

00322

11

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

"IDENTIFICACION DEL FACTOR CUERDA DE  
*Mycobacterium fortuitum* COMO ANTIGENO  
UTIL PARA EL SERODIAGNOSTICO DE  
TUBERCULOSIS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

IRMA PATRICIA LAQUINO SOSA

DIRECTORA DE TESIS DE GRADO, LUZ MARIA LOPEZ MARIN



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



TESIS CON  
TABLA DE ORIGEN

2003 CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente.

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Identificación del factor cuerda de *Mycobacterium fortuitum* como antígeno útil para el serodiagnóstico de tuberculosis"

realizado por **AQUINO SOSA IRMA PATRICIA**

con número de cuenta 9354984-4, quien cubrió los créditos de la carrera de: **BIOLÓGIA.**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Luz María López Marín

Propietario

Biol. Alejandro Huerta Saquero

Propietario

Biol. Andrea Reyna Neyra

Suplente

M. en C. Laura Vargas Parada

Suplente

Biol. Armando Muñoz Comonfort

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Coordinación de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Luz María López Marín, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D. F.

Agradezco muy sinceramente a la Dra. Luz, la oportunidad que me dio para continuar con mi formación académica en su laboratorio, por su apoyo incondicional, por su comprensión, paciencia y por compartir todos sus conocimientos conmigo.

A la Biol. Erika Segura Salinas por su gran apoyo por su paciencia, su cariño, y consejos GRACIAS.

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo Ricardo J. Zevada, la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN206600), y el CONACYT (Proyecto 33578-M).

Agradezco a todos los integrantes del H. Jurado por el apoyo que me brindaron por sus acertados consejos para el mejoramiento de mi trabajo.

Biol. Armando Comonfort

Biol. Andrea Reyna

M. en IBB. Laura Parada

Biol. Alejandro Huerta

Dedico esta tesis muy especialmente.

A mis padres

Por el amor, apoyo y comprensión en todo momento

Por su bondad rectitud y honestidad.

A mis hermanas, abuelos, tíos, primos, sobrinos.

Por confiar en mí.

Por sus consejos y el cariño.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias y del laboratorio:

Erika Pérez, Rosa Zarate, Paulina Lezama, Yuko Nakamura, Claudia Fragoso, Juan Carlos Gallardo, Miguel Chico, Prisco Palma, Jorge Valencia, Erika Navarrete, Rosalba Toledo, David Barrera, Isidro Ballinas, Adrian Reyes, Erik González, Eva Pego, Gonzalo Acero. Gracias a todos por su apoyo y su cariño en todo momento.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
CCF	Cromatografía en capa fina
CPA	Células presentadoras de antígenos
DAT	Diacil trealosa
DMT	Dimicolato de trealosa
DO	Densidad óptica
DS	Donadores sanos
ELISA	Inmunoensayo enzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
INF $\gamma$	Interferón gamma
LAM	Lipoarabinomanano
MAGP	Complejo micololil arabinogalactano-peptidoglicano
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMT	Monomicolato de trealosa
PIM	Fosfatidil-inositol-manósidos
RIA	Radio inmunoensayo
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TAT	Triacil trealosa
TAT-r	Fracción enriquecida con TAT
TGF $\beta$	Factor de crecimiento tumoral $\beta$
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TB	Tuberculosis
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

# ÍNDICE

Págs.

## RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Patogenia de la tuberculosis	3
1.2 Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.3 Componentes lipídicos de la pared celular	6
1.4 Respuesta inmune de la tuberculosis	10
1.5 Los lípidos y la respuesta inmune	13
1.6 Respuesta humoral e inmunodiagnóstico de tuberculosis	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3. ESQUEMA METODOLÓGICO</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1 Cultivo de cepas de micobacterias	22
4.2 Extracción de glicolípidos	22
4.3 Técnicas de cromatografía	22
4.4 Cromatografía en capa fina analítica	23
4.5 Cromatografía en fase sólida	24
4.6 Cromatografía en capa fina preparativa	24
4.7 Precipitación selectiva del dimicolato de trealosa	24
4.8 Desacilación alcalina suave de glicolípidos	25
4.9 Saponificación de ácidos grasos con alto impedimento estérico	25

6



	Págs.
4.10 Análisis de ácidos micólicos por cromatografía en capa fina	25
4.11 Técnica de serología	26
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
5.1 Fraccionamiento de un extracto lipídico total de <i>M. fortuitum</i>	27
5.2 Eficacia para el diagnóstico serológico de fracciones lipídicas de <i>M. fortuitum</i> con TAT	30
5.3 Identificación del lípido contaminante mayor de la fracción TAT-r como factor cuerda	33
5.4 Purificación del factor cuerda de <i>M. fortuitum</i>	34
5.5 Evaluación del factor cuerda de <i>M. fortuitum</i> como reactivo de diagnóstico para la tuberculosis	39
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>7. LITERATURA CITADA</b>	<b>44</b>

## RESUMEN

*Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria causante de la tuberculosis, es el organismo que causa el mayor número de muertes a escala mundial. Se estima que 30 millones de personas morirán esta década a causa de la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que ataca generalmente los pulmones, aunque puede atacar otros tejidos del cuerpo formando granulaciones. Los síntomas comunes presentan un cuadro con: tos, dolor de pecho, fiebre, sudoración nocturna, fatiga, tos con sangrado y pérdida de peso entre otros.

Uno de los principales problemas que enfrentamos para controlar esta enfermedad es la falta de un método de diagnóstico rápido específico y de fácil uso.

El inmunodiagnóstico sería un método muy conveniente para la detección de tuberculosis. Sin embargo su aplicación requiere antígenos anti-tuberculosos altamente específicos, y que puedan ser fácilmente obtenidos.

En este trabajo presentamos la identificación de un antígeno de carácter glicosídico aislado de una micobacteria no tuberculosa de rápido crecimiento, *M. fortuitum*.

Mediante una combinación de técnicas cromatográficas, de precipitación y degradación selectiva se identificó el dimicolato de trealosa como posible reactivo útil para el inmunodiagnóstico de tuberculosis. El producto purificado proporcionó por ELISA una especificidad de 96.6%, con una sensibilidad de 86.6%.

8

## INTRODUCCIÓN

### 1. ANTECEDENTES

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa contagiosa, originada por el bacilo de Koch, que se transmite por vía respiratoria básicamente. El agente causante de la tuberculosis es *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo que produce el mayor número de muertes a escala mundial (Fauci, 1995). Se estima que el 33% de la población, está infectada con el bacilo es decir unos 2,000 millones (Schuleger & Rom, 1998). Asimismo, se presentan alrededor de 8 a 10 millones de nuevos casos en el mundo y más de 3 millones de defunciones anuales causadas por esta patología (Orme, 1995), que actualmente sigue siendo un problema de salud pública, y es considerada como la principal enfermedad transmisible en el mundo.

A pesar de los grandes avances en la ciencia médica y de la existencia de una serie de medicamentos efectivos, la enfermedad no ha sido controlada. En algunos países desarrollados en los que se pensaba erradicar la tuberculosis, la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ha cancelado esta expectativa (Villalba *et al.*, 1999).

En México, la TB se ha mantenido en el decimoquinto lugar como causa notificada de enfermedad y, con relación a las cifras de mortalidad, se encuentra dentro de las primeras 20 causas de defunciones en el país. Sin embargo se calcula que la incidencia real triplica las cifras notificadas (Villalba *et al.*, 1999).

El control de la TB requiere de un sistema adecuado de diagnóstico y de tratamiento. Los métodos de uso común hasta ahora utilizados no proporcionan resultados rápidos y confiables. En la tabla No. 1 se muestran las características de diferentes métodos de diagnóstico para TB activa, de los cuales la baciloscopia y el cultivo son los de mayor uso.

El inmunodiagnóstico puede ser un método muy conveniente para la detección de la TB. Sin embargo, su aplicación requiere de antígenos anti-tuberculosos altamente específicos. Entre los antígenos más prometedores que se han descrito destacan los glicolípidos, como el dimicolato de trealosa (DMT), también llamado factor cuerda, de *M. tuberculosis*.

Tabla No. 1 Características de los métodos más conocidos para el diagnóstico de tuberculosis activa.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Baciloscopia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> <li>• Bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy poco sensible</li> <li>• Inútil para diagnóstico de TB extrapulmonar</li> <li>• Exposición del personal al patógeno</li> <li>• Necesidad de ser reproducido durante 3 días consecutivos</li> <li>• Puede requerirse lavado gástrico o broncoaspiración</li> <li>• Requiere de personal capacitado</li> </ul>	Warren <i>et al.</i> , 2000 Bloom, 1994
Cultivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generalmente específico</li> <li>• Posibilidad de ser combinado con pruebas de sensibilidad a fármacos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy lento (4 a 12 semanas)</li> <li>• Inútil para Dx de TB extrapulmonar</li> <li>• Exposición del personal al patógeno</li> <li>• Necesidad de infraestructura muy costosa</li> <li>• Requiere de personal capacitado</li> <li>• Posibilidad de falsos positivos</li> </ul>	Burman <i>et al.</i> , 1997 Bloom, 1994
Radiografía de tórax	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inespecífico</li> <li>• Costo elevado</li> <li>• Infraestructura especial requerida</li> <li>• Requiere personal capacitado</li> </ul>	Bloom, 1994
PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> <li>• Específico <i>vis-a-vis</i> de muchas otras micobacterias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poco sensible a partir de muestras biológicas</li> <li>• Varios reportes sobre inespecificidad (para la sonda IS6110)</li> <li>• Costo elevado</li> <li>• Requiere infraestructura especial</li> <li>• Requiere personal capacitado</li> </ul>	Bloom, 1994 Noordhoek <i>et al.</i> , 1993

**Tabla No. 1** Características de los métodos más conocidos para el diagnóstico de tuberculosis activa.  
Continuación

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Inmuno-diagnóstico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rápido</li> <li>• Posibilidad de ser realizado en sistemas que no requieren infraestructura especial ni capacitación</li> <li>• Posibilidad de diagnóstico para tuberculosis extrapulmonar e infantil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad no llega a ser total debido a casos con anergia</li> <li>• Falta de disponibilidad de antígenos específicos y sensibles</li> <li>• Diferencias en el reconocimiento de antígenos debido a factores genéticos en la población</li> </ul>	Bothamley <i>et al.</i> , 1989 Bloom, 1994 Chan <i>et al.</i> , 2000 Daniel & Debanne 1987
Cultivo radio-métrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Más rápido que cultivo tradicional (resultados en 10-14 días)</li> <li>• Posibilidad de ser combinado con pruebas de sensibilidad a fármacos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costo muy elevado</li> <li>• Requiere infraestructura especial (para manejo de organismos transmisibles por vía aérea y para manejo de radiactivos)</li> <li>• Requiere personal capacitado</li> </ul>	Bloom, 1994

### 1.1 Patogenia de la tuberculosis

*M. tuberculosis* puede infectar virtualmente a todos los tejidos del organismo, ocasionando la formación de pequeños granulomas en la masa del órgano afectado (Prescott *et al.*, 1999).

Al toser, estornudar o hablar, los individuos con tuberculosis pulmonar activa producen aerosoles (gotitas de saliva infecciosa con un diámetro de 5  $\mu\text{m}$ ) que contienen a los bacilos y pueden infectar por vía aérea a personas sanas (Fig. 1) (Edwards, 1986). Cuando llegan los bacilos a los lóbulos pulmonares inferiores provocan inflamación y son fagocitados por los macrófagos alveolares.

Dentro del macrófago, el bacilo se multiplica y destruye a la célula del hospedero. Algunos bacilos alcanzan la circulación linfohematógena y se diseminan a otras regiones del organismo. La diseminación ocurre en un término de 3 a 10 semanas; en este mismo periodo se origina hipersensibilidad a las proteínas del bacilo y una respuesta inmunitaria mediada por células. Aunque en este lapso la gran mayoría de los bacilos son destruidos, algunos de ellos pueden permanecer en estado latente dentro de los macrófagos, ganglios y nódulos linfáticos y, años más tarde, pueden llegar a causar la tuberculosis de reactivación.

El riesgo de desarrollar tuberculosis clínica es mayor en los primeros cinco años posteriores a la primoinfección y puede ser efecto de diferentes circunstancias como la desnutrición, factores genéticos, etc.

La gran mayoría de las personas infectadas con el bacilo nunca desarrollan síntomas clínicos. Algunas personas desarrollan enfermedad activa únicamente en el contexto de algún deterioro de su sistema inmune, como en el caso de los enfermos con SIDA, la desnutrición o bien la presencia de tumores malignos en etapa avanzada (Young, 1993). El SIDA facilita en un 90 a 95% el desarrollo de tuberculosis aguda y de presentaciones atípicas con formas de diseminación hematógena.

La creciente aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos ha contribuido a ensombrecer en gran medida el panorama de este padecimiento. Hasta ahora, no se ha detectado ningún factor de patogenia estrictamente necesario para el bacilo, y las evidencias sugieren que el grado de virulencia es producto de un fenómeno multifactorial, es decir de un fenómeno causado por múltiples factores en donde la estructura de la micobacteria parece ser determinante.

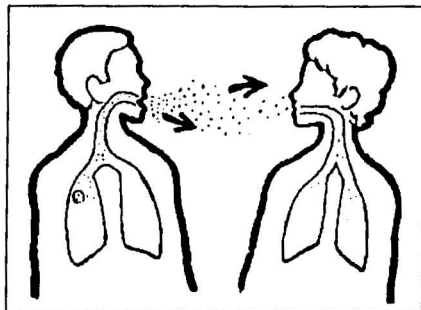


Fig. 1 Persona que transmite tuberculosis a través de aerosoles.

### 1.2 Características de *Mycobacterium tuberculosis*.

*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio facultativo, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo, inmóvil, que no forma esporas y es ácido-alcohol resistente. Su crecimiento es lento, con un tiempo de generación de 15 a 20 horas, por lo que tienen que transcurrir varias semanas para su cultivo. El único reservorio conocido es el ser humano (Prescott *et al.*, 1999).

La principal característica del bacilo tuberculoso es la riqueza en lípidos y carbohidratos de los cuales está compuesta su pared celular, y que le confieren una impermeabilidad extremadamente alta (Camacho *et al.*, 2001), además de ser factores de virulencia potenciales (Glickman & Jacobs, 2001; Barry, 2001).

Una de las principales observaciones derivadas de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, (Cole *et al.*, 1998), fue el alto porcentaje de genes implicados en la síntesis y el metabolismo de lípidos. Comparando con *Escherichia coli*, el número de estos genes en el bacilo tuberculoso resulta 5 veces superior: se conocen aproximadamente 250 distintas enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos en *M. tuberculosis* comparado con solo 50 en *E. coli*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.3 Componentes lipídicos de la pared celular.

La pared de la micobacteria es considerada una estructura compleja y altamente diferenciada. Se caracteriza por un alto contenido de lípidos, los cuales constituyen cerca del 60% de masa de la pared celular. Estos lípidos se encuentran comúnmente unidos a estructuras glicosiladas de la pared celular, formando el complejo micoloil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP) por un lado, y glicolípidos sin unión covalente al peptidoglicano, por el otro (Fig. 2).

En *M. tuberculosis* se localizan glicolípidos con estructuras muy características, algunos de ellos son compuestos indispensables para la bacteria, y la mayoría presenta propiedades antigénicas; estos glicoconjugados son por lo tanto compuestos clave que podrían servir como herramientas para el diagnóstico y pueden considerarse como blancos potenciales en la síntesis de antituberculosos novedosos.

Los ácidos micólicos, principales lípidos de la pared celular de la micobacteria, son considerados como el componente principal de una barrera de permeabilidad externa, y son los responsables de la tinción característica de la micobacteria.

La presencia de grandes cantidades de ácidos micólicos asociados con diferentes tipos de azúcares constituye la base de la integridad de la pared de la micobacteria, que es el complejo mAGP (Verschoor, 2001).



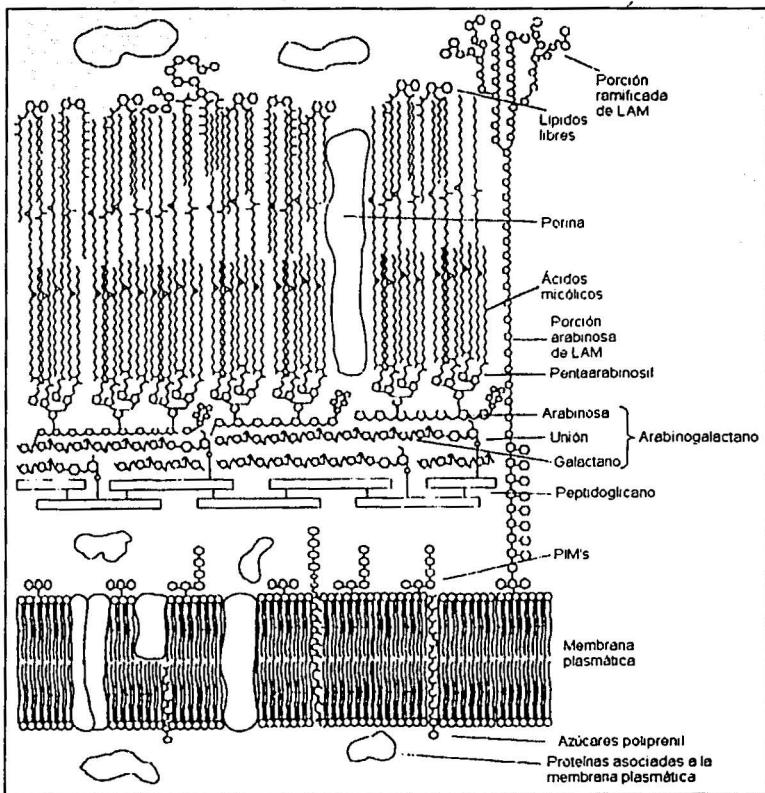


Fig. 2 Esquema de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Lee *et al.*, 1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los ácidos micólicos han sido reportados en otras especies bacterianas no pertenecientes a *Mycobacterium*. Se conocen tres principales categorías de ácidos micólicos:

- Ácidos corinomicólicos
- Ácidos nocardiomicólicos
- Ácidos micólicos micobacterianos

Los ácidos micólicos son ácidos grasos beta hidroxilados con un alto peso molecular, y tienen cadenas alifáticas moderadamente largas en posición alfa (Fig. 3); estos son solubles en un rango muy limitado de solventes, lo cual complica su purificación.

Beckman *et al.* (1994), por ejemplo, lograron la purificación de ácidos micólicos de *M. tuberculosis* solo después de la derivatización con bromuro de *p*-bromofenacilo, separación cromatográfica en fase inversa, resaponificación y extracción.

Los ácidos micólicos se presentan en la naturaleza como mezclas de diferentes tipos. Frecuentemente forman ésteres con carbohidratos, por ejemplo con arabinosa, formando la principal estructura de la pared celular, o con trealosa formando monomicoloil trealosa (MMT) y dimicoloil trealosa (DMT), también llamado factor cuerda (Fig. 4). Este último ha sido asociado con la virulencia de *M. tuberculosis* (Verschoor, 2001).

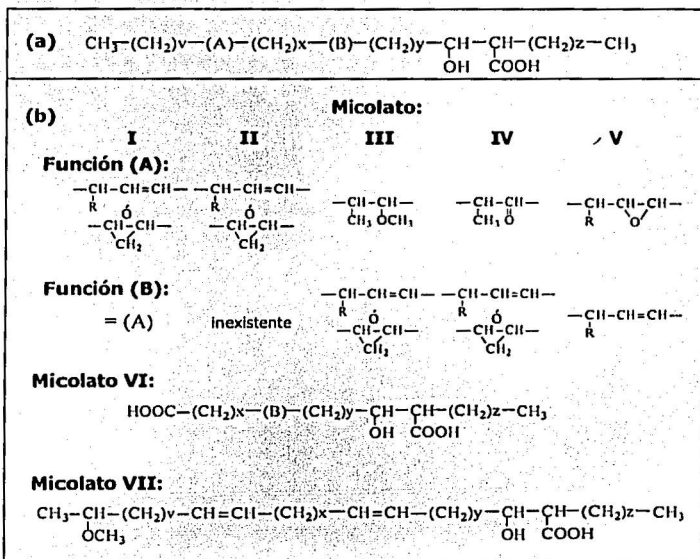


Fig. 3 Estructura de los ácidos micólicos de micobacterias. (a) Estructura general de un ácido micólico (b) variaciones estructurales entre ácidos micólicos de distintas especies micobacterianas. Estas variaciones incluyen cambios en: una o dos funciones químicas en las posiciones marcadas como [A] y [B], largo de la cadena grasa o presencia de funciones en posiciones  $\omega$  y  $\omega-1$ , dando como resultado un total de 7 tipos de ácidos micólicos, que son nombrados subclases I a VII.

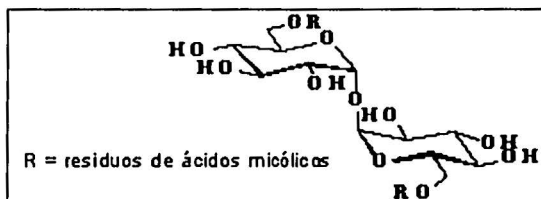


Fig. 4 Estructura del dimicollol trealosa, o factor cuerda.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 1.4 Respuesta inmune de la tuberculosis.

Durante los últimos años se han ideado métodos muy efectivos para detectar los diferentes tipos de respuesta inmune y el control de las enfermedades infecciosas.

En el caso de la TB estas herramientas son indispensables para obtener nuevas formas de tratamiento y descubrir vacunas eficientes contra la tuberculosis. Con experimentos de transferencia pasiva en animales de laboratorio se ha demostrado la incapacidad de los anticuerpos antimicobacterianos para proteger contra la infección por *M. tuberculosis*. Por el contrario los linfocitos circulantes de animales sensibilizados si confieren protección contra el bacilo (Hahn & Kaufmann, 1981; Mackanness, 1969).

La inmunidad celular protectora descansa principalmente en los linfocitos T con el fenotipo CD4+ (linfocitos T de ayuda). Estas células proliferan intensamente cuando son estimuladas *in vitro* con antígenos micobacterianos. También, se ha demostrado el papel protector de los linfocitos T con el fenotipo supresor citotóxico (CD8+); algunos animales deficientes en linfocitos CD8+ son muy susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* (Ehlers, 1999).

El linfocito CD4 activado por antígeno secreta la interleucina 2 (IL-2), citocina que expande la respuesta inmune antimicobacteriana del interferón gamma (INF $\gamma$ ), que es un activador potente de macrófagos (Matews *et al.*, 1985; Mustafa *et al.*, 1986). Estas últimas células, que albergan a los bacilos, adquieren mayor capacidad bactericida al ser activadas por el INF $\gamma$  (Cooper & Flynn, 1995).

La importancia del INF $\gamma$  ha sido claramente demostrada utilizando ratones a los cuales se les eliminaron los genes que codifican para la síntesis de INF $\gamma$ ; estos ratones desarrollaron una susceptibilidad exagerada a la infección por *M. tuberculosis*.

Hay observaciones que sugieren que en la respuesta inmune el bacilo de la tuberculosis, de acuerdo con sus perfiles de producción de citocinas, puede distinguir dos subpoblaciones de linfocitos T de ayuda: las células Th1 (inductoras de la secreción de IL-2 e INF $\gamma$  y promotoras de la hipersensibilidad retardada en ratones con infección experimental por *M. tuberculosis*), y las células Th2 (productoras de IL-4, IL-6 e IL-10, entre otras citocinas) (Romagni, 1994).

Existen indicios de que la subpoblación Th1 es la responsable de la inmunidad protectora, mientras que los linfocitos Th2 no parecen jugar un papel importante en la infección tuberculosa (Jung *et al.*, 2002). Los linfocitos Th1 ejercen efecto protector, en virtud de su capacidad de secretar INF $\gamma$ , que es un activador de macrófagos. Además de los macrófagos, los linfocitos T parecen tener un papel efector, pues se ha demostrado que tanto los linfocitos CD4+ como los CD8+ son capaces de lisar macrófagos infectados por bacilos (Stenger & Modlin, 1999).

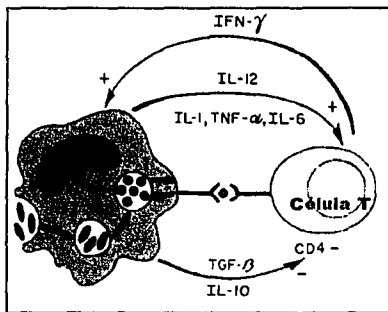
Torres y Sada han demostrado que pacientes con tuberculosis pulmonar presentan respuesta humoral con producción de anticuerpos, pero respuesta celular pobre (Villalba *et al.*, 1999). El análisis de la producción de citocinas por linfocitos periféricos de estos pacientes ha demostrado ausencia de INF $\gamma$  y producción elevada de interleucina (IL-10), lo que sugiere una respuesta de tipo Th2 (Zhang *et al.*, 1994a).

Esta forma de división de la respuesta Th1 y Th2 existe también en individuos con lepra, enfermedad producida por *M. leprae*.

Es muy importante profundizar en otros aspectos de la respuesta inmune en seres humanos y en la posibilidad de inducir respuestas Th1 o Th2. Se ha descrito que la inducción dependerá de que los macrófagos tengan producción temprana de una citocina denominada IL-12 (Hsieh *et al.*, 1993). La presencia de IL-12 dirigirá la respuesta inmune a una respuesta protectora tipo Th1, con producción de INF $\gamma$ , pero su ausencia inducirá una respuesta Th2, con producción de IL-4 e IL-10, lo que llevará a una respuesta humoral inefectiva para el control de los patógenos intracelulares.

Se sabe también que los macrófagos humanos normales, después de fagocitar *M. tuberculosis*, producen IL-12 (Zhang *et al.*, 1994b); esto ha llevado a la hipótesis de que los individuos que desarrollan tuberculosis activa probablemente son deficientes en la producción de IL-12. En la Fig. 5 se muestra un esquema con las relaciones entre interleucinas, células fagocíticas y células T de ayuda.

Adicionalmente, se ha demostrado un papel clave en la respuesta inmune temprana hacia *M. tuberculosis* por células dendríticas, las cuales pueden albergar también al bacilo (Demangel & Britton, 2000).



**Fig. 5** Regulación de la respuesta inmune humana en tuberculosis. Las células fagocíticas mononucleares de pacientes tuberculosos sensibilizados, cuando se exponen a *M. tuberculosis* (bastones rojos) o sus productos solubles (círculos rojos), sobre-expresan citocinas del tipo Th1. Las células CD4 son activadas por la expresión de estos antígenos micobacterianos en el contexto de moléculas MHCII. Factores coestimulatorios (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) producidos por el macrófago amplifican esta activación. El nivel de activación de la célula T es modulada por TGF- $\beta$  e IL-10. El TGF- $\beta$  reduce la producción o la acción de citocinas tipo Th1 (IFN $\gamma$ , IL-2) y también bloquea la actividad de IL-12. El TGF- $\beta$  amplifica su propia producción y desactiva las funciones efectuadas de los fagocitos mononucleares. El resultado es la supresión de respuestas tipo Th1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1.5 Los lípidos y la respuesta inmune.

Aunque los componentes lipídicos de la pared celular han sido asociados con la virulencia de *M. tuberculosis* desde hace mucho tiempo (Collins, 1994), estos componentes se consideraban sin propiedades inmunogénicas. La posibilidad de que los lípidos y particularmente los ácidos micólicos jueguen un papel significativo en el complejo proceso de la respuesta inmune del humano infectado con *M. tuberculosis* ha llegado a ser aparente a últimas fechas.

En 1994 Beckman *et al.* demostraron que los lípidos, en particular los ácidos micólicos, producen una respuesta inmune celular. Estos autores descubrieron que los ácidos micólicos estimulaban la proliferación de un raro subconjunto de células T humanas doble negativas (CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>) y describieron una nueva forma de presentación de antígenos: la presentación mediante moléculas CD1 en células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales como macrófagos y células dendríticas. Se trata de una presentación de antígenos independiente de las moléculas de presentación clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y que es actualmente poco conocida. Los lípidos de *Mycobacterium* hasta ahora conocidos por estimular linfocitos T son los siguientes: ácidos micólicos libres, monomicolato de glucosa, fosfatidil-inositol manósidos (PIMs), lipoarabinomano (LAM) y manosil-fosfoisoprenoide (Moody & Besra, 2001).

## 1.6 Respuesta humoral e inmunodiagnóstico de tuberculosis.

En el diagnóstico de uso más frecuente para tuberculosis pulmonar es necesario demostrar la presencia del bacilo en esputo de pacientes por baciloscopia o por cultivo. Sin embargo tales métodos convencionales presentan muchos inconvenientes, como el bajo índice de detección en las baciloscopías y los largos períodos que se requieren para un cultivo del bacilo (Bloom, 1994).

La mayoría de los pacientes producen anticuerpos para varios componentes antigénicos del organismo durante el curso de la enfermedad. Como se mencionó previamente el papel de los anticuerpos en la protección contra la enfermedad parece ser muy limitado. Sin embargo la presencia de estos anticuerpos puede ser útil para el inmunodiagnóstico de la enfermedad. El valor diagnóstico de la respuesta humoral ha sido estudiado por algunos investigadores.

El inmunodiagnóstico de la TB tiene un gran valor en los casos de la enfermedad extrapulmonar y para los no productores de esputo, como la tuberculosis infantil. La detección, ya sea de anticuerpos específicos en el suero o de antígenos en las muestras clínicas es una aproximación atractiva en el diagnóstico de la TB. Sin embargo, esta aproximación no ha sido utilizada ampliamente, principalmente debido a la falta de antígenos específicos de fácil disponibilidad.

Los exámenes serológicos utilizando antígenos crudos y parcialmente purificados de *M. tuberculosis* han sido usados por algunos años con éxito limitado. Estos productos brindan muy poca especificidad en el diagnóstico, especialmente al ser utilizados en países tropicales con individuos afectados por otro tipo de enfermedades. Los exámenes que consisten en la precipitación, aglutinación bacteriana y aglutinación de partículas cubiertas con antígenos dieron lugar a exámenes más sofisticados como el ensayo inmuno enzimático (Enzyme linked immunosorbent assay o ELISA) y el radio inmuno ensayo (RIA). Los exámenes de serodiagnóstico basados en anticuerpos monoclonales constituyen otra opción aceptable.

Los métodos inmunológicos utilizados para evaluar la presencia de anticuerpos incluyen suspensión y aglutinación bacteriana, aglutinación de eritrocitos sensibilizados con diferentes antígenos bacterianos, fijación de complemento, aglutinación de anticuerpos adheridos a partículas inertes, radioinmunoensayos y difusión de gel (Bloom, 1994).



La serología de la TB es un proceso complejo que involucra una enfermedad crónica en donde los pacientes están expuestos a varios antígenos por un periodo largo. El estatus genético de la población indudablemente juega un papel importante en la respuesta del anticuerpo. La localización geográfica también determina el grado de exposición de la población a organismos que dan una reacción cruzada, los cuales pueden interferir para la especificidad de la prueba.

Los antígenos del bacilo tuberculoso incluyen proteínas, carbohidratos y lípidos. Esto permite la existencia de un enorme número de antígenos y epitopes a los cuales puede responder el sistema inmune. En la tabla No. 2 se resume la eficacia encontrada con antígenos de distintos tipos para el inmunodiagnóstico de TB.

En los últimos años ha crecido el interés por conocer mejor la estructura molecular del bacilo de la TB. El diagnóstico serológico de las infecciones micobacterianas puede hacerse ahora con varios antígenos micobacterianos, los cuales se han purificado y evaluado para el inmunodiagnóstico como proteínas, y fosfolípidos. Sin embargo la especificidad de los antígenos no ha sido satisfactoria. Los métodos utilizados para purificarlos incluyen cromatografías de afinidad con anticuerpos monoclonales, métodos fisicoquímicos sofisticados y biología molecular (Bloom, 1994). El valor de estos antígenos en el diagnóstico serológico de la tuberculosis ha sido analizado generalmente por ELISA, debido a la alta sensibilidad que presenta este método.

Para el inmunodiagnóstico la disponibilidad de antígenos específicos de *M. tuberculosis* se encuentra limitada. Esta especie es un patógeno de alto riesgo biológico, transmisible por vía aérea, cuyo cultivo requiere infraestructura costosa y personal altamente capacitado. Adicionalmente, tiene un tiempo de replicación lento, lo que implica tiempos de cultivo de 4-8 semanas.

Estas características del bacilo han limitado la producción de reactivos de diagnóstico para tuberculosis para su uso en a gran escala. Por tal motivo, se han puesto en marcha estrategias recombinantes para la producción de antígenos proteicos de *M. tuberculosis*, muchos de los cuales suelen ser expresados en *Escherichia coli* (Colangeli, *et al.*, 1998). Alternativamente, la síntesis de epitopos peptídicos de proteínas del bacilo ha sido otra opción explorada para disponer de antígenos de inmunodiagnóstico de fácil obtención.

No obstante, tales alternativas no son viables en el caso de los antígenos de naturaleza no proteica, los cuales son constituidos por productos genéticos secundarios, en donde múltiples genes son necesarios para su biosíntesis. Tal es el caso de los glicolípidos del bacilo tuberculoso, de entre los cuales se han detectado reactivos de muy alto valor para el inmunodiagnóstico de la enfermedad.

Además del lipoarabinomanano (LAM), lipoglicano de pared celular con amplia distribución en micobacterias, tres glicolípidos característicos de *M. tuberculosis* han destacado por brindar una alta eficacia para el inmunodiagnóstico de tuberculosis: la trealosa di-acilada (DAT), la trealosa tri-acilada (TAT) y el factor cuerda (Chan *et al.*, 2000). Los dos primeros lípidos, DAT y TAT, han sido reportados en la especie *M. fortuitum* (Escamilla *et al.*, 1996). Ya que *M. fortuitum* es una especie de menor riesgo biológico que el bacilo tuberculoso, y pertenece al grupo de micobacterias de rápido crecimiento, su uso como fuente de DAT y TAT ha sido propuesta (Escamilla *et al.*, 1996). En la tabla No. 3 se muestra una comparación de algunas características de *M. fortuitum* con respecto a *M. tuberculosis*, y en esta se muestran las ventajas de utilizar *M. fortuitum* en lugar del bacilo tuberculoso.

Tabla No. 2 Antígenos micobacterianos utilizados para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

Tipo de extracto	Antígeno	No. de tuberculosos	No. de controles	Sensibilidad	Especificidad	Ref.
Proteínas Semipuras	Antígeno 5	N.I	N.I	68%	91%	Daniel & Debanne, 1987
Proteínas semipuras	Antígeno 6	36	21	93.8%	100%	Daniel & Debanne, 1987
Proteína	Proteína 38-KD	49	48	68%	96%	Espitia <i>et al.</i> , 1989
Proteína	Proteína 30-KD	77	92	61%	95%	Sada <i>et al.</i> , 1990
Lipoglicano	LAM	66	202	72%	91%	Sada <i>et al.</i> , 1990
Glicolípido	SAG A	N.I	N.I	91.3%	98.9%	Daniel & Debanne, 1987
Glicolípido	SAG B	N.I	N.I	73.9%	100%	Daniel & Debanne, 1987
Glicolípido	SAG C	N.I	N.I	56.5%	97.8%	Daniel & Debanne, 1987
Glicolípido	Dimicolato de trealosa	99	100	83.8%	100%	He <i>et al.</i> , 1991
Glicolípido	DAT	99	288	51.6%	100%	Craud <i>et al.</i> , 1990
Glicolípido	DAT	59 coinfectados con VIH	289	72.8%	99.3%	Casabona <i>et al.</i> , 1992
Glicolípido	DAT (de <i>M. fortuitum</i> )	60	100	80%	98%	Escamilla <i>et al.</i> , 1996
Glicolípido	TAT (de <i>M. fortuitum</i> )	60	100	90%	98%	Escamilla <i>et al.</i> , 1996

N. I. No indicado

El factor cuerda, por su parte, es un glicolípido de amplia distribución en el género *Mycobacterium*. Su estructura consiste en un disacárido formado por dos unidades de glucosa, sobre el cual se unen dos cadenas de ácidos micólicos (Fig. 4). Si bien el factor cuerda es de amplia distribución en el género, la estructura de los ácidos micólicos que lo forman varía entre especies de micobacterias (ver Fig. 3). Así, la obtención de factor cuerda a partir de especies menos patógenas que *M. tuberculosis* de rápido crecimiento implicaría un cambio estructural en los motivos grasos del producto.

En años recientes, Pan y colaboradores (1999) reportaron que aunque estos cambios estructurales parecen mínimos en la estructura del factor cuerda, su implicación en el reconocimiento antigénico humoral del producto es muy importante, de manera que un factor cuerda con ácidos micólicos estructuralmente diferentes resultaría pobremente reconocido por anticuerpos.

Finalmente, mientras que estudios menos amplios han mostrado la utilidad de glicolípidos adicionales para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis (PIMs, LOS, y PGL), otros lípidos permanecen aún sin ser detectados en el bacilo tuberculoso (Cole *et al.*, 1998), por lo que es probable que antígenos no proteicos diferentes a los ya descritos puedan aún ser caracterizados como reactivos útiles para el diagnóstico de la enfermedad.

Tabla No. 3 Características de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium fortuitum* como fuente de reactivos de diagnóstico.

	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tiempo de cultivo	7-14 días	4-6 semanas
Complejidad de lípidos extraíbles	Mediana	Alta
Patogenicidad	Oportunista. Frecuentemente encontrada en infecciones relacionadas con procedimientos quirúrgicos.	Patógeno estricto. Transmisible por vía aérea.
Infraestructura requerida para su manejo	Laboratorio de bioseguridad nivel II	Laboratorio de bioseguridad nivel III

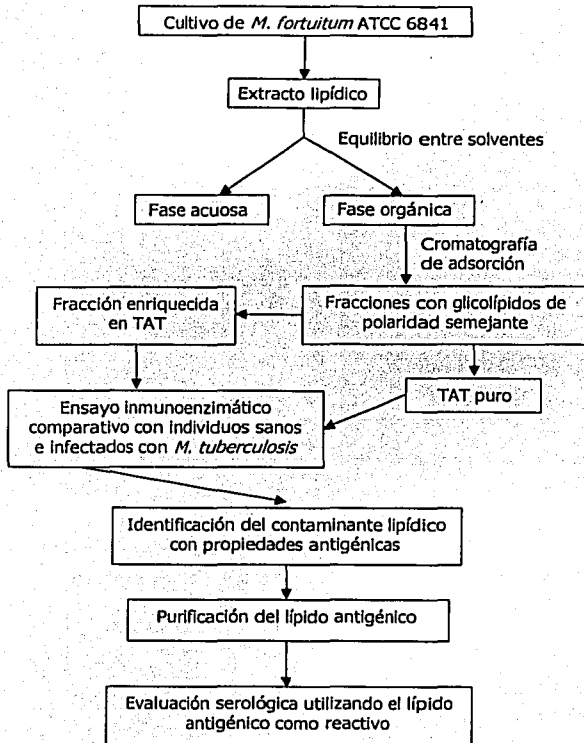
Previamente al presente trabajo, la purificación de los glicolípidos DAT Y TAT de *M. fortuitum* era un procedimiento de rutina de nuestro laboratorio para la obtención de reactivos de diagnóstico para tuberculosis. En el transcurso de pruebas serológicas brindadas por nuestro laboratorio a clínicas de salud, se decidió utilizar fracciones semipuras con DAT y TAT a fin de obtener resultados diagnósticos preliminares para un número reducido de individuos con diagnóstico de tuberculosis.

De manera interesante, cuando dichas fracciones fueron utilizadas, la fracción compuesta por TAT de *M. fortuitum* y otros componentes lipídicos resultó poseer una muy alta reactividad considerando su impureza. Por tal motivo, el presente trabajo de tesis consistió en la corroboración de estas observaciones, así como en la identificación, purificación y caracterización antigénica humoral del componente lipídico responsable de la reactividad antigénica adicional observada con los sueros de individuos infectados por *M. tuberculosis*.

## OBJETIVOS

- ✓ Desarrollar una metodología reproducible para la obtención y purificación de los glicolípidos antigénicos de *Mycobacterium fortuitum*.
- ✓ Identificar lípidos antigénicos de *M. fortuitum* presentes en fracciones semicrudas que contienen tri-O-acil trealosa (TAT).
- ✓ Purificar y evaluar el lípido identificado como antígeno para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis.

## ESQUEMA METODOLÓGICO



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo de cepas de micobacterias.

La cepa ATTC 6841 de *Mycobacterium fortuitum* fue sembrada en matraces Erlenmeyer de 1 litro con medio líquido de Sauton. Se incubó a 37° C durante dos semanas.

### 4.2 Extracción de glicolípidos.

Una vez que las micobacterias alcanzaron un desarrollo adecuado, se separaron del medio de cultivo por filtración. Las células recuperadas se depositaron en un recipiente de vidrio con una mezcla de cloroformo-metanol 1:2 (v/v), para extraer los lípidos totales y se incubaron a 50° C por 60 minutos. Transcurrido el tiempo, la mezcla se pasó por un filtro y el residuo celular se colocó nuevamente en otra mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v).

Posteriormente los extractos se juntaron y se secaron por evaporación en un rotavapor. Finalmente al extracto concentrado se le realizó un lavado de Folch (Folch, 1957), para lo cual se disolvió en una mezcla de cloroformo-metanol-agua en proporciones 4:2:1 (v/v/v) dentro de un embudo de separación. Después de haberse formado dos fases, se recuperó la fase orgánica que contenía los lípidos de interés obteniendo de esta forma el extracto lipídico total.

### 4.3 Técnicas de cromatografía.

El extracto lipídico se disolvió en un volumen mínimo de cloroformo, y se fraccionó mediante una cromatografía en una columna de vidrio con una matriz de florisil en una cantidad en gramos equivalente a 30 veces el peso del extracto. El



fraccionamiento fue obtenido eluyendo sucesivamente con un gradiente de metanol en cloroformo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12%). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina.

Las fracciones enriquecidas en lípidos glicosilados 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 cromatografía normal sobre gel de sílica en columnas preempacadas (Sep-Pack, Waters Corporation, Milford Massachussets, EUA).

#### 4.4 Cromatografía en capa fina analítica.

El análisis de las fracciones y de los compuestos aislados se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), para lo cual se emplearon cromatoplasacas de vidrio con gel de sílica (0.25 mm espesor, Merck, Alemania). Las muestras se colocaron a un centímetro de uno de los extremos de la placa ayudándose de un capilar. Una vez cargada la placa se eluyó dentro de una cámara de cromatografía saturada con los vapores de un sistema de solventes según los compuestos a analizar. Los sistemas utilizados para eluir los compuestos menos polares fueron mezclas de cloroformo-metanol 90:10 (v/v). La elución de lípidos polares fue hecha con mezclas de cloroformo-metanol-agua 60:16:2 (v/v/v).

Para análisis bidimensionales, la muestra fue colocada cerca de una esquina de una placa de 20x20 cm, eluida en una dirección, secada a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción, y eluida en la segunda dirección.

Para revelar los glicolípidos, la placa se roció con una solución de antrona 0.2% en  $H_2SO_4$  y se calentó de inmediato a 110° C durante 5 minutos aproximadamente. La detección de fosfolípidos se realizó rociando solución de óxido de molibdeno (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

#### 4.5 Cromatografía en fase sólida.

La cromatografía en fase sólida se empleó para la purificación final de antígenos. Los extractos lipídicos y las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna se pasaron a través de un soporte de sílica gel comercial (SepPack, Waters), utilizando de manera secuencial los siguientes eluyentes:  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  100:0 (v/v), 98:2 (v/v), 96:4 (v/v), 94:6 (v/v), 92:8 (v/v), 90:10 (v/v) y 85:15 (v/v). Las fracciones obtenidas se dejaron secar y posteriormente se analizaron en una placa por cromatografía con la técnica antes mencionada.

#### 4.6 Cromatografía en capa fina preparativa.

Las fracciones enriquecidas con DMT que se obtuvieron en la cromatografía por adsorción sobre florisil, fueron depositadas en placas de-gel de sílica preparativas de 0.5 mm de espesor (Merck). Se eluyó con una mezcla de solventes cloroformo-metanol 90:10 (v/v) y los lípidos fueron revelados por aspersion con una solución de rodamina al 5% en acetona, ayudándose de luz U.V. Una vez marcada la banda correspondiente al glicolípido de interés, la sílica fue raspada y eluida a partir del soporte con cloroformo-metanol 90:10 (v/v) durante 1 hora.

Posteriormente, la sílica y la rodamina fueron eliminadas del producto eluido por filtración a través de papel Whatman y de una columna de florisil 7 cm x 0.5 cm, 230mm.

#### 4.7 Precipitación selectiva del dimicolato de trealosa.

La purificación final del DMT se realizó utilizando la técnica de precipitación con acetona. Para ello, adicionamos a la muestra un poco de cloroformo grado HPLC y 5 ml de acetona. Después de dejar reposar durante una noche a 4° C, se centrifugó por 10 minutos a 2500 rpm, y el sobrenadante fue separado con ayuda de una pipeta

Pasteur. El producto precipitado fue resuspendido en cloroformo y analizado mediante cromatografía en capa fina.

#### 4.8 Desacilación alcalina suave de glicolípidos.

Una muestra con 0.5 mg de lípidos fue disuelta en una mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Se le adicionó un volumen igual de NaOH 0.2 N disuelta en metanol y la mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37° C. Se neutralizó con ácido acético concentrado y se secó con nitrógeno. Se resuspendió en 5 ml en una mezcla de cloroformo-metanol-agua 4:2:1 (v/v), se recuperó la fase clorofórmica (inferior) y se lavó 2 veces con una mezcla metanol-agua 1:1 (v/v). Se concentró por evaporación.

#### 4.9 Saponificación de ácidos grasos con alto impedimento estérico

La fracción enriquecida en TAT o el DMT purificado de *M. fortuitum*, fueron incubados toda la noche con 5% KOH en metanol/benceno 8:2 (v/v) bajo reflujo. Los ácidos libres fueron extraídos con éter después de acidificar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y transformados en forma de metil ésteres con diazometano (Buitrón *et al.*, 1998).

#### 4.10 Análisis de ácidos micólicos por cromatografía en capa fina.

Después de la saponificación del DMT purificado, como se indica en el apartado anterior, los lípidos metilados fueron disueltos en dietil éter y separados en placas de CCF eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los productos fueron revelados con ácido fosfomolibdico al 10% en metanol y comparados con micolatos obtenidos de cepas de micobacterias de referencia (Buitrón *et al.*, 1998).

#### 4.11 Técnica de serología.

Se utilizó la técnica del inmunoensayo enzimático o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). El antígeno se disolvió en una mezcla de hexano y etanol 1:1 (v/v), y se depositó 1 µg en cada pozo de microtitulación (Nunc Immuno Plate, PolySorp). El solvente se evaporó a 37° C durante 12 horas. Después de haber bloqueado con 200 µL de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% durante 1 hora a 37° C, se realizaron 5 lavados con solución amortiguadora de fosfatos. Enseguida se adicionaron 100 µL de sueros diluidos 1:100 en solución amortiguadora de fosfatos al 3% de BSA. Se incubó a 37° C durante 1 hora y se realizaron 5 lavados con 200 µL de solución amortiguadora de fosfatos por pozo. Posteriormente se adicionaron 100 µL de anti-anticuerpo anti-IgG humano conjugado a la fosfatasa alcalina diluida en solución amortiguadora de fosfatos al 0.3% de BSA. Finalmente se colocaron en cada pozo 100 µL de una solución de *paranitrofenilfosfato* (1mg/ml) en una solución amortiguadora de dietanolamina (pH 9). Se incubaron 15 minutos a 37° C y se leyó la densidad óptica (D. O.) a 405 nm en un espectrofotómetro para ELISA. Cada suero fue analizado por triplicado y los resultados muestran el valor promedio obtenido.

Para una prueba de ELISA, se consideran como positivos todos los resultados mayores a un valor de corte dado. Para calcular dicho valor de corte, se asume que las densidades ópticas obtenidas con los sueros controles están distribuidos alrededor de un valor medio pequeño, y los valores de corte se definen, generalmente, como el valor medio de esas densidades ópticas adicionado de 2.0, 2.5 o 3.0 veces el valor de la desviación estándar de esa misma muestra (Daniel & Debanne, 1987). Es importante que el número de controles sea grande para que la confianza de la especificidad sea mayor.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Fraccionamiento de un extracto lipídico total de *Mycobacterium fortuitum*.

A partir de cultivos con dos semanas de incubación se obtuvo el extracto lipídico total de células de *Mycobacterium fortuitum*, el cual se fraccionó mediante una columna de adsorción de florisil, empleando como eluyentes metanol en cloroformo a diferentes concentraciones (0, 2, 4, 6, 8, 10%). Mediante análisis de cromatografía en capa fina (CCF) y con reactivos de revelado específicos, como el ácido fosfomolibdico para lípidos en general, antrona para lípidos glicosilados, y azul de molibdeno para lípidos fosforilados, se pudo observar que el extracto de lípidos obtenido contenía una mezcla de ceras o triglicéridos, glicolípidos, y fosfolípidos. Adicionalmente, analizando el extracto lipídico intacto y después de haber realizado un tratamiento alcalino suave (reacción de desacidificación alcalina), pudo observarse que algunos lípidos son estables al álcali mientras que otros son inestables, indicando la ausencia o presencia respectivamente de ácidos grasos unidos mediante enlaces éster.

En la Fig. 6 pueden visualizarse sobre una cromatografía en capa fina revelada con antrona, en color café los lípidos no glicosilados que no contienen azúcares y en color azul los lípidos glicosilados. Con una cromatografía idéntica corrida paralelamente, pero revelada con azul de molibdeno (no mostrada), se pueden detectar los compuestos que tienen azúcares y fosfato, que corresponden por lo tanto a glicofosfolípidos, los cuales en *Mycobacterium* son manósidos de fosfatidil-inositol (Brennan, 1988).

Mediante CCF de doble dimensión pueden visualizarse triglicéridos y glicolípidos específicos de esa especie, como la trealosa diacilada (DAT) y la trealosa triacilada (TAT), los cuales fueron identificados por comparación de su corrimiento cromatográfico con el de estándares previamente caracterizados en el laboratorio (Escamilla *et al.*, 1996) (Fig. 7).

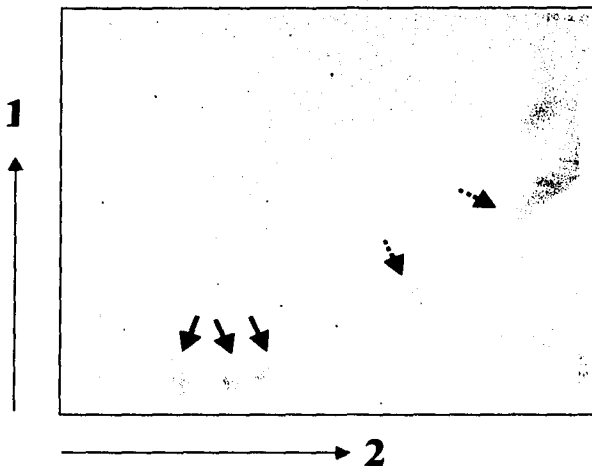
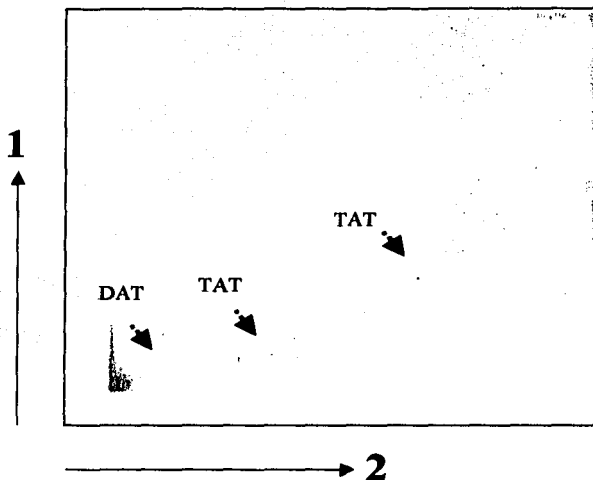


Fig. 6 CCF de doble dimensión del extracto lipídico total de *M. fortitum*. Eluyente: primera dirección (1): cloroformo-metanol (80:20 v/v); segunda dirección (2): cloroformo-metanol-agua (80:35:8 v/v/v). Soporte: gel de sílica G60. Detección: antrona. Las flechas indican las manchas correspondientes a glicofosfolípidos. Las flechas punteadas indican glicolípidos inestables al álcali.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 7** CCF de doble dimensión en donde puede visualizarse los glicolípidos específicos de *M. fortuitum*, las trealosas di-acilada y tri-aciladas (DAT y TAT). Eluyente: primera dirección (1): cloroformo-metanol (90:10 v/v); segunda dirección (2): cloroformo-metanol (80:20 v/v). Soporte: gel de sílica G60. Detección: antrona.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para fines de inmunodiagnóstico se procedió a obtener extractos enriquecidos con TAT, fraccionando el extracto lipídico total mediante una cromatografía de adsorción sobre florisil en columna abierta. De esta manera, se obtuvieron tres tipos de fracciones: lípidos de baja polaridad, de mediana polaridad, y lípidos polares. En total se obtuvieron 20 fracciones, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina sobre gel de sílica para visualizar el tipo de lípidos presentes en cada una de ellas.

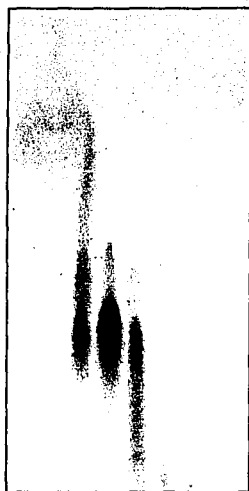
Las primeras fracciones que se obtuvieron contenían compuestos de baja polaridad. Como era de esperarse, entre estas fracciones, eluidas únicamente con cloroformo, se obtuvieron grasas no glicosiladas, como son los triglicéridos, cuya presencia ha sido bien documentada en micobacterias (Brennan, 1988). Al utilizar metanol en concentraciones menores al 5% en la composición del eluyente se obtuvieron lípidos enriquecidos con el glicolípido TAT (Fig. 8).

## 5.2 Eficacia para el diagnóstico serológico de fracciones lipídicas de *Mycobacterium fortuitum* con TAT.

Los glicolípidos DAT y TAT de *M. fortuitum* fueron reportados en nuestro laboratorio como reactivos de diagnóstico muy eficaces y de fácil obtención (Escamilla *et al.*, 1996). En el transcurso de pruebas serológicas brindadas por nuestro laboratorio a clínicas de salud, se decidió utilizar fracciones enriquecidas en TAT a fin de obtener resultados diagnósticos preliminares para un número reducido de individuos con diagnóstico de tuberculosis.

La fracción 3, cuyo perfil cromatográfico puede observarse en la Fig. 8, fue nominada TAT-r y utilizada para diagnóstico preliminar de TB. Esta fracción proporcionó muy buenos resultados de diagnóstico. El suero positivo utilizado como control mostró una reacción fuerte con la fracción TAT-r, mientras que el suero control negativo no mostró reactividad.





1 2 3 4 5 6 7

**Fig. 8** CCF Fraccionamiento del extracto de lípidos totales de *M. fortuitum*. En los carriles 1-7 se observan fracciones de polaridad creciente. La fracción 3 se encuentra enriquecida con el glicolípido TAT. Soporte: gel de sílica. Detección: antrona. Eluyente: cloroformo-metanol (90:10 v/v).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A fin de corroborar estas observaciones, decidimos analizar la respuesta humoral de 10 individuos con tuberculosis pulmonar y 10 individuos sanos hacia el glicolípido TAT puro y la fracción TAT-r. En la Fig. 9 se muestran los resultados de este análisis.

Como puede observarse, la fracción TAT-r proporciona una menor sensibilidad para el diagnóstico de la TB pulmonar comparándolo con la TAT purificada. Utilizando un valor de corte equivalente al promedio de D. O. de los donadores sanos + 2.5 veces las desviaciones estándar correspondientes, el 100% de los individuos con TB en esta muestra fueron diagnosticados con el antígeno TAT puro, mientras que solo el 80% reaccionaron positivamente ante la fracción TAT-r. Sin embargo varias de las muestras provenientes de individuos con tuberculosis pulmonar presentaron una reactividad mayor con la fracción TAT-r que con el lípido TAT puro. Las muestras de individuos sanos, por su parte, no experimentaron un cambio significativo en la reactividad hacia ambas preparaciones lipídicas.

Estos resultados indicaron que la fracción TAT-r contenía lípidos distintos a la TAT, con propiedades antigénicas que podrían ser utilizadas para el inmunodiagnóstico de TB.

La fracción TAT-r fue, por lo tanto, analizada a fin de explorar el valor para inmunodiagnóstico de lípidos que coeluyen con la TAT.

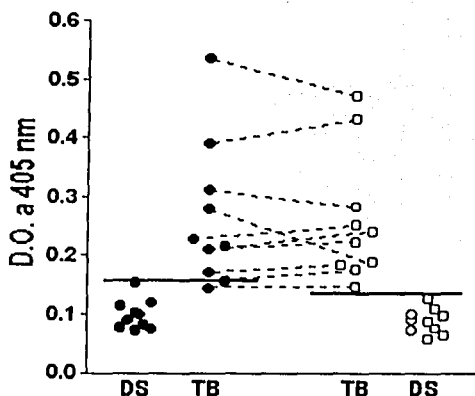


Fig. 9 Resultados del ELISA utilizando la fracción TAT-r (círculos negros) o el lípido TAT purificado (círculos blancos), como antígenos para el diagnóstico en suero de 10 pacientes con tuberculosis (TB), y 10 donadores sanos (DS). Las líneas punteadas fueron usadas para unir los resultados obtenidos con cada suero de los individuos. Un valor de corte equivalente al promedio del grupo control +2.5 desviaciones estándar está representado para ambas fracciones de antígenos.

### 5.3 Identificación del lípido contaminante mayor de la fracción TAT-r como factor cuerda.

La fracción TAT-r fue sometida a dos procedimientos de degradación química y analizada por CCF. Este análisis mostró que el principal producto contaminante de la TAT-r era, probablemente, el dimicolato de trealosa (DMT) o factor cuerda de la cepa de *M. fortuitum*. Esta hipótesis era apoyada por el hecho de tratarse de un glicolípido de relativa resistencia a tratamientos alcalinos suaves, pero degradable cuando procedimientos de alcalinólisis más severos fueron ensayados (Fig. 10). Como es conocido, los glicolípidos micobacterianos con este tipo de comportamiento son aquellos que presentan enlaces tipo éster con acilos provenientes de ácidos micólicos,

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ftioceránicos, dicarboxílicos o micocerósicos (Daffé *et al.*, 1983), mientras que aquellos con menor impedimento estérico sobre el enlace éster, como en la TAT, son susceptibles a alcalinólisis convencionales (Fig. 10, carriles 1 y 2). Por otro lado, de esos glicolípidos con resistencia relativa al álcali, el monomicolato de trealosa (MMT) y el dimicolato de trealosa (DMT) presentan una coloración púrpura-grisácea al ser puestos en contacto con el reactivo de antrona (Muñoz *et al.*, 1997), característica mostrada por el lípido contaminante de la fracción. El MMT es conocido por coeluir con la DAT a partir de cromatografías de adsorción sobre fase normal (Muñoz *et al.*, 1997), fase utilizada en el presente estudio. Así el DMT parecía la estructura más probable para este lípido. El presente trabajo se enfocó entonces a la purificación del DMT o factor cuerda de *M. fortuitum* a partir de la fracción TAT-r, a fin de evaluar si es este producto el responsable de la actividad antigénica.

#### 5.4 Purificación del factor cuerda de *Mycobacterium fortuitum*.

Para la purificación del DMT, la fracción TAT-r fue sometida a tres pasos adicionales de purificación: una cromatografía en columna de gel de sílica empacada comercialmente (SepPack, Waters), un equilibrio de precipitación en acetona fría y, una cromatografía en capa fina preparativa. La primera cromatografía, que fue corrida con un gradiente de solventes más fino que la columna de florisil, tuvo como objeto la eliminación de contaminantes de diferente polaridad al factor cuerda que, aunque en mínimas cantidades, se encontraban presentes. De esta columna, el factor cuerda eluyó junto con el glicolípido triacil-trealosa, de polaridad semejante.

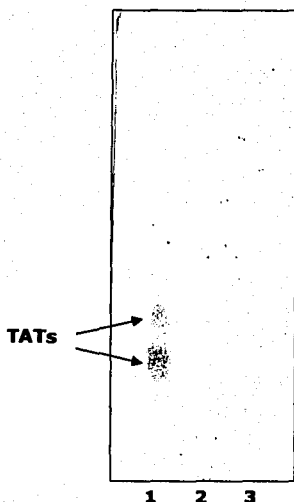


Fig. 10 Identificación del DMT como el principal lípido que coeluye con la TAT. CCF sobre gel de sílica de la fracción enriquecida en TAT intacta (carril 1), después un procedimiento de desacidificación alcalina suave (carril 2) y después de la saponificación con KOH 40% en metanol-benceno (carril 3). Eluyente: cloroformo-metanol (90:10 v/v). Detección: 0.2% antrona en  $H_2SO_4$  concentrado, seguida por calentamiento a  $110^\circ C$ . Las flechas indican un doble spot correspondiente a 2, 3,4- y 2, 3, 6-TAT.

Ya que el factor cuerda y la triacil-trealosa son glicolípidos con un mismo motivo sacarídico, la trealosa, pero con ácidos grasos de muy distinta solubilidad, un equilibrio de precipitación en un solvente medianamente polar fue utilizado para precipitar selectivamente el glicolípido más hidrofóbico, que es el factor cuerda. Posteriormente, el precipitado obtenido fue purificado por cromatografía sobre capa fina preparativa a fin de eliminar cualquier contaminante que pudiera haber arrastrado durante los pasos de purificación precedentes. De esta manera, se obtuvieron alrededor de 4 miligramos de factor cuerda puro, los cuales fueron mantenidos en

congelación bajo atmósfera inerte hasta ser utilizados posteriormente para los análisis de serodiagnóstico de tuberculosis.

En la Fig. 11 se muestra un análisis cromatográfico de factor cuerda purificado de *M. fortuitum* y de una preparación estándar de factor cuerda de *M. tuberculosis*. Ambos productos presentan una migración similar, así como la coloración característica púrpura-grisácea de este compuesto al ser detectado con antrona.

Para confirmar la identidad del producto purificado como factor cuerda, se realizó un análisis de los ácidos grasos que fueron liberados al saponificar. Si los ácidos grasos eran micólicos, su tipo puede ser identificado mediante CCF después de haberlos transformado en ésteres metílicos (Daffé *et al.*, 1983; Buitrón *et al.*, 1998). Como se muestra en la Fig. 12, los ácidos grasos provenientes del lípido purificado pertenecen a los tipos estructurales I y V, característicos de los micolatos de la especie *M. fortuitum* (Hinrikson & Pfyffer, 1994).

Así, el producto fue identificado como factor cuerda o dimicolato de trealosa con base en:

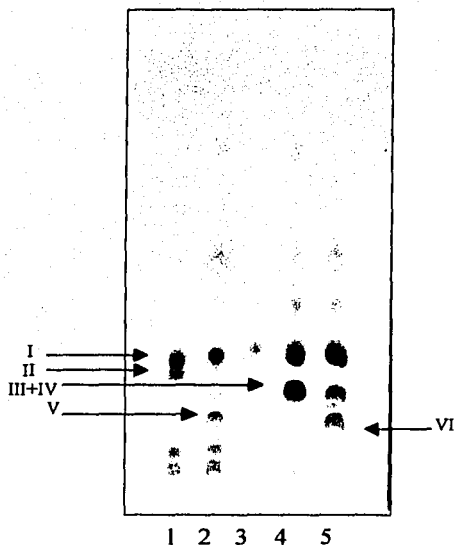
- ✓ Solubilidad
- ✓ Factor de referencia cromatográfico en distintos solventes (comparable con DMT de *M. tuberculosis*)
- ✓ La coloración púrpura-grisácea característica de este compuesto al ser detectado con antrona-ácido sulfúrico a 110° C y,
- ✓ La liberación de ácidos micólicos por hidrólisis alcalina fuerte del producto.



1 2

Fig. 11 CCF del DMT o factor cuerda purificado de *M. fortuitum* (carril 1) y factor cuerda de *M. tuberculosis* (carril 2). Eluyente: Cloroformo-metanol (90:10 v/v). Soporte: gel de sílica G60. Detección: antrona.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Fig. 12** La saponificación del producto contaminante en la fracción TAT-r liberó ácidos micólicos. Los ácidos micólicos liberados fueron O-metilados y analizados por CCF sobre gel de sílica. Ácidos micólicos de *M. chelonae*, tipos I y II (carril 1), *M. fortuitum*, tipos I y V (carril 2), *M. tuberculosis*, tipos I, III y IV (carril 4); *M. avium*, tipos I, IV y VI (carril 5); y fueron utilizados como estándares TAT-r libera ácidos micólicos de tipos I y V (carril 3). Eluyente: diclorometano. Revelado: ácidos fosfomolibdico al 10% en  $H_2SO_4$  a  $110^\circ C$ . Con números romanos se señalan los distintos tipos de micolatos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 5.5 Evaluación del factor cuerda de *Mycobacterium fortuitum* como reactivo de diagnóstico para tuberculosis.

Si bien el compuesto contaminante del TAT en la fracción TAT-r fue indiscutiblemente identificado como DMT, resultaba ahora interesante evaluar si este compuesto era el responsable de la alta reactividad antigénica en esa fracción.

Con el objetivo de investigar si el DMT de *M. fortuitum* reacciona con sueros de pacientes con tuberculosis y, en caso afirmativo, determinar las condiciones apropiadas para evaluaciones serológicas, se realizó un estudio serológico mediante ELISA con 30 sueros provenientes de pacientes con tuberculosis y 30 sueros de pacientes sanos. Se utilizaron tres valores de corte diferentes, equivalentes al promedio de lecturas con los individuos sanos adicionado de 2.0, 2.5 y 3.0 veces la desviación estándar correspondiente.

Los resultados de este estudio demostraron que el DMT de *M. fortuitum* reacciona con anticuerpos presentes en pacientes con tuberculosis proporcionando lecturas de densidad óptica significativamente superiores a las obtenidas con sueros de personas sanas (Fig. 13).

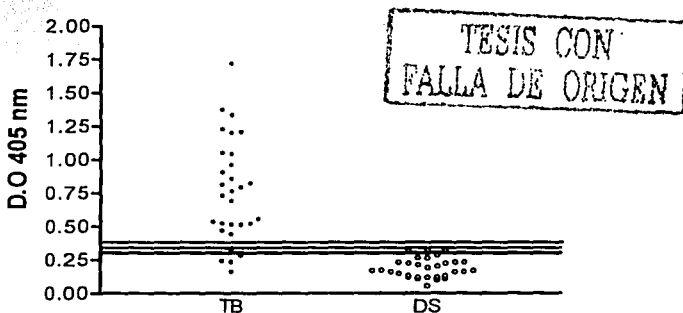


Fig. 13 Gráfica de la prueba de ELISA utilizando como antígeno el factor cuerda de *M. fortuitum* con 30 sueros de pacientes con tuberculosis (TB) y 30 sueros de donadores sanos (DS). Las líneas indican los tres diferentes valores de corte utilizados. Cada punto representa un individuo.

En la Tabla No. 4 se muestran los resultados obtenidos utilizando sueros diluidos 1:100. Los resultados obtenidos por ELISA con el antígeno DMT de *M. fortuitum* muestran que este lípido puede brindar una buena eficacia para el inmunodiagnóstico.

El ensayo proporcionó una especificidad de 96.6% al 100 % mientras que la sensibilidad varía de 83.3 % al 86.6%. Es importante mencionar que estos resultados son comparables con los mejores en cuanto a eficacia de diagnóstico para tuberculosis (ver Tabla No.2).

Tabla No. 4 Especificidades y sensibilidades obtenidas por la técnica de ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar con 30 sueros control y 30 sueros de pacientes con tuberculosis, usando el antígeno purificado DMT de *M. fortuitum*.

Valor de corte	Sensibilidad	Especificidad
$\bar{X}_{\text{controles}} + 2.0 \text{ Desv Std} = 0.3133$	86.6 %	96.6 %
$\bar{X}_{\text{controles}} + 2.5 \text{ Desv Std} = 0.3473$	83.3 %	100 %
$\bar{X}_{\text{controles}} + 3 \text{ Desv Std} = 0.3813$	83.3 %	100 %

Estos resultados demostraron que el glicolípido DMT de *M. fortuitum* reacciona de manera específica con sueros de individuos con tuberculosis. Nuestros resultados difieren con los reportados por Pan y colaboradores (1999), quienes encontraron que cambios estructurales en los ácidos micólicos del DMT impiden el reconocimiento de este lípido por los anticuerpos anti-DMT en individuos con tuberculosis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Es de notarse que entre los ácidos micólicos evaluados por estos autores no se incluyó al ácido micólico con funciones epóxido, presente en el DMT de *M. fortuitum*. El ácido micólico con función epóxido, comparte con el DMT de *M. tuberculosis* una función química oxigenada (ver Fig. 3 y 12). Probablemente sea debido a esta función oxigenada que el lípido de *M. fortuitum* sea reconocido por anticuerpos presentes en pacientes con tuberculosis.

*M. fortuitum*, especie de rápido crecimiento y de menor riesgo biológico que el bacilo tuberculoso, puede, por lo tanto, ser utilizada como fuente alterna de uno de los antígenos con mayor eficacia para el inmunodiagnóstico de la tuberculosis hasta ahora reportados, el DMT o factor cuerda. En efecto, el factor cuerda, cuando ha sido aislado de *M. tuberculosis*, ha sido reportado como uno de los antígenos que mayor eficacia han brindado en estudios serológicos para el diagnóstico de la tuberculosis. Su utilidad ha sido descrita inclusive para el diagnóstico de infecciones extrapulmonares (Sakai *et al.*, 2001).

Por otro lado, siendo el DMT un antígeno presentado por moléculas CD1 (Gumperz & Brenner, 2001), de naturaleza no polimórfica, los resultados obtenidos con esta molécula en diferentes laboratorios clínicos o de investigación muestran una consistencia que contrasta con aquellos obtenidos al utilizar antígenos de naturaleza proteica, en donde variaciones polimórficas entre genes HLA de distintas poblaciones han contribuido, probablemente, al encuentro de resultados completamente disímiles en cuanto a sensibilidad (Lyashchenko *et al.*, 1998; Bothamley *et al.*, 1989). Más aún, la naturaleza del DMT y el hecho de ser presentado por moléculas que actúan en las primeras etapas durante una infección (Gumperz & Brenner, 2001) sugiere una utilidad potencial de este antígeno para el diagnóstico temprano de la tuberculosis. Sería, por lo tanto de amplio interés la evaluación del DMT, así como de la fracción TAT-r de *M. fortuitum*, como antígenos para el rastreo precoz de la enfermedad en poblaciones con alto riesgo de contraerla, como es el caso de individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana, o de personas en contacto con individuos enfermos.

Como comentario final, es importante resaltar que tres de los antígenos más eficaces para inmunodiagnóstico de tuberculosis la DAT, la TAT y el DMT, pueden ser obtenidos a partir de la especie de rápido crecimiento *M. fortuitum*. Una fracción parcialmente purificada a partir de esta bacteria, es decir la fracción TAT-r, podría tener una alta utilidad para el diagnóstico. Esto abre la posibilidad de producir reactivos de inmunodiagnóstico de manera más simple, rápida, y segura que los obtenidos a partir del bacilo tuberculoso, favoreciendo así el uso de técnicas inmunológicas para el diagnóstico a gran escala.

## CONCLUSIONES

1. *M. fortuitum*, especie que sintetiza los antígenos Diacil trealosa y Triacil trealosa, contiene al menos un lípido adicional que es reconocido específicamente por sueros de individuos con tuberculosis.
2. El lípido antigénico de *M. fortuitum* con características de polaridad similar a la Triacil trealosa es el Dimicolato de trealosa.
3. El Dimicolato de trealosa aislado a partir de *M. fortuitum* funciona como un antígeno eficaz para serodiagnóstico de TB. El antígeno purificado Dimicolato de trealosa de *M. fortuitum* reacciona con los anticuerpos de sueros de personas con tuberculosis pulmonar en México con especificidades por arriba de 96% y sensibilidades que van desde 83.3% al 86.6%.
4. Aunque el Dimicolato de trealosa de *M. fortuitum* difiere estructuralmente del epítopo reconocido por anticuerpos humanos en el Dimicolato de trealosa de *M. tuberculosis*, este cambio no afecta el reconocimiento antigénico humoral.
5. *M. fortuitum* puede ser una fuente alterna de antígenos específicos para el diagnóstico de tuberculosis. Su uso permite evitar el alto riesgo biológico, así como los largos periodos de cultivo requeridos para la purificación de antígenos a partir de *M. tuberculosis*.
6. El método de purificación desarrollado para el Dimicolato de trealosa permitirá la fácil disponibilidad de este antígeno para su estudio a nivel inmunológico celular.

## LITERATURA CITADA

- ❖ Barry, C. E. III (2001) Interpreting cell wall virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 9:237-241.
- ❖ Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S.T., Brenner, M. B. (1994) Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted T cells. *Nature.* 372:691-694.
- ❖ Bloom, B. R. (1994) Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and control. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 637 pp.
- ❖ Bothamley, G. H., Beck, J. S., Schreuder, G. M., D'Amaro, J., de Vries, R. R., Kardjito, T., Ivanyi, J. (1989) Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *J Infect Dis.* 159:549-555.
- ❖ Brennan, P. J. (1988) *Mycobacterium* and other actinomycetes. En: Microbial Lipids. Eds. (Rallledge, C. and Wilkinson, S. G.) *Academic Press*, London. pp 251-278.
- ❖ Buitrón, G., González, A., López-Marín, L. M. (1998) Biodegradation of phenolic compounds by bacteria isolated from an acclimated activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 37:371-378.
- ❖ Burman, W. J., Stone, B. L., Reves, R. R., Wilson, M. L., Yang, Z., El-Hajj, H., Bates, J. H., and Cave, M. D. (1997) The incidence of false-positive cultures for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 155:321-326.
- ❖ Camacho, L. R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M. A., Triccas, J. A., Gicquel, B., Daffe, M., Guilhot, C. (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of

*Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem*. 276:19845-19854.

- ❖ Casabona, M., González, F., Papa, F., Roselló, J., Vidal, R., Grau, C. and Ruiz, C. (1992) Time course of anti-SLIV immunoglobulin G antibodies in patients with tuberculosis and tuberculosis-associated AIDS. *J Clin Microbiol*. 30:1089-1093.
- ❖ Chan, E. D., Heifets, L., Iseman, M. D. (2000) Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 80:131-140.
- ❖ Colangeli, R., Heijbel, A., Williams, A. M., Manca, C., Chan, J., Lyashchenko, K., Gennaro, M. L. (1998) Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 714:223-235.
- ❖ Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393:537-544.
- ❖ Collins, F. M. (1994) The immune response to mycobacterial infection: development of new vaccines. *Vet Microbiol*. 40:95-110.
- ❖ Cooper, A. M., Flynn, J. A. (1995) The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol*. 7:512-516.
- ❖ Cruaud, P., Yamashita, J., Casabona, N., Papa, F., David, H. (1990) Evaluation of a novel 2,3-diacil-trehalose-2-sulphate (SL-IV) antigen for case finding and diagnosis of leprosy and tuberculosis. *Res Microbiol*. 141:679-694.

- ❖ Daffé, M., Lanéele, M. A., Asselineau, C., Lévy-Frébault, V., David, H. (1983) Intérêt taxonomique des acides gras des mycobactéries : proposition d'une méthode d'analyse. *Ann Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134:241-256.
- ❖ Daniel, T. M., Debanne, S. M. (1987) The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis.* 135:1137-1151.
- ❖ Demangel, C., Britton, W. J. (2000) Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* 78:318-324.
- ❖ Edwards, D., Kirkpatrick, C. H. (1986) The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis.* 134:1062-1071.
- ❖ Ehlers, S. (1999) Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS. Immunol Med Microbiol.* 23:149-158.
- ❖ Escamilla, L., Mancilla, R., Glender, W., López-Marín, L. (1996) *Mycobacterium fortuitum* glycolipids for the serodiagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Crit Care Med.* 154:1864-1867.
- ❖ Espitia, C., Cervera, Y., Gonzalez, R., Mancilla, R. (1989) A 38kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol.* 77:373-377.
- ❖ Espitia Pinzón, C. (1991) Purificación de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* de 70, 50-55, 38, 30-31 y 16 kilodaltones. Análisis de sus propiedades antigénicas a nivel celular y humoral. Tesis Doctoral del Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México.



- ❖ Fauci, A. S. (1995) New science aimed at an ancient killer. *JAMA*. 274:786.
- ❖ Folch, J., Lees, M. B., Stanley, G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226:497-509.
- ❖ Glickman, M. S., Jacobs, W. R. Jr. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*. 104:477-485.
- ❖ Gumperz, J. E., Brenner, M. B. (2001) CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*. 13:471-478.
- ❖ Hahn, J., Kaufmann, S. H. E. (1981) Role of cell mediated immunity in bacterial infections. *Rev Infect Dis*. 3:1221-1250.
- ❖ He, H., Oka, S., Han, Y., Kusunose, M., Yano, T. (1991) Rapid serodiagnosis of human mycobacteriosis by ELISA using cord factor (trehalose-6,6-dimycolate) purified from *Mycobacterium tuberculosis* as antigen. *FEMS Microbiol Immunol*. 76:201-204.
- ❖ Hinrikson, H. P., Pfyffer, G. E. (1994) Mycobacterial mycolic acids. *Med Microbiol Lett*. 3:49-57.
- ❖ Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S. *et al.* (1993) Development of Th1, CD4+ T cell through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 260:547-549.
- ❖ Jung, Y. J., Course, R., Ryan, I., North, R. J. (2002) Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protectin afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. *Infect Immun*. 70:6439-6443.

- ❖ Lee, R. E., Brennan, P. J., Besra, G. S. (1996) *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. En: Tuberculosis. Current topics in microbiology and immunology (Shinnick, T. M.) 215, Springer-Verlag, Berlin. pp 1-28.
- ❖ Lyashchenko, K., Colangeli, R., Houde, M., Aljadhali, H., Menzies, D., Gennaro, M. L. (1998) Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun.* 66:3936-3940.
- ❖ Mackaness, G. B. (1969) The influence of immunologically committed lymphoid cell on macrophage activity in vitro. *J Exp Med.* 129:973-992.
- ❖ Matthews, R., Scoging, A., Ress, A. D. M. (1985) Mycobacterial antigen specific human T cell clones secreting macrophage activating factors. *Immunology.* 54:17-23.
- ❖ Besra, G. S. (2001) Glycolipid targets of CD1-mediated T-cell responses. *Immunology.* 104:243-251.
- ❖ Muñoz, M., Luquin, M., García-Barcelo, M., Julián, E., Auxina, V., Lanéelle, M. A., Daffé, M. (1997) Distribution of surface-exposed antigenic glycolipids in recent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol.* 148:405-412.
- ❖ Mustafa, A. S., Kvalheim, G., Degree, M., Godal, T. (1986) BCG induced human T-cell clones from BCG-vaccinated healthy subjects. Antigen specificity and lymphokine production. *Infect Immun.* 53:491-497.
- ❖ Noordhoek, G. T., Van Embden J. D. A., Kolk, A. H. J. (1993) Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 329:2036.
- ❖ Noordhoek, G. T., Van Embden, J. D. A., Kolk, A. H. J. (1996) Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international

collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol.* 34:2522-2525.

- ❖ Orme, I. (1995) *Inmunity to Mycobacteria*. Springer-Verlag R. G. Landes Company. U.S.A. pp. 3-70.
- ❖ Pan, J., Fujwara, N., Oka, S., Maekura, R., Ogura, T., Yano, I. (1999) Anti-cord factor (trehalose 6, 6-dimycolate) IgG antibody in tuberculosis patients recognizes mycolic acid subclasses. *Microbiol Immunol.* 43:863-869.
- ❖ Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999) *Microbiology*. 4ta edición. McGraw-Hill. Boston. 962 pp.
- ❖ Romagni, S. (1994) Th1 and Th2 subsets of CD4+ T lymphocytes. *Science and Medicine.* 1:68-77.
- ❖ Sada, E., Brennan, P., Herrera, T., Torres, M. (1990) Evaluation of lipoarabinomannan for the serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 28:2587-2590.
- ❖ Sada, E., Ferguson, L. E. Daniel, T. M. (1990) An ELISA for the serodiagnosis of tuberculosis using a 30,000-Da native antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 162:928-931.
- ❖ Sada, E. D., Aguilar, Torres, M., Herrera, T. (1992) Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 30:2415.
- ❖ Sakai, J., Matsuzawa, S., Usui, M., Yano, I. (2001) New diagnostic approach for ocular tuberculosis by ELISA using the cord factor as antigen. *Br J Ophthalmol.* 85:130-133.

- ❖ Schuleger, W., Rom, W. N. (1998) The host immune response to tuberculosis. *Amer J Respir Crit Care Med.* 57:679-691.
- ❖ Stenger, S., Modlin, R. L. (1999) T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol.* 2:89-93.
- ❖ Verschoor, J. A. Method for the isolation and purification of lipid cell-wall components United States Patent No. 6,171,830 January, 2001.
- ❖ Villalba, J., Valdespino, J. L., Anzaldo, G. *et al.* (1999) Tuberculosis. En: De la Fuente, J. R. & J. Sepúlveda. Diez problemas relevantes de salud pública en México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. pp 59-91.
- ❖ Warren, J. R., Bhattacharya, M., De Almeida, K. N., Trakas, K., Peterson, L. R. (2000) A minimum 5.0 ml of sputum improves the sensitivity of acid-fast smear for *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1559-1562.
- ❖ Young, L. S. (1993) Mycobacterial diseases and the compromised host. *Clin Infect Dis.* 17:5436-5441.
- ❖ Zhang, Y., Gately, M., Wang, E. *et al.* (1994a) Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J Clin Invest.* 93:1733-1739.
- ❖ Zhang, M., Gong, J., Iyer V. *et al.* (1994b) T cell cytokine response in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest.* 9:2435-2442.