamiento de antígenos provenientes de *M. tuberculosis* en células fagocíticas a nivel subcelular.

# 3 JUSTIFICACION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa producida por Mycobacterium tuberculosis y en algunos casos por Mycobacterium bovis; A pesar de que en la actualidad se cuenta con la vacuna BCG, sigue siendo un serio problema de salud pública en muchas naciones, particularmente en los países en vias de desarrollo, lo que incluye a México.

Teniendo en cuenta lo anterior, los estudios que involocran al agente causal de la tuberculosis se justifican por sí mismos, y desde el punto de vista biológico las interacciones parásito intracelular-hospedero pueden estudiarse en la relación que M. tuberculosis tiene con el macrófago, su hospedero.

El conocimiento del procesamiento de los antigenos de M. tuberculosis por el macrófago permitirá comprender mejor los mecanismos de infección y defensa involucrados en la tuberculosis, lo que podrá conducir posteriormente a la purificación de antígenos micobacterianos importantes inmunologicamente.

# 4 OBJETIVOS

1.- Obtener la fracción lisosomal de células de tipo macrofágico de la linea J774.

2.- Conocer la cinética de la digestión de antígenos de *M. tuberculosis* en células de la linea J774 mediante su detección en lisosomas por inmumoelectrotransferencia.

# 5 HIPOTESIS

Teniendo como antecedente que las proteínas de secreción de M. tuberculosis afectan morfologicamente a células fagocíticas inhibiendo la proyección de pseudópodos, y fisiologicamente alcalinizando los lisosomas de las mismas células, se puede esperar que estos antígenos sean internalizados a la célula fagocitica, y que dichos antígenos presenten resistencia diferencial a la degradación en lisosomas, lo que hará posible la detección de uno o más antígenos en estos organelos.

# 6 METODOLOGIA

## 6.1 Origen de los reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron Baker (Baker, J.T., S.A. de C.V., Xalostoc, México), a menos que se indique otra cosa.

## 6.2 Cultivo celular

El medio de cultivo celular DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) - Gibco Laboratories , U.S.A. - fue preparado disolviendo un sobre de DMEM para preparar un litro, en agua destilada y deionizada, con 2 g de $NaHCO_3$, 20 mM de L-Glutamina (Gibco) y 10 mM de HEPES ( Acido - N - Hidroxietilpiperasin -N'- 2 - Etanesulfonico ) ( Gibco ) , aforándose a un litro y ajustándose el pH a 7.2 con HCl 0.1 N. Inmediatamente el medio fue esterilizado por filtración al vacío usando un filtro Millipore (Millipore Filter Corp. , U.S.A. ) de 0.22 um. El medio fue fraccionado en frascos estériles y se guardo a 4°C.

Trabajando siempre en campana de flujo laminar vertical, la linea macrofágica murina J774 (31, 32) fue cultivada en este medio suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino -SFB- (Sigma Chemical Co. , U.S.A ) , 100 U/ml de Penicilina G (Sigma) y 100 ug/ml de Estreptomicina (Sigma). Se sembraron aprox. 1x10 6 células por caja de cultivo de 25 cm2, con un volumen de entre 5 y 7 ml de medio, y 2x10 6 células por caja

de cultivo de 75 cm2, con un volumen de entre 20 y 35 ml. Se emplearon cajas de cultivo Costar (Costar, U.S.A.)

Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37 ° C en una atmósfera húmeda y al 5% de $CO_2$. Diariamente los cultivos se revisaron al microscopio invertido, vigilando la morfologia de las celulas, que se encontraran pegadas al plastico y libres de contaminación bacteriana o fúngica. El medio de cultivo se cambiaba cuando baja el pH de 7.4 inicial a menos de 7, indicado por el cambio de color de rojo a amarillo en el medio. Cuando los cultivos se encontraban confluentes, esto es, cuando las celulas cubrían toda la superficie de la caja, se resembraban en cajs nuevas.

La viabilidad de las celulas fue checada periodicamente por exclusión al azul de tripano (22) y se congelaron células en DMSO (Dimetil sulfoxido) al 10% en SFB, a una concentracion de entre 5 y 7 millones de celulas/ml de mezcla para congelación. Los viales con células se colocaron en una caja de unicel y se guardaron en un ultracongelador Revco (Temp. -70°C) toda la noche; al dia siguiente los viales se transfirieron a un tanque de N2 liquido a una temperatura de -196°C, teniendo así células de reserva todo el tiempo.

Los cultivos celulares se mantuvieron durante la realización completa del trabajo experimental.

## 6.3 Lisis celular

Las células se rompieron por homogeneización y en un medio isotonico.

La Solución Isotonica de Sacarosa (SIS) empleada para suspender las células y romperlas en este medio, fue preparada con sacarosa 0.25 M , EDTA disodico 2 mM (Sal disodica del Acido Etilendiamin Tetraacetico) , y HEPES 2 mM.

Para cada uno de los ensayos de lisis celular se utilizó una caja de 75 cm2 con 15x10 6 celulas aproximadamente. Se eliminó el medio de cultivo de la caja y las células se lavaron una vez con PBS (Solucion Salina amortiguada con Fosfatos) 0.01 M pH 7.2 a 4°C y dos veces con SIS (10 ml para cada lavado) a la misma temperatura. Las células se despegaron de la caja con un gendarme sobre un tercer lavado de 10 ml de SIS y se centrifugaron a 700 g y 4°C por 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de SIS.

La suspensión celular se transfirió a un homogeneizador de 5 ml y las células se rompieron golpeando firmemente con el émbolo de teflón con movimientos hacia arriba y hacia abajo, haciéndolo manualmente. El número de golpes en la homogeneización se fue variando , tratando de obtener un buen porcentaje de lisis celular sin dañar demasiado a los lisosomas. Para mantener la temperatura constante se probó homogeneizando sobre hielo , hielo seco o una mezcla de hielo agua y sal , en diferentes ensayos ; aunque se usó hielo seco en ciertos ensayos, las células

nunca se congelaron y el uso del mismo fue para contrarrestar el calor producido en la homogeneizacion por fricción.

El porcentaje de lisis se evaluó contando las células en un hemocitometro antes y después del rompimiento.

## 6.4 Fraccionamiento subcelular

Para el fraccionamiento subcelular inicialmente se usó una caja de cultivo de 75 cm2 con 15 millones de células aproximadamente. Se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células 2 veces con 10 ml de SIS, y se despegaron de la caja en un tercer lavado de 10 ml de la misma solución, utilizando un agitador de vidrio con gendarme. Las células se centrifugaron a 700 g durante 10 min, el sobrenadante fue eliminado y el paquete de células se resuspendio en 1 ml de SIS a 4° C y se transfirió al homogeneizador de vidrio en donde se rompieron con el émbolo de teflón. Para mantener la temperatura a 4°C se ensayó colocando el homogeneizador sobre hielo, sobre hielo seco o sobre una mezcla de hielo, sal y agua, mientras se rompian las celulas. Una modificación posterior en el rompimiento de las células fue la utilización de un motor de velocidad variable; el émbolo de teflón se acopló al motor (Wheaton overhead stirrer), y trabajando a 3.5 de velocidad, el homogeneizador se subía y bajaba mientras el émbolo giraba impulsado por el motor.

Cuando terminaba la homogeneización, cuantificada la lisis en un hemocitometro. las células fueron centrifugadas

a 700 g y a 4ºC por 10 min. Enseguida se recuperó el sobrenadante, y el boton de células sin romper y núcleos fue resuspendido en 500 µl de SIS y centrifugado nuevamente a 700 g por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se agregó al sobrenadante del homogenado. Las células lisadas se lavaron así tres veces con 500 µl de SIS, recuperándose los sobrenadantes con organelos celulares. En experimentos posteriores, después de la homogeneización sólo se hizo un lavado con 500 µl de SIS, de las células no lisadas.

En un tubo para ultracentrifuga de 15 x 75 mm se colocaron 9 ml de una mezcla de Percoll (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) al 30% y SIS al 70%, pH 7.4 . En ensayos posteriores se colocó ademas un colchón de sacarosa 2.5 M -esto es 10 veces mas concentrado que la SIS- en el fondo del tubo, con el propósito de eliminar posible contaminación por células no rotas o núcleos, producto de la homogeneización, que pudieran entrar en el gradiente.

Sobre la mezcla de Percoll-Sacarosa se colocó con mucho cuidado la muestra con organelos, utilizando una pipeta pasteur. La muestra de 1.5 o de 2.5 ml (según se hicieran 1 ó 3 lavados después de romper las células) correspondía a los sobrenadantes postnucleares del homogenado y de los lavados.

En otro tubo se colocó la misma mezcla de Percoll-Sacarosa (30%-70%) y se pusieron 15 µl de cada uno de los 9 marcadores de densidad para gradientes de Percoll (Density Marker Beads, Pharmacia) y se equilibró con el otro tubo de la muestra, agregando SIS. Estos marcadores de densidad tienen diferentes colores y forman bandas a densidades de

1.036, 1.052, 1.055, 1.072, 1.082, 1.100, 1.112, 1.126 y 1.132 g/ml .

Los tubos fueron tapados y colocados en un rotor JA21 de ángulo fijo y diámetro máximo de 102 mm, y la centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Beckman (Beckman Instruments Inc., U.S.A.) modelo J2-21, a 4°C, probando velocidades de 20 000 , 17 500 y 13 500 RPM durante 75 o 90 min y sin freno.

Después de la centrifugación los tubos fueron sacados del rotor, y manteniendolos a 4°C se obtuvieron fracciones de 11 gotas (aprox. 0.5 ml) cada fracción, con una bomba peristaltica LKB a una velocidad de 50 pulsos/min , como se ilustra en la Figura 1. El sistema para obtener las fracciones fue montado con mucho cuidado para no perturbar el gradiente de densidad formado. Las densidades en el gradiente fueron obtenidas con los marcadores de densidad.

Las fracciones así obtenidas fueron guardadas en congelación a -20°C para el ensayo enzimatico posterior de B-Hexosaminidasa.

## 6.5 Ensayo enzimatico de β-Hexosaminidasa

Como marcador lisosomal fue utilizado el ensayo de la enzima β-Hexosaminidasa, según Lippincott (33), para cada fracción obtenida del fraccionamiento subcelular.

Se incubaron 33 µl de cada fracción con 66 µl del sustrato 4-Metil Umbeliferil-N-Acetil-B-D Glucosaminida 5 mM (Sigma) pH 4.4, conteniendo ácido cítrico 12 mM y 20mM de

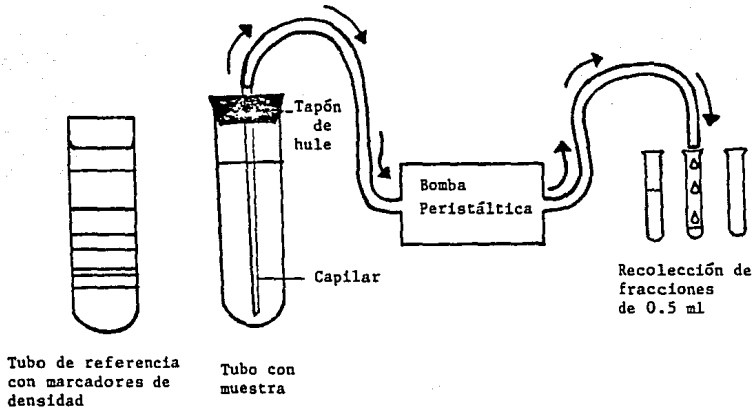



Figura 1 . Sistema para la recolección de fracciones de los gradientes de densidades de Percoll.

$Na_2HPO_4$, a 37°C durante 30 min. El blanco con ácido cítrico 12 mM, 20mM de $Na_2HPO_4$, 75 mM de NaCl , 0.1% de BSA (Albúmina Serica Bovina) - Sigma - y 0.1% de triton (Sigma) , fue incubado (33 ul) igualmente con 66 µl de sustrato.

Después de la incubación a 37°C la reacción se detuvo con 1.3 ml/tubo, de una solución amortiguadora de glicina-carbonatos a pH 10.5 (24 g/l de glicina Bio-Rad , 21.25 g/l de $Na_2CO_3$ y 7.5 g/l de NaOH) a 4°C.

Las muestras de los tubos fueron leídas en un espectrofluorometro Aminco-Bowman o Perkin Elmer LS-5, a 360 nm de excitación y 448 nm de emisión empleando una celda de cuarzo. Los ensayos fueron por triplicado para cada fracción.

En ensayos posteriores, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron cambiadas de 360/448 a 359/446 nm después de obtener los espectros de excitación y emisión de una solución estándar de 4-Metil Umbeliferona , en un espectrofluorometro Perkin Elmer LS-5. Este estándar corresponde al producto de la degradación del sustrato por la enzima.

## 6.6 Obtención del extracto antigenico de *M. tuberculosis* H37Rv

La cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, obtenida de la Escuela Nacional de Ciencias Biologicas del Instituto Politecnico Nacional. fue sembrada en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio PBY (Proskawer-Beck-Youmans) -ver

apéndice- y mantenida a 37°C. Alcanzada la fase estacionaria de crecimiento -esto es, cuando la superficie del medio de cultivo líquido estuvo completamente cubierta por la masa bacteriana-, los medios de cultivo fueron separados de la masa bacteriana a través de un filtro Whatman #3 y por filtraciones sucesivas en filtros microbiologicos Millipore de 0.45 y 0.22 µm. Las proteínas de los filtrados -es decir los medios de cultivo libres de bacterias- se precipitaron con $(NH_4)_2SO_4$ a una concentración de 0.42 g/ ml de filtrado, y a temperatura de 4°C durante 30 minutos con agitación constante. El precipitado se disolvió en PBS 0.01 M pH 7.2 con 0.2 mg/ml de Fluoruro de Fenil - Metil - Sulfoxido (PMSF) - Sigma - como inhibidor de proteasas. El extracto antigenico así obtenido se dializó extensivamente contra PBS a 4°C, eliminando así el exceso de sulfato de amonio.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (44), y ajustándose a una concentración de 6 mg/ml. el extracto antigenico se fraccionó en alícuotas de 2 ml y se guardó en un ultracongelador Revco (Temp. -70°C) hasta el momento de su uso.

## 6.7 Obtención del suero hiperinmune anti <u>M. tuberculosis</u>

El suero hiperinmune usado en la IET se obtuvo en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, como a continuación se describe (34).

Cuatro conejos adultos Nueva Zelanda fueron inmunizados por via intramuscular con una mezcla de 3 mg de extracto antigenico, 5 mg de bacterias muertas por calor (M. tuberculosis cepa H37Rv), y 1 ml de Al(OH)3 como advuvante, una vez a la semana durante seis semanas. Después de este tiempo los conejos fueron sangrados de las orejas y se determinó el titulo de anticuerpos por el método de ELISA, considerandose como adecuados los titulos superiores a 1/4000, y en los casos en que fueron menores fue necesario reinmunizar.

Los sueros fueron guardados en alicuotas de 1 ml a -20° C.

## 6.8 Experimentos de procesamiento de antígenos

Para cada tiempo probado (0, 20, 40, 120 y 240 min) se utilizaron 1 o 2 cajas de cultivo de 75 cm2 con 15 o 30 millones de células J774 respectivamente.

Antes de iniciar los experimentos de procesamiento de Ag's, las células fueron incubadas durante 2 horas en DMEM sin SFB (8 ml/caja) a 37°C y 5% de CO2. Se agregaron 0.66 ml de extracto antigenico de M. tuberculosis a cada caja - concentracion final de 500 µg/ml), y se incubaron a 37°C y 5% de CO2 durante 30 minutos. Las células control fueron incubadas sin extracto antigenico

Después de los 30 minutos de incubación inicial, por un lado se tomaron las células a tiempo 0 (t 0') y se lavaron

con SIS conteniendo $NH_4Cl$ 10 mM para romperlas; por otro lado las otras cajas fueron sacadas de la incubadora y se eliminó el medio. Estas células se lavaron 2 veces con DMEM -sin SFB ni antibioticos- y se les volvió a agregar 8 ml del mismo medio por caja. A partir de estos 30 min de incubación inicial, en que las células ingieren el extracto antigenico por endocitosis, las células nuevamente se incubaron a 37°C y 5% de $CO_2$ y se fueron sacando a tiempos de 20, 40, 120 y 240 minutos, para fraccionamiento subcelular. Las células control fueron sacadas al final del último tiempo de incubación en cada experimento.

Para fraccionarse, las celulas fueron lavadas 2 veces con 10 ml de SIS conteniendo ademas $NH_4Cl$ 10 mM como inhibidor de las enzimas lisosomales (35, 36). El cloruro de amonio alcaliniza los lisosomas, inhibiendo de este modo la actividad de las hidrolasas que aquí funcionan a un pH ácido; de este modo se puede reducir, teóricamente, la proteolisis de antígenos micobacterianos.

Sobre un tercer lavado de 10 ml de SIS con $NH_4Cl$, las células fueron despegadas de las cajas con un gendarme y transferidas a un tubo conico de 15 ml, se centrifugaron a 700 g y 4°C por 10 min.

El rompimiento de las celulas se llevo a cabo como se describe en la seccion 6.4, acoplando el émbolo del homogeneizador a un motor de velocidad variable (Wheaton overhead stirrer) a una velocidad de 3.5, y manteniendo la temperatura constante con una mezcla de hielo, agua y sal. Las células se rompieron entre el 50 y 60%.

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo como se describe en la misma seccion 6.4 , colocando un colchón de sacarosa 2.5 M en el fondo de los tubos para centrifugar.

Las fracciones obtenidas de estos experimentos, excepto el colchón de sacarosa 2.5 M, fueron guardadas a -20°C para la detección de Ag's de M. tuberculosis por IET.

El procedimiento de estos experimentos se muestra en la figura 2 .

## 6.9 Detección de antígenos de M. tuberculosis en lisosomas de células J774 por Inmunoelectrotransferencia.

### 6.9.1 Preparación de las muestras

Se tomaron las fracciones subcelulares 1, 2 y 3 de los experimentos de procesamiento de antígenos (células control, tiempo 0, tiempo 20', tiempo 40', tiempo 120' y tiempo 240'), correspondientes a la fracción lisosomal, y se dializaron extensivamente contra una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.05 M (pH 6.8)a 4°C y con agitación constante, empleando membrana para diálisis Spectrapor (Spectrum Medical Industries, U.S.A.) que retiene moleculas de peso molecular mayor de 12 000 daltons. Así se eliminó el exceso de sacarosa en las muestras.

Después de dializadas, las muestras con lisosomas fueron hervidas en baño María con mezcla digestora para electroforesis durante 5 min. La mezcla digestora o cocktail

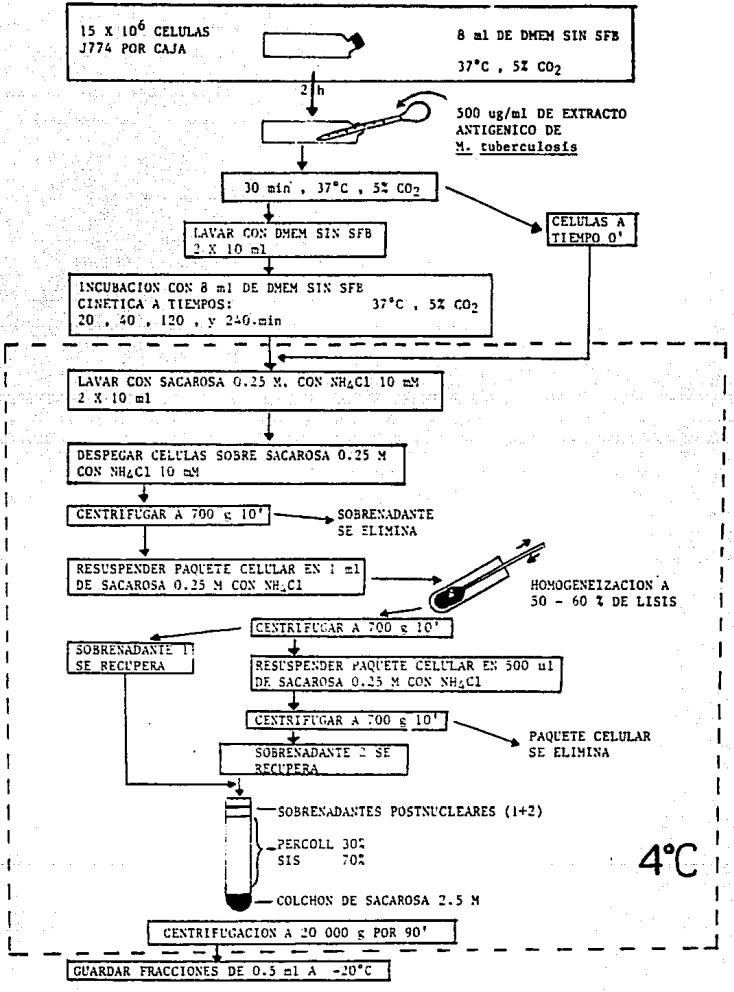



FIGURA 2. Diagrama de flujo de los experimentos de Procesamiento de Antígenos.

para electroforesis se preparo con Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), SDS 4%, glicerol 20%, 2-Mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol al 0.01% . Nuevamente las muestras se guardaron a -20°C para la IET.

### 6.9.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio en un sistema discontinuo.

El sistema discontinuo consiste en dos geles con diferente concentración de poliacrilamida. La muestra se concentra después de pasar por el gel superior -gel concentrador- y se separa en el gel inferior -separador- , obteniendose una mejor definición de bandas (37).

En un matraz kitasato se mezclaron con agitación constante y al vacío, las siguientes soluciones para preparar el gel separador:

Gel separador: Acrilamida 10% , Tris 0.375 M

| **Solución** | **Volumen (ml)** |
|---|---|
| Sol. madre de acrilamida | 11.7 |
| Sol. amortiguadora de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) | 8.8 |
| SDS al 10% | 0.35 |
| Agua destilada | 14.0 |
| Persulfato de Amonio (0.1 g/ml) | 0.3 |
| TEMED (N,N,N'N'-Tetrametiletilendiamina) | 0.01 |

Con una pipeta se virtieron 31.5 ml de esta mezcla entre

las placas de vidrio de 16 x 20 cm (con separadores de 1.5 mm) de una cámara para electroforesis Protean II Slab Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca.), evitando la formación de burbujas. Se permitió la polimerizacion del gel por 30 min, se eliminó el exceso de agua de la superficie del gel, y se colocó un peine de teflón para 10 carriles 1 cm por arriba del gel separador.

El gel concentrador (superior) se preparó mezclando con agitación constante y al vacío en un matraz kitasato, las siguientes soluciones:

Gel concentrador: Acrilamida 4% , Tris 0.125 M

| **Solución** | **Volumen (ml)** |
|---|---|
| Sol. madre de acrilamida | 0.78 |
| Sol. amortiguadora de Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) | 1.5 |
| SDS al 10% | 0.06 |
| Agua destilada | 3.6 |
| Persulfato de amonio (0.1 g/ml) | 0.03 |
| TEMED | 0.003 |

La mezcla se virtió rapidamente sobre el gel separador, evitando la formación de burbujas, y se dejó polimerizar por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se eliminó el exceso de agua, dejando secos los carriles formados y quedando listo para la colocación de las muestras.

Se descongelaron las fracciones lisosomales de las células de la linea J774 y se centrifugaron a 13000 RPM por 5 min en una microcentrifuga Beckman. Se colocaron 250 µl del

sobrenadante de cada muestra por carril, en el gel concentrador, y 25 µl del extracto antigenico de M. tuberculosis previamente hervido por 5 min en mezcla digestora relación 1 : 1 (vol.-vol).

En otro carril se puso una alícuota de la mezcla de marcadores de peso molecular SDS-7B (Sigma) para electroforesis. Dicha mezcla contiene los siguientes marcadores preteñidos:

| Proteína | P.M. Aproximado |
|---|---|
| 1.- Triosafosfato Isomerasa (de músculo de conejo) | 26 600 |
| 2.- Deshidrogenasa lactica (de musculo de conejo) | 36 500 |
| 3.- Fumarasa (de corazón de cerdo) | 48 500 |
| 4.- Pi uvato Kinasa (de músculo de pollo) | 58 000 |
| 5.- Fructosa-6-Fosfato Kinasa (de músculo de conejo) | 84 000 |
| 6.- B-Galactosidasa (de Escherichia coli) | 116 000 |
| 7.- ∝2-Macroglobulina (de plasma humano) | 180 000 |

Una vez que se montó el aparato, la electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 30 mA /gel durante 4 - 5 horas y manteniendo la temperatura constante con un baño enfriador CIUNAM (Centro de Instrumentos de la U.N.A.M., Mexico); la solución

amortiguadora utilizada en la electroforesis contiene Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS al 1% y el pH es de 8.3

### 6.9.3 Tinción con Azul de Coomassie

Después de la electroforesis los geles fueron separados de las placas de vidrio y se cortaron carriles con extracto antigenico de M. tuberculosis para teñirlos con Azul de Coomassie y ver el patron electroforetico de dicho extracto.

Los geles fueron colocados en un recipiente con una solución al 0.125% de Azul de Coomassie, (Bio-Rad), metanol al 50% y ácido acético al 10% , y se dejaron en esta solución toda la noche. Al dia siguiente el exceso de colorante fue eliminado efectuando cambios sucesivos de una solución decoloradora que contiene metanol al 50%, acido acético al 10% y agua destilada al 40% , hasta que las bandas de proteínas fueron visibles.

La tinción con Azul de Coomasie tambien se hizo como control para los geles después de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa.

### 6.9.4 Inmunoelectrotransferencia

Al término de la electroforesis los geles fueron colocados en un recipiente con sol. amortiguadora de transferencia (Tris 0.025 M , Glicina 0.192 M y Metanol al 20%) durante 30 minutos. En el mismo recipiente se colocaron

tiras de nitrocelulosa de 14 x 14 cm.

Se armó la cámara de transferencia Trans Blot (Bio-Rad), quedando el gel y la membrana de nitrocelulosa como se muestra en la figura 3.

La transferencia se llevó a cabo durante 2 horas a una corriente constante de 1 A y a 4°C utilizando un baño enfriador.

Una vez transferidas las muestras del gel a la nitrocelulosa, se cortó la tira con los marcadores de peso molecular , se lavó con agua y se guardó. La nitrocelulosa con las muestras se bloqueó con BSA al 3% en PBST 0.1% y a 4° C con agitación constante durante toda la noche. Todas las incubaciones y lavados sucesivos se hicieron con agitación.

Al dia siguiente las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas 5 veces con PBST 0.1% por 10 minutos en cada lavado y a temperatura ambiente. Enseguida las membranas fueron incubadas con suero hiperinmune de conejo anti M. tuberculosis diluído 1:200 en PBST 0.1% y BSA al 1% y dejadas toda la noche a 4°C. Después de esto, las tiras fueron lavadas 5 veces por 10 min con PBST 0.1%, y se incubaron durante 2 horas con Proteína A acoplada a Peroxidasa (Amersham International plc, UK) dilución 1:400 en PBST 0.1% y BSA 1% . Enseguida se lavo nuevamente con PBST 0.1% 5 veces, y 5 veces mas con PSB sin Tween. Durante el último lavado se preparó el sustrato O-Cloronaftol (Sigma) para evidenciar la reacción y visualizar las bandas en la nitrocelulosa. Se disolvieron 30 mg de O-Cloronaftol en 10 ml

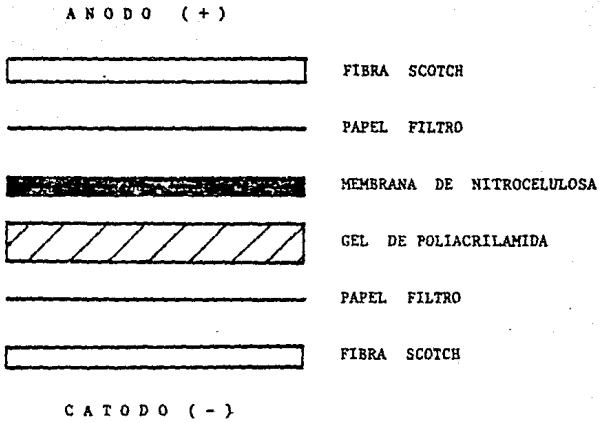



Figura 3 . Diagrama de la cámara para transferir proteínas del Gel de Poliacrilamida a la Membrana de Nitrocelulosa.

de metanol y se mezcló con 50 ml de PBS 0.01M y 100 µl de H202 al 30%. Las tiras se incubaron en esta mezcla entre 10 y 60 min hasta que las bandas color violeta fueron visibles. Una vez que aparecieron las bandas, las tiras fueron lavadas una vez con PBS y con agua corriente durante 1 hora, guardándose en hojas de papel blancas para fotografiarse después.

La técnica de Inmunoelectrotransferencia o Western Blotting se resume en el diagrama de flujo de la siguiente hoja.

Western Blotting para la detección de Antígenos de *M. tuberculosis*

Todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente, a menos que se especifique otra cosa

↓

1.- Bloquear las tiras de nitrocelulosa con BSA al 3% en PBS-Tween 20 0.1% toda la noche

↓

2.- Lavar 5 x 10 minutos con PBS-Tween 20 0.1%

↓

3.- Incubar con suero hiperinmune anti *M. tuberculosis* 1:200 en PBS-Tween 20 0.1% y BSA 1% toda la noche a 4°C

↓

4.- Repetir 2

↓

5.- Incubar con Proteina A con Peroxidasa 1:400 en PBS-Tween 20 0.1% y BSA 1% por 2 horas

↓

6.- Repetir 2

↓

7.- Repetir 2 con PBS

↓

8.- Visualizar bandas incubando con: 50 ml de PBS + 10 ml de metanol + 30 mg de O-Cloronaftol + 100 ul de H2O2 al 30% durante 10 a 60 minutos.

# 7 RESULTADOS

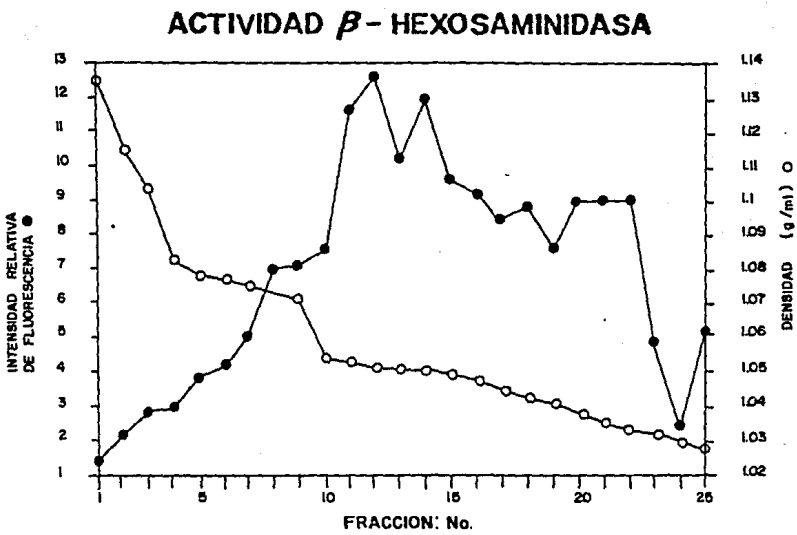
## 7.1 Fraccionamiento subcelular

Las diferentes condiciones de rompimiento de las células para el fraccionamiento subcelular tuvieron por finalidad estandarizar las mismas para obtener la fracción lisosomal de las células J774.

Como marcador lisosomal se utilizó el ensayo enzimatico para la actividad de β-Hexosaminidasa. Este ensayo se hizo para las fracciones de 0.5 ml que se obtuvieron del fraccionamiento subcelular en los gradientes de densidades.

Es importante hacer notar que las gráficas de actividad enzimatica tienen diferentes escalas en el eje de las ordenadas, esto es, en la Intensidad Relativa de Fluorescencia. Esto se debe a que se usaron dos espectrofluorometros distintos y estos tienen diferente sensibilidad y sus escalas no son iguales. No obstante las gráficas sí pueden ser comparadas, ya que las lecturas de fluorescencia que se obtienen son relativas, y lo que importa es la presencia de un pico de máxima actividad enzimatica.

En la gráfica 1 se muestra un primer ensayo para la actividad de β-Hexosaminidasa. En este intento se obtuvo un 80% de lisis celular rompiendo las células con 55 golpes del émbolo de teflón en el homogeneizador de vidrio, haciéndolo manualmente; la temperatura se mantuvo constante a 4° C trabajando sobre hielo. La actividad enzimatica que comienza




Gráfica 1 . Ensayo enzimático para las fracciones subcelulares de la línea J774 , obtenidas de un gradiente de densidad. Excitación a 360 nm, Emisión a 448 nm . Ensayo con 15 millones de células. Centrifugación a 20 000 RPM (43 000 g) por 75 min.

● ACTIVIDAD ENZIMATICA

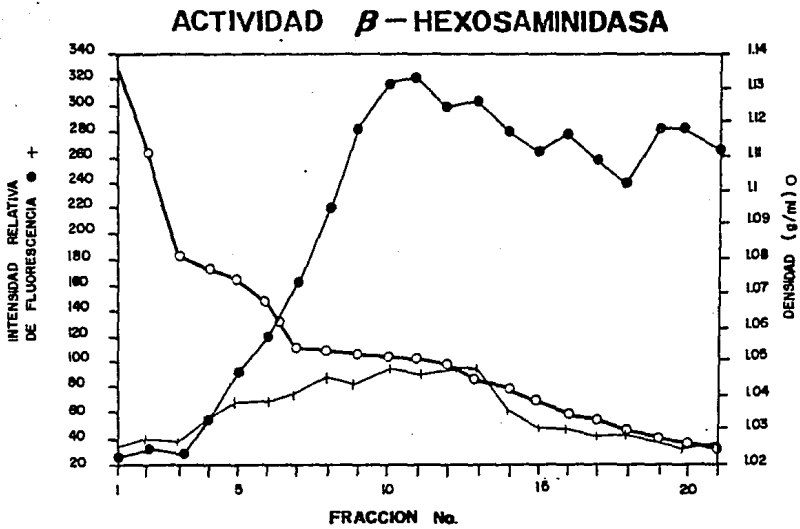
O GRADIENTE DE DENSIDAD

con valor de 1.4 de Intensidad Relativa de Fluorescencia (IRF) en la fraccion 1. se va incrementando paulatinamente hasta alcanzar su valor máximo de 12.7 de IRF en la fracción 12 y con una densidad aproximada de 1.05 . Después de este máximo, en general la actividad enzimatica cae paulatinamente, fluctuando entre valores de 8 y 10 de IRF, hasta llegar a la fracción 22, en donde hay una caída brusca hasta llegar a 2 en la fracción 24, para quedar en 5 de IRF en la última fracción.

Los puntos graficados de la actividad enzimatica, en esta y en las demás gráficas, son el promedio de 3 lecturas en el espectrofluorometro, y la densidad es expresada siempre en g/ml.

En la Gráfica 2 se presentan otros dos ensayos para β-Hexosaminidasa. En el primero de ellos se obtvo un 75% de lisis celular con 55 golpes del émbolo en el homogeneizador. En el ensayo enzimatico para las fracciones de este experimento ( ● ) no se ve un pico bien definido en la actividad enzimatica; iniciando con un valor de 25 de IRF en la fraccion 1 , la actividad se va incrementando al ir bajando la densidad en el gradiente, hasta llegar a su máximo en la fracción 11 (densidad de 1.052) con una lectura de 320 de IRF. A partir de aquí, la actividad comienza a decaer hasta alcanzar valores de entre 250 y 300 de IRF en las fracciones más ligeras del gradiente (fracciones 13 a 21).

En el segundo ensayo se obtuvo un 25% de lisis celular rompiendo con 17 golpes del émbolo en el homogeneizador. La gráfica del ensayo enzimatico de este experimento ( + )




Gráfica 2 . Ensayo enzimático para las fracciones subcelulares de la línea J774 , obtenidas de un gradiente de densidad. Excitación a 360 nm, Emisión a 448 nm . Experimento con 15 millones de células. Centrifugación a 20 000 RPM (43 000 g) por 75 min.

● ACTIVIDAD ENZIMATICA CON 75% DE LISIS

+ ACTIVIDAD ENZIMATICA CON 25% DE LISIS

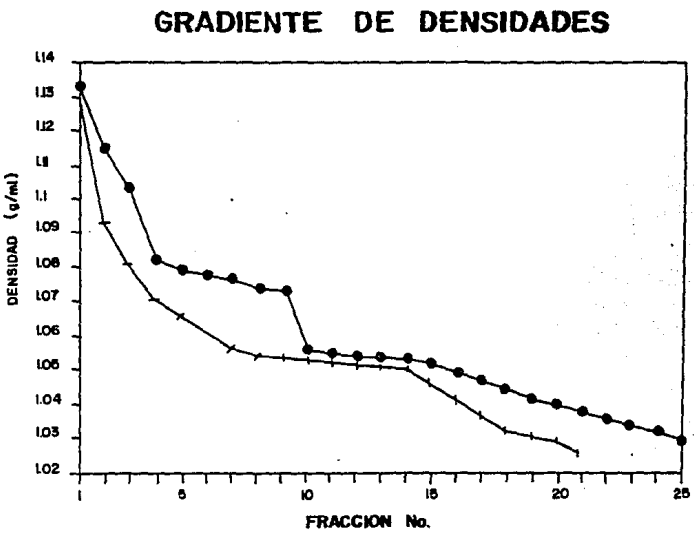
O GRADIENTE DE DENSIDAD

tampoco presenta un pico bien definido. La actividad enzimatica que inicia con un valor de 35 de IRF, se va incrementando poco a poco al ir disminuyendo la densidad en el gradiente, hasta que alcanza su máximo en la fracción 13 con un valor de 100 de de fluorescencia (IRF) y densidad de 1.046. A partir de este valor la actividad desciende hasta alcanzar valores de fluorescencia comparables con las primeras fracciones, alrededor de 40 de IRF.

Con la finalidad de mejorar las condiciones del fraccionamiento subcelular, para obtener una fracción lisosomal más pura que en los ensayos anteriores (Gráficas 1 y 2), se hicieron pruebas para la formacion del gradiente de densidades bajo diferentes velocidades de centrifugación.

Las Gráficas 3 y 4 corresponden a cuatro ensayos de centrifugacion a diferentes velocidades y tiempos para la formacion de los gradientes.

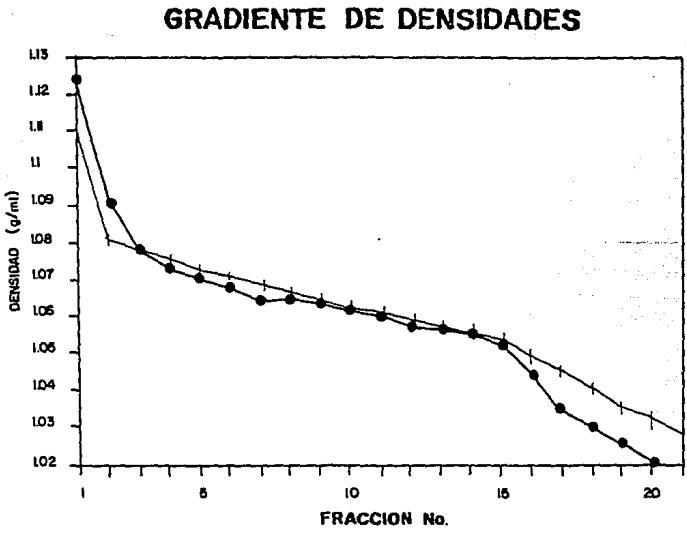
En los gradientes de los ensayos correspondientes a las graficas 1 y 2, se ve un cambio de pendiente muy brusco entre las densidades de 1.072 y 1.052, lo que podría influir en la escasa definición del pico del marcador lisosomal. Es por esto que en los ensayos de centrifugación de las graficas 3 y 4 se midio la separación entre estos dos marcadores de densidad (1.072 y 1.052) como criterio de elección de las condiciones de centrifugación para los siguientes experimentos. Los gradientes se comparan en la Tabla 1.




Gráfica 3 . Ensayos de Centrifugación de una solución de Percoll al 30% y Sacarosa 0.25 M al 70%

● CENTRIFUGACION A 20 000 RPM (43 000 g) POR 75 min

+ CENTRIFUGACION A 17 500 RPM (35 000 g) POR 75 min




Gráfica 4 . Ensayos de Centrifugación de una solución de Percoll al 30% y Sacarosa 0.25 M al 70%.

● CENTRIFUGACION A 13 500 RPM (20 000 g) POR 90 min

+ CENTRIFUGACION A 13 500 RPM (20 000 g) POR 75 min

| | 20 000 RPM 75 minutos | 17 500 RPM 75 minutos | 13 500 RPM 90 minutos | 13 500 RPM 75 minutos |
|---|---|---|---|---|
| FCR | 43 000 g | 35 000 g | 20 000 g | 20 000 g |
| Dif. | 0.80 ml | 0.90 ml | 5.60 ml | 4.80 ml |

Tabla 1. Comparación de los gradientes de densidades de las graficas 3 y 4 según la separación de los marcadores de densidad de 1.072 y 1.052 .

**RPM:** Revoluciones Por Minuto

**FCR:** Fuerza Centrífuga Relativa

**Dif:** Diferencia de volumen entre los marcadores de densidad de 1.072 y 1.052

En la Tabla 1 se ve que el gradiente con mayor diferencia entre las densidades de 1.072 y 1.052 es el conseguido centrifugando a 13 500 RPM por 90 min, siguiendo el de 13 500 RPM por 75 min, con diferencias de 5.6 y 4.8 ml respectivamente. Los otros dos gradientes - 17 500 y 20 000 RPM- presentan diferencias mas pequeñas entre las densidades mencionadas.

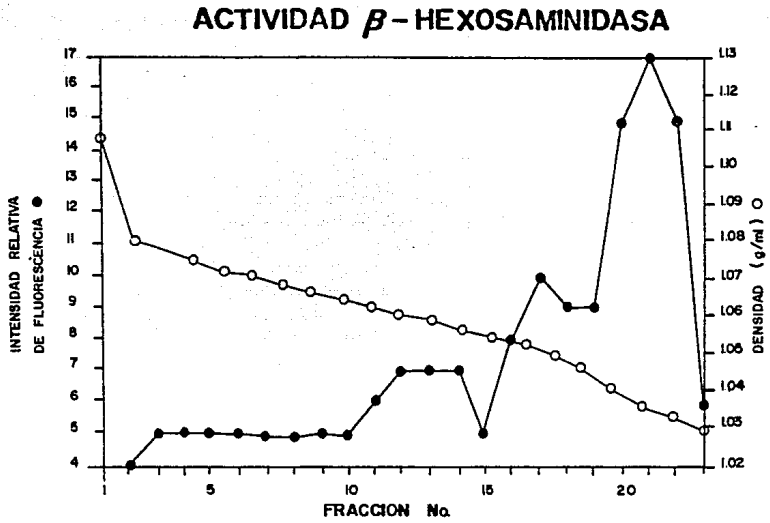
En lo sucesivo se realizaron otros ensayos enzimaticos probando con los gradientes de 13 500 RPM por 90 o 75 min.

En la Gráfica 5 se presenta otro ensayo de actividad de β-Hexosaminidasa para las fracciones subcelulares de células

J774. Se obtuvo un 50% de lisis celular rompiendo con 45 golpes del embolo de teflón en el homogeneizador de vidrio. La temperatura se trato de mantener constante con hielo seco durante la homogeneización, sin que las células llegaran a congelarse.

La actividad enzimatica presenta un valor inicial de 4 de IRF en la fracción 1 y sube a 5 en la fracción 2, manteniéndose en este valor hasta llegar a la fracción 10, en donde comienza a subir hasta 7, manteniéndose en este valor hasta que cae en la fracción 15 a una IRF de 5; a partir de la fraccion 16, la actividad enzimatica, en general, aumenta, hasta llegar al máximo en la fracción 21 (densidad de 1.035), y despues de esto cae abruptamente hasta un valor de 5.7 en la ultima fracción.

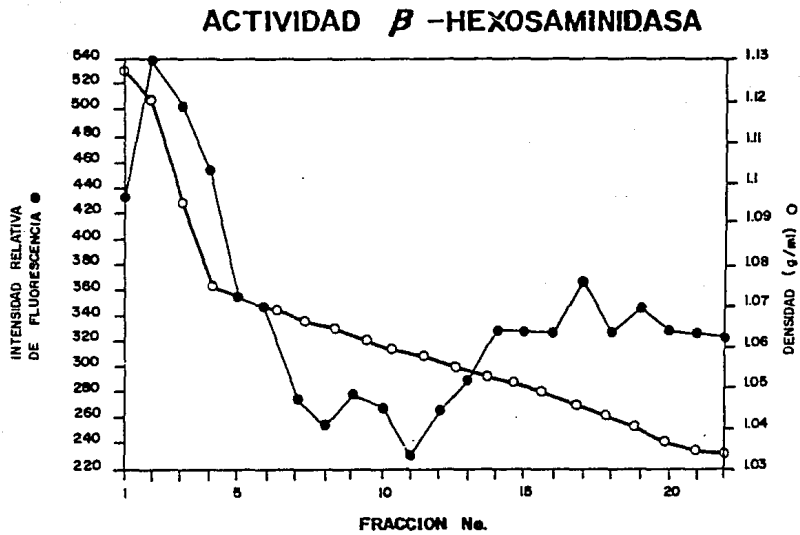
En la Gráfica 6 se presenta un nuevo ensayo de purificacion de lisosomas. Utilizando 30 millones de celulas se obtuvo un 60% de lisis con 30 golpes del embolo de teflón acoplado a un motor Wheaton trabajando a una velocidad de 3.5. La temperatura se mantuvo constante a 4°C con una mezcla de hielo, agua y sal. En el fondo del tubo se coloco un colchón de sacarosa 2.5 M y se centrifugó a 13 500 RPM por 90 min. La IRF inicia con un valor de 436 de IRF, y en la fraccion 2 alcanza su máximo llegando a 540. Después comienza a caer hasta 457 de IRF en la fracción 4 y a partir de aquí cae mas rapidamente y se mantiene entre valores de 230 y 275 hasta la fracción 11; a partir de la fracción 11 la actividad enzimatica aumenta y al llegar a la fraccion 14 se mantiene




Gráfica 5 . Ensayo enzimático para las fracciones subcelulares de la línea J774 , obtenidas de un gradiente de densidad. Excitación a 360 nm, Emisión a 448 nm . Experimento con 30 millones de celulas; homogeneización sobre - hielo seco. Centrifugación a 13 500 RPM (20 000 g) durante 75 min.

● ACTIVIDAD ENZIMATICA

O GRADIENTE DE DENSIDAD




Gráfica 6 . Ensayo enzimático de B-Hexosaminidasa para las fracciones subcelulares de células J774 , obtenidas de un gradiente de densidad. Excitación a 359 nm, Emisión a 446 nm. Experimento con 30 millones de células. Centrifugación a 13 500 RPM (20 000 g) por 90 min. Se colocó un colchón de sacarosa 2.5 M en el fondo del tubo de centrifugación.

● ACTIVIDAD ENZIMATICA

O GRADIENTE DE DENSIDAD

hasta la fraccion 16, para presentar un pequeño pico en la fraccion 17 (370 de IRF). La mayor actividad enzimatica se encuentra entre las densidades de 1.097 y 1.118 g/ml; un segundo pico se insinúa a 1.044 de densidad en la fracción 17.

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron cambiadas de 360/448 nm a 359/446 nm después de obtener los espectros de excitación y emisión de una solución estándar de 4-Metil umbeliferona en un espectrofluorometro Perkin Elmer LS-5 , como se indica en la metodología (seccion 6.5).

## 7.2 Extracto antigenico de M. tuberculosis

Obtenido el extracto antigenico de M. tuberculosis cepa H37Rv, se separó por SDS-PAGE, resultando el patrón electroforetico de la figura 4.

En el gel tenido con Azul de Coomasie que se presenta en esta figura, se detectan alrededor de 40 bandas proteicas con pesos moleculares entre 14 y 100 Kd.

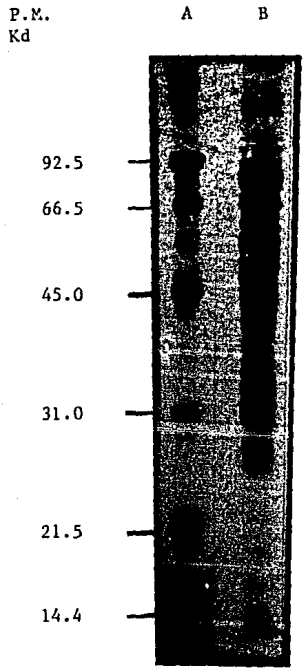



Figura 4 . Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS, del Extracto antigénico de M. tuberculosis cepa H37Rv, cultivada en PBY. Tinción con Azul de Coomassie.

A = Marcadores de Peso Molecular

B = Extracto antigénico de M. tuberculosis

## 7.3 Deteccion de antígenos de *M. tuberculosis* en lisosomas de células de la linea J774

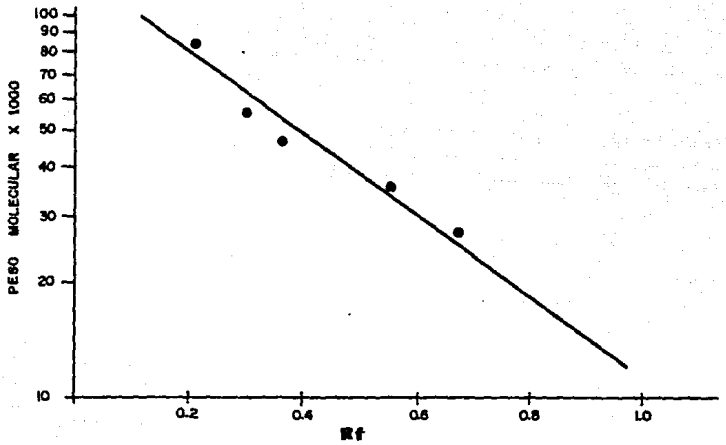
De los experimentos de procesamiento de antígenos, se tomaron las fracciones 1, 2 y 3 como la fracción lisosomal (según los resultados mostrados en la Grafica 6), se dializaron y se buscaron los Ag's en estas fracciones por IET.

La grafica 7 es la curva de referencia para el cálculo de los Pesos Moleculares -PM-, obtenida con los marcadores de PM en IET.

Los PM de las proteínas de los experimentos de procesamiento de Ag's (Figuras 6, 7 y 8) fueron calculados interpolando en la grafica 7, a partir de sus valores de Rf.

En la Figura 5 se presenta el extracto antigenico de *M. tuberculosis* que fue transferido del gel al papel de nitrocelulosa, y revelado con suero hiperinmune de conejo contra *M. tuberculosis*. En la fotografia de la IET de esta figura se pueden ver una gran riqueza de bandas antigenicas. Se sabe que este suero hiperinmune reconoce alrededor de 45 antígenos y que tienen Pesos Moleculares que van de los 14 Kd hasta más de 100 Kd (28, 34).

La Figura 6 corresponde a una IET de muestras de lisosomas de los experimentos de procesamiento de Ag's. Las moleculas detectadas a los tiempos 20 y 120 min tienen PM de 43 y 64 Kd. La de 43 Kd se ve al tiempo 20' y en este tiempo la de 64 Kd apenas y se detecta; en cambio al tiempo 120'




Gráfica 7 . Curva de calibración de Pesos Moleculares en Inmunoelectrotransferencia.

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína}}{\text{Distancia total recorrida}}$$

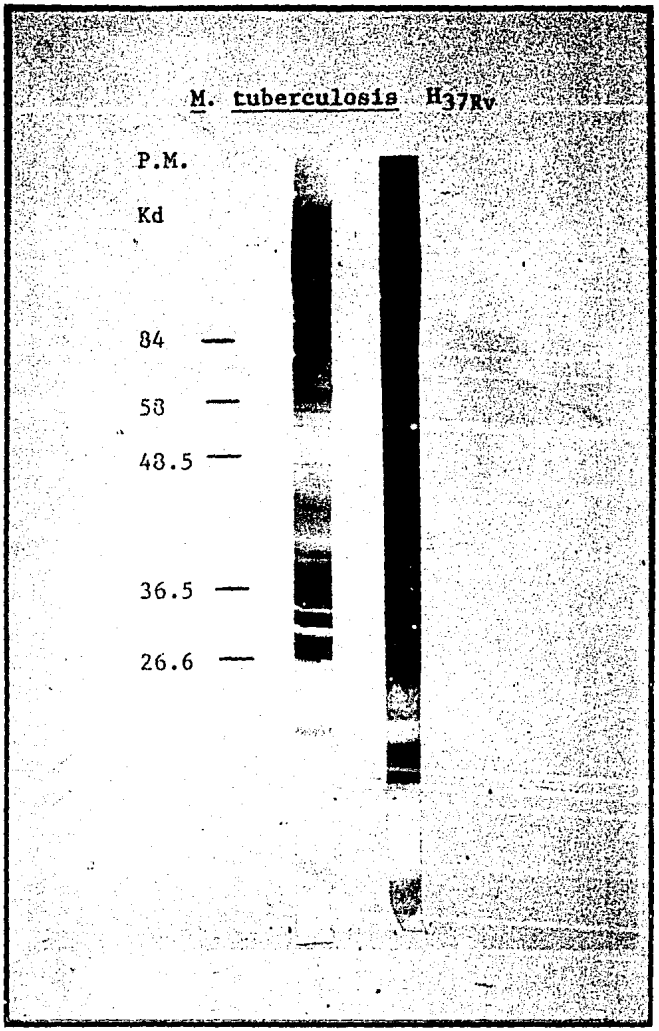



Figura 5 . Bandas antigénicas de M. tuberculosis cepa H37Rv reconocidas por suero hiperinmune de conejo (dilución 1:200), por la técnica de -- Inmunoelectrotransferencia.

sólo se ve el Ag de 64 Kd, mientras que el de 43 no se detecta. Las bandas que se encuentran alrededor de los 70 Kd no son tomadas en cuenta por presentarse en todos los carriles, incluso en el control.

En la Figura 7 se muestra la IET de lisosomas de celulas J774 infectadas con Ag's de M. tuberculosis despues de 20 y 120 min de procesamiento. En el tiempo 20' se ve una banda de aproximadamente 43 Kd bien definida, y otra menos definida de PM aproximado de 65 Kd; en el tiempo 120' se aprecia sólo una banda con un PM aproximado de 62 Kd. Las dos bandas con peso superior a los 70 Kd, aparecieron en todos los carriles, incluso en el que solo tenía mezcla digestora para electroforesis (carril sin marcar en la figura 7), por lo que no se tomaron como bandas antigenicas de M. tuberculosis reconocidas por el suero hiperinmune.

En la Figura 8 se presenta un ensayo mas de IET para las muestras de lisosomas de células J774 al tiempo 0' de procesamiento de Ag's, es decir, después de los 30 min iniciales de incubación con el extracto antigenico. En este experimento las células se incubaron con 1 mg de extracto antigenico/ml de medio de cultivo. Se ve una banda muy tenue de PM aproximado de 45 Kd en ambos carriles al tiempo 0 , mientras que en el control no se ve. La banda arriba de los 60 Kd de PM no se toma en cuenta por presentarse incluso en el control.

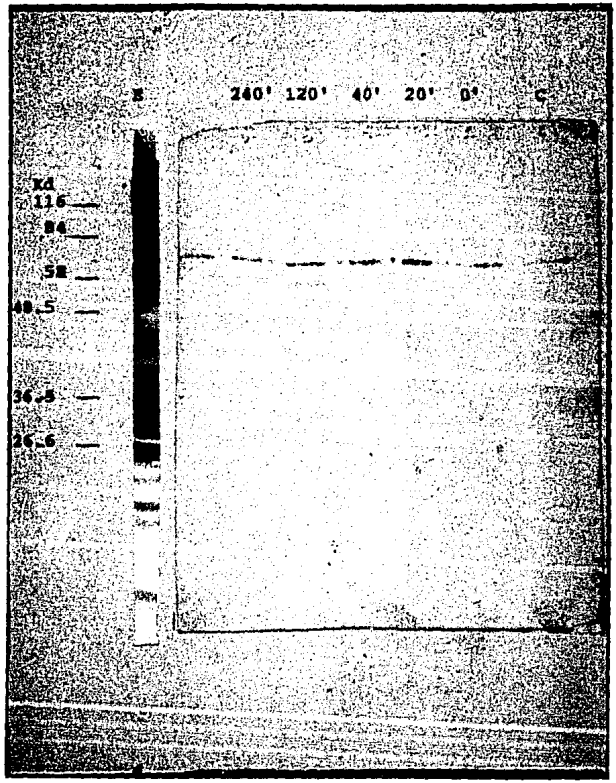



Figura 6 . Inmunoelectrotransferencia de fracciones lisosomales de células J774 incubadas con Ag's de M. tuberculosis y reveladas con suero hiperinmune de conejo. C = Control (células incubadas sin antígenos); 0'- 240'= Lisosomas de células incubadas con Ag's por 30 min, y reincubadas de 0 a 240 min en DMEM sin SFB. E = Extracto antigénico de M. tuberculosis. El carril sin marcar sólo tiene mezcla digestora para electroforesis.

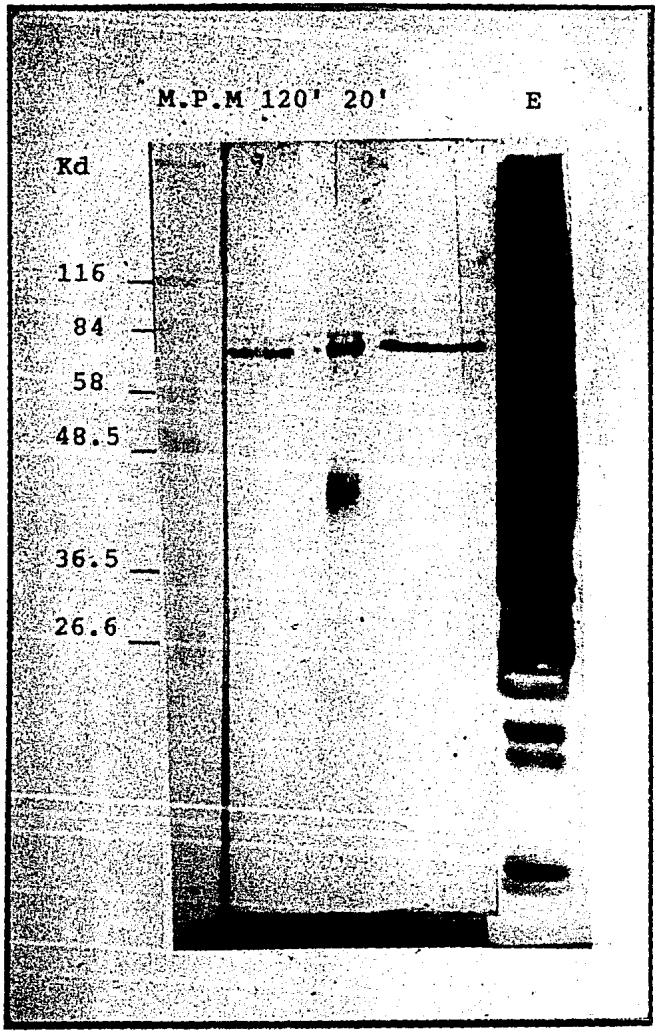



Figura 7 . Inmunoelectrotransferencia de fracciones lisosomales de células J774 incubadas con Ag's de M. tuberculosis . M.P.M.= Marcadores de Peso -- Molecular; 120' y 20'= Lisosomas de células después de 120 y 20 minutos de procesamiento de los antígenos. E= Extracto antigénico de M. tuberculosis. El carril sin marcar sólo tiene mezcla digestora para electroforesis.

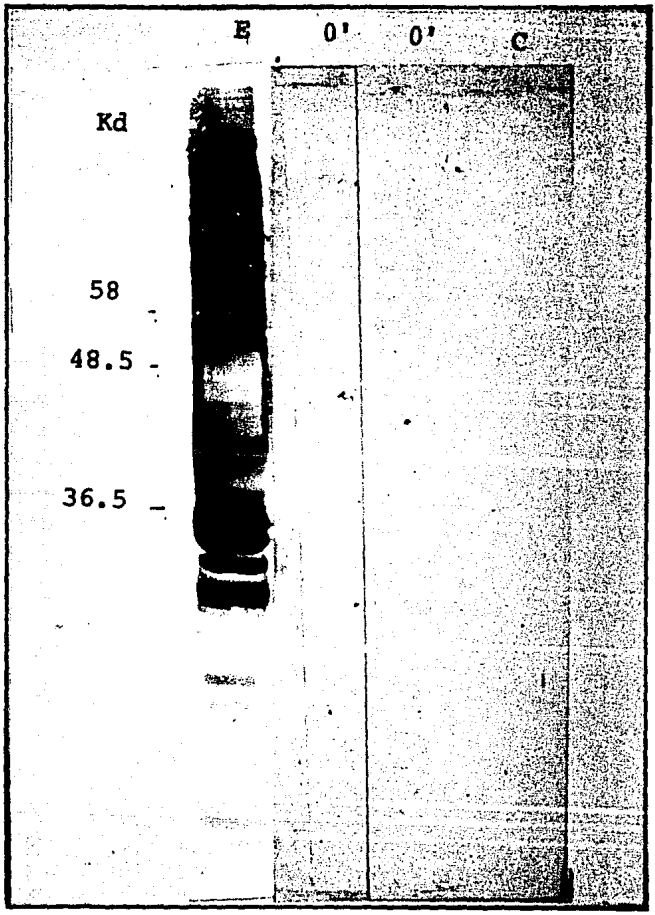



Figura 8 . Inmunoelectrotransferencia de fracciones lisosomales de células J774 incubadas con Ag's de M. tuberculosis y reveladas con suero hierinmune de conejo. C = Control (lisosomas de células incubadas sin Ag's); 0' = lisosomas de células incubadas con 1 mg de extracto antigénico/ml de medio, al tiempo 0 de procesamiento. E = Extracto antigénico.

# 8 DISCUSION

El trabajo presentado en esta tesis, pasó por una serie de problemas metodológicos que se tuvieron que resolver en primer término, antes de llegar a los experimentos de procesamiento de Ag's. La solución de tales dificultades, tuvo por finalidad el contar con una técnica de rompimiento y fraccionamiento subcelular que conservara íntegros a los lisosomas, para buscar Ag's en estos organelos.

En la Gráfica 1 no se tiene un pico bien definido de la actividad de β-Hexosaminidasa (el marcador lisosomal), y el máximo valor obtenido de IRF es a una densidad de 1.05, la cual es muy baja para lisosomas (40).En este experimento, al igual que en otro más presentado en la Grafica 2, las celulas se rompieron entre un 75 y un 80% , lo que pudo haber dañado a los lisosomas , liberando su contenido y haciendo que la actividad de β-Hexosaminidasa apareciera dispersa por todo el gradiente. Teniendo esta idea, en el otro ensayo presentado en la misma Gráfica 2, las células sólo se rompieron a un 25% y no se hizo ninguna otra modificación; Sin embargo, el resultado fue parecido al del experimento con 75% de lisis, sólo que la señal de fluorescencia fue como 3 veces menor en el ensayo enzimatico.

En estas pruebas se centrifugó a 20 000 RPM (43 000 g) por 75 minutos y lo que se observa en las curvas de los gradientes de densidades (Graficas 1 y 2) es un cambio de pendiente muy brusco entre las densidades de 1.072 y 1.052.

Se pensó que este cambio brusco de pendiente podría estar influyendo sobre la falta de definición de un pico de la actividad de β-Hexosaminidasa. Para tratar de eliminar esto, se hicieron los ensayos de centrifugación a diferentes velocidades y tiempos (Gráficas 3-d). En estas gráficas se ve que a menores FCR se obtienen gradientes con menores cambios de pendiente entre las densidades de 1.072 y 1.052, y un comportamiento más lineal entre las densidades de 1.08 y 1.04 g/ml.

Las diferencias entre estos gradientes (Tabla 1) y el antecedente de purificación de lisosomas de esta linea celular centrifugando a 20 000 g (39) apoyo la decisión de centrifugar a 13 500 RPM (20 000 g) en los siguientes experimentos.

En el experimento de la Gráfica 5 se probaron varias modificaciones en el rompimiento de las células. Aqui se empleó el doble de células que en los experimentos anteriores -30 millones contra 15 en los primeros por ensayo- pero en cambio sólo se rompieron al 50% para evitar dañar a los lisosomas. Ademas, la temperatura se mantuvo constante homogeneizando sobre hielo seco; la finalidad de ello fue eliminar el exceso de calor producido en la propia homogeneizacion. Con todo ello el pico de actividad de β-Hexosaminidasa se definió pero apareció en las fracciones más ligeras del gradiente, lo que podría indicar que los lisosomas fueron dañados y su contenido fue liberado.

Continuando en la búsqueda de las condiciones óptimas para el fraccionamiento subcelular para obtener lisosomas, en

el experimento de la Gráfica 6 la homogeneización se llevó a cabo con la ayuda de un motor de velocidad variable, con lo que se consiguió un 60% de lisis. Con esto se buscó ya no tener la variabilidad de la fuerza aplicada en la homogeneización manual. Asimismo, ya no se usó hielo seco para mantener la temperatura constante durante la homogeneización, teniendo en mente que esto pudo haber sido tambien algo que causara inestabilidad de los lisosomas; en lugar de ello se usó una mezcla de hielo agua y sal, con lo cual la temperatura ya no bajó mas alla de -5 ° C. La modificación más importante fue la colocación de un colchón de sacarosa 2.5 M en el fondo del tubo de centrifugación, lo que permitió que este sirviera de "basurero" para acumular las células no lisadas y los núcleos que entraran al gradiente. Por otra parte el cambio de las longitudes de onda de excitación y emisión usadas en el ensayo enzimatico (de 360/448 nm a 359/444 nm) resultó de la obtención de los espectros de excitación y emisión de una solución estándar de umbeliferona. Sin embargo este cambio no se considera el más importante en la obtención de un pico bien definido en el ensayo de β-Hexosaminidasa, ya que la diferencia de longitudes de onda entre uno y otro ensayo es muy pequeña. Se considera de mayor importancia la colocación del colchón de sacarosa 2.5 M y la homogeneización con el motor de velocidad variable, lo que la haría mas reproducible.

El máximo de actividad enzimatica que se ve en esta Gráfica 6, entre las densidades de 1.097 y 1.118 coincide con las densidades de 1.09 reportada por Galloway (40), y

1.10 reportada por Mellman (39) para lisosomas de macrófagos de la linea J774. Estos dos autores hacen su gradiente con Percoll 30% - Sacarosa 0.25 M 70% , como se usó en este trabajo. Estos resultados indican que los lisosomas se encuentran en las fracciones 1, 2 y 3 del gradiente de densidad.

Sin embargo queda la duda del significado de el segundo pico visto en el experimento de la grafica 6, a una densidad de 1.044 Esta densidad corresponde aproximadamente a la de endosomas segun Galloway (40); sin embargo, los endosomas no tienen actividad de hidrolasas ácidas y sólo son cuerpos que almacenan transitoriamente material pinocitado, por lo que no se podria pensar en estas vacuolas como las causantes del segundo pico visto en la gráfica 6 . Este segundo pico puede atribuirse a varias causas:

En primer termino, la actividad de B-Hexosaminidasa se encuentra en un 85% en los lisosomas, por lo que existe un 15% de actividad enzimatica extralisosomal (41); esta actividad extralisosomal puede ser en parte la causante de que haya actividad de β-Hexosaminidasa en las fracciones más ligeras del gradiente. Una segunda causa puede atribuirse al rompimiento de un número de lisosomas durante la homogeneización. Rome (25) encuentra dos picos de actividad para varias enzimas lisosomales en fibroblastos, y por microscopía electrónica confirma la existencia de dos subpoblaciones de lisosomas, lo que demuestra la naturaleza multivesicular de estos organelos (11). Sin embargo no es muy

factible pensar en una segunda subpoblacion de lisosomas, ya que la densidad del segundo pico es muy baja para estos organelos. Los dos picos que encuentra Rome (25) son a densidades de 1.11 y 1.085 g/ml. Por lo tanto la segunda señal vista en el gradiente de la grafica 6 es atribuída a una actividad enzimatica extralisosomal y al daño causado a los lisosomas durante la homogeneización.

La obtención del extracto proteico para los experimentos de procesamiento de Ag's no presentó ninguna dificultad. El extracto antigenico de la bacteria separado por electroforesis (Figura 4) da una idea de la complejidad antigenica de M. tuberculosis. Aproximaciones más finas utilizando electroforesis en dos dimensiones (d5) dan un mayor número de componentes proteicos que los presentados aquí.

Una vez que se superaron los problemas técnicos en el fraccionamiento subcelular, se pasó a la parte medular de esta tesis: los experimentos de procesamiento de antígenos.

Al efectuar los experimentos de procesamiento de Ag's, se prefirió hacer un solo lavado de las células después de la lisis, lo que disminuía la posibilidad de contaminación por núcleos y células no rotas, en el gradiente. Otra modificación importante, sobre todo como medida preventiva, fue el incluir en la solución isotonica de sacarosa $NH_4Cl$ a una concentracion de 10 mM. Lo que se buscó con esto fue detener la degradación de los Ag's en el momento del lavado de las celulas, basándose en el conocimiento de que las bases débiles como el $NH_4Cl$ y la cloroquina alcalinizan el lumen

debiles como el $NH_4Cl$ y la cloroquina alcalinizan el lumen lisosomal entre 1 y 1.5 unidades de pH rapidamente, despues de 2 a 4 min de incubacion (36), lo que reduce la actividad de las hidrolasas ácidas. La inclusión del $NH_4Cl$ en la solución isotonica puede preservar a los Ag's de una mayor degradación.

Antes de obtener los resultados presentados en las figuras 6, 7 y 8 se tuvieron que superar otras dificultades técnicas que no permitían detectar Ag's en lisosomas por IET.

Dializando extensivamente las muestras de la fracción lisosomal (fracciones 1 + 2 + 3 de los gradientes, Gráfica 6) contra el amortiguador de Tris-HCl que se usa en la mezcla digestora para electroforesis, se eliminó en buena parte el ruido introducido por el exceso de sacarosa en las muestras, lo que provocaba un barrido al correr las muestras por electroforesis. Además se aumentó el volumen de las muestras colocadas por carril en los geles, de 150 a 250 µl, lo que aumentaba la posibilidad de detectar los Ag's por IET.

La Figura 6 presenta dos Ag's detectados por IET en los lisosomas de la linea macrofágica J774. Estos Ag's de 43 y 64 Kd aparecen sólo a los tiempos de 20 y 120 min despues de la incubación inicial por 30 min con el extracto antigenico. En los carriles correspondientes a otros tiempos se ven dos bandas arriba de los 65 Kd, atribuible a la mezcla digestora, ya que estas también se ven en el control y en el carril que sólo tiene mezcla digestora. Este artefacto puede ser causado por el uso de 2-Mercaptoetanol en la mezcla digestora de electroforesis (46).

Los mismos Ag's pueden verse con mayor claridad en la Figura 7, y con mayor intensidad el de 43 Kd. Nuevamente el artefacto de dos bandas arriba de los 65 Kd se ve en el carril con mezcla digestora para electroforesis. A un tiempo de 20 min se ve con mayor intensidad el Ag de 43 Kd pero también se ve, aunque tenue, el Ag de 64 Kd. Sin embargo, a los 120 min sólo se ve el Ag de 64 Kd. Llama la atención la Figura 8 en donde se ve muy tenue un Ag de 45 Kd pero al tiempo 0', en un experimento llevado a cabo incubando a las celulas con el doble de la concentración de antígenos utilizada en los experimentos anteriores.

Es muy interesante el encontrar sólo dos Ag's en lisosomas, de un extracto de mas de 40 bandas (Figura 5). Tal parece que el Ag de 43 Kd se acumula entre el tiempo 0 y el tiempo 20', alcanzando mayor concentración a los 20 min, mientras que el Ag de 64 Kd se ve tenue a los 20 min y mas claramente al tiempo 120', para después degradarse.

Existen dos posibilidades para explicar la presencia de solo estos dos Ag's en lisosomas. La primera es que los Ag's de 43 y 64 Kd sean seleccionados para internalizarse, es decir, que sean los únicos que entran a la célula y logran llegar a lisosomas. Esto implicaría quizá su internalización por Endocitosis Mediada por Receptor. La otra posibilidad es que estos Ag's sean , hasta cierto punto, los más resistentes a la degradación, y que el resto de los Ag's del extracto sean internalizados y degradados rapidamente en los primeros minutos de incubación de las células con el extracto.

La posibilidad de que la internalizacion de estos Ag's

(43 y 64 Kd) sea por Endocitosis Mediada por Receptor se basa en que macrófagos y ciertos linfocitos B internalizan Ag's por esta via, y ciertos virus y toxinas usan tambien esta via para entrar a células, aparentemente uniéndose de manera oportunista a receptores que normalmente funcionan en la internalizacion de otras sustancias (47).

Por otro lado, la degradación de los Ag's no detectados en estos experimentos, si es que son internalizados, plantea varias dudas. Incluso existe la posibilidad de que la mayor parte de los Ag's del extracto, sean degradados extralisosomalmente, en el citosol, como es el caso de la albúmina y la hemoglobina (49). Las proteínas pueden ser degradadas en cuestión de minutos, o incluso de días, dependiendo de su naturaleza. Parece que hay proteinas que se degradan rapidamente en el citosol, mientras que moléculas de digestión más lenta son rotas en lisosomas (50). Las rutas de degradación proteica lisosomal y extralisosomal funcionan en la autofagia y en la endocitosis (48).

Lang (51) sugiere que la ruta intracelular seguida por los Ag's y su sitio de almacenaje depende de su naturaleza química y de su estado de degradación. Los macrófagos pueden discriminar entre material bacteriano heterogeneo localizado en fagolisosomas, los cuales pueden ser liberados y otros almacenados para su degradación posterior.

En un trabajo previo, Chicurel demostró que este mismo extracto antigenico modifica el pH lisosomal, incrementandolo entre 1 y 1.5 unidades de pH (10), trabajando con la linea

macrofágica J774 y la P388 D.1 . La alcalinización lisosomal demostrada en este trabajo es un proceso reversible, cíclico y dependiente de la concentración de Ag utilizado. Un primer pico de alcalinizacion lisosomal se detecta 30 minutos después de incubar células J774 con extracto antigenico de M. tuberculosis por 5 min a 4°C, y un segundo pico se presenta a los 60 min. La explicación tentativa a este fenómeno cíclico es la existencia de uno o mas Ag's micobacterianos capaces de perturbar la función de alguna estructura lisosomal esencial para la acidificación de los lisosomas (permeabilidad de la membrana lisosomal, bomba de protones dependiente de ATP, etc.). Los Ag's de 43 y 64 Kd podrían estar involucrados en la alcalinización lisosomal, aunque es difícil comparar los experimentos de alcalinizacion con los de procesamiento de Ag's presentados aqui, en términos de tiempo, ya que las condiciones de incubacion de las células son diferentes.

El Ag de 43 Kd encontrado aquí en lisosomas podría ser el descrito por Hunter (42). Este autor purifica un Ag de 40 Kd obtenido de M. tuberculosis y de M. leprae. El Ag, llamado Lipoarabinomanan (LAM)-B, produce una banda ancha y difusa en SDS-PAGE , parecida al patrón del Ag de 43 Kd en IET presentado aquí. Este Ag ha sido estudiado con mayor detalle en M. leprae pero lo mismo se encuentra en M. tuberculosis, y probablemente tenga un papel en la fisiología de la pared celular de las micobacterias, asi como algún papel en el reconocimiento por el macrófago (42).

Si efectivamente este Ag (43 Kd) es un lipopolisacarido, entonces quizá no tenga un papel importante en la

alcalinizacion lisosomal a la que se hizo referencia. En efecto, en los experimentos de alcalinización, Chicurel (10) propone que el Ag o Ag's causantes del incremento en el pH intralisosomal es de naturaleza proteica, ya que es termolábil, y los lipopolisacaridos no son muy sensibles al calor, o por lo menos a la temperatura de 56°C que Chicurel emplea para evidenciar "la naturaleza proteica del agente alcalinizante".

El Ag de 43 Kd ha sido detectado en celulas J774 como resistente a la degradación, y en monocitos de pacientes con tuberculosis se ha detectado un Ag con el mismo patron en la IET pero con un PM aparentemente mas bajo (52). Patarroyo y col. (53) sugiere que probablemente un Ag de 45 Kd -y otros mas de 33, 30 y 13 Kd- esté involucrado en el proceso de "control de la enfermedad (tuberculosis), al encontrar anticuerpos contra este Ag en pacientes con tratamiento, mientras que no se encuentran en pacientes reincidentes ni con primoinfección.

En relación al Ag de 64 Kd, se sabe que es una proteína con un bajo contenido de azúcares -menor al 0.3%- y sin lípidos, y que es una subunidad de un Ag de 246 Kd (tetrámero de la de 64 Kd). Esta proteína aislada de BCG (El Bacilo de Calmette y Guérin, una cepa atenuada de M. bovis) representa entre el 8 y 9% de las proteinas presentes en el extracto. La proteína denominada por Bruyn (43) como P64 es capaz de producir reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada en cerdos de guinea sensibilizados con BCG, con mayor fuerza

que el Derivado Proteico Purificado (PPD) de BCG. Asismismo, la P64 produjo altos niveles de anticuerpos en conejos inmunizados con esta proteína.

Es difícil afirmar que esta proteína (La "P64") sea un agente alcalinizante de lisosomas, ya que los experimentos de Chicurel no llegaron a probar el comportamiento del pH lisosomal mas alla de los 90 min de incubación despues de la internalización de los Ag's (10). El problema de la comparación de resultados entre la presencia de picos de alcalinización contra la presencia de los Ag's de 43 y 64 Kd en lisosomas, sigue siendo de desfasamiento en el tiempo.

Recientemente se ha afirmado que la proteina de 65 Kd de M. tuberculosis es un Ag común a otras especies micobacterianas, e incluso que es compartido por otras especies ajenas a las micobacterias (54). Esta afirmación se basa en el hecho de que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el Ag de 65 Kd de M. tuberculosis cruzan con Ag's de M. leprae, M. smegmatis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Legionela pneumophilia y Rickettsia rickettsii. Los Ag's de este PM de M. tuberculosis, Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli son moléculas altamente inmunoreactivas, pueden ser aisladas de homomultímeros mayores de 240 Kd y tienen una composición similar de aminoácidos. Por si fuera poco, este Ag parece ser sintetizado como respuesta a un cambio repentino en el ambiente, como un aumento en la temperatura u otras presiones ambientales (presencia de $H_2O_2$, anaerobiosis, deficiencia de Zn) (54). Quizá entonces el stress ambiental inherente a los

macrófagos sea suficiente para inducir la síntesis de esta proteína, la cual podría jugar un papel en la sobrevivencia de Mycobacterium tuberculosis dentro del macrófago.

Quedan muchas interrogantes en este trabajo que requerirán de más experimentos para desentrañar los secretos del procesamiento de Ag's. Una pregunta obligada es: cuando los Ag's son pinocitados por el macrofago, ¿En dónde se encuentra el Ag de 64 Kd antes de llegar a lisosomas? ¿Es en membrana o en algún compartimiento prelisosomal? . La forma más fina de seguir a los Ag's a nivel intracelular sería marcándolos radioactivamente, y mucho mejor aún si los experimentos se pudieran hacer con Ag's purificados de M. tuberculosis.

Otro aspecto importante es la cuestion: ¿Que papel juegan estos Ag's en la presentación de Ag por los macrófagos a linfocitos T? . Podria pensarse que quizá algun otro Ag del extracto, fuera de los de 43 y 64 Kd, sea de importancia a nivel de presentación en membrana. Sin embargo, se ha demostrado que los Ag's asociados a membrana que no son internalizados por el macrófago, y los Ag's exocitados al medio, no son capaces de estimular a linfocitos T (19). Hasta hoy, parece ser un requisito para la mayoria de los antígenos, su internalización antes de poder ser presentado a linfocitos T (16), por lo menos para el macrófago, ya que se ha demostrado que otras células presentadoras de Ag, como las células dendríticas, son capaces de presentar Ag,s a células T (haciéndolas proliferar) sin manejarlos intracelularmente (55, 56), lo que quiza involucre alguna modificación a nivel

membranal o una alta afinidad de los Ag's por las moléculas clase II del MHC en su forma nativa.

Existe la posibilidad de que los Ag's de 64 y 43 Kd sean modificados para ser presentados en membrana plasmática. Quizá algún producto de la degradación de estos Ag's tenga afinidad por moleculas clase II del MHC, y pueda ser presentado en la superficie del macrófago. Esto implicaría que en el procesamiento se seleccione el determinante antigenico con más afinidad por moléculas de clase II del MHC (16).

Experimentos con Ag's purificados, macrófagos y linfocitos T, podrían demostrar si éstas moleculas (43 y 64 Kd) tienen o no un papel en la presentación de Ag's. Asimismo, siguiendo con el fraccionamiento subcelular, se podrían buscar Ag's de la micobacteria en membrana plasmática e incluso en organelos en donde los Ag's puedan estar sufriendo modificaciones, tal como en el Complejo de Golgi.

Este trabajo es solo una pequeña contribución al estudio del procesamiento de antígenos por células fagocíticas; es evidente que los conocimientos por adquirir son bastantes. Esto requerira del trabajo arduo de personas interesadas en tratar de robarle un poco sus secretos a la naturaleza.

# 9 CONCLUSIONES

1.- Los lisosomas de la linea celular macrofágica J774 se encuentran entre las densidades de 1.097 y 1.118 g/ml en un gradiente de densidad de Percoll-Sacarosa.

2.- Es posible detectar antígenos micobacterianos en lisosomas por la técnica de Inmunoelectrotransferencia.

3.- Los antígenos de M. tuberculosis son internalizados selectivamente hasta lisosomas, en la linea J774.

4.- El antígeno de 43 Kd se acumula en lisosomas entre el tiempo 0 y los 20 miutos de incubacion después de la internalización. Después de este tiempo el antígeno es degradado.

5.- El otro antígeno seleccionado por la célula fagocitica es el de 64 Kd, el cual se presenta a los 20 minutos en lisosomas para despues desaparecer y volver a presentarse a los 120 minutos y parece ser degradado después de este tiempo.

## 10 REFERENCIAS


1.- Youmans, G., 1979. Tuberculosis. W. B Saunders Co. U.S.A. 1-45, 52-54, 121-151 .

2.- Styblo, K. and Ravillon, A., 1981. Stimated global incidence of smear positive pulmonary tuberculosis unrealiability of officially reported figures on tuberculosis. Union Against Tuberculosis 56:118

3.- Pacheco, C. Olvera, R., y Herrera, M., 1980. Panorama epidemiologico y control de la tuberculosis en la República Mexicana. Salud Publica de México. 23:25

4.- Ratledge, C. and Stanford, J., 1982. The biology of the Mycobacteria , Physiology, identification and classification. Vol. 1 . Academic Press Inc. London, U.K. 1-38

5.- Grange, J., 1980. Mycobacterial diseases. Edward Arnold. London, U.K. 1-25

6.- González, N., Torales, A. y Gomez, D., 1984. Infectologia clinica. Trillas. Mexico. 107-147

7.- Pelczar, M., Reid, R. y Chan, E., 1982. Microbiologia. Mc Graw-Hill . Mexico . 497-500

8.- Milon, G. y Marchal, G., 1986. La defensa antibacteriana. Mundo científico (La Recherche). 6:786

9.- Douglas, S., 1980. Células que intervienen en las respuestas inmunitarias. En : Inmunología Clinica. El Manual Moderno. Mexico. 84-102

10.- Chicurel, M., García, E. and Goodsaid, F., 1988. Modulation of macrophage lysosomal pH by Mycobacterium tuberculosis derived proteins. Infect. Immun. 56:479

11.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson J., 1984. Molecular bilogy of the cell. Garland Publishing Inc. U.S.A. 367-376

12.- Myrvik, Q., Leake, E. and Tenmer, R., 1983. Interaction of mycobacteria with normal and immunologically activated alveolar macrophages. In : Advances in experimental medicine and biology. Plenum Press. London, U.K. 162-183

13.- Armstrong, J. and Hart, D., 1971. Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. J. Exp. Med. 134:713

14.- Goren, M., Hart, P., Young, M. and Armstrong, J., 1976. Prevention of phagosome - lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73:2510

15.- Truffa-Bacchi,P. y Leclerc, C., 1986. Como cooperan las celulas para defender al organismo. Mundo cientifico (La Reeherche). 6:796

16.- Unanue, E. and Allen P. , 1987. The basis of the immunoregulatory role of macrophages and other accesory cells. Science 236:551

17.- Unanue, E., 1984. Antigen presenting function of the macrophage. Annu. Rev. Immunol. 2:395

18.- Unanue, E. , Allen, P., Babbitt, B., Bancroft, C., Kiely, J., Kurt-Jones, E., Virgin, H. and Weaver, C., 1986. The regulatory role of macrophages in infection with intracellular pathogens. Progress in Immunology VI. Academic Press. London, U.K. 725-761

19.- Allen, P., Beller, D., Braun, J. and Unanue, E., 1984. The handling of Listeria monocytogenes by macrophages : the search for an immunogenic molecule in antigen presentation. J. Immunol. 132:323

20.- Chesnut, R., Colon, S., and Grey, G., 1982. Requeriments for the processing of antigen by antigen presenting cells I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. J. Immunol. 129:2382

21.- Allen, P., Strydom, D. and Unanue, E., 1984. Processing of lysozyme by macrophages: identification of the determinant recognized by two T cell hybridomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:2489

22.- Freshney, R., 1983. Culture of animal cells. A manual of basic techniques. Alan R. Liss Inc. N.Y. U.S.A. 1-4; 71-78; 199-215.

23.- Graham, J., 1972. Isolation and characterization of membranes from normal and transformed tissue culture cells. Bioche. J. 130:1113

24.- De Duve, C., Berthet, J., and Beanfay, H., 1959. Gradient centrifugation of cell particles: theory and applications. Progr. Biophys. Chem. 9:325

25.- Rome, L., Garvin, A., Allietta, M. and Neufeld, E., 1979. Two species of lysosomal organells in cultured human fibroblasts. Cell 17:143

26.- Nardone, R., 1987. Cell culture methodology from donor to cell lines. Bio Techniques 5:122

27.- Ferro, G. and Ames, L., 1974. Resolution of bacterial proteins by polyacrilamide gel electrophoresis on slabs. J. Bacter. Chem. 249:634

28.- Huesca, M., 1986. Caracterización antigenica de la especie Mycobacterium tuberculosis. Tesis para maestría en ciencias. U.N.A.M. Mexico.

29.- Gershoni. J. and Palade, G., 1983. Protein Blotting: principles and applications. Analytical Biochemistry 131:1

30.- Bers, G. and Garfin, D., 1985. Protein and Nucleic Acid Blotting and Immunobiochemical detection. Biotechniques 3:276

31.- Ralph, P., Pichard, J. and Cohn, M., 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody dependent cell-mediated immunity. J. Immunol. 114:898

32.- Van Furth, R., Van Schadewijk, M., Claasen, I., Cornelisse, C. and Nibbering, P., 1985. Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophage - like cell lines. Cellular Immunol. 90:339

33.- Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D., 1986. Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar development of a major lysosomal membrane glycoprotein. J. Cell Bio. 102:1593

34.- Torres, M., 1988. Caracterización de antígenos de M. tuberculosis en pacientes con tuberculosis meníngea y pleural por el método de inmunoelectrotransferencia. Tesis de licenciatura Q.F.B. ENEP Zaragoza, U.N.A.M. Mexico

35.- Maxfield, F., 1982. Weak bases and ionophpres rapidly and reversibly raises the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. J. Cell Bio. 95:676

36.- Ohkuma, S., and Poole, B., 1981. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. J. Cell Bio. 90:656

37.- Laemli, V., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. Nature 227:680

38.- Lloyd, J. and Forster, S., 1986. The lysosome membrane. Trends in Biochemical Sciences 11:365

39.- Mellman, I., Plutner, H. and Pentii, V., 1984. Internalization and rapid recycling of macrophage Fc receptors target with monoclonal antireceptor antibody: posible role of a prelysosomal compartment. J. Cell Bio. 98:1163

40.- Galloway, C., Dean, G., Marsh, M., Rudnick, G. and Mellman, I., 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:3334

41.- Chung, K., Diment, S. and Stahl, P., 1985. Distribution and membrane extractability of lysosomal enzymes in macrophages. J. Cell Bio. 101:542

42.- Hunter, S., Gaylord, H. and Brennan, P., 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. J. Biol. Chem. 261:12345

43.- De Bruyn, J., Bosmans, R., Turneer, M., Wecky, M., Nyabenda, J., Van Vooren, J., Falmagne, P., Wiker, H. and Harboe, M., 1987. Purification, partial characterization, and identification of a skin reactive protein antigen of Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. 55:245

44.- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R., 1951. Protein measurement with Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265

45.- Harboe, M., Nagai, S., Patarroyo, M., Torres, M., Ramirez, C. and Cruz, N., 1986. Properties of proteins MPB 64, MPB 70 and MPB 80 of Mycobacterium bovis BCG. Infec. Immun. 55:293

46.- Tasheva, B., and Dessen, G., 1983. Artifacts in sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis due to 2-Mercaptoetanol. Analytical Biochemistry 129:98

47.- Goldstein, J., Brown, M., Anderson, R., Rusell, D. and Schneider, W., 1985. Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Ann. Rev. Cell Biol. 1:1

48.- Glaumann, H., Ahlberg, J., Berkenstam, M., Falk, M. and Henell, F., 1985. Protein degradation in the lysosome. Biochem. Soc. Trans. 13:1010

49.- Mayer, R.J., 1987. Protein degradation in animal cells. Biochem. Soc. Trans. 15:820

50.- Dice, J., Backer, J., Ling, H. and Goff, S., 1987. Lysosomal degradation of microinjected proteins. Biochem. Soc. Trans. 15:824

51.- Lang, T., Tassin, M. and Ryter, A., 1988. Bacterial antigen immunolabeling in macrophages after phagocytosis and degradation of Bacillus subtilis. Infect. Immun. 56:468

52.- Mondragón, V., 1988. Manejo de proteinas solubles de Mycobacterium tuberculosis por celulas fagociticas. Tesis de Maestria en Ciencias-Microbiologia. Fac. de Medicina. U.N.A.M. Mexico

53.- Patarroyo, M., Parra, C., Pinila, C., Del Portillo, P., Lozada, D., Oramas, M., Torres, M., Clavijo, P., Ramírez, C., Fajardo, N. and Jiménez, C., 1986. New aproaches for the prevention of tuberculosis. In : Modern biotechnology and healt perspectives for the year 2000 . Academic Press Inc. London, U.K. 155-168

54.- Schinick, T., Vodkin, M., and Williams. J., 1988. The Mycobacterium tuberculosis 65 - Kilodalton antigen is a heat shock protein which correspons to common antigen and to the Escherichia coli Gro-EL protein. Infect. Immun. 56:446

55.- Kaye, P., Chain, B. and Feldmann, M., 1985. Non phagocytic dendritic cells are effective accesory cells for antimycobacterial responses in vitro. J. Immunol. 134:1920

56.- Chain, B., Kaye, P. and Feldmann, M., 1986. The celular pathway of antigen presentation: biochemical and functional analysis of antigen processing in dendritic cells and macrophages. Immunology 58:271

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# 11 APENDICE

Preparación de soluciones utilizadas en este trabajo

1.- Solución Salina amortiguada con Fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.2

Solución A
$NaH_2PO_4$ 0.2 M

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ .....27.2 g
Aforar a 1 l con agua destilada

Solución B
$Na_2HPO_4$ 0.2 M

$Na_2HPO_4$ anhidro .....28.4 g
Aforar a 1 l con agua destilada

Mezclar 140 ml de Solución A + 360 ml de Solucion B + 74 g de NaCl. Ajustar el pH a 7.2 y aforar a 1 l con agua destilada.

Tomar 100 ml de la Solución anterior y aforar a 1 l con agua destilada

2.- Solución Saturada de Sacarosa ( Solucion madre 10 X para preparar SIS )

Para preparar 50 ml de solución:

Sacarosa (2.5 M) .....42.78 g
EDTA Disodico (20 mM) .....0.292 g
HEPES (100 mM) .....1.161 g

Disolver primero el EDTA y el HEPES en un volumen pequeño de agua destilada. Despues agregar la Sacarosa poco a poco, con agitacion constante, y cuando sea necesario agregar mas agua o calentar suavemente en baño maria. Una vez que se disuelva toda la sacarosa ajustar el pH a 7.4 con KOH 1 M y aforar a 50 ml con agua destilada y deionizada.

3.- Solución Isotonica de Sacarosa (SIS) con $NH_4Cl$ 10 mM para inhibición de enzimas lisosomales

Para preparar 250 ml de solución:

Tomar 25 ml de la solución madre de sacarosa (2.5 M) y llevar a 200 ml con agua destilada y deionizada. Disolver 0.1337 g de $NH_4Cl$ y llevar con agua hasta cerca de los 250 ml. Ajustar el pH a 7.2 con KOH 1 M y aforar a 250 ml.

4.- Medio de cultivo PBY (Proskawer y Beck modificado por Youmans) para M. tuberculosis

Asparagina .....5 g
$KH_2PO_4$ .....5 g
$K_2SO_4$ .....0.5 g
$MgCl_2$ .....0.2 g
Citrato de sodio .....0.6 g
Glicerol .....50 ml

Ajustar el pH a 6.8 y aforar a 1 l con agua destilada. Esterilizar por 15 min a 10 lb

5.- Monómero de Acrilamida. Solucion madre: 30% Acrilamida, 0.8% Bis-Acrilamida

Acrilamida (Bio-Rad) .....30 g
Bis-Acrilamida (Bio-Rad) .....0.8 g

Llevar hasta cerca de los 100 ml con agua destilada, aforar hasta que la solución esté a temperatura ambiente. Filtrar usando membrana Millipore de 0.45 um. Conservar a 4°C.

6.- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%

SDS (Bio-Rad).....10 g

Llevar a 100 ml con agua destilada, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

7.- Solución amortiguadora de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Tris (Bio-Rad) .....18.17 g

Disolver el Tris en agua destilada (menos de 80 ml). Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml, filtrar con membrana Millipore de 0.45 um y guardar a 4°C.

8.- Solución amortiguadora de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Tris (Bio-Rad).....6.07 g

Disolver el Tris en un volumen menor a 80 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 ml con agua destilada, filtrar por membrana Millipore de 0.45 um y guardar a 4°C.

9.- Solución amortiguadora para Electroforesis: Tris 0.025 M , Glicina 0.19 M , SDS 0.1%

Tris (Bio-Rad) .....12 g
Glicina .....57.6 g
SDS .....40 ml al 10%

Disolver los reactivos en un volumen mayor de 3 litros de agua destilada. Ajustar el pH a 8.3, aforar a 4 litros, filtrar y conservar a 4°C.

10.-Mezcla digestora para Electroforesis : Tris 0.125 M , SDS 4% Glicerol 20% , 2-Mercaptoetanol 1% , Azul de Bromofenol 0.1%.

Glicerol .....2 ml
Tris .....2 ml (0.5 M , pH 6.8)
SDS .....2 ml al 10%
2-Mercaptoetanol .....100 ul
Azul de Bromofenol .....1 ml al 1%

Mezclar estos reactivos en una probeta y aforar a 10 ml con agua destilada. Hacer alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C. Centrifugar antes de usar.

11.-Solución amortiguadora para Transferencia : Tris 0.025 M , Glicina 0.19 M, Metanol 20%

Tris (Bio-Rad) .....12 g
Glicina .....57.6 g
Metanol .....800 ml

Disolver el Tris y la Glicina en agua destilada (3 l), y agregar el metanol. Ajustar el pH a 8.3 ; aforar a 4 l , filtrar y conservar a 4°C.

12.-Tinción con Azul de Coomassie : Azul de Coomassie 0.125% , Metanol 50% , Acido Acetico 10% .

Solución I
Azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad)..2 g
Agua destilada .....800 ml

Solución II
Azul de Coomassie .....62.5 ml se Solucion I
Metanol .....250 ml
Acido acetico .....50 ml

Aforar con agua destilada a 500 ml . Guardar a temperatura ambiente.

13.-Solución decoloradora para geles : Metanol 50% , Acido acético 10%

Metanol .....500 ml
Acido acético .....100 ml

Aforar a 1 l con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.