



60
21

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

EL EFECTO DE LOS GLICOLIPIDOS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS SOBRE LA
PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS MODELO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MIGUEL ANGEL MARTINEZ GALINDO



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Peniche Quintana Elda
Vocal:	Prof. Hernández Montes Homero
Secretario:	Prof. López Marín Luz María
1er. Suplente:	Prof. Garza Velasco Raúl
2o. Suplente:	Prof. Hernández Gómez Luciano

Sitio en donde se desarrollo el tema:

**Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México.**

Asesor:

Dra. Luz María López Marín



Sustentante:

Miguel Ángel Martínez Galindo

MARTÍNEZ GALINDO M. A.

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de mi hermano Rafael Mauricio.

A mis padres Mateo Martínez y Genoveva Galindo :
con amor y respeto, porque todo lo que soy se los debo a ustedes.

A mis hermanos Blanca, Eliseo, Lourdes, Lucía, Dolores, Vicente, Xochitl, Christian, César y Ana :
por su cariño y apoyo, lo cual ha permitido mi superación día a día.

A mis sobrinos, Carlos, Liliana, Brenda, Marco, Silvia, Mauricio, Isaac y Eugenia :
por todos los momentos felices que hemos compartido.

A mis compañeros y amigos :
por sus palabras de aliento para seguir adelante.

A la Dra. Luz María López :

por todo el apoyo otorgado para la realización de esta tesis, y por compartir sus conocimientos conmigo.

Al Ing. Luis Velasco del Instituto de Química :

por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas :

por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Química :

por permitir mi formación como profesionista.

A la UNAM :

por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a ella.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 Importancia de la tuberculosis	6
1.2 Tuberculosis	8
1.3 Respuesta inmune	10
1.4 Diseminación y progresión de la tuberculosis	11
1.5 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y su pared celular	13
1.6 Factores de virulencia	21
2. METODOLOGÍA	24
2.1 OBTENCIÓN DE GLICOLÍPIDOS	24
2.1.1 Cultivo de las micobacterias	24
2.1.2 Extracción de los glicolípidos	24
2.1.3 Purificación	25
2.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	25
2.2.1 Cromatografía en columna	25
2.2.2 Cromatografía en capa fina	26
2.2.3 Cromatografía en capa fina preparativa	27
2.2.4 Cromatografía en fase sólida	28
2.2.6 Cromatografía de gases	28
2.3 TÉCNICAS QUÍMICAS	29
2.3.1 Hidrólisis ácida	29
2.3.2 Trimetilsililación	29
2.3.3 Metilación	30
2.3.4 Precipitación con acetona	30

2.4 TECNICAS BIOFÍSICAS	31
2.4.1 Preparación de liposomas	31
2.4.2 Purificación de liposomas	31
2.4.3 Suspensión de glicolípidos	32
2.4.4 Pruebas de permeabilidad pasiva	32
2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	34
2.5.1 Espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB)	34
2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM)	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1 PURIFICACIÓN	35
3.1.1 Fracciones enriquecidas	35
3.1.2 Purificación de derivados de trealosa	36
3.1.3 Purificación de los glicolípidos GL ₁ y GL ₂	38
3.1.4 Purificación de fosfatidil inositol manósidos (PIM's)	38
3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	39
3.2.1 Identificación del sulfolípido (SL) y del factor cordón (FC)	39
3.2.2 Identificación del diaciltrealosa (DAT)	42
3.2.3 Identificación del fosfatidil inositol dimanósido (PIM ₂)	45
3.2.4 Identificación del PIM _{2a} y PIM _{2b}	49
3.3 PRUEBAS DE PERMEABILIDAD	53
3.3.1 Pruebas de permeabilidad pasiva	53
4. CONCLUSIONES	57
8. BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXO	64

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
DAT	Diaciltrealosa
EM	Espectrometría de masas
FAB	Bombardeo de átomos rápidos (Fast atom bombardment)
FC	Factor cordón (dimicoloil trealosa)
GL	Glicolípido
GPL	Glicopeptidolípido
LOS	Lipooligosacárido
m/z	Masa / carga
PIM	Fosfatidil inositol manósido (Phosphatidyl inositol mannoside)
PPD	Derivado proteico purificado (Purified protein derivative)
SL	Sulfolípido
uma	Unidades de masa atómica

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública y su incidencia aumenta año tras año. Se estima que a nivel mundial, cada año ocurren 10 millones de nuevos casos de enfermos y un promedio de 3 millones de muertos y cientos de millones de individuos se suman a los 1,900 millones de personas infectadas (una tercera parte de la población mundial). Por lo tanto, es de especial interés conocer los mecanismos que confieren patogenicidad a *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis.

La virulencia de *M. tuberculosis* está relacionada con su capacidad para sobrevivir y proliferar dentro del macrófago. Se sabe que la pared celular micobacteriana contiene una gran proporción de lípidos (en especial glicolípidos), que son muy diferentes a los de origen animal. Estos rasgos han dado bases para relacionarlos con la virulencia y patogenicidad de la bacteria. Es probable que estos glicolípidos se inserten en las membranas de la célula hospedera ocasionando alteración de las mismas, lo cual podría afectar funciones de vital importancia para el hospedero (16). Con base en lo anterior, se tratará de aislar y purificar algunos de los principales glicolípidos asociados a la pared celular de *M. tuberculosis*, caracterizarlos químicamente y estudiar el posible efecto de los compuestos purificados sobre la permeabilidad de membranas modelo (liposomas), todo ello a fin de definir factores de virulencia y patogenicidad potenciales.

OBJETIVOS

- ❖ Purificar los principales glicolípidos asociados a la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.
- ❖ Caracterizar químicamente los glicolípidos purificados.
- ❖ Determinar el efecto de los glicolípidos purificados sobre la permeabilidad de un modelo artificial de membranas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Importancia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado al hombre a lo largo de la historia ocasionando un gran número de muertes. Millones de personas, incluidos célebres personajes, fallecían irremediamente hasta hace pocas décadas.

No obstante que el agente causante, *Mycobacterium tuberculosis*, fue descubierto hace más de cien años por el Dr. Roberto Koch, que existe una vacuna desde 1921 y medicamentos específicos desde hace cincuenta años, en la actualidad, aún constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial.

A partir de los años 50's, con la combinación de la mejoría en las condiciones de vida de importantes segmentos de la población, el descubrimiento de medicamentos que permiten su curación y la organización de campañas de distribución y vigilancia de tratamientos, se logró disminuir su frecuencia y mortalidad. Fue entonces que a principios de los años 70's, mundialmente se tuvo un falso optimismo al creer que la enfermedad estaba controlada y en vías de erradicación, lo cual ocasionó que la población y las autoridades de salud descuidaran las acciones específicas. En los últimos años un alarmante recrudescimiento en el número de casos y fallecimientos hizo que la Organización Mundial de la Salud declarara una situación de emergencia por razón de la tuberculosis (9, 22).

En México el problema es significativo, en el pasado se contaba con intensos programas de control de la tuberculosis lo cual provocó un descenso en la morbilidad y

mortalidad años atrás, pero con el tiempo dichos programas se desvanecieron una vez que se consideraba ya superada esta enfermedad. En consecuencia, son pocos los estudios recientes sobre esta infección, pero los datos existentes permiten suponer que se trata de una enfermedad de alta incidencia y se predice un incremento en las tasas de mortalidad y morbilidad en los próximos años (9).

Esta situación es cierta para todo el mundo, ya que de acuerdo con la OMS, se estima que en la presente década la tuberculosis provocará 30 millones de muertes, ocurrirán 90 millones de nuevos casos y cientos de millones de individuos se sumarán a los 1.900 millones de personas infectadas (una tercera parte de la población mundial) (4, 22).

En México, se estima que actualmente ocurren al año, cerca de 30,000 nuevos casos y 5,000 muertes debidas a esta enfermedad. Se estima también que 1,000 personas se infectan diariamente, aunque estas cifras pueden estar subvaluadas debido a la falta de buenos seguimientos de la enfermedad en todo el país. Los mayores estragos se producen en las personas con edades productivas, el 60% de los afectados se encuentran dentro del grupo de 25 a 60 años, seguido del grupo de 15 a 24 años, con el 17.3%. Por lo tanto, queda claro el gran daño que ocasiona a las fuentes de trabajo y a la economía nacional y familiar (9).

Esta grave situación se complica por la presencia de dos nuevos factores: la aparición del SIDA y de las cepas poli-quimiorresistentes. Cuando las personas enfermas de tuberculosis se infectan también con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la tuberculosis es drásticamente agresiva y fatal en poco tiempo.

La multiplicación de contagios con cepas resistentes incrementan la dificultad y el costo de los tratamientos requeridos para controlar la infección, por lo que de no tratarse eficientemente los nuevos casos registrados, existe el riesgo de que la enfermedad se vuelva nuevamente incurable como lo era antes del descubrimiento de los agentes quimioterapéuticos (1, 4, 22).

Con todo esto, el panorama puede ser más sombrío para la próxima década si las tendencias económicas y sociales (guerra, pobreza, y hacinamiento) se mantienen. Por lo tanto, se requiere emplear todos los elementos que tenemos a nuestro alcance para frenar este nuevo embate de la enfermedad. Se debe aplicar la vacunación con BCG (mientras no exista otra vacuna mejor), se deberán desarrollar programas para la detección precoz de la enfermedad, establecer métodos capaces de identificar con rapidez y alta sensibilidad al agente causal y sus características de resistencia, y desarrollar programas eficientes de distribución de medicamentos y de vigilancia del apego al tratamiento. Asimismo, resulta importante el desarrollo de líneas de investigación que guíen a conocer mejor los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad para así poder desarrollar nuevas vacunas y fármacos que permitan un mejor control de la misma (4, 9, 22).

1.2 Tuberculosis

La tuberculosis la causa un bacilo aerobio estricto con una pared celular rica en lípidos. La enfermedad se transmite de persona a persona por medio de aerosoles, que son pequeñas partículas generadas al toser la persona infectada y las cuales no sólo sobrepasan las defensas de las vías respiratorias superiores sino que permanecen por

mucho más tiempo en el aire que las partículas de mayor tamaño (4, 11, 23). Las enfermedades transmitidas por aerosoles son particularmente persistentes debido a lo difícil y costoso que resulta la esterilización del aire. La tuberculosis es una enfermedad seria, pero no altamente contagiosa. La transmisión ocurre solamente cuando existe un contacto cercano y prolongado entre una persona susceptible y una persona que tiene la infección activa. Una persona se considera infectada por *M. tuberculosis* cuando se convierte la prueba cutánea de negativa a positiva. La conversión positiva a la prueba cutánea indica que *M. tuberculosis* se ha inhalado y ha sido capaz de sobrevivir en los pulmones durante el tiempo suficiente para atraer la atención del sistema inmune. Solo del 3 al 5% de las personas que se vuelven positivas a la prueba cutánea desarrollan una tuberculosis activa (4, 11 23).

Los síntomas de la tuberculosis incluyen fiebre, tos (frecuentemente con esputo sanguinolento), pérdida de peso y fatiga. Los sujetos con la infección activa muestran la destrucción progresiva e irreversible del pulmón y la bacteria puede escapar de los pulmones y causar la enfermedad sistémica la cual casi siempre es mortal. *M. tuberculosis* puede infectar cualquier área del cuerpo, incluyendo los huesos, las articulaciones, el hígado, el bazo, el tracto gastrointestinal y el cerebro (tuberculosis miliar). La tuberculosis no es por lo general una enfermedad de rápido desarrollo y frecuentemente los pacientes decaen en su salud durante años antes de morir. En personas con SIDA, la muerte ocurre más rápidamente, algunas veces en meses y el índice de mortalidad es de cerca del 80% (1, 4, 23).

M. tuberculosis no es la única especie patógena dentro del género *Mycobacterium*. La lepra es causada por *M. leprae*, mientras que *M. bovis* ingerido, al tomar leche de ganado infectado, suele ser causa de enfermedad en niños, aunque la pasteurización de la leche ha disminuido dramáticamente este tipo de infección. Un número de micobacterias encontradas en el suelo y en el agua (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, etc.) pueden causar enfermedades sistémicas en personas severamente inmunocomprometidas, especialmente en pacientes con SIDA (1, 23). *M. tuberculosis* también infecta pacientes con SIDA, sin embargo, en los países desarrollados la incidencia de tuberculosis no es mucho mayor entre los pacientes con SIDA que en el resto de la población. *M. avium* y otras micobacterias del suelo y de la tierra son la principal causa de infección en estos pacientes. En contraste, en los países en desarrollo, la infección por tuberculosis entre los pacientes con SIDA ocurre en índices muy elevados (1, 22, 23).

1.3 Respuesta inmune

La principal defensa en el pulmón es el macrófago alveolar. Aunque *M. tuberculosis* ha desarrollado la capacidad de sobrevivir y proliferar en los macrófagos alveolares inactivos, los macrófagos activos son capaces de matar a la bacteria. Por lo tanto, la capacidad de una persona para montar una respuesta rápida y efectiva a través de macrófagos activados determina si el resultado de una exposición es o no una enfermedad sintomática (4, 10, 23).

La interacción inicial entre *M. tuberculosis* y el macrófago produce una respuesta tanto de células T_H ($CD4^+$) como de células T_c ($CD8^+$), las cuales contribuyen al control

de la infección. Una subpoblación de células T CD4⁺ (Th₂) estimula la producción de anticuerpos, pero los obtenidos contra el bacilo son inútiles porque las bacterias gram-positivas son serorresistentes y *M. tuberculosis* puede crecer dentro de los macrófagos (4, 10, 23). La principal contribución de las células T CD4⁺ viene de la subpoblación de células CD4⁺ (Th₁) que liberan interferon γ (Inf γ), el cual estimula la activación de los macrófagos (las células T CD8⁺ también liberan Inf γ pero en menor cantidad). El Inf γ también estimula a las células endoteliales a unirse con las células T, por lo tanto dispara su movimiento fuera de los vasos sanguíneos hacia el tejido adyacente de forma que puedan llegar al sitio de la infección. Es probable que otras citocinas pueden ser necesarias también para estimular la activación de los macrófagos, pero claramente el Inf γ juega un papel importante. Las células T CD8⁺ matan y degradan a los macrófagos infectados que han fallado en su tarea de detener el crecimiento de las bacterias, de tal forma que las bacterias puedan ser ingeridas y eliminadas por los macrófagos activados. Estos mecanismos sugieren una estrategia para desarrollar una vacuna efectiva. Esta debe estimular el tipo correcto de respuesta inmune, si es que se pretende proveer de una protección duradera contra la tuberculosis (4, 23).

1.4 Diseminación y progresión de la tuberculosis

Si un adulto sano se expone a un número relativamente pequeño de micobacterias, generalmente los macrófagos activados aparecen tempranamente para detener la infección antes de que se produzca un daño apreciable en el pulmón. Dicha persona se vuelve positiva al PPD pero no desarrolla una tuberculosis sintomática. En

un niño o en un adulto que no puede montar una respuesta de células T rápida y efectiva, los macrófagos activados no aparecen sino hasta mucho después del proceso infectivo y la bacteria continúa creciendo dentro de los macrófagos. Puesto que la infección no ha sido eliminada por las células fagocíticas, nuevas células T, células polimorfonucleares (PMN's) y macrófagos, continúan siendo atraídos al sitio de la infección y se van acumulando alrededor de los sitios donde las bacterias están creciendo. Los macrófagos vecinos a la bacteria comienzan a fusionarse para formar células gigantes y una capa de macrófagos y células T formadas alrededor del foco de crecimiento y de daño tisular contienen a la bacteria. En algunos casos, no obstante que los fagocitos no son capaces de matar a la bacteria, las células T y los macrófagos logran detener el crecimiento de la lesión con una capa gruesa de fibrina. La lesión emparedada es llamada tubérculo. Los tubérculos eventualmente se calcifican, dando lugar a una lesión de borde duro visible mediante el uso de rayos-X. La respuesta mediada por células (células T y fagocitos) que produce lesiones tuberculoideas se llama respuesta granulomatosa, debido a que el tubérculo microscópicamente parece un granuloma (4, 11, 23).

Los fagocitos que infructuosamente tratan de matar a la bacteria, causan un daño considerable al tejido pulmonar tanto por la liberación de enzimas lisosomales como por la producción de TNF α , que causa daño al tejido. Una característica importante de las lesiones que se desarrollan durante un caso de tuberculosis es la licuefacción. Inicialmente las áreas donde la bacteria se encuentra creciendo tienen una consistencia gruesa semejante a la caseína del queso (lesiones caseosas). Como la

bacteria continúa creciendo y los fagocitos continúan entrando al área, la región necrótica se vuelve mucho más líquida. Debido a que los líquidos forman aerosoles con mayor facilidad que el material caseoso, una persona con lesiones licuadas es mucho más contagiosa que una cuyas lesiones se encuentran en estado de necrosis caseosa. También la consistencia gruesa de las lesiones caseosas previene el movimiento de las bacterias fuera del área. Las bacterias en las lesiones licuadas pueden escapar más rápidamente y diseminarse a otras partes del cuerpo, causando la forma diseminada de la enfermedad (4, 23).

Las personas que han montado una respuesta inmune a tiempo para detener el crecimiento bacteriano y prevenir el desarrollo de los síntomas severos de la enfermedad no están necesariamente fuera de peligro. Algunas lesiones emparedadas pueden contener bacterias vivas. Una característica inusual de *M. tuberculosis* es la de sobrevivir por décadas en dichas lesiones. Posteriormente, una supresión del sistema inmune (v.g. un cáncer, la toma de fármacos inmunosupresores, o el SIDA) pueden permitir a la bacteria salir de las lesiones y comenzar su crecimiento nuevamente. Esta forma de la enfermedad se llamada tuberculosis reactivada y sus síntomas e infectividad son idénticos a una tuberculosis primaria (4, 11, 23).

1.5 *Mycobacterium tuberculosis* y su pared celular

La pared celular de las especies micobacterianas consisten no sólo de peptidoglicanos, sino también de un gran número de glicolípidos. La presencia de estos lípidos inusuales hacen a la bacteria impermeable a los procedimientos suaves de tinción como es la tinción de Gram. Para teñir micobacterias se usa el procedimiento

denominado tinción ácido-alcohol resistente. En este procedimiento, las bacterias se someten a calentamiento con una solución que contiene disuelto un colorante rojo (la fucsina) para decolorarse posteriormente con una solución de alcohol ácido. Las micobacterias son las únicas bacterias que toman y retienen el colorante efectivamente cuando se colocan en condiciones tan drásticas (4, 11, 23)

La envoltura celular de *M. tuberculosis* (Fig. 1.1) no difiere mucho de la de otras micobacterias no patógenas. Las propiedades de la pared celular se atribuyen al peptidoglicano, que es un polímero formado por unidades de amino azúcares y amino ácidos, y cuya estructura química, en *M. tuberculosis*, se parece a la encontrada en otras bacterias (4). Unida al peptidoglicano por medio de un enlace fosfodiéster hay un polisacárido ramificado, la arabinogalactana, cuyo extremo distal está esterificado con ácidos grasos de alto peso molecular (los ácidos micólicos) cuyo tamaño y características son únicos de las micobacterias. Los ácidos micólicos son ácidos grasos 1-alquil ramificados, 2-hidroxilados, con 70 a 90 átomos de carbono. La ramificación es comúnmente de 24 átomos de carbono de longitud y es una cadena alquilo simple, pero la cadena principal de estos compuestos contiene grupos ciclopropilos, metoxilos, cetilos, o metilos. El complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolatos (mAGP) forma el llamado esqueleto de la pared celular. Asociado al esqueleto existen una gran cantidad de lípidos y glicolípidos, los cuales difieren considerablemente entre especies o grupos de especies micobacterianas (4, 23).

En el modelo propuesto por Brennan (4) para el arreglo de los residuos micólicos y de los lípidos y glicolípidos asociados a la pared, se considera que los ácidos micólicos del micololil-arabinogalactano están arreglados con sus cadenas hidrocarbonadas paralelas y sus metilos terminales apuntando hacia el exterior de la célula micobacteriana. También se considera que las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos micólicos están intercaladas con las cadenas de hidrocarburos de los numerosos lípidos y glicolípidos asociados a la pared. La naturaleza ramificada de los ácidos micólicos, con una cadena hidrocarbonada larga y otra corta, hacen esta interposición estructuralmente plausible. Es posible que las ramificaciones metilo y otros grupos laterales en las cadenas alifáticas de los lípidos controlen la profundidad a la cual ocurre la interposición. Más aún, la estructura particular (e inusual) de las cadenas alquilo tanto de los ácidos micólicos como de varios de los ácidos grasos encontrados en los lípidos y glicolípidos asociados a la pared micobacteriana, son consistentes con el modelo de intercalación. Se cree que las cadenas acilo intercaladas se encuentran unidas por sobreposición mediante interacciones hidrofóbicas débiles en vez de enlaces químicos covalentes (4, 23).

Entre los principales lípidos y glicolípidos asociados a la envoltura celular micobacteriana se encuentran los siguientes:

- **Ceras:** que consisten de ácidos grasos y dioles de cadena larga, como son el tiocerol A y los ácidos micocerósicos reducidos (conocidos también como ácidos micosanoicos/micoceranoicos) (Fig. 1.2) (4, 11).

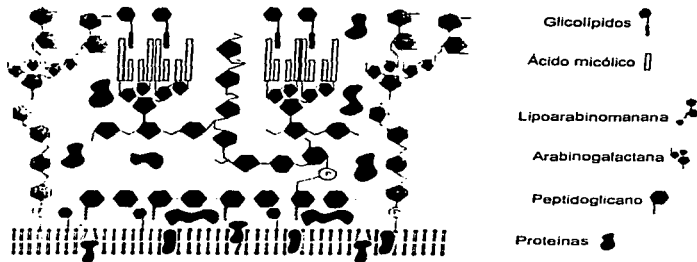
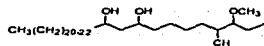
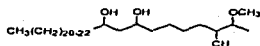


Figura 1.1 Representación esquemática de uno de los modelos propuestos para la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*.

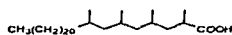
A)



Tiocerol A



Tiocerol B

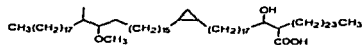


Ácido micocerósico

B)



α Micolato



Meloximicolato

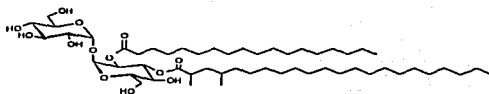


Cetomicolato

Figura 1.2 Estructura de ácidos grasos y dioles de cadena larga (A) y de ácidos micólicos (B) de *M. tuberculosis*.

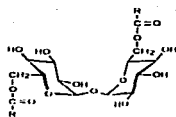
- **Factor cordón** (6,6-dimicólico trealosa): es un derivado de trealosa con dos sustituyentes micolatos (derivados de ácidos micólicos) que pueden consistir de combinaciones simétricas α - α , metoxi-metoxi, y ceto-ceto, y las combinaciones asimétricas α -metoxi, metoxi-ceto y α -ceto (Fig. 1.3) (4, 11).
- **Sulfolípidos** (SL): son compuestos constituidos por trealosas-2'-sulfato, con ácidos hidroxitioceránico, tioceránico y grasos de cadena lineal como grupos acilo (Fig. 1.3) (4).
- **Diaciltrealosas** (DAT): es una clase de compuesto relativamente polar que es un 2,3-di-O-aciltrealosa que contienen una combinación de ácidos grasos de cadena lineal con micocerosatos de 21 a 25 átomos de carbono (Fig. 1.3) (3, 4).
- **Fosfatidil-inositol-manósidos** (PIM's): son los fosfolípidos más abundantes y altamente característicos encontrados en las micobacterias. Están formados por una mitad diacil-glicerol fosfato que se encuentra unida en la posición L-1 al anillo de *myo*-inositol de la mitad polar de la molécula. Las moléculas de manosa presentes en la mitad polar de la molécula se encuentran glicosídicamente unidos en las posiciones 2 y 6 del anillo de *myo*-inositol. La molécula con 2 manosas es la más abundante aunque recientemente se ha descrito la existencia de una molécula con 6 anillos de manosa (Fig. 1.4) (4, 8).
- **Lipoarabinomanana** (LAM): es un lipopolisacárido cuya parte glicosídica consiste de un esqueleto de *D*-manopiranosas unidas mediante enlaces α (1-6), al cual se unen pequeñas cadenas de anillos de *D*-manopiranosas unidas mediante enlaces α (1-2) y de unidades de *D*-arabinopiranosas unidas mediante enlaces α (1-5) (4,14).

A)



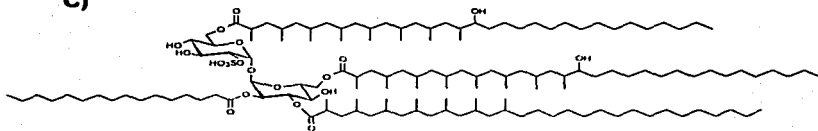
2,3-di-O-aciltrealosa

B)



Factor cordón, RCO = micolato

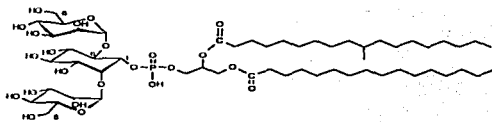
C)



Sulfolipido I

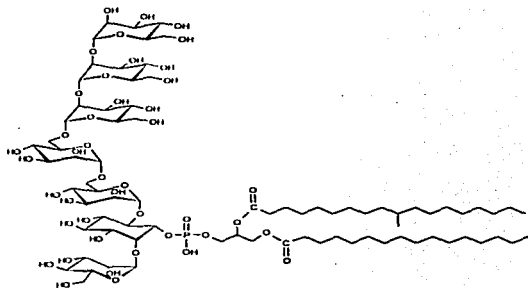
Figura 1.3 Estructura de los principales glicolípidos derivados de trealosa de *M. tuberculosis*: diacil trealosa (A), factor cordón (B), y sulfolípidos (C).

A)



Fosfatidil-inositol-dimanósido diacilado (PIM 2)

B)



Fosfatidil-inositol-hexamanósido diacilado (PIM 6)

Figura 1.4 Estructura de los principales fosfatidil-inositol-manósidos (PIM's) de *M. tuberculosis*: Fosfatidil inositol dimanósido (A), y fosfatidil inositol hexamanósido (B).

1.6 Factores de virulencia

Generalmente se supone que los macrófagos y los linfocitos son la principal defensa del hospedero contra la micobacteria, sin embargo *Mycobacterium tuberculosis* no sólo no es eliminado por las células fagocíticas, sino que es capaz de crecer intracelularmente después de la fagocitosis. Esto podría deberse a la desorganización de la membrana del fagosoma, a la inhibición de la activación del macrófago o a la inhibición de la proliferación de los linfocitos (4, 16).

Es probable que la pared celular rica en lípidos de la micobacteria, tenga ciertas propiedades especiales que la defiendan de los procesos microbicidas del hospedero, lo cual podría contribuir a su capacidad de sobrevivir en los macrófagos inactivos. Las características complejas y distintivas de muchas de las moléculas de la pared celular, han guiado a especular que éstas pueden estar involucradas en la virulencia y patogenicidad de *M. tuberculosis* (4, 16, 23).

Se sabe que los lípidos de la pared celular micobacteriana se producen abundantemente durante la infección y que algunos de estos lípidos pueden difundir hacia las membranas e insertarse en ellas, lo cual podría alterar la organización lipídica de las membranas de la célula hospedera y por lo tanto el buen funcionamiento de las mismas (16).

Entre las funciones que podrían verse alteradas está la permeabilidad de las membranas, lo cual podría disminuir o incrementar la permeabilidad pasiva al agua o a las moléculas solubles en agua, también podría cambiar la polaridad o hidrofobicidad de la superficie al introducirse un gran número de carbohidratos diferentes a los

normalmente presentes. Estos efectos podrían alterar severamente el reconocimiento entre células (macrófagos y linfocitos), la fusión de membranas (la formación del fagolisosoma), la transferencia de electrones (en mitocondria y en la membrana plasmática), la concentración iónica de los organelos y el pH (15, 16).

Uno de los factores que puede contribuir a la supervivencia de *M. tuberculosis* en el macrófago es su aparente capacidad de prevenir la acidificación del fagosoma (6, 16, 26). La ingestión de bacterias u otros agentes por fagocitosis es normalmente seguida de la acidificación del fagosoma mediada por la ATPasa en la membrana del fagosoma que bombea protones hacia el interior del fagosoma, por lo tanto reduce el pH dentro del fagosoma (6, 16, 24, 26). La acidificación no sólo inhibe el crecimiento de la bacteria dentro del fagosoma, sino que también puede ser un paso esencial para conducir a la fusión fagosoma-lisosoma y para la activación de factores liberados durante la fusión. Presumiblemente la micobacteria impide la acidificación mediada por la ATPasa de protón, y entonces mantiene óptimas las condiciones para su desarrollo dentro de las vesículas (16, 24, 26). La prevención de la acidificación del fagosoma aparentemente no previene la fusión fagolisosomal, pero la fusión resultante puede tener una capacidad microbicida disminuida si es que el bajo pH en el fagosoma ayuda a activar las enzimas lisosomales (23, 24, 26). Existen algunos reportes en los que se ha observado que algunos glicolípidos micobacterianos provocan el aumento en la permeabilidad de membranas modelo (18, 25), por lo cual es probable que algunos de los glicolípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* puedan alterar la permeabilidad del fagosoma y evitar de esta forma la adecuada acidificación del mismo.

Otros posibles mecanismos de defensa contra la muerte por fagocitosis se han sugerido por estudios sobre glicolípidos, entre ellos los glicolípidos fenólicos de *M. leprae* y el SL de *M. tuberculosis* que mostraron capacidad para capturar radicales tóxicos del oxígeno *in vitro* y por lo tanto destoxifican el ambiente (7, 20). Asimismo, se ha reportado una clase de glicolípidos presentes en *Leishmania major* (un parásito protozoario) que inhibe la síntesis de óxido nítrico, que es un producto tóxico para los organismos intracelulares y extracelulares (21). Probablemente los glicolípidos, que son abundantes en la pared celular de las micobacterias, también ayudan a proteger a la bacteria de las formas tóxicas del nitrógeno producidas en el fagolisosoma.

Análogamente, podría ser de interés para la bacteria producir factores que interfieran con la activación de macrófagos. El Inf- γ (y posiblemente otras citocinas) producido por células T activas, especialmente células CD4⁺, es esencial para la activación de macrófagos. *M. tuberculosis* produce algunos compuestos que (al menos *in vitro*) interfieren con la activación de células T (16). Algunos estudios han reportado que la lipoarabinomanana y otros glicolípidos de la pared celular micobacteriana, suprimen la proliferación de células T (2, 5, 16, 28).

Con base en todo lo anterior, al realizar este trabajo se intentará purificar mediante técnicas cromatográficas, algunos de los principales glicolípidos asociados a la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizarlos químicamente y estudiar el posible efecto de los compuestos purificados sobre la permeabilidad de membranas modelo, todo ello a fin de definir su potencialidad como potenciales factores de virulencia y patogenicidad.

2. METODOLOGÍA

2.1 OBTENCIÓN DE GLICOLÍPIDOS

2.1.1 Cultivo de las micobacterias

Como fuente de micobacterias se empleó la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v la cual se sembró en matraces Erlenmeyer de 1 litro con medio líquido de Sauton. Para ello, dentro de una campana de seguridad biológica (clase II tipo A/B3) se sembró una asada de bacterias en matraces con medio estéril, los cuales se incubaron en condiciones aerobias a 37 °C durante dos meses.

2.1.2 Extracción de los glicolípidos

Una vez que las bacterias alcanzaron un desarrollo adecuado se separaron del medio de cultivo por filtración. Las células recuperadas se colocaron en una mezcla de cloroformo-metanol (1:2, v/v) y se extrajeron durante una semana. El extracto obtenido se filtró y el residuo celular se colocó en una nueva mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v) extrayéndose durante otros cinco días. Los extractos sucesivos se juntaron y se secaron en un rotavapor. Al extracto concentrado se le realizó una separación de fases empleando una mezcla de cloroformo-metanol-agua (4:2:1, v/v/v). La fase acuosa, con algunos polisacáridos y residuos celulares, se desechó. La fase orgánica, que contenía los lípidos, se recuperó, obteniendo de esta forma el extracto lipídico total.

2.1.3 Purificación

El extracto lipídico total se fraccionó mediante una cromatografía en una columna de vidrio empacada con florisil, eluyendo sucesivamente con un gradiente discontinuo de metanol en cloroformo y con cloroformo-metanol-agua. Las fracciones colectadas se secaron y posteriormente se analizaron por cromatografía en capa fina. Estas fracciones enriquecidas se sometieron a una nueva purificación mediante una nueva cromatografía en columna, eluyendo con un gradiente más lento de los mismos disolventes. La purificación final se realizó por cromatografía en capa fina preparativa o en fase sólida.

2.2 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

2.2.1 Cromatografía en columna abierta

Para el fraccionamiento del extracto lipídico por cromatografía de adsorción en columna, se empleó florisil 60-100 mesh (Mallinckrodt, USA) empacado en columnas de vidrio de 40 x 2.95 cm y de 25 x 1.05 cm (según el peso del extracto). Con esta técnica se logró la separación de los compuestos presentes en el extracto de acuerdo con su polaridad. La columna se empacó con 30 a 50 veces el peso de la muestra. El florisil se suspendió en cloroformo para empacarse en la columna. La muestra se depositó sobre el soporte. Posteriormente se eluyó con un gradiente de metanol en cloroformo, empezando con una concentración del 0% y continuando con concentraciones de 2, 3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, y 40%, y posteriormente con mezclas de cloroformo-metanol-agua 65:25:4 (v/v/v) y 60:35:8 (v/v/v).

2.2.2 Cromatografía en capa fina

El análisis de los compuestos aislados se realizó por cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon cromatoplasacas de vidrio con gel de sílica 60, F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck Darmstadt, Germany) como soporte. Las muestras se colocaron en un extremo de la placa punteando con un capilar sobre el soporte; una vez cargada la placa se eluyó dentro de una cámara para cromatografía saturada con los vapores de un sistema de solventes según los compuestos a analizar. Los sistemas de solventes empleados para eluir los compuestos menos polares fueron mezclas de cloroformo-metanol en las siguientes proporciones : 90:10, 80:20, 70:30 (v/v). Para las fracciones más polares se emplearon como sistemas de elución mezclas de cloroformo-metanol-agua en las proporciones antes mencionadas. Una vez eluida, la placa se retiró de la cámara y se dejó secar para posteriormente revelarse. Para la visualización de los glicolípidos, la placa se roció con una solución de antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) al 0.2% en H₂SO₄ concentrado y posteriormente se calentó a 110 °C durante cinco minutos, los glicolípidos aparecieron como pequeñas manchas de color azul-violeta. Para la visualización de los fosfolípidos se emplearon vaporizaciones del reactivo de Dittmer (óxido de molibdeno al 1.3% en H₂SO₄ 4.2 M, Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) a temperatura ambiente, con el que los fosfolípidos aparecen como pequeñas manchas de color azul.

2.2.3 Cromatografía en capa fina preparativa

Para la purificación final de algunos glicolípidos (GL, LOS y PIM's) se empleó la cromatografía en capa fina preparativa; para ello se emplearon cromatoplasacas de vidrio

cubiertas con gel de sílica 60 de 0.5 mm de espesor sin indicador fluorescente (Merck Darmstadt, Germany). La cromatoplaaca se cargó con aproximadamente 20 mg de la fracción enriquecida que contenía los glicolípidos a purificar, para lo cual, con ayuda de un capilar, se depositó la muestra a todo lo largo de un extremo de la placa. Posteriormente, la placa se colocó dentro de una cámara para cromatografía saturada con el sistema apropiado de solventes. Para la separación de los glicolípidos de polaridad media se empleó la mezcla cloroformo-metanol (70:30, v/v), y para los fosfatidil-inositol-manósidos la mezcla cloroformo-metanol-agua (60:35:8, v/v/v). La localización general de los lípidos se logró mediante el rociado de la placa con una solución 0.01M de Rodamina B en solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.25 M, pH 7.4. La zona de la placa con lípidos se visualiza como una franja teñida de un color rosa intenso. Para la identificación de los compuestos fosfolípidicos, las placas se revelaron en un extremo lateral (1.5 cm aproximadamente) con antrona 0.2% y con reactivo de Dittmer en el otro extremo. Para completar la localización de los fosfolípidos en el resto de la placa se empleó una lámpara de luz UV. Una vez localizados los compuestos en la placa, se rasparon en las diferentes partes que contenían compuestos, separándolas y recuperándolas en vasos de precipitados. Cada compuesto se recuperó mediante la elución con el sistema de solventes correspondiente, seguido de una filtración en papel Whatman 40 libre de cenizas para eliminar el exceso de sílica. Después de filtrados, los extractos se depositaron en pequeñas columnas de vidrio (pipetas Pasteur) empacadas con florisil y se eluyeron

con un sistema adecuado de solventes para eliminar el colorante y restos de sílica del compuesto ya purificado.

2.2.4 Cromatografía en fase sólida

La cromatografía en fase sólida se empleó para la purificación final de algunos de los compuestos (FC, DAT y SL), para lo cual se emplearon cartuchos Sep-pak de gel de sílica (Waters Corporation, Milford MA, USA). Para la activación del cartucho primeramente se eluyeron 6 volúmenes del cartucho con un disolvente no polar (generalmente el disolvente de la muestra, cloroformo). Una vez activada la columna, se depositó la muestra (aproximadamente 5 mg) sobre el soporte y se eluyeron los compuestos indeseados con un solvente no polar (cloroformo), mientras que los productos de interés (de mayor polaridad) se obtuvieron incrementando la polaridad del eluyente (mezclas de metanol-cloroformo). La recuperación del SL se logró empleando como eluyente una mezcla de metanol al 6% en cloroformo, para el FC se empleó una mezcla de los mismos solventes al 9%, y para el DAT una mezcla al 12%.

2.2.5 Cromatografía de gases

Los constituyentes glicosídicos de los lípidos purificados se analizaron por cromatografía de gases, para lo cual se empleó un cromatógrafo de gases Varian 3,300 equipado con una columna de sílica fundida empacada con dimetilpolisiloxano como fase estacionaria, de 30 m de longitud y un diámetro interno de 0.32 mm (J&W Scientific, Folsom CA, USA). El análisis de carbohidratos de los compuestos purificados se realizó bajo las siguientes condiciones: el flujo de la columna fue de 1 mL/min, la

temperatura inicial de la columna de 150 °C y la final de 300 °C, con un incremento de 4 °C/min, la temperatura del inyector de 260 °C y la del detector de ionización de flama de 310 °C. Los carbohidratos se analizaron en forma de derivados trimetilsililados, y se disolvieron en éter de petróleo antes de su inyección.

2.3 TÉCNICAS QUÍMICAS

2.3.1 Hidrólisis ácida

Para el análisis químico de los compuestos purificados se realizó una hidrólisis ácida para obtener los componentes glicosídicos y lipídicos de las moléculas. Una muestra de aproximadamente 0.5 mg de glicolípidos purificados se hidrolizaron con 0.5 mL de ácido trifluoroacético 2 N a 110 °C durante 1 hora en un tubo con tapón de rosca. Después de secar con una corriente de nitrógeno, la muestra hidrolizada se resuspendió en una mezcla de cloroformo-metanol-agua (4:2:1, v/v/v), se agitó y se esperó hasta obtener dos fases, que se recuperaron por separado. De la fase acuosa se obtuvieron los monosacáridos que componen la molécula y, de la fase orgánica, la parte lipídica.

2.3.2 Trimetilsililación

Los carbohidratos obtenidos a partir de la hidrólisis de los glicolípidos purificados se emplearon para obtener trimetilsililos antes de analizarse por cromatografía de gases. Una muestra de aproximadamente 0.5 mg se colocó en un tubo de ensayo con tapa de rosca y se le agregaron 4 gotas (100 µL) de piridina anhidra, 2 gotas (50 µL) de hexametildisilazano y 1 gota (25 µL) de trimetilclorosilano (27). Se agitó y se dejó

reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se secó la muestra bajo corriente de nitrógeno y finalmente se disolvió en éter de petróleo antes de inyectarse en el cromatógrafo de gases.

2.3.3 Metilación

Los ácidos grasos obtenidos por hidrólisis de los glicolípidos purificados se emplearon para obtener ésteres de metilo antes de analizarse por espectrometría de masas. Una muestra de ácidos grasos se disolvió en un volumen mínimo de éter etílico y se añadió una solución etérea de diazometano. Después de cinco minutos de reacción, la muestra se evaporó en su totalidad quedando lista para analizarse.

2.3.4 Precipitación con acetona

A partir de las fracciones enriquecidas con lípidos polares se procedió a realizar una precipitación con acetona para obtener una fracción enriquecida con fosfatidilinositol-manósidos (PIM's) que son de baja solubilidad en acetona. Las fracciones enriquecidas obtenidas con solventes polares (aproximadamente 800 mg) se disolvieron con la mínima cantidad de una mezcla caliente de cloroformo-metanol (70:30, v/v); posteriormente se le añadieron 10 mL de acetona caliente (50 °C). La muestra se dejó enfriar a 4 °C durante una hora, se centrifugó durante 20 minutos a 3,000 rpm, y se recuperó el precipitado que contiene los PIM's, los cuales se purificaron posteriormente por cromatografía en capa fina preparativa.

2.4 TÉCNICAS BIOFÍSICAS

2.4.1 Preparación de liposomas

Los liposomas pequeños unilaminares, se prepararon empleando fosfatidilcolina, fosfatidilserina y colesterol en proporciones molares 2:1:1 (Fig. 2.1A). Para cada experimento se emplearon 4 μmol de lípidos totales, las cuales se dispersaron por sonicación en 600 μL de una solución amortiguadora (tris 5 mM con 45 mM de NaCl, pH 7.2) con 70 mM de 5(6)-carboxifluoresceína. Se emplearon periodos alternados de 45 segundos de sonicación y 30 segundos de enfriamiento en un baño de hielo, hasta lograr el aclaramiento de la solución. Los liposomas se separaron del fluorocromo no encapsulado a través de una columna de exclusión molecular.

2.4.2 Purificación de liposomas

Los liposomas pequeños unilaminares se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular (Fig. 2.1B). La suspensión con liposomas y material no encapsulado se colocó en una columna (10 x 100 mm) empacada con Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), el cual se expandió previamente con un exceso de solución amortiguadora de tris 5 mM con 45 mM de NaCl, pH 7.2 durante tres horas a temperatura ambiente. Una vez colocada la muestra, la columna se lavó empleando como eluyente una solución amortiguadora de tris 5 mM con 70 mM NaCl, pH 7.2. Ya recuperados los liposomas, se mantienen a 4 °C hasta el momento de su uso.

2.4.3 Suspensión de glicolípidos

Un miligramo de glicolípido se disolvió en 20 μL de hexametildisfosforamida, calentando a 50 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se añadieron alícuotas de 50 μL de una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 5 mM, pH 7.2, hasta completar un volumen de 500 μL . Cada adición se realizó manteniendo la temperatura a 50 $^{\circ}\text{C}$ y agitando en *vortex*. Se prepararon soluciones control siguiendo el mismo procedimiento, sin la adición del glicolípido.

2.4.4 Pruebas de permeabilidad pasiva

La permeabilidad pasiva se estimó midiendo el incremento de la intensidad de la fluorescencia provocada por la fuga de carboxifluoresceína a partir de liposomas unilaminares, en donde su fluorescencia se encuentra autoinhibida debido a su alta concentración (Fig. 2.1C). Las pruebas se realizaron colocando en una celda para espectrofluorómetro, 3 mL de solución amortiguadora tris 5 mM con 70 mM de NaCl, pH 7.2, y 50 μL de liposomas. Las lecturas se realizaron en un espectrofluorómetro SLM-AMINCO DMX-1.000. La medición se realizó empleando longitudes de onda de 492 nm para la excitación y de 520 nm para la emisión. Durante todos los ensayos, la temperatura de la celda se mantuvo a 30 $^{\circ}\text{C}$. Después de registrar la intensidad de fluorescencia inicial durante 10 minutos se realizaron adiciones sucesivas de glicolípido en suspensión (30 μL cada vez) midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia durante 5 minutos después de cada adición. Los datos obtenidos se graficaron colocando en el eje de las abscisas el tiempo y en el eje de las ordenadas la intensidad de la fluorescencia.

A) Se prepararon liposomas unilaminares con fosfolípidos y colesterol con un fluorocromo, en condiciones de autoinhibición, en el interior.



B) Purificación de liposomas mediante cromatografía de exclusión molecular.

Mezcla de liposomas y fluorocromo no encapsulado.



La mezcla comienza a separarse



Fluorocromo

Liposomas



C) Al escapar el fluorocromo a través de las membranas modelo, la fluorescencia aumenta al diluirse en el medio de suspensión.

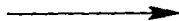


Figura 2.1 Esquema del modelo empleado para medir la permeabilidad de membranas modelo.

2.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.5.1 Espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB)

La masa molecular de los compuestos purificados se determinó por espectrometría de masas empleando la técnica de ionización por bombardeo de átomos rápidos (FAB). Los análisis se realizaron en un espectrómetro de masas JEOL JMS-X102A, el cual opera con una corriente de átomos de xenón a 8 keV; las muestras se disolvieron en cloroformo (DAT) o en una mezcla cloroformo-metanol-agua (60:35:5, v/v/v) (PIM's) y se mezclaron con alcohol *m*-nitrobenílico (como matriz) antes de depositarse. Para el DAT se empleó el modo de ionización positiva, mientras que para los PIM's se utilizó el modo de ionización negativa.

2.5.2 Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM)

Para el análisis de los ácidos grasos obtenidos a partir de los compuestos purificados en forma de ésteres metílicos, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM), para lo cual se empleó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5,890 conectado a un espectrómetro de masas JEOL AX-505HA provisto de una fuente iónica de impacto electrónico. Para la separación de los ácidos grasos en el cromatógrafo de gases se empleó una columna HP-PAS 1,701 de silicón, empleando un gradiente de temperatura de 4 °C/min de 120 a 260 °C. El registro de los espectros se realizó entre 33 y 420 unidades de masa atómica (uma).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PURIFICACIÓN

3.1.1 Fracciones enriquecidas

A partir de cultivos de micobacterias con dos meses de incubación se obtuvo el extracto lipídico total, que contiene una gran cantidad de lípidos como ceras, glicolípidos, fosfolípidos, algunos polisacáridos y algunos residuos celulares. A partir de éste se obtuvieron fracciones enriquecidas mediante una cromatografía en columna con la cual se obtuvieron tres tipos de fracciones enriquecidas: glicolípidos de baja polaridad, de mediana polaridad y polares.

Al emplear como eluyente las mezclas con 5 a 10% de metanol en cloroformo se obtuvieron fracciones que contenían tres compuestos de baja polaridad. De acuerdo con el R_f de estos compuestos en cromatografía de capa fina sobre gel de sílica se dedujo que sus estructuras podrían corresponder a las del 6,6'-dimicoloiltrealosa (factor cordón), del sulfolípidos (SL), y del 2,3-diaciltrealosa (DAT).

En las fracciones de polaridad media, obtenidas con mezclas de cloroformo con 15 y 20% de metanol se obtuvieron dos compuestos glicosilados de mayor polaridad que los anteriores, que podrían tratarse de sulfátidos y/o de algún lipooligosacárido (LOS).

Finalmente, en las fracciones polares, eluidas con una mezcla de 40% de metanol en cloroformo y con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (60:35:8, v/v/v)

se obtuvieron principalmente los fosfatidil-inositol-manósidos (PIM's), compuestos identificados mediante revelados específicos para carbohidratos y para fósforo.

3.1.2 Purificación de derivados de trealosa

La purificación final de los glicolípidos de menor polaridad (FC, SL y DAT) se logró realizando una nueva cromatografía de las fracciones enriquecidas en una columna de vidrio con florisil, eluyendo con un gradiente más lento de metanol en cloroformo. En esta nueva columna se logró la purificación del SL empleando como eluyente una mezcla al 4 y 5% de metanol en cloroformo. La pureza de este compuesto se verificó mediante su análisis por cromatografía en capa fina en la cual se visualizó como una mancha única utilizando un revelador general de lípidos (Fig. 3.1A).

La purificación del FC se realizó empleando mezclas de 6, 7 y 8% de metanol en cloroformo como gradiente de elución, mientras que el DAT se eluyó con mezclas de 10, 11 y 12% de metanol en cloroformo. La pureza del FC y del DAT se comprobó por cromatografía en capa fina (Fig. 3.1A). En las fracciones eluidas con 8 y 9% de metanol en cloroformo se obtuvo una mezcla de FC y DAT, que para separarlos se sometieron a una extracción en fase sólida sobre sílica. Con este método, el FC se eluyó con una mezcla al 6% de metanol en cloroformo y el DAT con una mezcla al 10% de metanol en cloroformo.

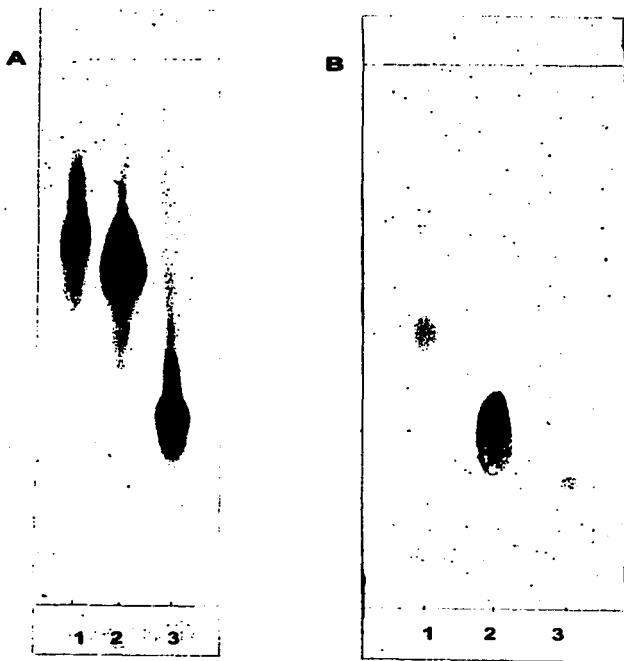


Figura 3.1 Cromatografía en capa fina sobre gel de sílica de glicolípidos purificados. A) Derivados de trealosa: SL (1), FC (2) y DAT (3) con cloroformo-metanol (80:20, v/v) como eluyente. B) Glicolípidos de polaridad media: DAT (1), GL₁ (2) y GL₂ (3) con cloroformo-metanol (70:30, v/v) como eluyente.

3.1.3 Purificación de los glicolípidos GL₁ y GL₂

Los compuestos preponderantes en las fracciones obtenidas con 15 a 20% de metanol en cloroformo se purificaron por cromatografía en capa fina preparativa, utilizando una mezcla de cloroformo-metanol (70:30, v/v) como eluyente. Se obtuvieron dos productos los cuales se recuperaron y se extrajeron de la sílica mediante el uso de una mezcla con la misma proporción de solventes. La pureza de estos compuestos se comprobó mediante cromatografía en capa fina (Fig. 3.1B).

3.1.4 Purificación de fosfatidil inositol manósidos (PIM's)

Se obtuvo una fracción rica en PIM's al eluir de una columna de florisil el extracto lipídico total con una mezcla al 40% de metanol en cloroformo y con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (60:35:8, v/v/v), después de haber usado un gradiente de 0 a 30% de metanol en cloroformo para la obtención de compuestos menos polares. Ya que esta fracción también contenía impurezas, fue necesario realizar una precipitación posterior de los compuestos de interés, que son de baja solubilidad en acetona fría. Este precipitado contenía una mezcla de PIM's, que difieren entre sí en el número de monosacáridos y grupos acilo. Para separar unos de otros se realizó una cromatografía en capa fina preparativa eluyendo dos veces con una mezcla cloroformo-metanol-agua (60:35:8, v/v/v), con lo cual se logró la separación de 4 compuestos. Este protocolo se adoptó después de haber estudiado el valor de diferentes sistemas de elución, con lo cual se logró optimizar la separación de los compuestos. La extracción de estos compuestos a partir del gel de sílica se realizó con una mezcla cloroformo-metanol-agua (60:27:4, v/v/v), sistema que imposibilitó el uso de

la Rodamina B como marcador temporal de las bandas, pues esta mezcla eluye con mayor eficiencia al revelador que a los glicolípidos. Mediante esta técnica se aislaron cuatro compuestos que, de acuerdo con su reactividad, se identificaron como un fosfolípido y tres glicofosfolípidos (Fig. 3.2). Ya que los únicos glicofosfolípidos presentes en *M. tuberculosis* son los PIM's, sólo quedó por establecer la estructura final de cada uno de estos compuestos.

3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.2.1 Identificación del sulfolípidido (SL) y del factor cordón (FC)

La identificación parcial del sulfolípidido (SL) y del factor cordón (FC) se realizó por medio de un análisis en cromatografía en capa fina, en donde los R_f 's y la coloración pueden discernir entre el SL y el FC (12, 17). Queda por comprobarse la identidad del SL, para lo cual se requieren diversas técnicas analíticas que no se utilizaron debido a la cantidad de producto disponible. Dentro de estas técnicas se encuentran la cromatografía de gases, la espectrometría de masas (FAB) y la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM).

Para la identificación del factor cordón (FC) se corrió una cromatografía en capa fina de los compuestos purificados junto con un estándar comercial de FC. Una vez eluida y revelada la placa, se pudo identificar al FC por comparación de los R_f 's con el del FC estándar (Fig. 3.3). El compuesto identificado como FC corresponde al obtenido por extracción en fase sólida con una solución de 6% de metanol en cloroformo.

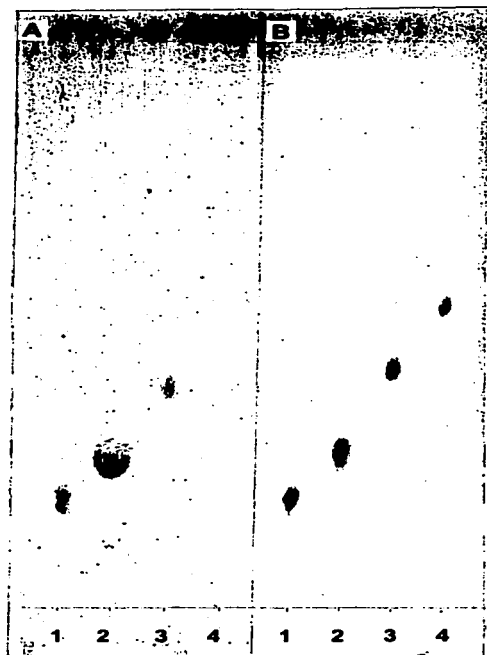


Figura 3.2 Cromatografía en capa fina de glicolípidos polares purificados de *M. tuberculosis*. Placa de gel de sílica con PIM_{2a} (1), PIM₂ (2), PIM_{2b} (3) y fosfolípido (4), con cloroformo-metanol-agua (60:35:8 v/v/v) como eluyente y revelada con antrona (A) y reactivo de Dittmer (B).



Figura 3.3 Cromatografía en capa fina sobre gel de sílica con el SL (1), un estándar comercial de FC (2) y con el FC (3), con cloroformo-metanol (90:10, v/v), como eluyente y revelada con antrona.

3.2.2 Identificación del diaciltreososa (DAT)

La identificación del DAT se logró mediante su análisis por diversas técnicas. Los análisis por cromatografía en capa fina mostraron un compuesto glicosilado con un R_f que corresponde al DAT, según datos reportados en la bibliografía (3). Un análisis por espectrometría de masas empleando la técnica de bombardeo de átomos rápidos (EM-FAB), mediante la cual se obtienen las señales de iones moleculares o pseudomoleculares, permitió determinar la masa molecular de los diferentes homólogos del compuesto. Las masas de 954, 966, 982, 994, 1.010, 1.022 y 1.040 unidades de masa atómica (uma) corresponden a homólogos del DAT con diferentes ácidos grasos (Fig. 3.4). Finalmente, se realizó la identificación de los constituyentes lipídicos y glicosídicos de la molécula mediante cromatografía de gases acoplada, en algunos casos, a la espectrometría de masas (CG/EM). Para esto se realizó una hidrólisis ácida del glicolípido, la cual rompe los enlaces éster y los enlaces O-glicosídicos de la molécula, dando como productos los ácidos grasos y los monosacáridos presentes en la cadena glicosídica. Una vez separados por partición entre solventes, se formaron los metil-ésteres de los ácidos grasos y los trimetilsililatos de los sacáridos. La fracción glicosídica se analizó por cromatografía de gases, en la cual se pudo comprobar, mediante comparación con estándares, que el monosacárido presente en la molécula era glucosa (Fig. 3.5).

Los derivados de los ácidos grasos se analizaron mediante CG/EM, en donde se encontraron dos homólogos predominantes. De acuerdo con sus espectros de fragmentaciones, uno de ellos se identificó como un ácido graso saturado de cadena

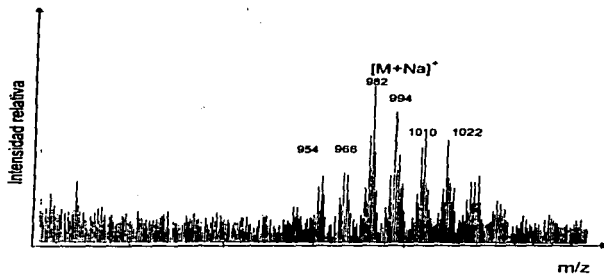


Figura 3.4 Espectro de masas de los iones pseudomoleculares $[M + Na]^+$ del DAT obtenidos por la técnica de FAB en modo de ionización positivo.

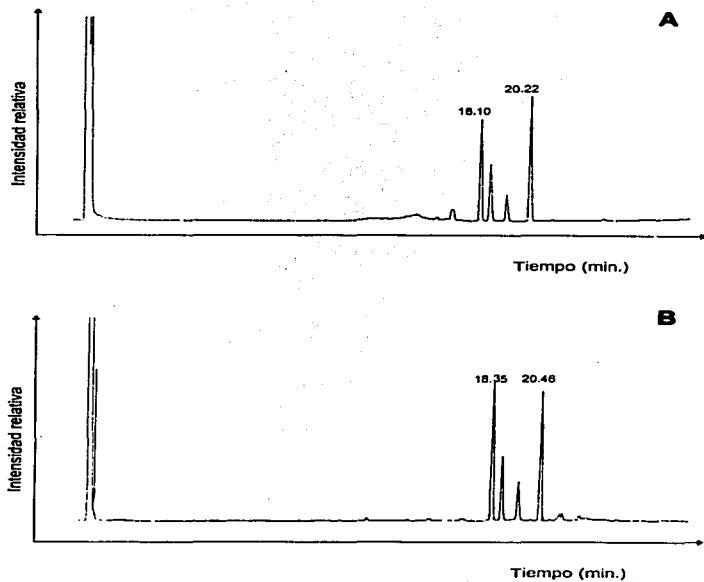


Figura 3.5 Caracterización química de los constituyentes glicosídicos del DAT. Cromatografía de gases de: A) los monosacáridos trimetilsililados de la molécula purificada y B) de un estándar de glucosa trimetilsililado.

lineal de 19 átomos de carbono. En la Figura 3.6A se muestra el espectro con una señal a 298 uma correspondiente al ion molecular M^+ ; la presencia del pico base a 74 uma, corresponde al rearrreglo de McLafferty (19, 29); la presencia de iones de fórmula general $[(CH_2)_nCOOCH_3]^+$ donde $n=2, 3, 4, 5, \text{ etc.}$, separadas por 14 uma se observan a 87($n=2$), 101($n=3$), 115($n=4$) y 129($n=5$) uma, predominando las señales correspondientes a los aductos $n=2, n=6, n=10$ y $n=14$ (separados por 4 unidades metileno), como es común en ácidos grasos lineales no ramificados (19, 29).

El espectro del otro ácido graso corresponde a una molécula de 24 átomos de carbono, con una cadena principal de 22 átomos de carbono y dos sustituyentes metilo en los carbonos 2 y 4. En la Figura 3.6B se muestra el espectro con una señal a 382 uma, que pertenece al ion molecular M^+ y la presencia del pico base a 88 uma, debido al rearrreglo de McLafferty para ácidos grasos sustituidos en el carbono α . La posición del segundo sustituyente metilo se situó en el carbono γ y debido a la presencia de los fragmentos con 101 y 129 uma, así como por la presencia de las señales de 339 uma ($M - 43$) y 311 uma ($M - 71$) que confirman la presencia de los dos sustituyentes metilo (18, 28). La señal de 339 uma ($M - 43$) corresponde a la pérdida de los átomos de carbono 2 y 3 junto con la cadena metilo lateral y la señal a 311 uma ($M - 71$) a la pérdida de los átomos de carbono 2, 3 y 4 junto con las dos cadenas metilo laterales (19, 29).

3.2.3 Identificación del fosfatidil inositol dimanósido (PIM₂)

La identificación del PIM₂ se realizó mediante diversos estudios. Primeramente, se efectuó un estudio por cromatografía de capa fina, en donde con el uso de

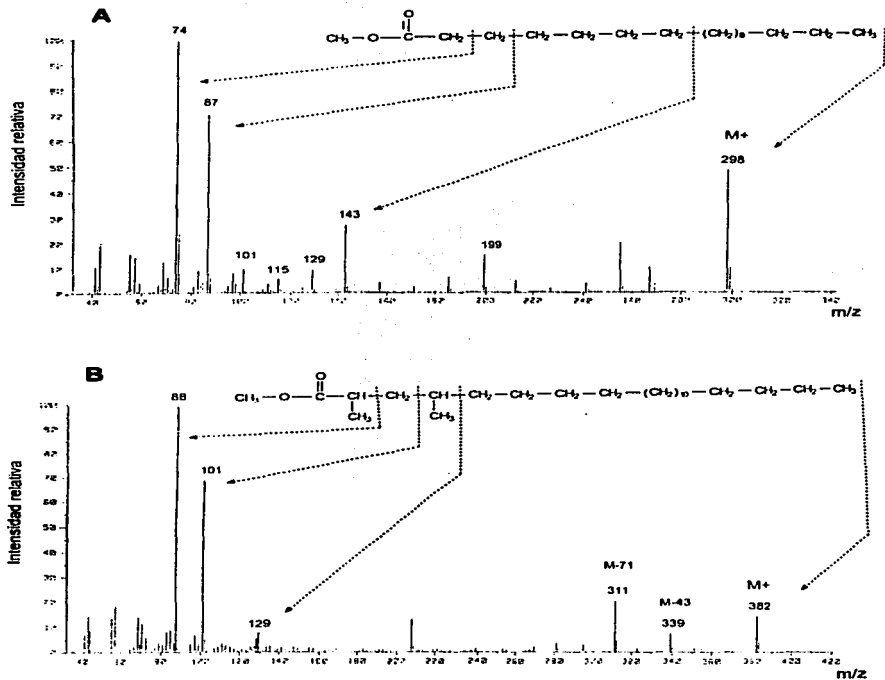


Figura 3.6 Espectros de masas (por impacto electrónico) de dos de los ácidos grasos obtenidos por hidrólisis del DAT. A) Espectro característico de un ácido graso lineal saturado de 18 átomos de carbono. B) Espectro que muestra señales de un ácido graso de 24 átomos de carbono con dos ramificaciones metilo.

reveladores específicos se determinó la presencia de fósforo y de sacáridos en la molécula (Fig. 3.2).

Al analizar la estructura de los ácidos grasos presentes en la molécula (después de una hidrólisis ácida) se determinó la presencia de al menos 7 ácidos grasos diferentes, predominando 2 de ellos. En la Figura 3.7A se muestra el espectro de masas de uno de ellos, el ácido palmítico, con la presencia del ion molecular a 270 uma, un fragmento a 74 uma, correspondiente al rearrreglo de McLafferty para ácidos no ramificados, y señales debidas a fragmentos del tipo $[(CH_2)_nCOOCH_3]^+$, cuyas señales se encuentran a 87 uma (n=2), 101 uma (n=3), 115 uma (n=4), etc (19, 29).

El otro aducto de mayor abundancia corresponde a un ácido graso ramificado de 19 átomos de carbono, el ácido 10-metiloctadecanoico (ácido tuberculosteárico). En la Figura 3.7B se muestra el espectro de masas de este ácido con la presencia del ion molecular a 312 uma, que es lo esperado para una molécula de 19 átomos de carbono, señales abundantes a 171 y 199 uma (debido a las rupturas α al carbono terciario), señales a 167 (=199 - 32) y 149 (=199 - 50) uma, debidas a la pérdida de agua y/o metanol del fragmento que contiene a la cadena metilo lateral (19, 29). Todos estos rasgos son característicos de las moléculas de ácidos grasos con ramificaciones metilo en la parte media de la cadena y en especial de las moléculas con substituyentes en el átomo de carbono 10 (19, 29).

Mediante un análisis por EM-FAB del compuesto, se observó la masa molecular del homólogo principal a 1.176 uma y señales de menor intensidad a 1.162, 1.190, 1.204 y 1.218 uma, atribuidas a una serie de moléculas que variaban entre sí por la

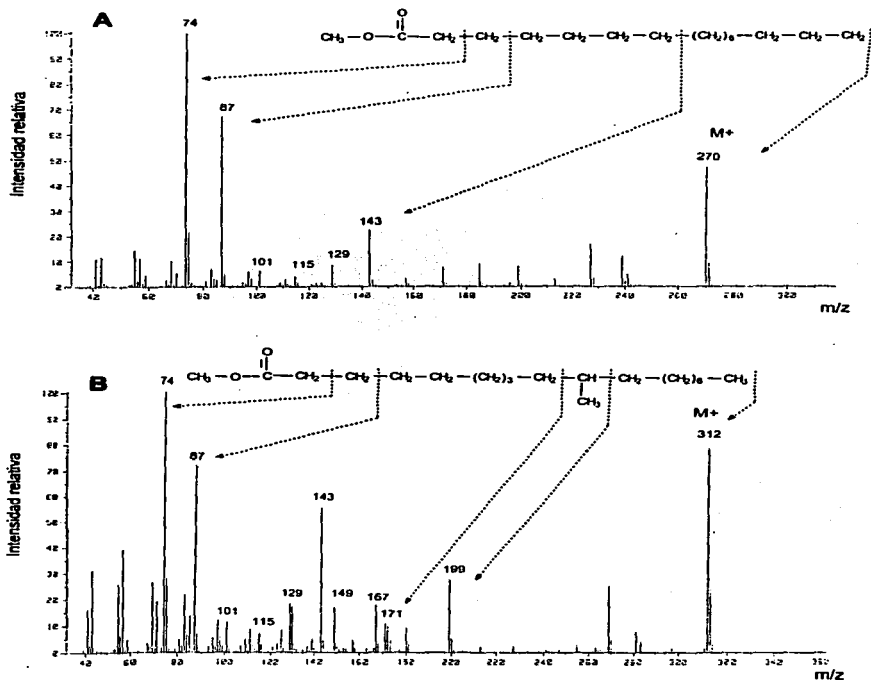


Figura 3.7 Análisis por CG acoplada a la EM de los principales ácidos grasos liberados por la hidrólisis del PIM₂. A) Espectro con señales características de un ácido graso lineal saturado (ácido palmítico). B) Espectro con un patrón de fraccionamiento característico de una molécula lineal con una ramificación metilo en el carbono 10 (ácido tuberculosteárico).

longitud de las cadenas de los ácidos grasos presentes en sus estructuras (Fig. 3.8). Estos resultados concuerdan con la estructura de un fosfatidil inositol dimanósido, sustituido principalmente por los ácidos tuberculosteárico y palmítico, para originar el aducto preponderante $(M - H)^-$ de 1,176 uma (Fig. 3.10) (8, 13).

3.2.4 Identificación del PIM_{2a} y PIM_{2b}

La identificación de los otros 2 glicofosfolípidos se realizó mediante un análisis de EM-FAB con el cual se determinó la masa molecular de estos compuestos. El espectro del compuesto de mayor polaridad, PIM_{2a} (Fig. 3.9A) muestra dos señales de igual intensidad a 1.176 y 1.134 uma que se asignaron a iones pseudomoleculares $(M - H)^-$ con 2 ácidos palmíticos y con un ácido palmítico y uno tuberculosteárico (Fig. 3.10). Ya que los espectros del PIM_2 y el PIM_{2a} muestran las masas esperadas para diacil fosfatidil inositol manósidos, queda por establecerse si la diferencia de polaridad entre ellos (ver Fig. 3.2) se debe a una mayor longitud de los ácidos grasos en el PIM_2 , o a alguna diferencia estructural de los mismos en el PIM_{2a} .

En cuanto al PIM de menor polaridad, su espectro mostró una serie de iones pseudomoleculares de 1,442, 1,456, 1,470, 1,482 y 1,498 uma (Fig. 9B), masas que corresponden a un PIM_2 triacilado (Fig. 3.10). De acuerdo con su masa de 280 uma por arriba de las señales del PIM_2 , este compuesto correspondería a un PIM_2 con un ácido tuberculosteárico más en su estructura, el cual puede localizarse en una molécula de manosa o en el inositol (14). Las estructuras propuestas para cada uno de los glicofosfolípidos aislados se representan en la Figura 3.10.

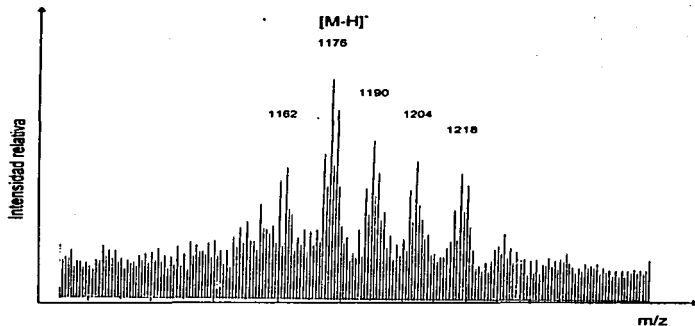


Figura 3.8 Espectro de masas de los iones pseudomoleculares $(M - H)^-$ del PIM_2 obtenidos por la técnica de FAB en modo de ionización negativo.

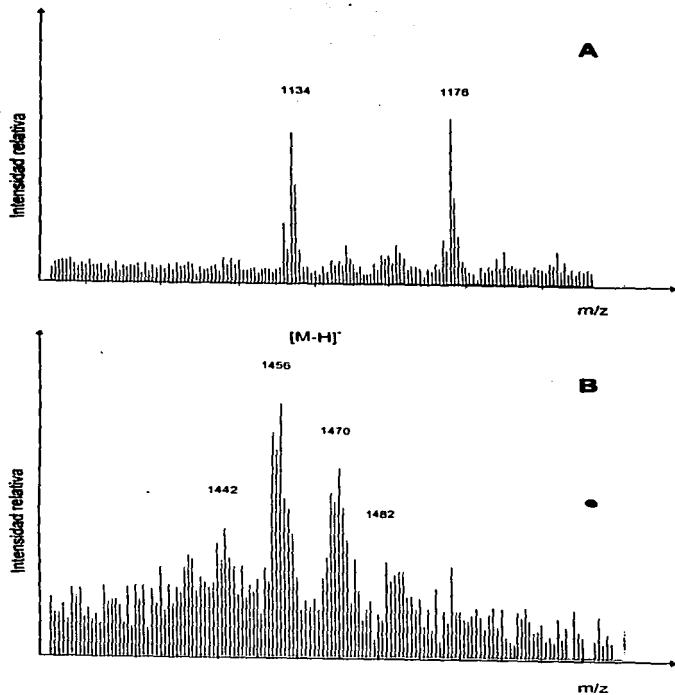
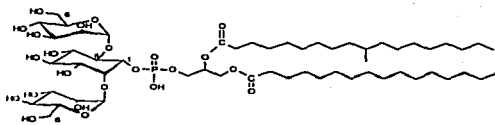


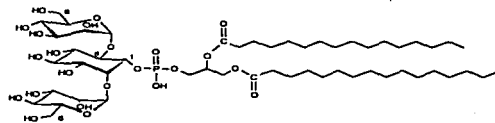
Figura 3.9 Espectros de masas de los iones pseudomoleculares $(M - H)^{-}$ del PIM_{2a} (A) y del PIM_{2b} (B) obtenidos por la técnica de FAB en modo de ionización negativo.

A)



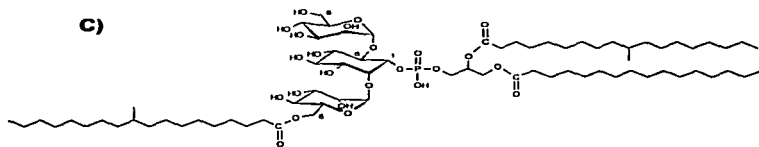
Fosfatidil-inositol-dimanoído diacilado (PIM 2)

B)



Fosfatidil-inositol-dimanoído diacilado (PIM 2a)

C)



Fosfatidil-inositol-dimanoído triacilado (PIM_{2b})

Figura 3.10 Estructuras químicas propuestas para los glicofosfolípidos purificados: A) PIM₂, B) PIM_{2a}, y C) PIM_{2b}.

3.3 PRUEBAS DE PERMEABILIDAD

3.3.1 Pruebas de permeabilidad pasiva

El efecto de glicolípidos aislados sobre la permeabilidad de las membranas modelo, se evaluó mediante fluorimetría (Fig.2.1). Debido a que la cantidad de producto purificado para algunos glicolípidos fue limitada, sólo se realizaron pruebas de permeabilidad con el DAT, FC, SL, PIM₂, PIM_{2a} y PIM_{2b}, productos con los cuales se podría obtener una conclusión entre la actividad permeabilizante y los cambios de glicosilación y acilación de los dos tipos de glicolípidos que representan (aciltrealosas y glicofosfolípidos).

Las pruebas de permeabilidad se realizaron midiendo el incremento de la fluorescencia antes y después de la adición de glicolípido en suspensión, comparando con soluciones control. Los resultados se registraron como gráficas de intensidad de fluorescencia contra tiempo de incubación. La permeabilidad se midió por comparación de diversos compuestos en una misma población de liposomas, lo cual limitó el número de productos que se analizaron por cada experimento, debido a que la medición debe realizarse con liposomas recién preparados.

Los resultados obtenidos en los experimentos muestran que todos los glicolípidos probados tienen cierta actividad permeabilizante, con excepción del FC (Fig. 3.11 y 3.12). Sin embargo no se posible determinar si el FC no actúa sobre la permeabilidad de los liposomas o si el modelo experimental es incapaz de visualizar el efecto (por ejemplo, por falta de integración de este glicolípido en los liposomas empleados). Lo mismo vale para comparar con prudencia el efecto de las 6 moléculas.

El efecto observado fue de diferente intensidad para cada compuesto. En todos los casos, la actividad permeabilizante dependió de la dosis, aunque después de cierta dosis se llegó a una estabilización en la permeabilidad. Es posible que este fenómeno se deba a la imposibilidad de insertar más glicolípido en la membrana modelo después de que se ha alcanzado un determinado porcentaje de incorporación.

La mayor actividad permeabilizante se registró con el DAT junto con el PIM_{2a} y el PIM_{2b}, que mostraron un efecto aun mayor al de un estándar con una alta actividad permeabilizante (el GPL de *M. chelonae*) (18, 25). La actividad PIM_{2a} fue mayor que la del PIM_{2b}. Debido a la cantidad de producto disponible de estos compuestos no fue posible comparar su actividad respecto al DAT. El PIM₂ y el SL exhibieron una menor actividad permeabilizante.

Los resultados obtenidos parecen indicar que dentro de un mismo tipo de glicolípidos son los de menor grado de acitación los que producen un mayor aumento sobre la permeabilidad de liposomas unilamelares.

La actividad permeabilizante mostrada por el DAT es un hallazgo de gran importancia pues se trata de una molécula de reciente descripción en *M. tuberculosis* (3), y compartida solo por *M. leprae* y *M. fortuitum*. Tomando en consideración que varios autores han postulado la hipótesis de que existe cierta relación entre la desorganización de membranas y efectos sobre el sistema inmune (2, 5, 7, 15, 16, 20, 28), resulta de considerable interés realizar estudios que permitan revelar el efecto de estas moléculas sobre la respuesta de las células del sistema inmune del hospedero.

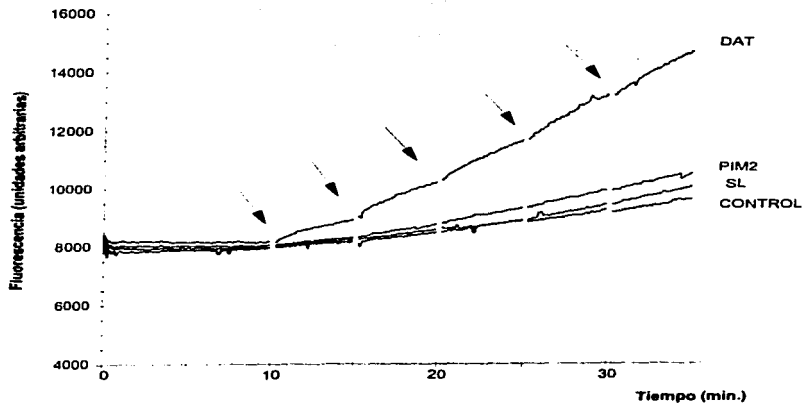


Figura 3.11 Efecto sobre la permeabilidad pasiva en membranas modelo, debido a la adición del DAT, PIM₂, SL y de solución control. Las flechas representan la adición de la suspensión de glicolípido o de la solución control.

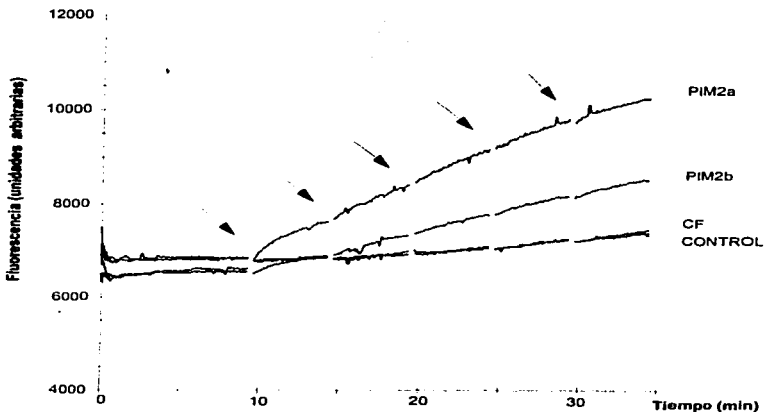


Figura 3.12 Efecto sobre la permeabilidad pasiva en membranas modelo debido a la adición de PIM_{2a}, PIM_{2b}, FC y de solución control. Las flechas indican la adición de la suspensión de glicolípidos o de la solución control.

4. CONCLUSIONES

En los últimos años se ha dado un incremento en la incidencia de la tuberculosis a nivel mundial, principalmente por el abandono de los tratamientos contra la enfermedad una vez que se pensó controlada, así como también por la aparición del SIDA y de las cepas poliquimiorresistentes.

No obstante de que la tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas en la historia de la humanidad, poco se sabe de los factores que le confieren su patogenicidad y su virulencia a *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de esta enfermedad.

Mediante diversas técnicas cromatográficas se puede lograr la purificación de algunos de los principales glicolípidos asociados a la pared celular de *M. tuberculosis*.

Mediante el uso de técnicas analíticas como la espectrometría de masas y la cromatografía de gases se pueden caracterizar químicamente los glicolípidos aislados.

La metodología empleada facilitará la obtención futura de estos glicolípidos, a fin de determinar su posible implicación como factores de patogenia o virulencia de la micobacteria.

Con el efecto de los glicolípidos aislados sobre la permeabilidad de membranas modelo, se podría especular sobre su posible importancia como factores de patogenia, ya que se sabe que un glicolípido (GPL) de una micobacteria atípica (*M. chelonae*) tiene una gran actividad permeabilizante sobre membranas modelo y que también muestra el mismo efecto sobre membranas mitocondriales de células de mamífero.

Tres de los glicolipidos aislados (el DAT, PIM_{2a} y PIM_{2b}) mostraron la mayor actividad permeabilizante sobre las membranas modelo, mientras que otros dos glicolipidos (PIM₂ y SL) mostraron una menor actividad; en contraste, el FC no mostró efecto permeabilizante. Debido a que las pruebas con el DAT no se realizaron en conjunto con el PIM_{2a} y el PIM_{2b} no se puede saber cuál de estas moléculas tenga una mayor actividad permeabilizante. Por lo tanto, se requiere de estudios posteriores para determinar un orden de actividad en este modelo.

El hecho de que el DAT mostrara el mayor efecto permeabilizante resulta muy interesante, ya que este glicolipido es altamente específico de *M. tuberculosis*.

Es posible que estas moléculas pudieran estar implicadas en la patogenia de la micobacteria, ya que si afectan la permeabilidad de las membranas modelo es posible que afecten a las membranas de las células hospederas, especialmente las de los macrófagos que es donde reside y se multiplica este microorganismo. Al alterar la permeabilidad de las membranas del macrófago, la micobacteria podría afectar ciertas funciones vitales para la célula, como el aumento o la disminución de la concentración citoplásmica y de los organelos de moléculas solubles en agua, con sus posibles repercusiones sobre los procesos fisiológicos de la célula.

Se piensa que podrían verse afectados procesos como la transferencia de electrones y la acidificación del fagolisosoma, lo cual podría evitar la adecuada degradación y eliminación de la micobacteria.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Existen evidencias de que durante la infección con *M. tuberculosis* la acidificación del fagolisosoma no es adecuada, por lo tanto es posible que estas moléculas (DAT, PIM_{2a} y PIM_{2b}) pudieran estar colaborando de alguna forma en dicho proceso.

Es probable que el mecanismo por el cual dichas moléculas afecten la permeabilidad de las membranas modelo implique una modificación en la organización de los lípidos de la membrana debido a su inserción en las mismas, con lo que de ocurrir lo mismo en las membranas de la célula hospedera, podrían verse afectados procesos de reconocimiento entre células como sería el caso de los macrófagos y los linfocitos, lo cual podría tener como consecuencia una inhibición de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*.

Los resultados obtenidos en las pruebas de permeabilidad hacen pensar que es probable que el DAT, el PIM_{2a} y el PIM_{2b} puedan contribuir en la patogenia y virulencia de *M. tuberculosis*.

En un futuro sería de gran interés realizar estudios que permitan revelar el efecto de estas moléculas sobre la respuesta de las células hospederas implicadas en el control de la micobacteria durante el proceso de infección, principalmente los macrófagos y los linfocitos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **Barnes, P. F., Bloch, A. B., Davidson, P. T., and Snider, D. E.** (1991) Tuberculosis in patients with Human Immunodeficiency Virus infection. *N. Engl. J. Med.* **324**: 1644-1650.
2. **Barrow, W. M., Davis, T. L., Wright, E. L., Labrousse, V., Bachelet, M., and Rastogi, N.** (1995) Immunomodulatory spectrum of lipids associated with *Mycobacterium avium* serovar-8. *Infect. Immun.* **63**: 126-133
3. **Besra, G. S., Bolton, R. C., McNeil, R., Ridell, M., Simpson, K. E., Glushka, J., Van Halbeck, H., Brennan, P. J., and Minnikin, D. E.** (1992) Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* **31**: 9832-9837.
4. **Bloom, B.** (Ed) (1994) Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. ASM Press, Washington, D.C.
5. **Brownback, P. E., and Barrow, W. W.** (1988) Modified lymphocyte response to mitgens after intraperitoneal injection of glycopeptidolipid antigens from *Mycobacterium avium* complex. *Infect. Immun.* **56**: 1044-150.
6. **Chicurel, M., Garcia, E., and Goodsaid, F.** (1988) Modulation of macrophage lysosomal pH by *Mycobacterium tuberculosis*-derived protein. *Infect. Immun.* **56**: 479-483.
7. **Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P., McNeil, M., Turco, S. J., Sibille, J. C. Snapper, M., Aisen, P., and Bloom, B. R.** (1989) Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2453-2457.
8. **Chatterjee, D., Hunter, S. W. McNeil, R., and Brennan, P. J.** (1992) Lipoarabinomannan: Multiglycosylated form of the mannosyl phosphatidylinositols. *J. Biol. Chem.* **267**: 6228-6233.

9. **Comité Nacional de lucha contra la tuberculosis y enfermedades del aparato respiratorio.** Comunicado (Febrero de 1997).
10. **Cooper, A. M. and Flynn, J. L.** (1995) The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 512-516
11. **Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., and Ginsberg, H. S.** (1990) Microbiology. 4th Edition. J. B. Lippincott, Philadelphia.
12. **Dobson, G., Minnikin, D. E., Minnikin, S. M., Pariett, J. H., and Goodfellow, M.** (1985) Systematic analysis of complex mycobacterial lipids. In: Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (Ed.) Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press, London. pp. 237-265.
13. **Fournie, J. J., Mullins, R. J., and Basten, A.** (1991) Isolation and structural characteristics of a monoclonal antibody define cross-reactive antigen from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 1211-1219.
14. **Khoo, K-H., Dell, A., Morris, H.R., Brennan, P.J. and Chatterjee, D.** (1995) Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology.* **5**: 117-127.
15. **Krishnaraj, R., Lengle, E. E., and Kemp, R. G.** (1982) Murine leukemia. Proposed role for gangliosides in immune suppression. *Eur. J. Cancer. Clin Oncol.* **18**: 89-98.
16. **Lanéelle, G., and Daffé, M.** (1991) Mycobacterial cell wall and pathogenicity: Lipodologist's view. *Res. Microbiol.* **142**: 433-437.
17. **Lemassu, A., Lévy-Frébault, V. V., Lanéelle, M. A., and Daffé M.** (1992) Lack of correlation between colony morphology and lipooligosaccharide content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1535-1541

18. López, L.M., Quesada, D., Lakhdar-Ghazal, F., Toccanne, J.F., and Lanéelle, G. (1994) Interactions of mycobacterial glycopeptidolipids with membranes: Influence of carbohydrate on induced alterations. *Biochemistry*. **33**: 7056-7061.
19. Odham, G., Larsson, L. and Mardh, P.A. (1984) Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Applications in microbiology. Plenum Press, N.Y.
20. Pabst, M. J., Gross, J. M., Brozna, J. P., and Goren, M. B. (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **140**: 634-640.
21. Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., and Liew, F.Y. (1995) Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophage. *Eur. J. Immunol.* **25**: 745-750.
22. Raviglione, M.C., Snider, D.E., and Kochi, A. (1995) Global epidemiology of the tuberculosis: Morbidity and mortality of a world wide epidemic. *J. Amer. Med. Assoc.* **273**: 220-226
23. Salyers, A. and Whitt, D. (1994) Bacterial Pathogenesis: A molecular approach. ASM Press, Washington D.C.
24. Small, P.L.C., Ramakrishnan, L., and Falkow, S. (1994) Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science*. **263**: 637-639.
25. Sut, A., Sirugue, S., Sixou, S., Lakhdar-Ghazal, F., Toccanne, J.F., and Lanéelle, G. (1990) Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: Alteration of model and natural membranes. *Biochemistry*. **29**: 8498-8502.

26. **Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.k., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J., and Russell, D.G.** (1994) Lack of acidification in mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. **263**: 678-681.
27. **Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W.** (1963) Gas-Liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **25**: 2497-2507.
28. **Tassell, S. K., Pourshafie, M., Wright, E. L., Richmond, M. G., and Barrow, W. W.** (1992) Modified lymphocyte response to mitogens induced by the lipopeptide fragment derived from *Mycobacterium avium* serovar-specific glycopeptidolipids. *Infect. Immun.* **60**: 706-711.
29. **Waller, G. R.** (Ed) (1972) *Biochemical application of the Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience, New York.

ANEXO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Medio de cultivo líquido de Sauton

El medio líquido de Sauton se prepara con los siguientes compuestos en las proporciones indicadas:

Citrato de hierro y amonio	0.05 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Fosfato monopotásico	0.5 g
Ácido cítrico	2.0 g
Asparagina	4.0 g
Glicerol	60.0 g
Agua	c.s.p. 1000 mL

Se neutraliza con NH_4OH hasta un pH de 7.2 - 7.3.

Se esteriliza en autoclave a 21 lb de presión y 120°C durante 30 minutos.

2. Solución de antrona al 0.2%

Para la preparación de esta solución reveladora se adicionan 0.2 g de 9,10-dihidro-9-oxoantraceno (antrona) en un matraz y se afora con H_2SO_4 concentrado hasta un volumen total de 100 mL. La solución se mantiene a 4°C y protegida de la luz.

3. Solución de Rodamina B al 0.01%

Esta solución se prepara adicionando 0.01 g de Rodamina B (Sigma Chemical Co., St. Louis MO. USA) en un matraz y aforando con una solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.25 M de pH 7.4, hasta un volumen final de 100 mL. La solución se mantiene a 4°C y protegida de la luz.

4. Solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.25 M, pH 7.4

La solución amortiguadora de fosfatos de potasio 0.25 M, pH 7.4, se preparó a partir de las siguientes soluciones:

A: Solución 0.25 M de fosfato monobásico de potasio (43.6 g de KH_2PO_4 en 1,000 mL).

B: Solución 0.25 M de fosfato dibásico de potasio (34 g de K_2HPO_4 en 1,000 mL).

Para preparar 100 mL de la solución de trabajo se mezclan aproximadamente 19 mL de A + 81 mL de B ajustando a un pH 7.4.

5. Solución amortiguadora Tris 5 mM, pH 7.2

La solución amortiguadora Tris 5 mM, pH 7.2, se preparó a partir de las siguientes soluciones:

A: Solución Tris [tris(hidroximetil)aminometano] 0.02 M

B: Solución de HCl 0.02M.

Para preparar 500 mL de la solución de trabajo se mezclan 125 mL de A + 110 mL de B, se ajusta a pH 7.2, y se diluye a un volumen total de 500 mL.

Note: Para la solución con 45 mM de NaCl se añaden 1.316 g de NaCl antes de aforar, y para la solución con 70 mM se añaden 2.047 g de NaCl.

6. Solución amortiguadora Tris con 70 mM de carboxifluoresceína

Para preparar 10 mL de solución amortiguadora con marcador fluorescente se adiciona 0.7 mmol (271 mg) de carboxifluoresceína a 8 mL de solución amortiguadora Tris 5 mM con NaCl 45 mM, pH 7.2 y se añaden pequeñas alícuotas de una solución de NaOH 1 N hasta lograr la completa disolución de la sal. Se ajusta el pH a 7.2 y se afora con solución amortiguadora hasta un volumen final de 10 mL.

7. Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 5 mM, pH 7.2

La solución amortiguadora de fosfatos de sodio 5 mM, pH 7.2, se preparó a partir de las siguientes soluciones:

A: Solución 5 mM de fosfato monobásico de sodio (69 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1,000 mL).

B: Solución 5 mM de fosfato dibásico de sodio (179 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1,000 mL).

Para preparar 100 mL de la solución de trabajo se mezclan aproximadamente 28 mL de A + 72 mL de B, ajustando a un pH de 7.2.

8. Solución etérea de diazometano

El diazometano resulta de la reacción de la potasa con la nitrosometilurea.



En un matraz Erlenmeyer se colocan 3 mL de una solución acuosa de KOH al 40% (w/v) y 15 mL de éter etílico, dejándolo en hielo por unos minutos. Posteriormente se adiciona con precaución 1 g de nitrosometilurea a la fase acuosa, con lo que se forma de manera inmediata el diazometano gaseoso, el cual se solubiliza en el éter. Una vez que terminó la reacción, se decanta la fase etérea sobre otro matraz previamente enfriado, el cual debe contener algunas lentejas de KOH para eliminar la humedad. Esta solución puede ser utilizada 15 minutos después.

Notas: La solución es eficaz mientras conserve un color amarillento fuerte.

La reacción se debe realizar en una campana de extracción y a una temperatura entre 0-4 °C.

No utilizar material de vidrio esmerilado.